



**HAL**  
open science

# Étude de la reconnaissance des *Escherichia coli* adhérents et invasifs (AIEC) associés à la maladie de Crohn par l'autophagie : identification des récepteurs autophagiques et des facteurs de virulence

Alison da Silva

► **To cite this version:**

Alison da Silva. Étude de la reconnaissance des *Escherichia coli* adhérents et invasifs (AIEC) associés à la maladie de Crohn par l'autophagie : identification des récepteurs autophagiques et des facteurs de virulence. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne, 2023. Français. NNT : 2023UCFA0117. tel-04543546

**HAL Id: tel-04543546**

**<https://theses.hal.science/tel-04543546>**

Submitted on 12 Apr 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.

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

**Thèse**

Présentée à l'Université Clermont Auvergne  
pour l'obtention du grade de **Docteur d'Université**  
(Décret du 05 juillet 1984)

Spécialité : Biologie-Santé

Soutenue le 15 décembre 2023

**Alison DA SILVA**



Étude de la reconnaissance des *Escherichia coli* adhérents et invasifs (AIEC)  
associés à la maladie de Crohn par l'autophagie : identification des récepteurs  
autophagiques et des facteurs de virulence



Rapporteurs

**Mme. ROLHION Nathalie** : Chargée de Recherche, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris

**M. FOLIGNÉ Benoît** : Professeur des Universités, Institut de Recherche Translationnelle sur  
l'Inflammation, Université de Lille, Lille

**M. GUITTAUT Michaël** : Professeur des Universités, Institut RIGHT, Université de Bourgogne-  
Franche-Comté, Besançon

Présidente

**Mme. COMBARET Lydie** : Directeur de Recherche, Unité de Nutrition Humaine, Centre INRAE,  
Université Clermont Auvergne, Saint-Genès-Champanelle

Directrice de thèse

**Mme. NGUYEN Hang** : Chargée de Recherche, Laboratoire Microbes, Intestin, Inflammation et  
Susceptibilité de l'Hôte, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

Co-directeur de thèse

**M. BARNICH Nicolas** : Professeur des Universités, Laboratoire Microbes, Intestin, Inflammation et  
Susceptibilité de l'Hôte, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

# Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier **Madame ROLHION Nathalie**, **Monsieur FOLIGNÉ Benoît** et **Monsieur GUITTAUT Michaël** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse, ainsi que d'avoir consacré du temps à la lecture, à l'analyse et à la critique de mon manuscrit. Je remercie également **Madame COMBARET Lydie** d'avoir accepté de participer à ce jury et d'examiner ce travail.*

*Je souhaite également remercier **Monsieur LAPAQUETTE Pierre**, **Monsieur BALESTRINO Damien** et **Monsieur BARREAU Frédéric** d'avoir accepté de faire partie de mes comités de suivi de thèse et d'avoir partagé votre expertise pour améliorer mon travail de thèse et apporté de nouvelles perspectives.*

## *À ma directrice et à mon co-directeur de thèse,*

*Nicolas, je te remercie de m'avoir offert l'opportunité de faire ma thèse dans ton laboratoire. De par tes fonctions je sais que tu es très occupé, mais tu as toujours fait en sorte d'avoir un peu de temps pour pouvoir assister à mes réunions, exposer ton point de vue sur les expériences et partager ton savoir avec moi. Même si j'étais principalement encadrée par Hang, je te remercie pour tes conseils et ta disponibilité. Enfin, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir emmenée à New York. C'était mon 1<sup>er</sup> et dernier congrès international en dehors de la France au cours de ma thèse, que je n'oublierai jamais. J'ai appris beaucoup de choses sur l'histoire du laboratoire, j'ai passé de très bons moments avec tous les gens du congrès et j'en ai pris plein les yeux pendant tout le séjour. Encore merci, j'ai eu une chance incroyable!*

*Hang, je souhaite sincèrement te remercier pour ton aide lors de la préparation du concours de l'ED. C'est grâce à ta disponibilité, tes conseils et à toutes les questions que tu as préparé que j'ai pu réussir ce concours, et en prime avec la 1<sup>ère</sup> place! Je te remercie pour tes conseils et tes corrections qui m'ont beaucoup aidé pour améliorer mon écriture et mes présentations orales. Grâce à toi, j'ai énormément appris au cours de ma thèse, autant en termes scientifiques que sur moi-même. Merci d'avoir pensé à moi et d'avoir fait ton fameux gâteau au chocolat dont tout le monde raffole au labo juste pour moi! Enfin, je te remercie également de m'avoir emmenée au CFATG à Besançon, au Cell Symposium à Paris et aux 25 ans des AIEC à New York! J'ai passé de très bons moments avec toi à tous ces congrès!*

## ***Aux membres du M2iSH,***

*Avant de dire un petit mot sur chacun d'entre vous, je souhaite vous remercier de façon globale pour votre accueil, vos rires, votre bienveillance, vos discussions et vos gâteaux! Je n'ai jamais été dans un labo qui ramenait autant de trucs à manger! J'ai eu beaucoup de chance d'être arrivée dans un labo qui m'a très bien accueilli. Mes débuts étaient difficiles car j'étais un peu timide, mais petit à petit j'ai noué des liens et maintenant, je m'entends bien avec vous tous. Je pense sincèrement que cette ambiance de travail va me manquer et je ne sais pas si je retrouverai une telle ambiance ailleurs, alors merci beaucoup pour tous ces moments passés avec vous. Merci pour votre soutien et votre aide en tout genre tout au long de mes trois ans de thèse.*

*Les filles, également connues sous le nom : « les gens du bureau », **Amandine, Hélène, Chloé, Margot, Héloïse et Charline** (notre nouvelle recrue), je tiens à vous remercier du fond du cœur pour tout ce que vous avez fait et pour ce que vous êtes. Tout aurait été différent sans vous à mes côtés pour affronter les hauts et les bas de la thèse, et vous le savez. Même si parfois mon moral était au plus bas, j'avais quand même envie de venir au labo car je savais que j'allais forcément passer une bonne journée avec vous. Merci pour votre aide, votre soutien sans faille, vos conseils, vos rires, vos blagues, votre gentillesse, votre bienveillance, vos histoires (et il y en a eu beaucoup en 3 ans), vos gâteaux (il y en a eu beaucoup trop en 3 ans) et tous nos moments passés ensemble : restau, pique-nique, bar, goûter, bal des pompiers « wé wé wé » (j'espère qu'on y retournera l'année prochaine!!!) <3. Ce sont des moments que je n'oublierais jamais et qui m'ont permis de souffler quand c'était nécessaire. Au cours de ma thèse, vous avez été à la fois les épaules sur lesquelles je pouvais pleurer et à la fois, c'est avec vous que j'ai passé les moments les plus drôles. Un immense merci pour vos cadeaux, en particulier la réalisation de ma propre bûche de Noël que j'ai adoré et que mes proches ont adoré manger! Vous êtes toutes des filles incroyables, gentilles, attentionnées et drôles que je n'aurais jamais pensé rencontrer en thèse. Restez vous-même, ne changez pas, vous êtes juste géniales. Vous savez que les mots ne suffiront pas, vous allez énormément me manquer!*

***Amandou**, ma petite Amandou, ma clubbeuse n°1, mon soutien moral, tu es celle que je viens voir en 1<sup>er</sup> tous les matins en arrivant au labo! Tu parais toute sage d'un point de vue extérieur, mais une fois qu'on te connaît, quelle tempête! Je ne me laisserai jamais de tes histoires à midi, qui sont en fait un peu comme une série télévisée, si tu loupes un midi, tu loupes un épisode! Plus sérieusement, merci pour ton rire communicatif, toutes tes blagues et tes phrases sorties de nulle part comme « je crois qu'il s'est pris une rousse » ou alors « ah mais le catch c'est des acteurs? », qui m'ont beaucoup fait rire! Merci pour ton soutien et merci pour les moments qu'on a partagé ensemble à l'Armoire à Cuillères, ou encore au sport au SUAPS ou à Lempdes avec **Éric** (je crois qu'il s'appelait comme ça), c'était bien drôle, même si c'était dur! Tu sais aussi bien que moi que tu as une place particulière dans mon cœur et que tu vas beaucoup me manquer. Je suis très heureuse de*



*t'avoir rencontré et d'avoir découvert une fille à la fois drôle, courageuse, sensible et remplie de joie de vivre et de folie ! Même si je pars bientôt, j'espère que tu continueras à me donner de tes nouvelles. Je t'envoie tout mon courage pour cette fin de thèse et plein de réussite ! J'espère que tu trouveras le post-doc de tes rêves et que tu t'épanouiras. Enfin, même si je suis allergique, je n'oublie pas Praline, parce que je l'aime quand même !*

***Hélène**, mon 1er date dans la capitale de l'amour, on a partagé beaucoup de choses ensemble, y compris notre lit (moments au cours desquels tu as eu l'immense privilège de rencontrer et de dormir avec ma meuh-meuh ! Je ne sais pas si tu t'en rends compte !). Tu es également ma binôme de galère, que ce soit de thèse ou de voiture (on se comprend). La probabilité qu'on crève le même jour, quelle blague.. Merci d'avoir supporté et ri à mes grimaces au bureau. Je continue quand même de croire que c'est toi qui a la plus belle vue de ta place ! Merci de m'avoir fait découvrir tendances et paillettes, j'ai adoré faire ma cloche en fleur séchée avec toi ! Merci aussi de m'avoir fait découvrir des spécialités géorgiennes comme le « khatchapouri » et le « tchourchkhela », ainsi que la bataille des œufs de pâques ! Pour ces remerciements, je suis sympa, je ne te chanterai pas la chanson des R\*\*\* M\*\*\*\* ! Je t'envoie tout mon courage pour cette dernière année. Je sais que ce n'est pas facile tous les jours, mais tu tiens le bon bout et je sais que tu finiras avec brillance !*

***Chloé**, ma chanteuse en toutes circonstances (surtout dans le labo), ma binôme de trajet, ton doux rire mélodieux ainsi que tes éternuements dignes d'un grand orchestre vont peut-être me manquer, mais pas l'histoire de la barrière.. J'ai des frissons dès que j'entends le mot « barrière » maintenant.. Pendant la loooooongue période de travaux, on était toujours en train de se dire « Tu passes par où toi ? » « Ah oui par Port Royal » « Mais c'est fermé ça, non ? C'est quelle rue ? » « Attends on va regarder sur Google maps », et c'est ainsi qu'on passait notre temps à chercher le chemin avec le moins de bouchons.. Même si on entend ton rire à l'autre bout de la planète, ne changes pas ! Je serais toujours admirative de ton énergie et de ton humour, j'ai vraiment passé de bons moments à rire ! Et puis le combo « réflexe vomitif » et « bruit du sopalin qui vole » était quand même très drôle ! En tous cas, je te souhaite bon courage pour tous tes ELISA, je compte sur toi pour casser les oreilles à Lucas et à Flo. Enfin, je terminerai par un seul mot « Argentina » !*

***Margot**, l'artiste de ce labo ! Tu remercieras ta mamie de nous avoir autant nourri, par contre je ne la remercie pas pour les kilos que j'ai pris pendant la thèse. Plus sérieusement, tu m'étonneras toujours de réussir à tout gérer, la danse, les spectacles, le dessin (ta BD est magnifique, je suis impressionnée), les manips, les réunions ! Merci de m'avoir invité à l'un de tes spectacles à l'Opéra de Clermont, c'était vraiment chouette ! Merci pour ta folie, ta douceur et ton écoute au quotidien. Je t'envoie plein de courage pour cette fin de thèse, je sais que tu vas y arriver ! PS : j'espère que pour ta soutenance tu connaîtras un peu mieux tes tables de multiplication que la dernière fois, quand tu nous as chanté ta fameuse chanson. . .*

***Héloïse**, ma binôme de rédaction de thèse... On sait à quel point ça a été dur mais on a réussi et on pourra fêter ça dignement ! À part ça, j'espère qu'un jour tu arrêteras de faire 1 000 choses en même temps et de dire*

« mais ça paaaaaasse tranquille » alors que non. Merci d'avoir organisé nos sorties laboratoire, ça m'a permis de passer des bons moments avec toutes les personnes du labo. Enfin, grâce à tes talents culinaires, j'aurais découvert qu'on peut remplacer de la courgette par du chocolat pour faire un gâteau au chocolat... ou pas... (je rigole bien sûr).

**Charline**, notre génération Z comme on t'a surnommé, merci pour ta bonne humeur, ton humour et ton aide en tout genre (surtout pour tout ce qui est informatique). Ta thèse ne fait que commencer mais tu connais déjà bien ton sujet et le labo, donc je ne me fais aucun souci pour toi ! Merci pour tous les moments qu'on a passé ensemble !

**Micha & Lucas**, mon duo préféré, merci pour vos blagues, votre bonne humeur quotidienne, votre aide et votre humour (comme « Flamenkuchvili » ou « Aliiii une chanson ! »). Vous m'embêtez mais je sais qu'au fond c'est gentil ! En revanche, je ne vous remercie pas de ne pas vous être portés volontaires pour baisser ce fichu store au Parc Animalier d'Auvergne.. Vous auriez pu avoir ma mort sur votre conscience... Merci pour les repas du midi à rire et essayer de faire des mots fléchés bien trop compliqués pour nous, où seul Google trouvait les réponses. **Lucas**, je compte sur toi pour entretenir ma belle fleur et ne pas la laisser faner. Je n'oublierai pas ce joli petit carton que tu m'as construit pour transporter mes géloses. D'ailleurs, j'ai l'honneur de t'annoncer que je te le lègue, je sais que tu en feras bon usage. Une fois partie, je ne pourrais plus inquiéter tout le monde à demander « il est où Lucas ? il est où Lucas ? » alors que tu avais tout simplement posé ta matinée et que Micha ne s'en souvenait pas... On avait failli appeler la police quand même ! Des bisous à Fanny et Maëlle, et je te souhaite plein de bonheur avec ta petite famille ! **Micha**, ou plutôt Super Myckaël, je ne te remercie pas pour nos discussions déprimantes sur mon avenir.. En revanche, je te remercie pour ton aide et tes précieux conseils quand j'étais en pleine galère avec mon Tn-Seq, tu étais le seul à pouvoir me débloquer, encore merci ! Merci aussi pour tes blagues sur les Portugais, alors que tu es toi-même Portugais ! Au moins, de temps en temps, tu étais le seul à savoir de quoi je parlais, surtout niveau bouffe ! Je souhaite sincèrement te remercier pour ton aide tout au long de ma thèse, que ce soit pour la bio mol, les cellules, les ELISA ou l'easyspiral (zizi ou zezette pour les intimes) ! Des bisous à Cécily et Théa, et je te souhaite plein de bonheur avec ta petite famille !

**Fred**, mon binôme de karma de merde, je continue quand même de penser que le tien est pire que le mien ! Finalement, on est revenu indemne de New York, et pourtant, c'était pas gagné ! Je te remercie énormément pour ta bonne humeur, tes conseils, ton rire, ta tendresse et ton oreille attentive. Tu m'as beaucoup aidé dans les moments difficiles et beaucoup fait rire. Merci pour tes blagues qui sont si mignonnes, ça va me manquer. Merci de m'avoir soutenue, aidé et surtout d'avoir cru en moi pour MT180. J'aurais bien aimé que tu te déguises en bactérie quand même, j'aurais peut-être gagné.. Concernant la journée de l'unité au Parc Animalier d'Auvergne, merci d'avoir négocié ma potentielle mort avec une bouteille de vin offerte (j'espère que tout le monde a apprécié ce vin !). Merci pour l'organisation de ces journées, qui sont des moments incroyablement

*drôles et qui permettent de mieux nous connaître ! J'espère que tu vas enfin arrêter de monopoliser la radio de mon labo avec Johnny et Sardou, et d'apprendre que les autres peuvent aussi écouter d'autres chansons !*

*Merci aux étudiantes du N3, **Flavie, Fanny, Leslie, Coline, Méline** et **Léa** (même si tu n'es pas du N3)! **Flavie**, également surnommée Squirrel, et **Fanny**, vous n'en êtes qu'à la moitié, et je sais que vous mènerez à bien votre thèse sans problème ! Merci pour les repas le midi à discuter de tout et de rien, et à rire ! J'ai pu vous découvrir un peu plus à New York et j'en suis ravie. J'ai passé un très bon séjour à vos côtés. **Leslie**, on n'a pas eu l'occasion de travailler ensemble, mais merci pour tes conseils sur l'itinéraire le plus rapide à prendre pour rentrer à la Pradelle. Merci pour tes blagues, dont une où je ne m'en remettrais jamais « vous allez devoir résoudre des contrepèteries » et toi qui répond « mais pourquoi elle parle de boîte de Pétri ? » (j'espère que tu sauras de quoi je parle). Bon courage pour la suite de ta thèse ! **Coline**, un membre de la team Hang. Je n'ai jamais réussi à avoir LC3 en Western Blot, donc bravo (je suis peut-être un peu jalouse, j'avoue) ! Merci pour tes histoires et ta spontanéité. Je te souhaite plein de courage pour la suite de ta thèse. **Méline**, ta thèse ne fait que commencer mais tu connais déjà bien ton sujet et le labo, donc je ne me fais aucun souci pour toi. **Léa**, tu ne fais pas partie des étudiantes du N3, mais je suis tout de même contente d'avoir fait ta connaissance et je te remercie pour ta bonne humeur et ton écoute. Merci pour les moments qu'on a passé ensemble.*

***Alex**, merci pour toutes tes histoires, parfois les unes plus tordues que les autres et merci pour tes expressions et ta façon de parler qui me font beaucoup rire. Merci pour tes compliments, pour ton travail sur les commandes et pour ton aide importante pendant les sacrifices (même si tu n'aimes pas ça). Je tiens à préciser que de mon côté, je ne t'ai sollicité qu'une fois ! Malgré tout ce que tu peux entendre, n'oublies pas que tu es une femme géniale et pleine d'énergie. Ne changes pas pour les autres. Des bisous à Alice et merci pour ta petite montre lors du Père Noël secret. **Sandra**, je tiens à te remercier pour ta bonne humeur constante et nos discussions à l'animalerie, même si souvent ce n'était pas à moi de venir t'aider. . . Je te souhaite plein de courage et de bonnes choses pour la suite, au travail et dans ta vie personnelle. **Vivi**, je crois que la seule image que je garderai de toi est celle d'une personne qui court partout pour être sur tous les fronts en même temps ! Merci pour ton organisation dans les cellules à l'azote et j'espère que mon tri aura libéré de la place pour les autres et surtout pour la team Hang. Des bisous à Zoé, la mini toi ! **Angéline** et **Hanh**, deux autres membres de la team Hang. Je vous remercie sincèrement pour vos conseils et pour votre aide. Je vous souhaite plein de belles choses pour le futur !*

***Guillaume**, merci pour tes conseils et de m'avoir fourni les plasmides avec NDP52 à mon arrivée en thèse. **Julien**, nous n'avons pas travaillé ensemble mais merci pour tes escape game, j'admire sincèrement ton imagination pour faire ça ! **Laurent**, merci pour tes blagues et tes expressions de « jeunes » sorties de nulle part comme « t'as pécho ? ». Je serais toujours admirative de savoir que tu viens à vélo depuis Gerzat tous les jours (même si c'est un peu de la triche parce que c'est un vélo électrique) ! J'espère qu'un jour tu arrêteras enfin de faire couler le café à côté de la machine à café. . . **Gwen** et **Florian**, on ne s'est pas beaucoup côtoyé,*

mais assez pour passer de bons moments ensemble et rire. Je vous souhaite plein de bonnes choses pour la suite. **Devon**, je te remercie pour tes conseils en tout genre, pour les WB et pour l'écriture de la thèse. J'admire ta détermination et ta passion pour ton sujet et j'espère que bientôt tu auras le concours et le poste que tu souhaites depuis tant d'années! **Aurélien**, merci pour tes analyses qui nous ont permis d'avancer un peu sur le Tn-Seq. **Pedro**, nous n'avons pas beaucoup travaillé ensemble, mais merci pour ton aide technique!

**Magalie**, merci pour ton incroyable efficacité! Aussitôt dit, aussitôt fait! Merci pour les commandes, les ordres de mission, les remboursements, les contrats, les fournitures et tout autre chose! Sans ton efficacité, on serait bien embêté pour manipuler. Enfin, je suis désolée qu'à cause de mon karma de merde, tu sois maintenant obligée de faire un ordre de mission pour les journées de l'unité! **Patricia & Séverine** (ou Sandrine), un énorme merci, sans votre travail, le labo ne pourrait pas tourner aussi bien! Merci pour votre disponibilité dès qu'on a besoin de quelque chose et merci pour votre aide. **Pat**, merci pour ton soutien et ton aide. On a appris à se connaître à travers mes bouteilles de milieu LB « c'est qui ADS? » « Bhe, c'est moi », comme si c'était évident pour tout le monde! Mais finalement, tu t'es habituée et c'est devenu ma petite signature! J'espère que je ne serais pas remplacée par une autre « ADS » (normalement non, car je suis unique)!

**Mathilde, Delphine, Anthony et Elisabeth**, merci pour vos conseils et votre aide. **Mathilde**, merci pour ton oreille attentive et tes conseils, aussi bien pour mes perspectives d'avenir que pour ma santé mentale! **Anthony**, merci de m'avoir rassurée pour mon 1<sup>er</sup> vol long-courrier! Je riais, mais finalement j'aurais peut-être dû faire comme toi pour éviter que mes pieds ne triplent de volume en arrivant à Clermont! **Elisabeth**, je te remercie tout particulièrement pour ton expertise en cytométrie en flux et les bons moments passés à New York! **Jérémy**, merci de m'avoir proposé de donner des cours à l'IUT. Même si au départ ce n'était pas très bien parti, je suis tout de même contente d'avoir pu les faire et d'avoir pu affronter ma peur et ma timidité devant les étudiants. J'espère que mes diapos pour le TP antibiotique seront bien utilisées! Un énorme merci pour ton aide pour l'analyse du Tn-Seq, même si tout cela reste encore flou dans nos têtes car l'analyse est quelque peu... compliquée. Enfin, il n'y a qu'à la dernière journée de l'unité que j'ai pu m'apercevoir de tes talents incroyables au blind test et pour mimer Nicki Minaj! On était arrivé 2<sup>ème</sup>, c'est pas si mal! **Lucie**, je te remercie pour tes encouragements et tes petits conseils pour les TP.

**Valérie**, merci de m'avoir donné l'opportunité de participer aux Nuées Ardentes, c'était une super expérience et j'en garde un très bon souvenir malgré les orages qui nous ont obligés à fuir! **Adeline** (également surnommée « Angéline » aux USA) et **Caroline**, merci pour votre disponibilité, votre gentillesse et votre aide. Finalement, il aura fallu attendre ma 3<sup>ème</sup> année de thèse pour que je puisse vous connaître un peu plus à New York. Je suis ravie d'avoir pu partager ce séjour avec vous, c'était incroyable!

Enfin, je voudrais souhaiter la bienvenue au laboratoire à **Charlotte, Cyril et Zoé**. J'espère que vous passerez d'aussi bons moments que ceux que j'ai pu passer (vous verrez, on y mange beaucoup trop)!

## ***Aux anciens du M2iSH,***

*Même si vous avez quitté le laboratoire, vous n'avez pas quitté mon cœur et c'est aussi grâce à vous que mes trois ans de thèse se sont bien passés. **Élia**, merci pour tes expressions un peu beaufs, je pouvais rire à chaque fois que tu en disais une! Je te souhaite plein de bonnes choses et plein de réussite pour tes futurs projets. Je suis ravie d'avoir fait ta connaissance et je suis contente d'avoir partagé plein de moments avec toi! **Maxime**, « on le surnomme Yvette », quel clown que tu es, souvent tu nous empêchais de travailler mais tu me faisais aussi beaucoup rire avec tes dessins farfelus comme « Bigflo et Coli », et tes imitations de voix. Un jour tu perceras sur Tik Tok (si ce n'est pas déjà fait)! **Ingrid**, ma crossfiteuse, je suis déçue qu'on ne soit jamais venus te voir à une compétition et je suis déçue aussi que travaillant si proche du M2iSH, tu ne passes pas plus souvent nous voir mais, je t'apprécie quand même beaucoup <3 Merci pour tous les moments passés ensemble. J'espère qu'on aura l'occasion de retourner ensemble à la crêperie 19 13! **Mélissa**, mon ancienne voisine de paillasse, un énorme merci pour ton aide, ta bienveillance, ta disponibilité, ta gentillesse et tes conseils tout au long de la thèse et pour tout ton soutien quand j'étais au plus bas... J'espère ne pas t'avoir trop embêtée avec toutes mes questions d'organisation. Je n'ai pleuré que deux fois pendant l'écriture, ça va! Je te souhaite plein de bonnes choses pour ton avenir et plein de réussite! **Élisa, Hannah et Mathilde**, merci pour votre bonne humeur au labo. Je vous souhaite plein de belles choses!*

## ***À mes proches,***

*Ma famille, **Maman, Papa, Tonton Carlos, Tonton Jorge, Mamie & Papi**, je tiens à vous remercier pour votre soutien et votre amour. **Tonton Jorge**, je sais que tu es très occupé avec ta grande famille et ton travail, mais tu as toujours été présent et je te remercie pour ton soutien. **Tonton Carlos**, ne sois pas déçu de ne pas m'avoir emmenée à New York en 1<sup>er</sup>, la vie en a décidé autrement et ça sera peut-être l'occasion pour nous de découvrir ensemble une autre ville des USA! Je te remercie d'être toujours disponible et d'être toujours présent à mes côtés pour me faire découvrir de nouvelles choses! Merci pour ton soutien en toutes circonstances, ta bienveillance et ton amour. Comme tu dis, je serais maintenant la plus diplômée de la famille! **Mamie**, merci pour ton amour inconditionnel et tes gâteaux! Même si tu ne comprends pas forcément sur quoi je travaille et ce que je fais exactement, peu importe, je sais que tu me soutiens et que tu me soutiendras toujours! Gros bisous mamie <3 Enfin, je souhaite plus particulièrement vous remercier, **Maman & Papa**, vous m'avez toujours soutenu peu importe mes choix, vous m'avez toujours aidé, encouragé et permis de faire ce qui me plaît. Aujourd'hui, c'est en partie grâce à vous je suis capable d'obtenir mon diplôme de doctorat. Vous avez toujours été là pour moi et vous savez à quel point je vous aime. Merci pour votre soutien, votre écoute et vos encouragements. Vous savez que j'aime faire les choses bien et que parfois c'est difficile à gérer, mais vous*

avez toujours été là. Je ne vous remercierai jamais assez. Je suis fière de vous, fière de ce que vous êtes et de tout ce que vous avez accompli au cours de votre vie. Tout simplement, je suis fière d'être votre fille.

Un grand merci aussi à ma belle-famille, **Gwen, Michel, Christine, Émilie, Anouk, Farès et Jojo** (même si tu passes plus de temps à nous embêter avec notre avenir qu'autre chose). Vous êtes une famille remplie d'humour et de joie de vivre, c'est très agréable de passer du temps avec vous ! Vous savez que mes trois ans de thèse n'ont pas toujours été simples, et je vous remercie pour votre soutien.

Un énorme merci à mes amies, **Rebecca, Camille, Laura et Anaïs**. Même si on ne se voit pas souvent (en partie à cause de la thèse), vous savez que vous pouvez compter sur moi en toutes circonstances et inversement. Vous avez une place particulière dans mon cœur et je tiens énormément à vous. Même si j'en ai peu, je suis fière d'avoir des amies comme vous et je ne vous échangerai pour rien au monde. Je tiens sincèrement à vous remercier pour votre soutien jusqu'à aujourd'hui. C'est aussi grâce à votre soutien, votre confiance en moi et notre amitié que j'en suis là aujourd'hui. Tout simplement, merci pour votre soutien, votre gentillesse et votre écoute <3 Vous êtes des amies en or et ne changez pas <3 **Rebecca**, nous nous sommes rencontrées à l'IUT, une rencontre en amphitheâtre le 1er jour de la rentrée, une rencontre que je n'oublierai jamais ! On s'est si bien entendu dès le début et on était inséparables ! J'adorais te voir arriver le matin et me dire à chaque fois « tu sais pas ce qui m'est arrivé ce matin ! », qu'est-ce que je riais ! Maintenant, avec la distance, c'est différent mais tu sais que je te porterai toujours dans mon cœur. Je tiens à te remercier pour tous les moments que j'ai passé avec toi à l'IUT et en dehors, et je suis contente que tu aies trouvé ta voie aujourd'hui. **Camille**, ma colocataire londonienne, quelle incroyable expérience ! J'ai eu beaucoup de chance d'être tombée dans la même chambre que toi (même si je ne peux pas en dire autant de notre 3<sup>ème</sup> colocataire). J'ai adoré passer tous ces moments avec toi et visiter cette ville avec toi ! Malgré la distance qui nous sépare, je pense souvent à toi et j'essaie de prendre de tes nouvelles dès que je peux. Dans tous les cas, tu sais très bien que je serais toujours présente pour toi. **Laura**, notre rencontre remonte déjà au lycée, tu te rends comptes ! On a vécu beaucoup de choses ensemble, en particulier l'obtention de notre bac et ma 1ère sortie en boîte de nuit au « Country » avec notre classe de Terminale (je ne sais pas si tu t'en souviens) ! Je suis heureuse pour toi, pour ton couple et je suis heureuse de voir que malgré la difficulté de ton métier, tu t'épanouis, tu étais faite pour ça. Je sais que ça n'a pas toujours été facile pour toi mais ne lâches rien, je serais toujours là pour te soutenir ! **Anaïs**, mon aînée de 8 petits jours (qu'est-ce que je l'aurais entendu cette phrase !), notre amitié dure maintenant depuis 15 ans et je sais qu'elle durera encore. Impossible de décrire tous les moments que l'on a passé ensemble ! Je t'ai vu grandir, tu m'as vu grandir, et pourtant nous sommes restées les mêmes et j'en suis très heureuse. J'ai vraiment de la chance d'avoir une amie comme toi, qui me soutien, qui m'aide et qui m'épaule chaque jour. Merci <3

**Ronan, Gwen et Kiki** (ou **Burni** pour les intimes), même si nous nous sommes rencontrés par un intermédiaire, je tiens quand même à vous remercier pour tous les moments que l'on a partagés, que ce soit au restaurant, au bar, au billard, au cinéma, autour d'une piscine, d'un match ou d'un jeu de société. Merci de

*m'avoir soutenu dans les moments difficiles de la thèse et aussi d'avoir cru en moi. Grâce à toi **Ronan**, j'ai découvert que j'aimais le magret de canard, que j'étais forte au bière pong, qu'on est un duo de choc au blind test et que je ne suis pas nulle à tous les jeux comme le prétend quelqu'un (sauf au Trivial Pursuit, je l'admets... sauf si la réponse est « Mike Tyson »...). **Burni**, comment dire... Tu nous énerves à gagner à tous les jeux, parfois tu restes encore une énigme à dire des choses qu'on ne comprend pas, mais on s'y fait et on t'aime quand même! **Gwen**, le mécano de la famille. Tu fais partie de ma belle-famille, mais je te vois aussi en tant qu'ami, c'est pourquoi je ne peux pas t'oublier dans les remerciements. Merci pour ton soutien, ta gentillesse, ta bienveillance et aussi pour ton aide lors de mes galères de voiture... Tu m'as sauvé plusieurs fois déjà! Merci de toujours faire en sorte de prendre de mes nouvelles et de penser à moi pour mes anniversaires, tu m'as beaucoup gâté. Grâce à ta participation et à celle de mes parents, on va pouvoir faire notre tour de montgolfière dont je rêve tant! Tout simplement, merci!*

*Comme on dit, le meilleur pour la fin. Tout le monde au labo te connaît en tant que « **Doudou** », je suis désolée... Entre toutes mes galères de voitures, nos deux déménagements et mes grosses journées avec des temps 10h ou 12h, ces trois années de thèse n'ont pas été faciles, mais tu as toujours été présent et tu m'as toujours soutenue. Je te remercie du fond du cœur en particulier d'avoir été à mes côtés pendant l'écriture de mon manuscrit de thèse ou pour toute l'aide que tu m'as apportée. C'est en partie grâce à toi que j'ai pu tenir jusqu'au bout de ma thèse et je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait. Tu rends mon quotidien meilleur, tu m'aides, tu me soutiens, tu me fais rire, tu prends soin de moi et tu m'aimes telle que je suis. Tu sais à quel point je t'aime et à quel point tout aurait été différent sans toi à mes côtés <3 Merci pour toutes tes attentions, ta tendresse, ta bienveillance, ta gentillesse, ton écoute (même si tu ne m'écoutes pas toujours), ton aide et ton amour, qui me porte chaque jour depuis bientôt 7 ans <3*

*Un immense merci à tous!*

# Table des matières

Liste des abréviations

Table des figures

Liste des tableaux

Résumé

Abstract

## Étude bibliographique

<b>I</b>	<b>Chapitre I : Maladie de Crohn</b>	<b>1</b>
I.1	Épithélium intestinal . . . . .	1
I.1.1	Structure de l'épithélium intestinal . . . . .	1
I.1.2	Fonction barrière de l'épithélium intestinal . . . . .	1
I.2	Maladie de Crohn . . . . .	3
I.2.1	Généralités sur la maladie de Crohn . . . . .	3
I.2.2	Épidémiologie de la maladie de Crohn . . . . .	3
I.3	Physiopathologie de la maladie de Crohn . . . . .	4
I.3.1	Augmentation de la perméabilité intestinale . . . . .	4
I.3.2	Dérégulation de la réponse immunitaire . . . . .	5
I.4	Étiologie de la maladie de Crohn . . . . .	6
I.4.1	Facteurs génétiques et épigénétiques . . . . .	6
I.4.1.1	Gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée . . . . .	7
I.4.1.1.1	Récepteurs « Toll-like » (TLR) . . . . .	7
I.4.1.1.2	Récepteurs « NOD-like » (NLR) . . . . .	7
I.4.1.2	Gènes impliqués dans l'autophagie . . . . .	10
I.4.1.3	Facteurs épigénétiques . . . . .	10
I.4.1.3.1	micro-ARN . . . . .	10
I.4.1.3.2	Méthylation de l'ADN . . . . .	11
I.4.1.3.3	Modification des histones . . . . .	11
I.4.2	Facteurs microbiens . . . . .	12
I.4.2.1	Généralités sur le microbiote intestinal . . . . .	12
I.4.2.2	Rôle du microbiote intestinal dans la MC . . . . .	13
I.4.2.3	Dysbiose chez les patients atteints de la maladie de Crohn . . . . .	13



I.4.2.3.1	Microbiote fongique . . . . .	14
I.4.2.3.2	Microbiote viral . . . . .	14
I.4.2.3.3	Microbiote bactérien . . . . .	15
I.4.3	Facteurs environnementaux . . . . .	18
I.4.3.1	Tabac . . . . .	19
I.4.3.2	Régime alimentaire . . . . .	19
I.4.3.2.1	Régime alimentaire occidental . . . . .	19
I.4.3.2.2	Additifs alimentaires . . . . .	21
I.4.3.3	Autres facteurs environnementaux . . . . .	22
I.4.3.3.1	Sédentarité . . . . .	22
I.4.3.3.2	Carence en vitamine D . . . . .	23
I.4.3.3.3	Autres facteurs environnementaux . . . . .	23
I.5	Diagnostic de la maladie de Crohn . . . . .	24
I.5.1	Symptômes et signes cliniques . . . . .	24
I.5.2	Examens endoscopiques et radiologiques . . . . .	24
I.5.3	Analyses histologiques . . . . .	24
I.5.4	Bio-marqueurs . . . . .	25
I.6	Prise en charge thérapeutique de la maladie de Crohn . . . . .	26
I.6.1	Arsenal thérapeutique disponible dans la maladie de Crohn . . . . .	26
I.6.2	Approches thérapeutiques ciblant les agents pathogènes . . . . .	27
I.6.2.1	Antibiotiques . . . . .	28
I.6.2.2	Probiotiques, prébiotiques, post-biotiques et symbiotiques . . . . .	28
I.6.2.3	Transplantation du microbiote fécal . . . . .	30
<b>II</b>	<b>Chapitre II : <i>Escherichia coli</i> adhérents et invasifs (AIEC) associés la maladie de Crohn</b>	<b>31</b>
II.1	Présentation du pathovar AIEC associé à la maladie de Crohn . . . . .	31
II.1.1	Définition . . . . .	31
II.1.2	Prévalence . . . . .	31
II.1.3	Identification des AIEC . . . . .	32
II.2	Caractéristiques des AIEC . . . . .	33
II.2.1	Traversée de la couche de mucus par les AIEC . . . . .	33
II.2.2	Adhésion des AIEC aux cellules épithéliales intestinales . . . . .	34
II.2.2.1	Interaction FimH-CEACAM6 . . . . .	34
II.2.2.2	Interaction ChiA-CHI3L1 . . . . .	34
II.2.2.3	Production de flagelles par les AIEC . . . . .	35
II.2.2.4	Interaction OmpA-Gp96 . . . . .	35
II.2.2.5	Interaction LPF-cellules M . . . . .	36
II.2.2.6	Formation de biofilms . . . . .	36
II.2.3	Invasion des cellules épithéliales intestinales par les AIEC . . . . .	37
II.2.4	Déstabilisation de la fonction barrière de l'épithélium par les AIEC . . . . .	38
II.2.5	Survie et réplication des AIEC dans les cellules immunitaires . . . . .	38
II.2.6	Induction de la production de cytokines pro-inflammatoires par les AIEC . . . . .	40

II.2.7	Impact des AIEC sur le microbiote intestinal . . . . .	40
II.2.8	Résistance des AIEC aux antibiotiques . . . . .	42
II.3	Facteurs de l'hôte régulant les capacités d'adhésion, d'invasion et de réplication intracellulaire des AIEC . . . . .	42
II.3.1	Influence de l'alimentation sur la capacité de colonisation des AIEC . . . . .	42
II.3.2	Protection des cellules épithéliales intestinales par l'hôte . . . . .	43
II.3.3	Autophagie, mécanisme de défense de l'hôte contre les infections . . . . .	43
II.4	Stratégies thérapeutiques ciblant les AIEC . . . . .	44
II.4.1	Inhibition de l'interaction entre les AIEC et l'épithélium intestinal . . . . .	44
II.4.1.1	Probiotiques . . . . .	44
II.4.1.2	Inhibition de l'adhésion des AIEC à l'aide de composés chimiques . . . . .	45
II.4.1.3	Autres stratégies . . . . .	45
II.4.2	Élimination des AIEC . . . . .	46
II.4.2.1	Antibiotiques . . . . .	46
II.4.2.2	Utilisation de colicines . . . . .	46
II.4.2.3	Thérapie par les bactériophages . . . . .	47
II.4.2.4	Prédation et compétition bactérienne . . . . .	47
II.4.2.4.1	Prédation bactérienne . . . . .	47
II.4.2.4.2	Conjugaison bactérienne et CRISPR . . . . .	48
II.4.3	Interventions nutritionnelles . . . . .	48
II.4.4	Activation de l'autophagie . . . . .	49
II.4.5	Vaccination . . . . .	49
II.4.5.1	Vaccination contre la flagelline . . . . .	49
II.4.5.2	Vaccination contre les sidérophores . . . . .	49

### **III Chapitre III : Autophagie . . . . . 51**

III.1	Généralités . . . . .	51
III.2	Mécanismes moléculaires de la macro-autophagie . . . . .	51
III.2.1	Initiation . . . . .	52
III.2.2	Élongation . . . . .	53
III.2.3	Maturation et dégradation du contenu par le lysosome . . . . .	53
III.3	Autophagie et réponse aux bactéries intracellulaires : la xénophagie . . . . .	54
III.3.1	Récepteurs de la xénophagie . . . . .	54
III.3.1.1	Optineurine . . . . .	55
III.3.1.1.1	L'OPTN dans la xénophagie bactérienne . . . . .	56
III.3.1.1.2	L'OPTN dans la formation et la maturation des autophagosomes . . . . .	56
III.3.1.1.3	L'OPTN dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B . . . . .	57
III.3.1.1.4	Lien entre l'OPTN et la maladie de Crohn . . . . .	58
III.3.1.2	NDP52 . . . . .	58
III.3.1.2.1	NDP52 dans la xénophagie bactérienne . . . . .	59
III.3.1.2.2	NDP52 dans la formation et la maturation des autophagosomes . . . . .	60

III.3.1.2.3	NDP52 dans la régulation de l'expression des gènes et de la structure de l'ADN . . . . .	61
III.3.1.2.4	NDP52 dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et lien avec la maladie de Crohn . . . . .	62
III.3.1.3	p62 . . . . .	62
III.3.1.3.1	p62 dans la xénophagie bactérienne . . . . .	63
III.3.1.3.2	p62 dans la formation des autophagosomes . . . . .	64
III.3.1.3.3	p62 dans la régulation de la voie de signalisation Keap1-Nrf2 . . . . .	64
III.3.1.3.4	p62 dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B . . . . .	65
III.3.1.4	TAX1BP1 . . . . .	65
III.3.1.4.1	TAX1BP1 dans la xénophagie bactérienne . . . . .	66
III.3.1.4.2	TAX1BP1 dans la maturation des autophagosomes . . . . .	66
III.3.1.4.3	TAX1BP1 dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B . . . . .	67
III.3.1.5	NBR1 . . . . .	67
III.3.1.5.1	NBR1 dans la xénophagie bactérienne . . . . .	68
III.3.2	Échappement des bactéries à la xénophagie . . . . .	68
III.3.2.1	Évitement de la reconnaissance par la machinerie autophagique . . . . .	68
III.3.2.2	Inhibition de l'induction de l'autophagie . . . . .	69
III.3.2.3	Dégradation des récepteurs de la xénophagie . . . . .	70
III.3.2.4	Utilisation de l'autophagosome comme niche de réplication . . . . .	70
III.3.2.5	Inhibition de la voie de l'inflammation de l'hôte . . . . .	71
III.3.2.6	Modulation des miARN de l'hôte contrôlant l'autophagie . . . . .	72
III.4	Autophagie et AIEC . . . . .	73
III.4.1	Activation de l'autophagie dans les cellules hôtes infectées par les AIEC . . . . .	73
III.4.2	Inhibition de l'autophagie dans les cellules hôtes infectées par les AIEC . . . . .	74
III.5	Autophagie et maladie de Crohn . . . . .	74
III.5.1	SNP dans les gènes impliqués dans l'autophagie . . . . .	75
III.5.1.1	<i>ATG16L1</i> . . . . .	75
III.5.1.2	<i>IRGM</i> . . . . .	76
III.5.1.3	<i>ULK1</i> . . . . .	77
III.5.1.4	<i>LRRK2</i> . . . . .	78
III.5.2	Régulation de l'homéostasie intestinale par l'autophagie . . . . .	78
III.5.2.1	Rôle de l'autophagie dans la fonction barrière de l'épithélium . . . . .	78
III.5.2.2	Rôle de l'autophagie dans la mort cellulaire . . . . .	78
III.5.2.3	Rôle de l'autophagie dans l'homéostasie des cellules de Paneth . . . . .	79
III.5.3	Influence de l'autophagie sur le microbiote intestinal . . . . .	80
III.5.4	Autophagie et stress du réticulum endoplasmique . . . . .	81
III.5.5	Autophagie et immunité innée . . . . .	82
III.5.6	Autophagie et immunité adaptative . . . . .	83
III.5.6.1	Autophagie et présentation antigénique . . . . .	83
III.5.6.2	Autophagie et activation des cellules T . . . . .	83
III.5.7	Xénophagie et maladie de Crohn . . . . .	84

III.6	Autophagie : vers de potentielles thérapies pour la maladie de Crohn . . . . .	86
III.6.1	Activation de l'autophagie par la rapamycine et ses analogues . . . . .	86
III.6.2	Activation spécifique de l'autophagie par des composés alimentaires ou végétaux . . . . .	86
III.6.3	Activation des récepteurs et régulateurs de l'autophagie . . . . .	87
III.6.4	Activation de l'autophagie pour moduler l'inflammasome . . . . .	88
III.6.5	Approche thérapeutique par une thérapie personnalisée . . . . .	89

## Travail expérimental

<b>IV</b>	<b>Travail expérimental</b>	<b>90</b>
IV.1	Contexte scientifique . . . . .	90
IV.2	Identification du ou des récepteur(s) autophagique(s) impliqué(s) dans la reconnaissance des bactéries AIEC associées à la MC par l'autophagie . . . . .	92
IV.3	Identification des facteurs de virulence nécessaires aux bactéries AIEC pour échapper à l'autophagie . . . . .	126

## Discussion & Conclusion

<b>V</b>	<b>Discussion &amp; Perspectives</b>	<b>154</b>
V.1	Identification du ou des récepteur(s) autophagique(s) impliqué(s) dans la reconnaissance des bactéries AIEC associées à la maladie de Crohn . . . . .	154
V.1.1	Étude du mécanisme d'adressage des bactéries AIEC vers les autophagosomes par les récepteurs autophagiques NDP52 et p62 . . . . .	154
V.1.1.1	Coopération entre les récepteurs autophagiques NDP52 et p62 dans la xénophagie . . . . .	154
V.1.1.2	Implication des ligases E3 et des ubiquitines dans la xénophagie . . . . .	156
V.1.1.2.1	Ligases E3 . . . . .	156
V.1.1.2.2	Ubiquitines . . . . .	159
V.2	Étude de l'impact du variant à risque <i>NDP52<sup>Val248Ala</sup></i> sur la réponse de l'hôte lors d'une infection par les AIEC . . . . .	160
V.2.1	Impact du variant à risque <i>NDP52<sup>Val248Ala</sup></i> sur le contrôle de la réplication intracellulaire des AIEC . . . . .	160
V.2.2	Impact du variant de risque <i>NDP52<sup>Val248Ala</sup></i> sur le contrôle de la réponse inflammatoire induite par les AIEC . . . . .	162
V.3	Identification des facteurs de virulence nécessaires aux AIEC pour échapper à l'autophagie par la technique Tn-Seq . . . . .	163

<b>VI</b>	<b>Conclusion générale</b>	<b>167</b>
-----------	----------------------------	------------

## Bibliographie

<b>Bibliographie</b>	<b>168</b>
----------------------	------------

## Annexe

# Liste des abréviations

<b>ABIN</b> : A20-binding inhibitor of NF- $\kappa$ B	<b>GPR65</b> : G protein-coupled receptor 65
<b>AGCC</b> : acide gras à chaîne courte	<b>GWAS</b> : genome wide association study
<b>AIEC</b> : adherent-invasive <i>Escherichia coli</i>	<b>HDAC</b> : histone désacétylase
<b>AMPK</b> : AMP-activated protein kinase	<b>HF/HS</b> : high fat/high sugar
<b>ATF4</b> : activating transcription factor 4	<b>HOIL-1L</b> : heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase 1L
<b>ATG</b> : autophagy-related gene	<b>HOIP</b> : HOIL-1 interacting protein
<b>ATG16L1</b> : autophagy-related gene 16 like 1	<b>HSP</b> : heat shock protein
<b>CARD9</b> : caspase recruitment domain 9	<b>IFN-<math>\gamma</math></b> : interféron- $\gamma$
<b>CB2R</b> : cannabinoid receptor 2	<b>Ig</b> : immunoglobuline
<b>CC</b> : coiled-coil	<b>IKK</b> : inhibitor of $\kappa$ B kinase
<b>CEABAC10</b> : carcinoembryonic antigen bacterial artificial chromosome 10	<b>IL</b> : interleukine
<b>CEACAM6</b> : carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6	<b>IRE1<math>\alpha</math></b> : inositol requiring enzyme 1 $\alpha$
<b>CEI</b> : cellule épithéliale intestinale	<b>IRGM</b> : immunity-related GTPase family M
<b>CHI3L1</b> : chitinase 3-like-1	<b>JAK</b> : janus kinase
<b>cLIR</b> : non-canonical LC3-interacting region	<b>Keap1</b> : kelch-like ECH-associated protein 1
<b>CMC</b> : carobymethylcellulose	<b>KIR</b> : Keap1-interacting region
<b>CMH-II</b> : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II	<b>LAMP1</b> : lysosome-associated membrane glycoprotein 1
<b>CRISPR-Cas9</b> : clustered regularly interspaced short palindromic repeat	<b>LC3</b> : light chain 3
<b>CRP</b> : C-reactive protein	<b>LCV</b> : <i>Legionella pneumophila</i> -containing vacuole
<b>DSS</b> : dextran sulfate sodium	<b>LF82</b> : Lille-France 82
<b>EIF2AK4</b> : eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ kinase 4	<b>LIR</b> : LC3-interacting region
<b>FIP200</b> : focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa	<b>LPF</b> : long polar fimbriae
<b>FIR</b> : FIP200-interacting region	<b>LPS</b> : lipopolysaccharide
<b>GABARAP</b> : gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein	<b>LRRK2</b> : leucine-rich repeat kinase 2
<b>GALBI</b> : galectine-8-binding region	<b>LUBAC</b> : linear ubiquitin assembly complex
<b>GAS</b> : group A Streptococcus	<b>MAP</b> : <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
<b>gipA</b> : growth in peyer's patches	<b>MAP1LC3/LC3</b> : microtubule-associated protein 1-light chain 3/light chain 3
<b>GP2</b> : glycoprotéine 2	<b>MAPK</b> : mitogen-activated protein kinase
	<b>MC</b> : maladie de Crohn
	<b>MDP</b> : muramyl dipeptide

**MEKK3** : mitogen-activated protein kinase kinase 3

**MICI** : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

**MMP-9** : matrix metalloprotease-9

**mTOR** : mechanistic target of rapamycin

**MYD88** : myeloid differentiation primary response 88

**MYO6** : myosine 6

**NBR1** : neighbor of BRCA1 gene protein 1

**NDP52** : nuclear dot protein 52 (ou CALCO-CO2 : calcium binding and coiled-coil domain 2)

**NEL** : novel E3 ligase

**NEMO** : NF- $\kappa$ B essential modulator ou IKK $\gamma$

**NF- $\kappa$ B** : nuclear factor- $\kappa$ B

**NLR** : NOD-like receptor

**NLRC4** : NLR family CARD4

**NLRP3** : NOD-like receptor family pyrin domain containing 3

**NOD2** : nucleotide oligomerization domain 2

**Nrf2** : nuclear erythroid-related factor 2

**OMP** : outer membrane protein

**OmpA** : outer membrane protein A

**OmpB** : outer membrane protein B

**OMV** : outer membrane vesicle

**OPTN** : optineurine (optic neuropathy inducing)

**p62/SQSTM1** : sequestosome 1

**P80** : polysorbate 80

**PAMP** : pathogen-associated molecular pattern

**pANCA** : perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody

**PB1** : Phox et Bem1 domain

**PBMC** : peripheral blood mononuclear cell

**PE** : phosphatidyléthanolamine

**PI3K III** : phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3

**PI3P** : phosphatidylinositol-3-phosphate

**poly (I:C)** : polyinosinic-polycytidylic acid

**PRR** : pattern recognition receptor

**PTPN2** : protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2

**PTPN22** : protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22

**RCH** : rectocolite hémorragique

**RE** : réticulum endoplasmique

**Reg3 $\alpha/\beta/\gamma$**  : regenerating islet-derived protein 3  $\alpha/\beta/\gamma$

**RIPK1** : receptor-interacting protein kinase 1

**RNAPII** : RNA polymerase II

**SCV** : *Salmonella*-containing vacuole

**SKICH** : skeletal muscle and kidney enriched inositol phosphatase carboxyl homology domain

**SNP** : single nucleotide polymorphism

**TSS** : type secretion system

**TAX1BP1** : tax1 binding protein 1 (ou T6BP : Traf6-binding protein ou CALCOCO3 : calcium binding and coiled-coil domain 3)

**TB** : TRAF6-binding domain

**TBK1** : TANK-binding kinase 1

**Th** : lymphocyte T helper

**TIS** : transposon-insertion sequencing

**TLR** : toll-like receptor

**TMF** : transplantation du microbiote fécal

**TNF- $\alpha$**  : tumor necrosis factor- $\alpha$

**Tn-Seq** : transposon sequencing

**TRAF6** : TNF receptor-associated factor 6

**Treg** : lymphocyte T régulateur

**TRIM** : tripartite motif

**UBA** : ubiquitin-associated domain

**UBAN** : ubiquitin-binding ABIN and NEMO domain

**ULK** : unc-51 like autophagy activating kinase

**ULK1** : unc-51 like autophagy activating kinase 1

**UVRAG** : UV radiation resistance-associated gene protein

**VDR** : vitamin D receptor

**VMP** : vacuole membrane protein

**VPS** : vacuolar protein sorting

**WIPI** : WD repeat protein interacting with phosphoinositides

**XPB1** : X-box binding protein 1

**ZF** : zing finger domain

**ZO** : zonula occluden

**ZZ** : ZZ-type zinc finger domain

# Table des figures

- Figure 1** : Représentation schématique du tractus gastro-intestinal.
- Figure 2** : Anatomie de la muqueuse intestinale.
- Figure 3** : Structure de la couche de mucus dans l'intestin grêle et le côlon. .
- Figure 4** : Lésions endoscopiques de la maladie de Crohn.
- Figure 5** : Incidence et prévalence de la maladie de Crohn dans le monde entre 1990 et 2016.
- Figure 6** : Évolution de l'incidence des MICI dans le monde au cours du temps.
- Figure 7** : Système immunitaire de la muqueuse intestinale dans la maladie de Crohn.
- Figure 8** : Étiologie multifactorielle de la maladie de Crohn.
- Figure 9** : Prédispositions génétiques dans l'étiologie des MICI.
- Figure 10** : Activation des récepteurs « Toll-like » et réponse immunitaire innée.
- Figure 11** : Voies de signalisation induites par l'activation des récepteurs « NOD-like ».
- Figure 12** : Rôle de NOD2 dans l'homéostasie intestinale et dans le contexte de la maladie de Crohn.
- Figure 13** : Distribution du microbiote bactérien le long du tractus digestif chez l'Homme.
- Figure 14** : Signature bactérienne de la maladie de Crohn basée sur 8 genres bactériens.
- Figure 15** : Résumé des facteurs environnementaux impliqués dans les MICI.
- Figure 16** : Impact des émulsifiants alimentaires sur la localisation du microbiote intestinal.
- Figure 17** : Localisation et phénotype de la maladie de Crohn selon la classification de Montréal.
- Figure 18** : Examens endoscopiques et radiologiques utilisés pour le diagnostic de la maladie de Crohn.
- Figure 19** : Stratégies thérapeutiques utilisées dans la maladie de Crohn.
- Figure 20** : Stratégies thérapeutiques « Step-up » et « Top-down » utilisées dans la maladie de Crohn.
- Figure 21** : Protocole d'identification des patients porteurs d'AIEC à partir des biopsies.
- Figure 22** : Mécanismes de virulence et de colonisation des AIEC dans l'intestin.
- Figure 23** : Production de flagelle et de pili de type I par la souche AIEC LF82 sauvage.
- Figure 24** : Évolution et adaptation des AIEC à l'hôte avec la sélection d'un profil hypermotile.
- Figure 25** : Vésicules de membrane externe (OMV) observées par microscopie électronique à transmission.

**Figure 26** : Cellules épithéliales Hep-2 infectées par la souche AIEC LF82 observées par microscopie électronique à transmission.

**Figure 27** : Altération de la fonction barrière de l'épithélium intestinal par la souche AIEC LF82.

**Figure 28** : Expression de claudine-2 et de CEACAM6 dans les biopsies iléales de patients atteints de la maladie de Crohn.

**Figure 29** : Macrophages J774-A1 et THP1 infectés par la souche AIEC LF82.

**Figure 30** : Impact d'un régime alimentaire de type occidental sur le microbiote fécal de souris CEABAC10 ou sauvages.

**Figure 31** : Stratégies de prévention de la colonisation par les AIEC chez les patients atteints de la maladie de Crohn.

**Figure 32** : Stratégies visant à éliminer les AIEC chez les patients atteints de la maladie de Crohn.

**Figure 33** : Trois types d'autophagie dans les cellules mammifères.

**Figure 34** : Initiation de la formation des autophagosomes.

**Figure 35** : Le processus de la macro-autophagie.

**Figure 36** : Autophagie non sélective et autophagie sélective.

**Figure 37** : Recrutement des récepteurs de l'autophagie sélective pendant la xénophagie.

**Figure 38** : Structure des récepteurs de l'autophagie sélective.

**Figure 39** : Rôle du récepteur NDP52 dans l'élimination de *Salmonella* Typhimurium par la xénophagie.

**Figure 40** : Recrutement de NDP52 au niveau des bactéries intracellulaires ubiquitinées par Rab35 au cours de la xénophagie.

**Figure 41** : Rôle de NDP52 dans la régulation de l'expression des gènes.

**Figure 42** : Activation de la voie Keap1-Nrf2 par p62 pendant la xénophagie.

**Figure 43** : Évitement de la reconnaissance de *Listeria monocytogenes* par l'autophagie.

**Figure 44** : Évitement de la reconnaissance de *Shigella flexneri* par l'autophagie.

**Figure 45** : Contournement de la machinerie autophagique par *Salmonella* Typhimurium pour éviter sa dégradation par l'autophagie.

**Figure 46** : Clivage de la forme LC3-PE associée aux phagophores par *Legionella pneumophila* pour éviter sa dégradation par l'autophagie.

**Figure 47** : Clivage de la protéine C3 du complément par *Shigella flexneri* et *Salmonella* Typhimurium pour éviter leur dégradation par l'autophagie.

**Figure 48** : Modulation des miARN de l'hôte contrôlant la machinerie autophagique par les bactéries.

**Figure 49** : Impact du variant *ATG16L1*<sup>T300A</sup> sur l'autophagie et la présentation antigénique dans les cellules de Paneth, les cellules dendritiques et les macrophages.



**Figure 50** : Impact du variant à risque *NOD2*<sup>L1007fsinsC</sup> dans la clairance des bactéries intracellulaires médiée par la xénophagie et dans la présentation antigénique.

**Figure 51** : Genres et protéines spécifiques des récepteurs autophagiques p62 et NDP52 et de la protéine LC3 de l'autophagie.

**Figure 52** : Implication de LRSAM1 dans l'ubiquitination des bactéries AIEC.

**Figure 53** : Position du SNP *NDP52*<sup>Val248Ala</sup> associé à la MC sur le récepteur autophagique NDP52.

**Figure 54** : La présence du SNP *NDP52*<sup>Val248Ala</sup> augmente la proportion de patients atteints de la MC présentant un nombre de bactéries AIEC intra-macrophagiques plus élevé.

**Figure 55** : Rôle du variant à risque *NDP52*<sup>Val248Ala</sup> sur la stabilité des protéines.

**Figure 56** : Interactions entre l'autophagie et les pathogènes

**Figure 57** : Purification des autophagosomes par la technique APEX2.

**Figure 58** : Schéma bilan de mon travail de thèse.

# Liste des tableaux

**Tableau 1** : Principaux changements du microbiote bactérien associés à la maladie de Crohn.

**Tableau 2** : Rôles des récepteurs autophagiques dans l'autophagie sélective, l'autophagie non sélective et la régulation de différentes voies de signalisation.

**Tableau 3** : Pathogènes ciblés par NDP52 au cours de la xénophagie.

**Tableau 4** : Pathogènes ciblés par p62 au cours de la xénophagie.

**Tableau 5** : Protéines effectrices sécrétées par les bactéries pour détourner ou échapper à la machinerie autophagique de l'hôte.

**Tableau 6** : SNP des gènes impliqués dans l'autophagie retrouvés dans la maladie de Crohn.

**Tableau 7** : Principales molécules ou cibles thérapeutiques utilisées pour activer l'autophagie dans le traitement des MICI.

**Tableau 8** : Facteurs de virulence décrits chez les AIEC impliqués dans la survie en macrophages.

# Résumé

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin, dont l'étiologie est multifactorielle. Elle résulte de l'interaction complexe entre des prédispositions génétiques, des facteurs environnementaux et des altérations de la composition du microbiote intestinal, induisant une dérégulation du système immunitaire intestinal. À ce jour, la MC est incurable, seuls des traitements visant à soulager les symptômes et à prévenir les récives et complications sont disponibles. Chez les patients atteints de la MC, une augmentation de la prévalence de souches particulières d'*Escherichia coli*, appelées les AIEC (adherent-invasive *E. coli*), a été rapportée. Les AIEC sont des pathobiontes capables d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales ainsi que de se répliquer en macrophages sans induire la mort cellulaire, entraînant une réponse immunitaire dérégulée. Par ailleurs, des études ont montré que plusieurs polymorphismes dans les gènes de l'autophagie (*ATG16L1*, *IRGM*, *ULK1*, etc.) sont associés à un risque augmenté de développer la MC. L'autophagie est un processus essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire permettant la dégradation et le recyclage de composants cytoplasmiques et de pathogènes *via* le lysosome. Toutefois, certains pathogènes intracellulaires développent diverses stratégies pour échapper à la dégradation par l'autophagie. Dans ce contexte, l'objectif de mes travaux de thèse était d'identifier les récepteurs autophagiques responsables de la reconnaissance des AIEC, ainsi que les gènes nécessaires aux AIEC pour échapper à l'autophagie.

Le 1<sup>er</sup> axe de mes travaux de thèse a montré que la déficience de p62 ou NDP52 dans les cellules HeLa entraîne une augmentation de la réplication intracellulaire de la souche de référence AIEC LF82 et de la production de cytokines pro-inflammatoires. L'analyse par microscopie confocale a révélé la colocalisation de p62 ou NDP52 avec la bactérie AIEC LF82 et la protéine LC3, un marqueur de l'autophagie. Ainsi, nos résultats suggèrent que p62 et NDP52 agiraient comme des récepteurs autophagiques pour contrôler la réplication intracellulaire des AIEC. De plus, nous avons étudié l'impact d'un polymorphisme du gène *NDP52* associé à une susceptibilité augmentée de développer la MC, appelé *NDP52<sup>Val248Ala</sup>*, sur le contrôle des AIEC. Aucune différence n'a été observée dans le nombre de bactéries AIEC LF82 intracellulaires entre les cellules HeLa exprimant le variant à risque *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* et celles exprimant l'allèle sauvage, suggérant un autre rôle de ce variant, probablement dans le contrôle de l'inflammation.

Le 2<sup>ème</sup> axe de mes travaux de thèse s'est concentré sur l'identification de gènes nécessaires aux AIEC pour échapper au contrôle par l'autophagie en utilisant la technique Transposon Sequencing (Tn-Seq). Brièvement, une banque de mutants de la souche AIEC LF82 a été créée de manière « saturée », c'est-à-dire que chacun des gènes du génome bactérien a été interrompu par au moins un transposon, conduisant à son invalidation. Cette banque de mutants a été utilisée pour infecter des cellules HeLa contrôles et déficientes pour l'autophagie. À 24h post-infection, l'ADN des mutants a été extrait et les sites d'insertion du transposon déterminés par séquençage ont permis d'identifier 68 gènes différenciellement représentés entre nos deux conditions. Les gènes sur-représentés dans les cellules HeLa déficientes pour l'autophagie par rapport aux cellules contrôles, sont les gènes potentiellement nécessaires aux AIEC pour échapper à l'autophagie. Ainsi, cette étude permettrait d'identifier de nouvelles cibles pour limiter la virulence des AIEC.

En conclusion, ces travaux contribuent à la compréhension des divers aspects de l'interaction entre les cellules hôtes et les bactéries AIEC associées à la MC et permettront, à l'avenir, de mieux caractériser la pathogenèse de cette maladie.

**Mots clés :** Maladie de Crohn, adherent-invasive *E. coli*, autophagie, récepteurs autophagiques, Tn-Seq.

# Abstract

Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory bowel disease, of which the etiology is multifactorial. It results from the complex interaction between genetic predispositions, environmental factors and alterations in the intestinal microbiota composition, inducing a deregulation of the intestinal immune system. To date, CD is incurable, only treatments aimed at alleviating symptoms and preventing recurrences and complications are available. In CD patients, an increase in the prevalence of particular strains of *Escherichia coli*, called AIEC (adherent-invasive *E. coli*) strains, has been reported. AIEC are the pathobionts able to adhere to and to invade intestinal epithelial cells as well as replicate inside macrophages without inducing cell death, leading to a dys-regulated immune response. Furthermore, it has been shown that several polymorphisms in autophagy-related genes (*ATG16L1*, *IRGM*, *ULK1*, etc.) are associated with an increased risk to develop CD. Autophagy is an essential process for maintaining cellular homeostasis, which allows the degradation and recycling of cytoplasmic components and pathogens *via* the lysosome. However, some intracellular pathogens develop various strategies to escape autophagy degradation. In this context, the aim of my thesis was to identify the autophagic receptors responsible for AIEC recognition, as well as the genes necessary for AIEC to escape autophagy.

The first part of my thesis showed that the depletion of p62 or NDP52 in HeLa cells leads to an increase in the intracellular replication of the AIEC LF82 reference strain and the production of pro-inflammatory cytokines. Confocal microscopy analysis revealed the colocalization of p62 or NDP52 with AIEC LF82 bacteria and LC3 protein, a marker of autophagy. Thus, our results suggest that p62 and NDP52 could act as autophagic receptors to control AIEC intracellular replication. Additionally, we investigated the impact of a polymorphism in the NDP52 gene associated with increased susceptibility to develop CD, called *NDP52<sup>Val248Ala</sup>*, on the control of AIEC. No difference was observed in the AIEC LF82 intracellular number between HeLa cells expressing the *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* risk variant and those expressing the wild-type allele, suggesting another role for this variant, probably in the control of inflammation.

The second part of my thesis focused on the identification of the genes necessary for AIEC to escape from autophagy control by the Transposon Sequencing (Tn-Seq) technique. Briefly, a mutant library of the AIEC LF82 strain was created in a "saturated" manner, meaning that each gene of the bacterial genome was inserted by at least one transposon, leading to its invalidation. This mutant library was used to infect control and autophagy-deficient HeLa cells. At 24 hours post-infection, the mutants DNA was extracted and transposon insertion sites determined by sequencing allowed the identification of 68 genes differentially represented between our two conditions. The genes over-represented in autophagy-deficient HeLa cells compared to control cells, are potential genes necessary for AIEC to escape from autophagy control. Thus, this study could allow the identification of new targets to limit the virulence of AIEC.

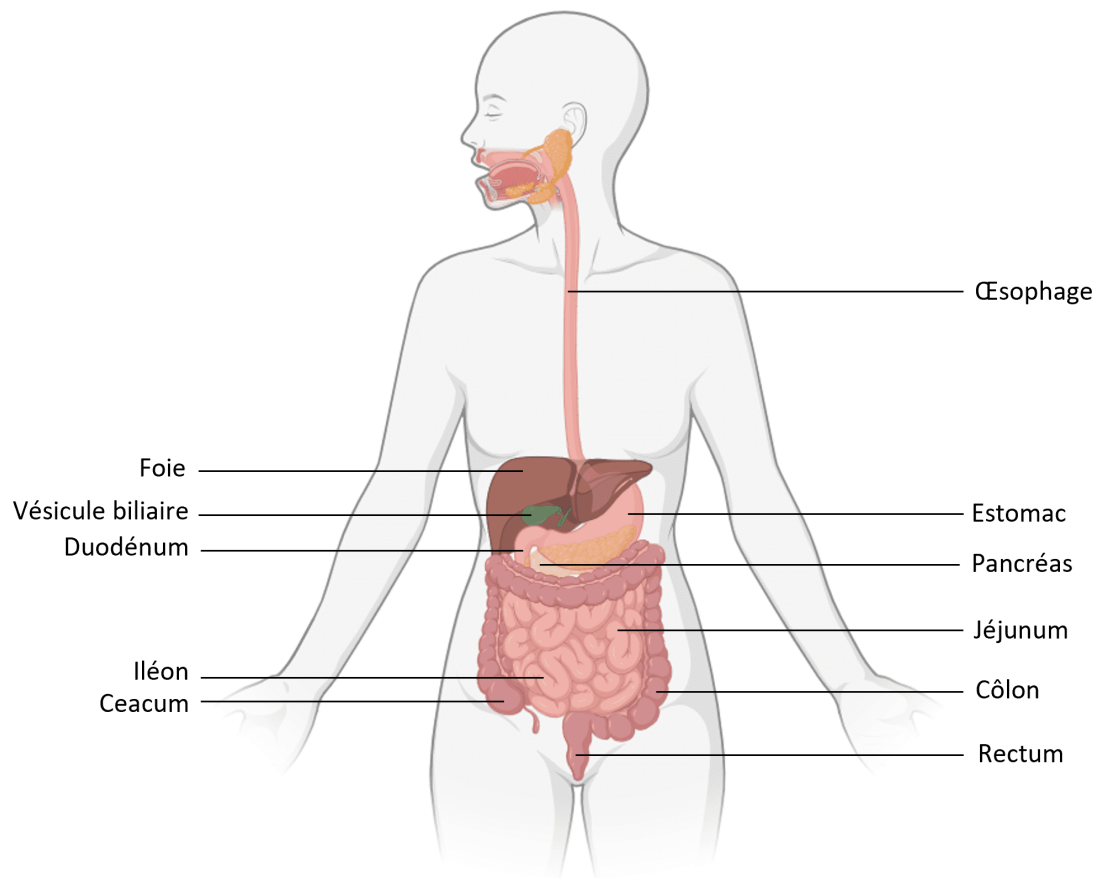
In conclusion, this work contributes to the understanding of various aspects of the interaction between host cells and CD-associated AIEC bacteria and, in the future, will aide to better characterize the etiopathogenesis of this disease.

**Keywords** : Crohn's disease, adherent-invasive *E. coli*, autophagy, autophagic receptors, Tn-Seq.



# **Étude bibliographique**





**FIGURE 1 : Représentation schématique du tractus gastro-intestinal.**

L'intestin grêle est divisé en trois segments : il débute à la sortie de l'estomac par le duodénum, suivi du jéjunum et enfin de l'iléon qui aboutit sur le caecum, à la jonction iléo-caecale. Le tractus digestif se poursuit par le côlon ascendant (droit), transverse puis descendant (gauche) pour finir sur le côlon sigmoïde, avant le rectum.

# Chapitre I : Maladie de Crohn

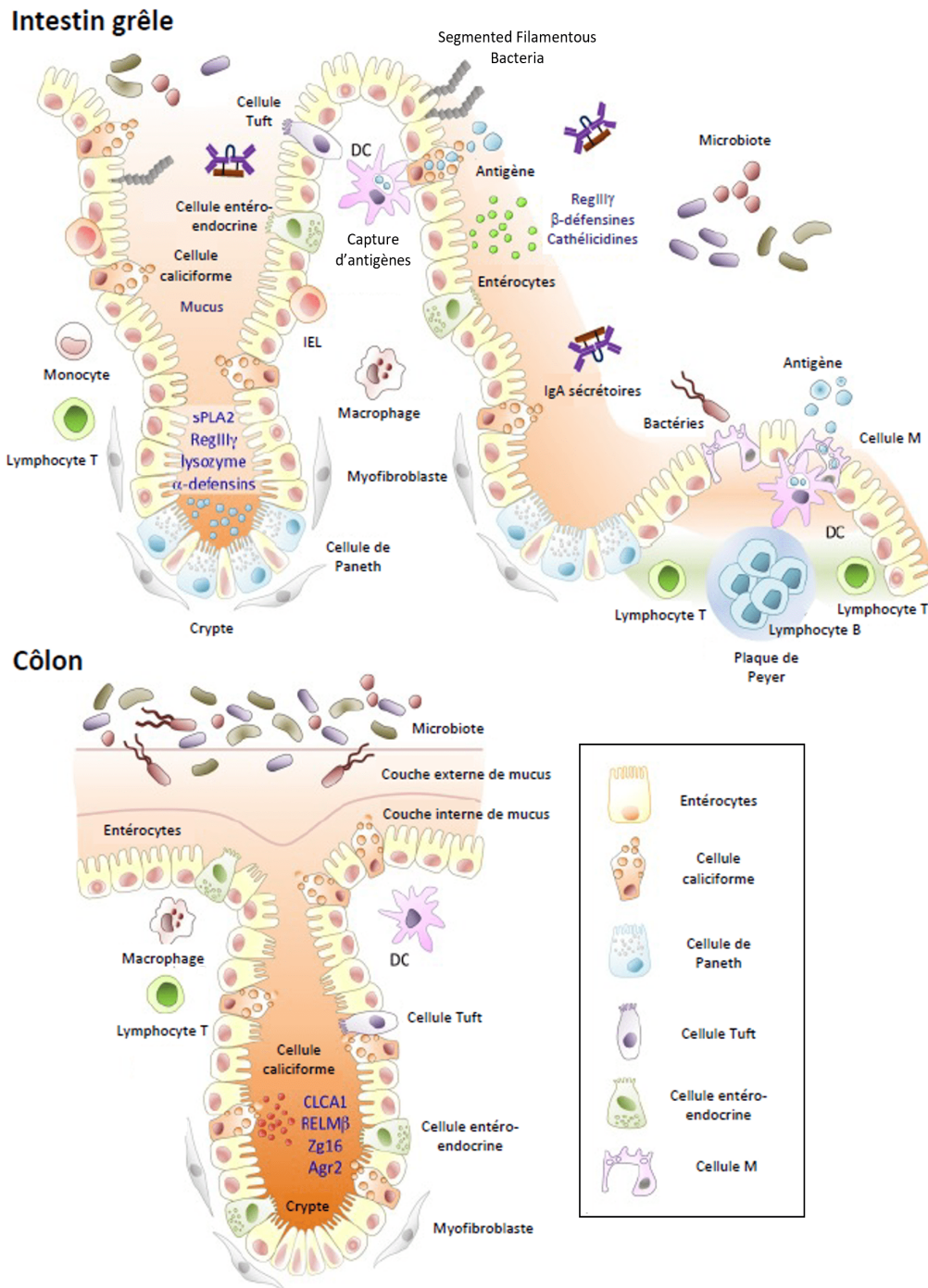
## I.1 Épithélium intestinal

### I.1.1 Structure de l'épithélium intestinal

La partie de l'organisme qui s'étend de la bouche à l'anus constitue le tractus gastro-intestinal, dont la surface est estimée entre 200 et 300 m<sup>2</sup> chez l'Homme. Les organes digestifs qui composent le tractus gastro-intestinal sont l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), le côlon et le rectum (**Figure 1**). Ainsi, la muqueuse intestinale tapissant ces organes est la plus grande surface d'interaction entre l'hôte et l'environnement extérieur. La première couche de tissu composant cette muqueuse intestinale est l'épithélium intestinal, qui est une barrière interactive et dynamique. L'épithélium intestinal est composé de cellules caliciformes qui sécrètent du mucus, d'entérocytes responsables de la fonction d'absorption des nutriments par l'intestin, de cellules entéro-endocrines qui produisent des hormones digestives, de cellules de Paneth sécrétant des peptides anti-microbiens et de cellules M responsables du passage d'antigènes de la lumière intestinale vers les cellules immunitaires sous-jacentes (Allaire et al., 2018). Les cellules épithéliales, reliées entre elles par des jonctions serrées, forment une monocouche de cellules polarisées qui reposent sur la *lamina propria*. L'épithélium est organisé en villosités augmentant la surface de contact entre l'intestin et la lumière intestinale et en cryptes de Lieberkühn, où l'on trouve les cellules souches intestinales assurant le renouvellement des cellules de l'épithélium (**Figures 2 et 3**).

### I.1.2 Fonction barrière de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal constitue une barrière protectrice permettant de limiter l'entrée des micro-organismes pathogènes dans les tissus de l'hôte. En effet, la muqueuse intestinale est constamment exposée à des antigènes d'origine alimentaires ou bactériens, pouvant entraîner des réactions allergiques. Cette barrière intestinale est à la fois : (i) physique, grâce aux jonctions serrées des cellules épithéliales et à leurs interactions avec le tissu conjonctif sous-jacent, (ii) chimique, grâce à la sécrétion de mucus et de substances défensives et protectrices contre de potentiels micro-organismes pathogènes comme les peptides anti-microbiens, et (iii) immunitaire, grâce à la participation des cellules épithéliales à l'immunité innée et à leurs interactions avec le système lymphoïde associé au tube digestif, et à la sécrétion d'immunoglobulines (Ig) A (**Figures 2 et 3**).



**FIGURE 2 : Anatomie de la muqueuse intestinale.**

**Intestin grêle** : Les entérocytes sont les cellules majoritairement retrouvées dans l'axe crypte-villosité. Elles sécrètent des peptides anti-microbiens (Reg3γ, β-défensines, cathélicidines), tout comme les cellules de Paneth (lysozyme, α-défensines, sPLA2) présentes à la base des cryptes, afin d'éloigner les bactéries de la surface épithéliale. Les cellules M, localisées au niveau de l'épithélium associé aux follicules, recouvrent les plaques de Peyer et participent au passage et à la capture des antigènes vers les cellules immunitaires sous-jacentes. La transcytose et la libération luminale d'immunoglobulines A (IgA) sécrétoires contribuent également à la fonction barrière de l'épithélium. **Côlon** : Les entérocytes et les cellules caliciformes sont les principales cellules composant l'épithélium colique. Les cellules caliciformes sont responsables de la production de mucus, favorisant l'exclusion des bactéries de la surface épithéliale. Adaptée de (Allaire et al., 2018).

Abréviations : DC : *dendritic cells*, IEL : *intra-epithelial lymphocytes*.



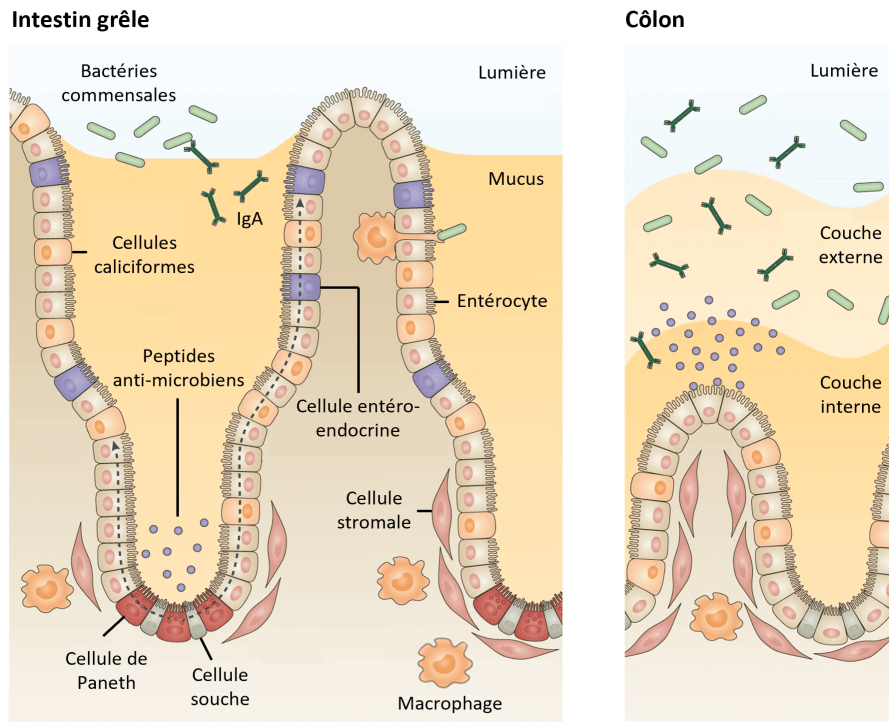
**Mucus** : Le mucus est sécrété de façon continue par les cellules caliciformes et est principalement composé d'eau et de glycoprotéines ramifiées, les mucines, MUC2 étant la mucine principale. L'intestin grêle est recouvert d'une fine couche de mucus qui concentre les peptides anti-microbiens et les IgA, permettant le maintien des bactéries à distance de l'épithélium. Au niveau colique, deux couches de mucus sont présentes, une première couche interne adhérente et dense généralement stérile, et une seconde couche externe peu adhérente et hébergeant des bactéries commensales (**Figure 3**) (Herath et al., 2020).

**Peptides anti-microbiens** : Les peptides anti-microbiens sont majoritairement sécrétés par les cellules de Paneth et les entérocytes mais les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes de la *lamina propria* sont également capables de synthétiser certains de ces peptides. Au niveau intestinal, les trois principaux types de peptides anti-microbiens retrouvés sont les défensines et les cathélicidines qui créent des pores dans les membranes des bactéries, et Reg3 $\alpha/\beta/\gamma$  (*regenerating islet-derived protein 3  $\alpha/\beta/\gamma$* ) qui sont des lectines solubles interagissant avec des composants de la surface bactérienne (**Figures 2 et 3**) (Zong et al., 2020).

**Jonctions serrées** : En régulant finement la perméabilité intestinale paracellulaire, les jonctions serrées sont les déterminants majeurs de la barrière intestinale physique. Les jonctions serrées constituent un réseau de protéines situées sur la membrane latérale des cellules épithéliales comprenant principalement les protéines transmembranaires occludine, claudine ainsi que des protéines d'échafaudage intracellulaires telles que ZO (*zonula occluden*) (Turner, 2009; Peterson and Artis, 2014; Barbara et al., 2021). Brièvement, ZO-1, ZO-2 et ZO-3 permettent de lier les jonctions serrées avec le cytosquelette. Il existe deux classes de claudines fonctionnellement différentes au niveau intestinal. En effet, il y a : les claudines « *barrier-forming* » telles que les claudines-1, -3, -4, -5, -7, -8, -11, -14, -18 et -19 responsables de l'étanchéité, et les claudines « *pore-forming* » telles que les claudines-2, -10a/-10b, -15, -16 et -17 qui forment des pores entre les cellules de l'épithélium intestinal (Günzel and Yu, 2013; Barbara et al., 2021). Enfin, l'occludine est une protéine transmembranaire dont le domaine carboxy-terminal cytoplasmique contient le site de fixation pour ZO-1. C'est aussi une protéine dont la phosphorylation est corrélée avec la localisation des jonctions serrées.

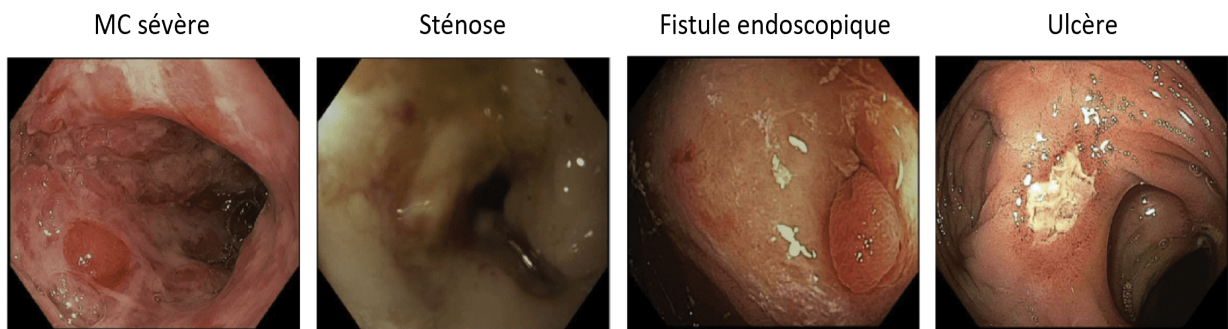
**IgA** : Produites par les plasmocytes en réponse à des antigènes alimentaires ou microbiens, les IgA sécrétoires participent à la défense de l'épithélium en neutralisant des toxines ou en se fixant à des bactéries, ce qui permet leur rétention dans la lumière intestinale, limitant ainsi leur accès à l'épithélium et favorisant leur élimination. Les IgA sécrétoires peuvent aussi immobiliser des bactéries en ciblant leurs flagelles ou en modulant l'expression de gènes bactériens *via* le ciblage de protéines de surface (**Figures 2 et 3**) (Pietrzak et al., 2020).

**Système immunitaire intestinal** : Le système immunitaire intestinal joue un rôle important dans la tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal. Au niveau de la *lamina propria*, diverses cellules immunitaires sont présentes telles que des macrophages qui assurent la phagocytose et l'élimination des bactéries, ou des cellules dendritiques qui coordonnent la réponse immunitaire adaptative *via* la présentation d'antigènes. Les plaques de



**FIGURE 3 : Structure de la couche de mucus dans l'intestin grêle et le côlon.**

Le renouvellement continu de la couche de cellules épithéliales est assuré par les cellules souches résidant dans les cryptes. Les cellules épithéliales intestinales différenciées, à l'exception des cellules de Paneth, migrent vers le haut de l'axe crypte-villosité, comme l'indiquent les flèches en pointillées. **Intestin grêle** : L'intestin grêle est composé d'une seule couche de mucus, lâchement associée à l'épithélium et facilement pénétrable. **Côlon** : Le côlon distal est composé de deux couches de mucus : une couche de mucus interne adhérente et dense, et une couche de mucus externe peu adhérente. La couche interne est généralement stérile, tandis que la couche externe abrite une partie du microbiote intestinal. Adaptée de (Peterson and Artis, 2014).



**FIGURE 4 : Lésions endoscopiques de la maladie de Crohn.**

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

Peyer sont des organes lymphoïdes secondaires impliquées dans l'échantillonnage d'antigènes *via* les cellules M pour la présentation au système immunitaire sous-jacent (**Figure 2**) (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010; Mörbe et al., 2021).

Par conséquent, la fonction barrière de l'épithélium intestinal est cruciale pour maintenir l'homéostasie cellulaire et la bonne santé de l'hôte. Toutefois, des dysfonctionnements de cette barrière peuvent avoir lieu au niveau du tractus digestif et conduire au développement de certaines pathologies, telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

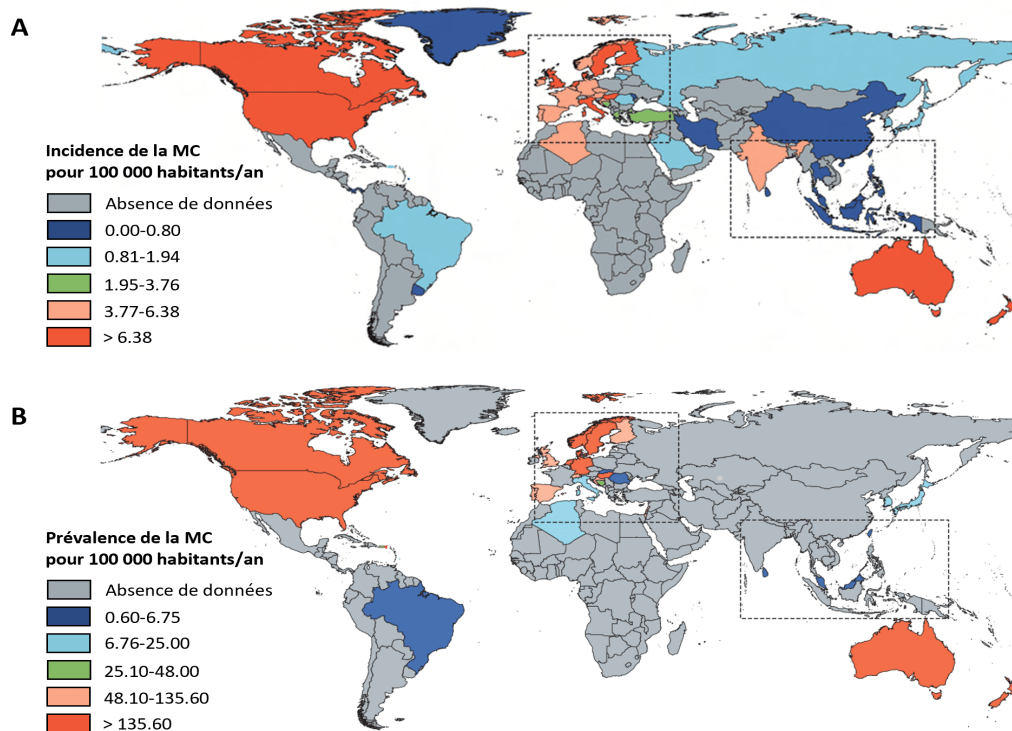
## I.2 Maladie de Crohn

### I.2.1 Généralités sur la maladie de Crohn

Au même titre que la rectocolite hémorragique (RCH), la maladie de Crohn (MC) est une MICI qui affecte considérablement la qualité de vie des patients. Décrite pour la première fois en 1932 par le médecin Burrill B. Crohn, la MC évolue par périodes de poussées inflammatoires d'intensité variable entrecoupées de périodes de rémission cliniques (Crohn et al., 1932). Elle se caractérise par des lésions intestinales segmentaires, discontinues (respectant des zones de muqueuse intestinale saine) et transmuraux qui peuvent toucher la totalité du tractus gastro-intestinal, avec une atteinte préférentielle de l'iléon terminal et du côlon chez 35 à 45 % des cas (**Figure 4**) (Torres et al., 2017; Roda et al., 2020). La MC est majoritairement diagnostiquée chez le jeune adulte entre 20 et 30 ans, avec un pic d'incidence plus faible chez les personnes de 50-60 ans, sans aucune distribution sexe-dépendant. Les patients atteints de la MC présentent un risque plus élevé de développer des cancers digestifs, notamment colorectaux que des sujets sains (Stidham and Higgins, 2018; Olén et al., 2020). À l'heure actuelle, les traitements ne sont pas curatifs et visent seulement à soulager les symptômes, cicatrifier la muqueuse intestinale et réduire l'inflammation (Sandborn, 2014). Ainsi, la MC reste un enjeu majeur de santé publique.

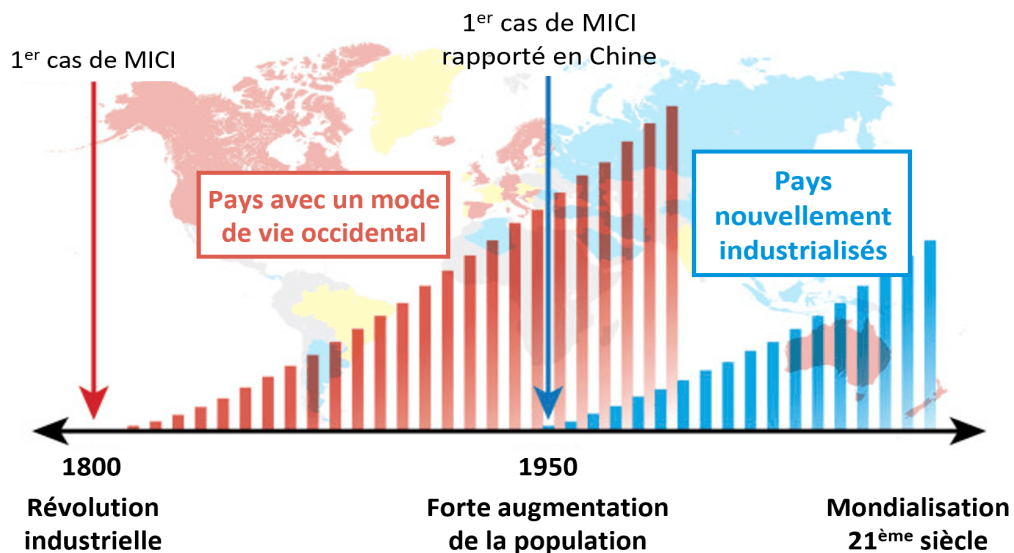
### I.2.2 Épidémiologie de la maladie de Crohn

De nos jours, la MC est une maladie mondiale qui affecte d'avantage les pays développés au 20<sup>ème</sup> siècle, bien que l'incidence (nombre de nouveaux cas dans une population sur une période donnée) et la prévalence (nombre de cas total dans une population sur une période donnée) de cette maladie soient inégales selon les régions géographiques, l'environnement et les groupes ethniques (Gajendran et al., 2018). La prévalence est plus élevée dans les pays ayant un mode de vie occidental que dans les pays en développement. En effet, entre 1990 et 2016, les plus fortes prévalences de la MC ont été constatées en Europe du Nord (Allemagne : 322 cas pour 100 000 habitants) et en Amérique du Nord (Canada : 319 cas pour 100 000) (Ng et al., 2017). Concernant l'incidence pendant cette même période, les pays d'Amérique du Nord, d'Europe et l'Australie présentent la plus forte incidence pour 100 000 habitants (**Figure 5**) (Ng et al., 2017). Toutefois, même si l'incidence est plus



**FIGURE 5 : Incidence et prévalence de la maladie de Crohn dans le monde entre 1990 et 2016.**

L'incidence et la prévalence sont indiquées en nombre de cas pour 100 000 habitants et par an. **(A) Incidence mondiale de la MC** : Elle est la plus élevée dans les pays d'Amérique du Nord, d'Europe et en Australie. Elle est en augmentation depuis quelques années dans les pays nouvellement industrialisés d'Asie du Sud-Est et d'Europe de l'Est. **(B) Prévalence mondiale de la MC** : Elle est supérieure en Europe, en Amérique du Nord et en Australie. Depuis quelques années, elle augmente dans les pays d'Asie du Sud-Est. Adaptée de (Ng et al., 2017).



**FIGURE 6 : Évolution de l'incidence des MICI dans le monde au cours du temps.**

Au cours du 20<sup>ème</sup> siècle, l'incidence des MICI dans les pays ayant un mode de vie occidental a connu une forte augmentation. Cependant, même si ce n'est pas représenté, l'incidence est actuellement stable, voire en baisse dans ces pays, contrairement aux pays nouvellement industrialisés, où l'incidence est en forte hausse durant le 21<sup>ème</sup> siècle. Adaptée de (Kaplan and Ng, 2017).

élevée dans les pays industrialisés ayant un mode de vie occidental, elle est stable voire en baisse, tandis qu'elle augmente dans les pays d'Afrique, d'Asie, et d'Amérique du Sud nouvellement industrialisés, faisant craindre une forte hausse de la prévalence de la MC dans ces pays dans les prochaines années (**Figure 6**) (Torres et al., 2017; Roda et al., 2020). D'après le registre français EPIMAD, l'incidence de la MC a augmenté de 30 % entre 1988 et 2008. Enfin, depuis 2015, le nombre de personnes atteintes de la MC s'élèverait à 200 000 en France et 2,5 millions en Europe.

## I.3 Physiopathologie de la maladie de Crohn

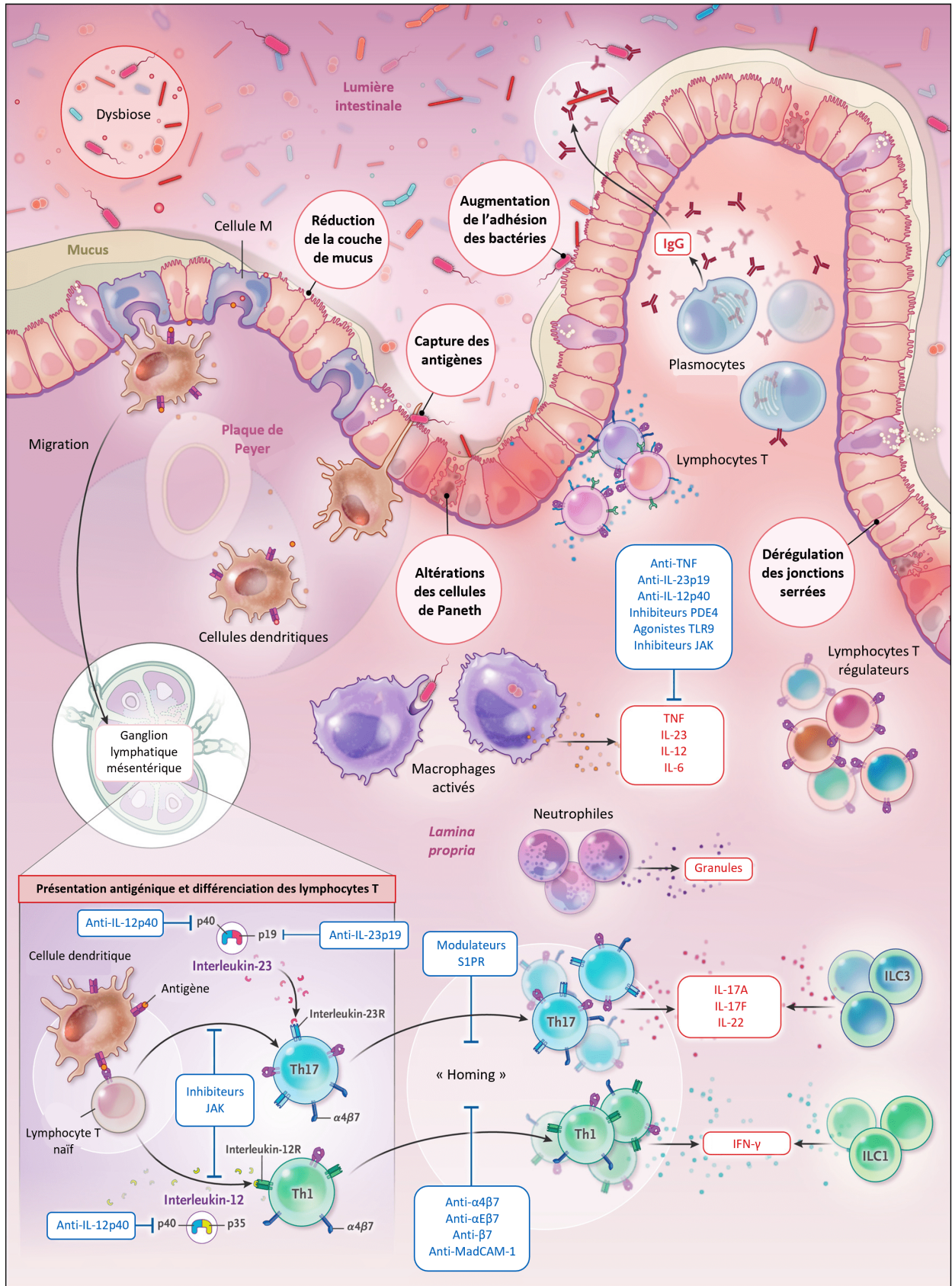
### I.3.1 Augmentation de la perméabilité intestinale

Un dysfonctionnement de la barrière intestinale est défini comme étant la perte de la continuité de l'épithélium intestinal à la suite d'une altération des jonctions intra-épithéliales. Cette altération rend l'épithélium perméable aux micro-organismes, antigènes et autres molécules de la lumière intestinale, menant à l'activation du système immunitaire intestinal et à la mise en place de l'inflammation, conduisant potentiellement au développement de la MC (Michielan and D'Inca, 2015).

Plusieurs études ont observé une augmentation de la perméabilité intestinale chez les patients atteints de la MC en phase active, ainsi qu'un rétablissement de cette perméabilité pendant les phases de rémission (Hollander et al., 1986; Benjamin et al., 2008; Vivinus-Nébot et al., 2014). De plus, l'augmentation de la perméabilité intestinale a été corrélée avec le risque de rechute, montrant que celle-ci jouerait certainement un rôle dans la progression de la MC et serait prédictive des rechutes (D'Inca et al., 1999; Arnott et al., 2000). Des études ont constaté une augmentation de la perméabilité intestinale chez des parents atteints de la MC du 1<sup>er</sup> degré, associée avec un développement ultérieur de la MC, même avec un test de perméabilité intestinale réalisé 3 ans avant le déclenchement de la maladie (Hollander et al., 1986; Fries et al., 2005; Turpin et al., 2020). À l'aide d'analyses de microscopie électronique à transmission, une étude a révélé une structure anormale des jonctions serrées chez les patients atteints de la MC en phase active. En outre, chez ces patients, cette même étude a montré une diminution de l'expression de l'occludine et des claudines-5 et -8 « *barrier-forming* » combinée à une augmentation de l'expression de la claudine-2 « *pore-forming* » (Zeissig et al., 2007). Enfin, une baisse de l'expression de ZO-1 au niveau des cellules épithéliales de patients atteints de la MC a également été observée (Vetrano et al., 2008; Vivinus-Nébot et al., 2014). Ainsi, ces données supposent qu'une altération de la barrière intestinale précéderait le développement et participerait à la pathogenèse de la MC (**Figure 7**).

Par ailleurs, il est important de rappeler que la translocation des micro-organismes de la lumière intestinale vers la *lamina propria* est favorisée par l'augmentation de la perméabilité intestinale et induit une stimulation anormale du système immunitaire sous-jacent. Récemment, une étude a démontré qu'à la suite de la translocation de bactéries chez la souris et l'Homme, une augmentation des IgG systémiques spécifiques de bactéries commensales est observée et que les bactéries ayant transloqué peuvent être identifiées grâce à l'analyse du ré-





**FIGURE 7 : Système immunitaire de la muqueuse intestinale dans la maladie de Crohn.**  
(Légende sur la page suivante).

pertoire d'IgG. De façon intrigante, par rapport aux patients contrôles, le profil des IgG dirigés contre le microbiote est différent chez les patients atteints de la MC, avec notamment une réponse systémique IgG accrue contre plusieurs genres bactériens, y compris *Bifidobacterium*, *Collinsella*, *Faecalibacterium* et *Blautia*, indiquant une translocation préférentielle de ces genres bactériens chez les patients (**Figure 7**) (Vujkovic-Cvijin et al., 2022).

### I.3.2 Dérégulation de la réponse immunitaire

L'inflammation intestinale chronique caractéristique de la MC serait la conséquence d'une dérégulation des réponses immunitaires innées et adaptatives au niveau de la muqueuse intestinale. De plus, l'augmentation de la perméabilité intestinale favorise l'entrée d'antigènes de la lumière intestinale vers la *lamina propria*, déclenchant une réponse immunitaire accrue dans le cas de la MC (**Figure 7**) (Torres et al., 2017; Roda et al., 2020).

En effet, l'accumulation de micro-organismes pathogènes au sein de l'épithélium intestinal peut altérer la fonction barrière et entraîner la production de médiateurs pro-inflammatoires, qui vont entretenir l'inflammation intestinale (de Souza and Fiocchi, 2016). Chez les patients atteints de la MC, il a été rapporté une augmentation de l'expression des récepteurs de l'immunité innée TLR2 et TLR4 (*Toll-like receptor*), capables de reconnaître des molécules bactériennes et des molécules de co-stimulation au sein des cellules dendritiques, contribuant à l'inflammation intestinale *via* l'induction de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ), l'IL-1 $\beta$  (interleukine), l'IL-6 et l'IL-18 (Hart et al., 2005; Middel et al., 2006). De plus, chez les patients atteints de la MC, il a été révélé une augmentation du nombre de macrophages, en particulier des macrophages M1 pro-inflammatoires, au niveau de la muqueuse intestinale. Après leur stimulation, ces macrophages sécrètent les cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-23 et TNF- $\alpha$  (Kamada et al., 2008; Franzè et al., 2013; Chapuy et al., 2019). Par conséquent, la libération de cytokines solubles et d'autres médiateurs de l'inflammation contribuent à l'inflammation et au recrutement d'autres cellules immunitaires responsables de lésions tissulaires.

La MC est caractérisée par une réponse excessive des lymphocytes Th1 et Th17 (*T helper*) vis-à-vis des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, l'IL-18 et l'IL-23 produites par les cellules dendritiques et les macrophages. En réponse à cela, les lymphocytes Th1 et Th17 vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17, l'IFN- $\gamma$  (*interféron- $\gamma$* ) et le TNF- $\alpha$ , qui vont maintenir l'inflammation (Ahluwalia et al., 2018; Uhlig and Powrie, 2018). De plus, un dysfonctionnement des lymphocytes T régulateurs (Treg), qui ont une fonction suppressive, est également associé à la pathogenèse de la MC. La dérégulation de la réponse inflammatoire serait due à la dérégulation du rapport lymphocytes effecteurs/Treg plutôt que le nombre absolu de Treg (**Figure 7**) (Ahluwalia et al., 2018).

### (Suite Figure 7)

Dans la MC, la dysbiose microbienne est associée à une altération de la couche de mucus, à un dérèglement des jonctions serrées épithéliales, à des défauts dans le nombre et la fonction des cellules de Paneth ainsi qu'à une augmentation de la perméabilité intestinale, augmentant ainsi l'exposition de la *lamina propria* aux antigènes luminaux. Les macrophages activés phagocytent les bactéries et produisent des niveaux accrus de TNF, IL-23, IL-12 et IL-6, favorisant l'inflammation (en rouge). Les cellules dendritiques restent dans les plaques de Peyer ou migrent vers les ganglions lymphatiques mésentériques, où elles présentent les antigènes aux lymphocytes T (LT) naïfs. Les LT CD4<sup>+</sup> prolifèrent et se différencient en sous-ensembles de LT effecteurs, tels que les LT helper de type 1 (Th1) ou de type 17 (Th17). Les lymphocytes Th1 et Th17 différenciés augmentent l'expression des récepteurs aux chimiokines et des intégrines, qui leur permettent de pénétrer dans la circulation systémique et de se diriger vers le tissu intestinal, où ils exercent des fonctions inflammatoires, telles que la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes Th1 et la production d'IL-17A, IL-17F et IL-22 par les cellules Th17. Les cellules lymphoïdes innées du groupe 1 productrices d'IFN- $\gamma$  (ILC1) et du groupe 3 productrices d'IL-17A (ILC3), ainsi que les plasmocytes sécréteurs d'IgG sont augmentés. Les approches thérapeutiques approuvées ou à l'étude (en bleu) consistent à (i) neutraliser les cytokines favorisant l'inflammation (anticorps anti-TNF, anti-IL-12p40 et anti-IL-23p19) ou entraînant la différenciation des sous-ensembles de LT CD4<sup>+</sup> effecteurs (anticorps anti-IL-12p40 et anti-IL-23p19), (ii) inhiber les cascades de transduction du signal en aval des voies inflammatoires (inhibiteurs JAK), (iii) bloquer le trafic des lymphocytes vers l'intestin (anticorps anti- $\alpha$ 4 $\beta$ 7, anti- $\beta$ 7, anti- $\alpha$ E $\beta$ 7 et anti-MAdCAM-1) ou inhiber la sortie des ganglions lymphatiques (modulateurs S1PR), ou encore (iv) diminuer la production de médiateurs inflammatoires (inhibiteurs PDE4 et agonistes TLR9). Les anticorps anti-IL-12p40 bloquent la signalisation de l'IL-12 et de l'IL-23 en raison de leur sous-unité p40 commune. Adaptée de (Chang, 2020).

Abréviations : IFN- $\gamma$  : *interféron- $\gamma$* , IgG : *immunoglobuline G*, IL : *interleukine*, ILC : *innate lymphoid cells*, JAK : *janus kinase*, MAdCAM-1 : *mucosal addressin-cell adhesion molecule 1*, PDE4 : *phosphodiesterase 4*, S1PR : *sphingosine-1-phosphate receptor modulator*, TLR9 : *toll-like receptor 9*, TNF : *tumor necrosis factor*.



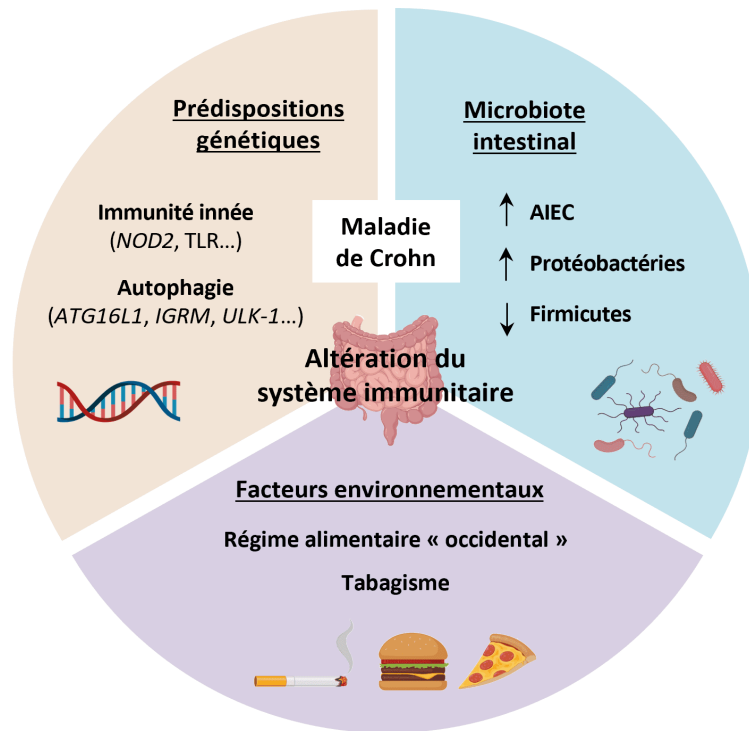
## I.4 Étiologie de la maladie de Crohn

L'étiologie de la MC est multifactorielle, complexe et reste à l'heure actuelle incomplètement décrite. En effet, elle résulte de l'interaction entre des prédispositions génétiques de l'hôte, des facteurs environnementaux et des altérations du microbiote intestinal menant à des dérégulations de la réponse immunitaire innée et adaptative, ainsi qu'à la mise en place d'une réponse inflammatoire non contrôlée à l'origine de la survenue, du maintien et/ou de l'aggravation de la MC (**Figure 8**) (Rogler et al., 2018).

### I.4.1 Facteurs génétiques et épigénétiques

L'implication des facteurs génétiques dans la MC s'appuie sur l'observation de cas groupés familiaux, sur des études menées sur des groupes ethniques différents ou encore sur des analyses réalisées sur des jumeaux. Par exemple, les populations juives ashkénazes présentent un risque 3 à 4 fois plus élevé de développer la MC, comparé aux populations non-juives (Bernstein et al., 2006; Ananthkrishnan, 2015). Des études épidémiologiques ont démontré que 2 à 14 % des patients atteints de la MC rapportent une histoire familiale de MICI et le risque de développer la MC est augmenté si une personne de la famille est atteinte (Halme et al., 2006). En effet, si les deux parents sont atteints, un tiers des enfants développera une MICI avant l'âge de 30 ans (Laharie et al., 2001). En revanche, le risque de développer la MC est 7,8 à 35 fois plus élevé que dans la population générale pour un parent du 1<sup>er</sup> degré d'une personne atteinte de la MC (Halme et al., 2006; Moller et al., 2015; Santos et al., 2018). Concernant les formes familiales de la MC, une étude a observé qu'elles sont associées à un âge de survenue plus précoce, un phénotype plus agressif et une extension digestive plus importante de la maladie (Colombel et al., 1996). Par ailleurs, une méta-analyse incluant six études sur les jumeaux a montré un taux de concordance de la MC de 30,3 % pour les jumeaux monozygotes contre 3,6 % pour les jumeaux dizygotes, indiquant un rôle important de la génétique dans le risque de développer la MC (Brant, 2011).

Les études d'association à l'échelle du génome (GWAS, *genome wide association study*) ont permis d'identifier plus de 240 *loci* de susceptibilité associés aux MICI, dont 170 sont associés à la MC (Jostins et al., 2012; Liu et al., 2015; de Lange et al., 2017). L'analyse de ces *loci* a mis en évidence de nombreux polymorphismes génétiques (SNP, *single nucleotide polymorphism*) associés à un risque accru de développer la MC. Plus récemment, des travaux de séquençage à large échelle analysant les données de séquence de plus de 30 000 patients atteints de la MC et de 80 000 individus contrôles, ont identifiés pour la première fois, 10 gènes directement impliqués dans l'apparition de la MC (Sazonovs et al., 2022). Les gènes de susceptibilité identifiés sont impliqués dans l'immunité innée avec la reconnaissance et la prise en charge des micro-organismes, l'immunité adaptative, le stress du réticulum endoplasmique, l'autophagie ou encore la fonction barrière (**Figure 9**) (Graham and Xavier, 2020). Actuellement, les gènes codant pour les protéines NOD2 (*nucleotide oligomerization domain 2*), ATG16L1 (*autophagy-related gene 16 like 1*) et IRGM (*immunity-related GTPase family M*) sont les plus décrits.



**FIGURE 8 : Étiologie multifactorielle de la maladie de Crohn.**

La MC est caractérisée par une dérégulation de la réponse immunitaire intestinale vis-à-vis du microbiote intestinal chez des individus génétiquement prédisposés et sous l'influence de facteurs environnementaux.

Abréviations : AIEC : *adherent-invasive Escherichia coli*, ATG16L1 : *autophagy-related gene 16 like 1*, IGRM : *immunity-related GTPase family M*, NOD2 : *nucleotide oligomerization domain 2*, TLR : *toll-like receptor*, ULK-1 : *unc-51 like autophagy activating kinase 1*.

Processus associés aux MICI	
<b>Barrière épithéliale</b> <i>GNA12*</i> , <i>HNFA4</i> , <i>CDH1</i> , <i>ERRF1</i> , <i>MUC19</i> , <i>ITLN1*</i>	<b>Présentation des antigènes</b> <i>ERAP2*</i> , <i>LNPEP</i> , <i>DENND1B</i>
<b>Signalisation</b> <i>REL</i> , <i>PTGER4</i> , <i>NKX2-3</i> , <i>STAT3</i> , <i>ERRF1</i> , <i>HNFA4</i> , <i>PLA2G2A/E</i>	<b>IL-23/Th17</b> <i>IL23R*</i> , <i>JAK2</i> , <i>TYK2*</i> , <i>STAT3</i> , <i>ICOSLG</i> , <i>IL21</i> , <i>TNFSF15*</i>
<b>Transport de solutés</b> <i>SLC9A4</i> , <i>SLC22A5</i> , <i>SLC22A4*</i> , <i>AQP12A/B</i> , <i>SLC9A3</i> , <i>SLC26A3</i>	<b>Régulation lymphocytes T</b> <i>NDFIP1</i> , <i>TNFSF8</i> , <i>TAGAP</i> , <i>IL2</i> , <i>IL2RA</i> , <i>TNFRSF9</i> , <i>PIM3</i> , <i>IL7R*</i> , <i>IL12B</i> , <i>IL23R*</i> , <i>PRDM1</i> , <i>ICOSLG</i> , <i>TNFSF8</i> , <i>IFNG</i> , <i>IL21</i>
<b>Cellules de Paneth</b> <i>ITLN1*</i> , <i>NOD2*</i> , <i>ATG16L1*</i> , <i>XBP1*</i>	<b>Régulation lymphocytes B</b> <i>IL5</i> , <i>IKZF1</i> , <i>BACH2</i> , <i>IL7R*</i> , <i>IRF5</i>
<b>Défense innée de la muqueuse</b> <i>NOD2*</i> , <i>ITLN1*</i> , <i>CARD9*</i> , <i>REL</i> , <i>SLC11A1</i> , <i>FCGR2A*/B</i>	<b>Tolérance immunitaire</b> <i>IL10</i> , <i>IL27*</i> , <i>SBNO2</i> , <i>CREM</i> , <i>IL1R1/IL1R2</i> , <i>NOD2*</i>
<b>Recrutement cellules immunitaires</b> <i>CCL11/CCL2/CCL7/CCL8</i> , <i>CCR6</i> , <i>IL8RA/IL8RB</i> , <i>MST1*</i>	
Réponses cellulaires	
<b>Autophagie</b> <i>ATG16L1*</i> , <i>IRGM</i> , <i>NOD2*</i> , <i>LRRK2</i> , <i>CUL2</i> , <i>PARK7</i> , <i>DAP</i>	<b>Apoptose/Nécroptose</b> <i>FASLG</i> , <i>THADA*</i> , <i>DAP</i> , <i>PUS10</i> , <i>MST1*</i>
<b>Stress du réticulum endoplasmique</b> <i>CPEB4</i> , <i>ORMDL3</i> , <i>SERINC3</i> , <i>XBP1*</i>	<b>Métabolisme des glucides</b> <i>GCKR*</i> , <i>SLC2A4RG</i>
<b>Organisation intracellulaire</b> <i>VAMP3</i> , <i>KIF21B</i> , <i>TTL8</i> , <i>FGFR10P</i> , <i>CEP72</i> , <i>TPPP</i>	<b>Stress oxydant</b> <i>PRDX5</i> , <i>BACH2</i> , <i>ADO</i> , <i>GPX4</i> , <i>GPX1*</i> , <i>SLC22A4</i> , <i>LRRK2</i> , <i>NOD2*</i> , <i>CARD9*</i> , <i>HSPA6</i> , <i>DLD</i> , <i>PARK7</i> , <i>UTS2*</i> , <i>PEX13</i>
<b>Migration cellulaire</b> <i>ARPC2</i> , <i>LSP1</i> , <i>AAMP</i>	

**FIGURE 9 : Prédispositions génétiques dans l'étiologie des MICI.**

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

### I.4.1.1 Gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée, non spécifique, représente la première ligne de défense de l'hôte contre des pathogènes. Plusieurs polymorphismes ont été identifiés au sein de gènes impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire innée tels que les récepteurs « Toll-like » et « NOD-like ».

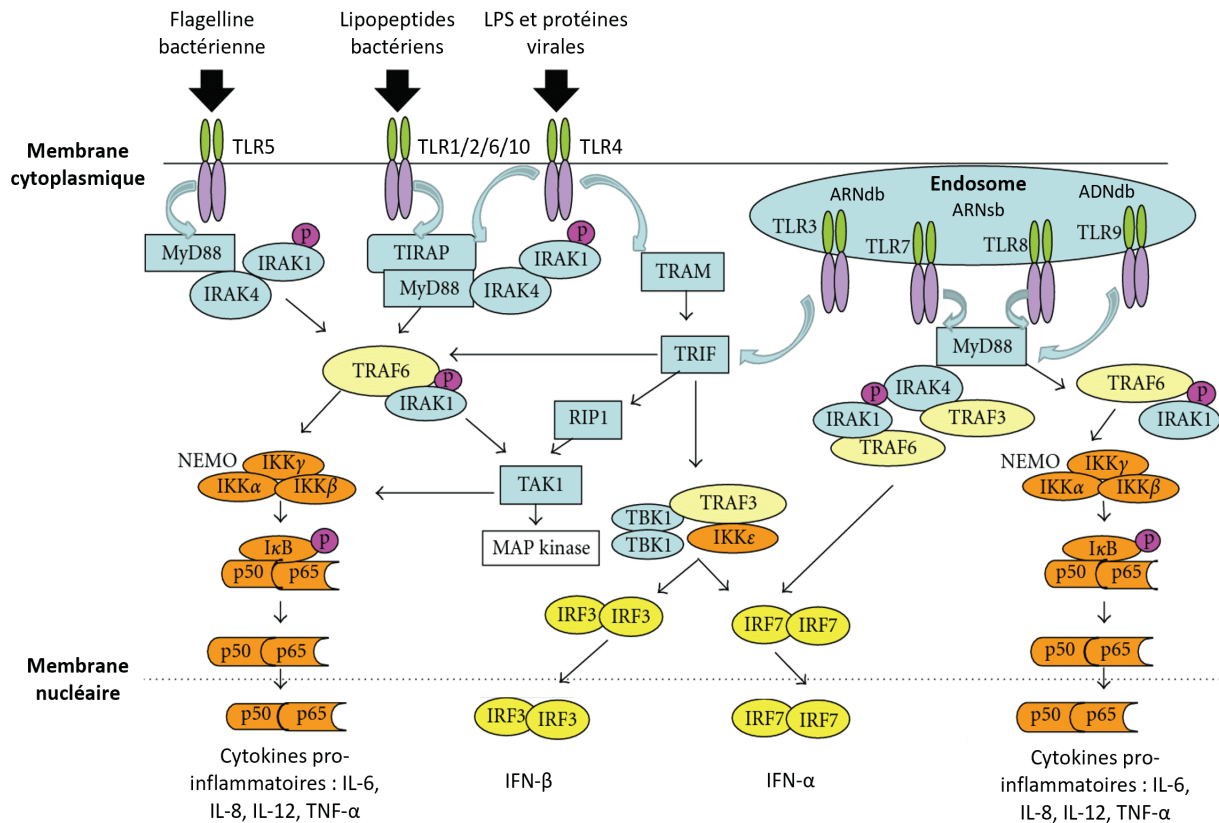
#### I.4.1.1.1 Récepteurs « Toll-like » (TLR)

Les TLR sont des récepteurs membranaires exprimés à la surface des cellules de l'immunité innée de type PRR (*pattern recognition receptor*), capables de reconnaître des bactéries ou des dérivés bactériens. En effet, les TLR reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, *pathogen-associated molecular pattern*), induisant ainsi la réponse immunitaire inflammatoire (Vijay, 2018). À ce jour, 13 TLR ont été identifiés, dont 10 chez l'Homme, situés au niveau de la membrane plasmique des cellules et/ou au niveau des compartiments intracellulaires tels que les endosomes (**Figure 10**) (Gao and Li, 2017; Gulati et al., 2018; Vijay, 2018).

Plusieurs SNP dans les gènes codant les TLR ont été associés à un risque augmenté de développer la MC (Kordjazy et al., 2018). En effet, dans une cohorte danoise incluant 624 patients atteints de la MC et 795 individus sains, il a été rapporté que le SNP *TLR1* (rs4833095), induisant une forte réponse inflammatoire, est associé à un risque plus élevé de développer la MC (Bank et al., 2015). De manière similaire, dans une population caucasienne, une méta-analyse a montré que deux polymorphismes du *TLR4* (D299G et T399I) confèrent un risque plus accru de développer la MC (Shen et al., 2010). Ces deux SNP entraînent une augmentation de l'expression du *TLR4* au sein de la muqueuse intestinale des patients, provoquant la perturbation de la transmission du signal induite par le LPS (*lipopolysaccharide*) et une sécrétion continue des cytokines pro-inflammatoires (Kordjazy et al., 2018). D'autres travaux ont mis en évidence un lien entre des SNP non synonymes dans les gènes *TLR1*, *TLR2* et *TLR6* et l'augmentation du risque d'une atteinte colique (Pierik et al., 2006). Enfin, un polymorphisme codant non synonyme du gène *TLR5* (rs5744174) a également été associé à un risque modéré de développer la MC chez des enfants et jeunes adultes. *In vitro*, ce variant du gène *TLR5* entraîne une plus forte expression de la chimiokine pro-inflammatoire CCL20 (*chemokine ligand 20*) en réponse à son activation par la flagelline (Sheridan et al., 2013).

#### I.4.1.1.2 Récepteurs « NOD-like » (NLR)

Les récepteurs « NOD-like » (NLR, *NOD-like receptor*), comme les TLR, sont des récepteurs cytoplasmiques de l'immunité innée de type PRR, dont 22 ont été identifiés chez l'Homme. Les NLR reconnaissent différents ligands tels que les PAMP et les motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires (DAMP, *damaged-associated molecular pattern*), déclenchant ainsi la réponse inflammatoire *via* l'activation de l'inflam-



**FIGURE 10 : Activation des récepteurs « Toll-like » et réponse immunitaire innée.**

Au nombre de 10 chez l'Homme, les TLR (*Toll-like receptor*) sont exprimés par différentes lignées cellulaires et reconnaissent des ligands de diverses origines. Les TLR1, 2, 4, 5, 6 et 10 sont retrouvés au niveau de la membrane plasmique. Le TLR5 reconnaît la flagelline bactérienne. Les TLR1, 2, 6, 10 reconnaissent différents constituants bactériens (peptidoglycane, lipoprotéines et lipopeptides triacylés ou diacylés) et le TLR4 reconnaît le lipopolysaccharide (LPS) ainsi que des protéines virales. Les TLR3, 7, 8 et 9 sont quant à eux, retrouvés au niveau de l'endosome. Les TLR3 et 9 reconnaissent des molécules virales d'ARN double brin (db) et les TLR7 et 8 reconnaissent des molécules d'ARN simple brin (sb). L'activation des TLR déclenche l'activation des voies de signalisation par l'intermédiaire des protéines adaptatrices (TIRAP, MyD88, TRIF ou TRAM) conduisant à l'activation de la transcription de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 et IL-12) et l'IFN- $\alpha$  et  $\beta$ . Adaptée de (Zhu and Mohan, 2010).

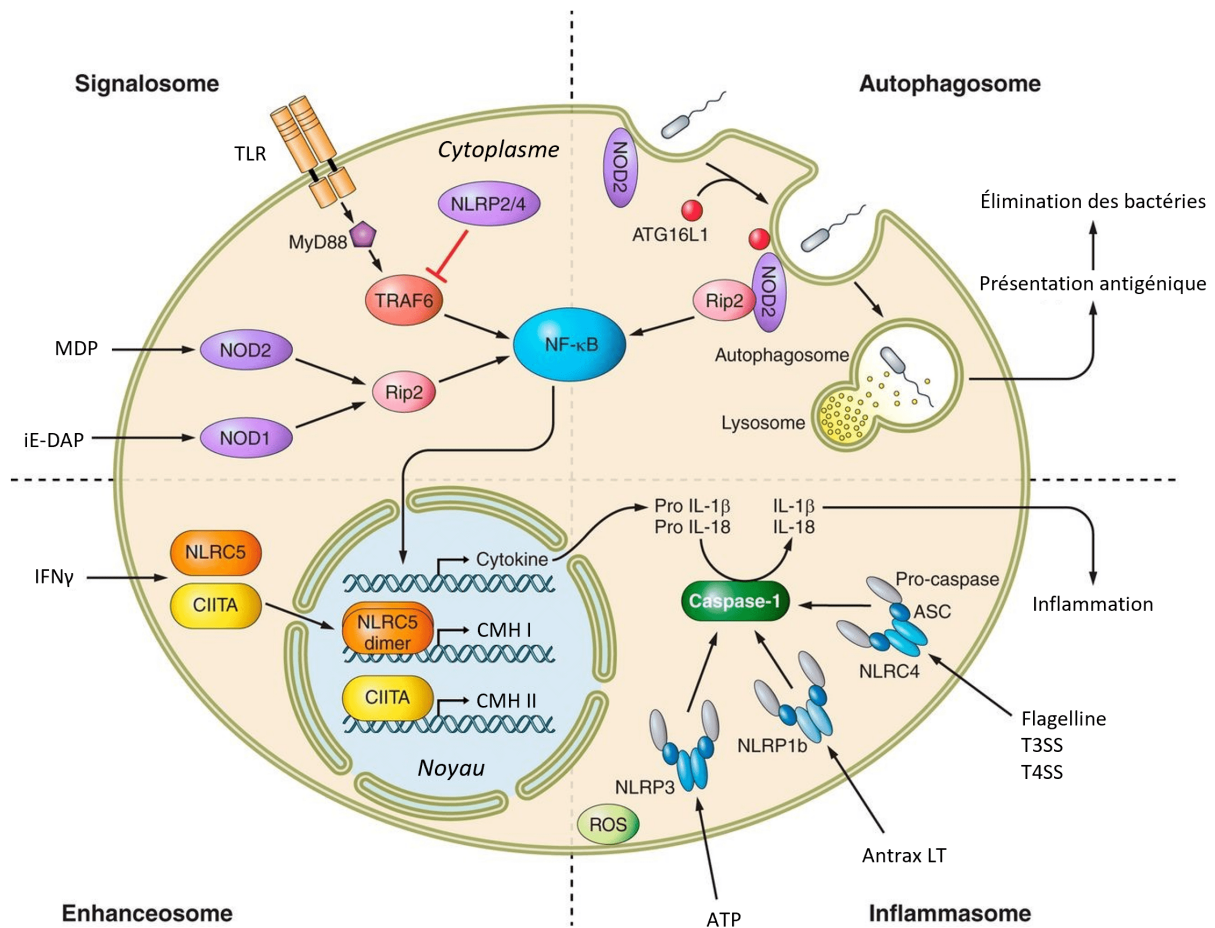
masome, la transduction du signal, l'activation de la transcription ou de l'autophagie (**Figure 11**) (Kim et al., 2016b). Des SNP dans les gènes *CARD9* (*caspase recruitment domain 9*) et *NOD2* (aussi appelé *CARD15*, *caspase recruitment domain 15*) ont particulièrement été associés à une augmentation du risque de développer la MC (Van Limbergen et al., 2009).

## - NOD2

Dans l'intestin, NOD2 est exprimé dans les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes ainsi que dans les cellules souches, les cellules caliciformes, les cellules de Paneth et les entérocytes (Al Nabhani et al., 2017; Ferrand et al., 2019). NOD2 reconnaît le muramyl dipeptide (MDP), un constituant du peptidoglycane présent chez toutes les bactéries à paroi Gram négatif et Gram positif, ce qui entraîne l'activation des voies de signalisation NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*) et MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), contribuant à la défense de l'hôte *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de mucines et de molécules anti-microbiennes (Al Nabhani et al., 2017; de Bruyn and Vermeire, 2017).

**Polymorphismes du gène *NOD2* associés à la MC :** Mis en évidence en 2001, *NOD2* a été le premier gène de susceptibilité de la MC découvert. En effet, trois polymorphismes principaux du gène *NOD2* sont directement associés à un risque accru de développer la MC (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). La mutation L1007fsinsC de *NOD2* engendre un décalage du cadre de lecture conduisant à une forme tronquée de la protéine qui ne reconnaît plus le peptide bactérien MDP et entraîne une altération de l'activation de NF- $\kappa$ B (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). Les deux autres polymorphismes de *NOD2* (Arg702Trp et Gly908Arg) sont des variants non-sens affectant également la reconnaissance du MDP. Ces trois mutations sont principalement observées dans les populations européennes, tandis que d'autres variants sont retrouvés chez les patients asiatiques par exemple (Ng et al., 2012; de Bruyn and Vermeire, 2017). Récemment, neuf nouveaux variants dans le gène *NOD2* ont été identifiés chez des patients atteints de la MC et pourraient constituer un nouveau facteur de risque (Chen et al., 2018; Frade-Proud'Hon-Clerc et al., 2019). De façon intéressante, des études ont estimé que les sujets hétérozygotes pour une mutation de *NOD2* ont un risque 2 à 4 fois plus élevé de développer la MC, alors que pour les sujets homozygotes ou hétérozygotes composites (deux allèles à risque différents), le risque est 20 à 40 fois plus élevé (Economou et al., 2004; Hugot et al., 2007; de Bruyn and Vermeire, 2017). Il a également été montré que les mutations dans le gène *NOD2* augmentent le risque de complications de la MC. Par exemple, le risque d'évolution de la maladie vers un phénotype fistulant ou sténosant augmente de 8 % chez les hétérozygotes et de 41 % chez les homozygotes ou les hétérozygotes composites. Enfin, chez les individus porteurs d'une mutation, le risque de chirurgie est 58 % plus élevé (Adler et al., 2011).

**Conséquences des polymorphismes du gène *NOD2* :** La perte de reconnaissance du MDP aboutit à un défaut de l'induction de NF- $\kappa$ B, ce qui paraît paradoxal dans le cas de la MC. Toutefois, chez des souris exprimant le variant *NOD2*<sup>L1007fsinsC</sup>, une étude a rapporté une activation plus forte de NF- $\kappa$ B en réponse à du



**FIGURE 11 : Voies de signalisation induites par l'activation des récepteurs « NOD-like ».**

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

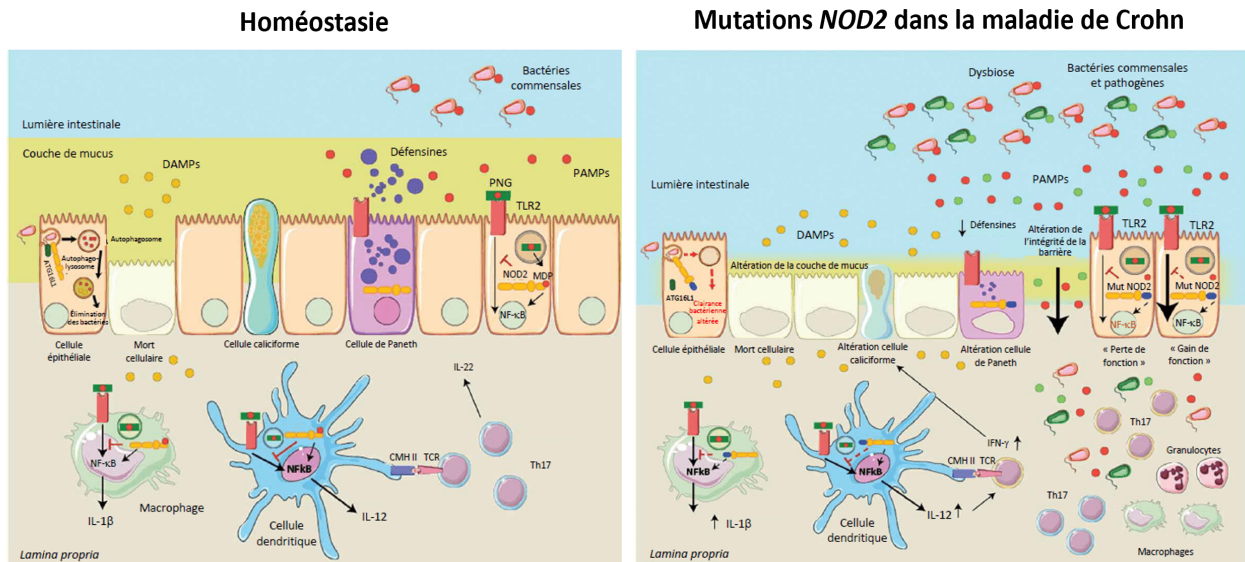
Abréviations : Antrax LT : *antrax lethal factor*, CIITA : *class II major histocompatibility complex transactivator*, iE-DAP : *d-glu-meso-diaminopimelic acid*, MDP : *muramyl dipeptide*, NLRP : *NOD-like receptor family pyrin domain*, ROS : *reactive oxygen species*, TLR : *toll-like receptor*, TSS : *type secretion system*.

MDP, rendant les souris plus sensibles à une colite induite au DSS (*dextran sulfate sodium*) (Maeda et al., 2005).. Cette observation pourrait être expliquée par le lien entre NOD2 et les TLR. En effet, des souris sont protégées d'une colite induite au DSS par l'administration de MDP, *via* la régulation négative de la réponse des TLR. En revanche, chez des souris déficientes pour *Nod2*, une augmentation de l'activation de NF- $\kappa$ B dépendante de TLR2 a été constatée après stimulation avec du MDP (Watanabe et al., 2004, 2008). Ainsi, ces données suggèrent que l'activation de NOD2 régule négativement la signalisation TLR et que ce contrôle négatif est perdu en présence d'une mutation de *NOD2*, entraînant une réponse inflammatoire accrue (**Figure 12**).

Par ailleurs, NOD2 joue un rôle essentiel dans la fonction barrière de l'épithélium intestinal. En effet, une étude a associé la présence de mutation dans le gène *NOD2* chez des parents du 1<sup>er</sup> degré à une augmentation de la perméabilité intestinale (Buhner et al., 2006). De plus, chez des patients atteints de la MC porteur d'une mutation de *NOD2*, une morphologie anormale des cellules de Paneth ainsi qu'une réduction de la sécrétion d' $\alpha$ -défensines ont été rapportées (Wehkamp et al., 2004; Bevins et al., 2009; VanDussen et al., 2014). Des travaux de 2009 ont confirmé l'implication de *NOD2* dans la synthèse de peptides anti-microbiens. Les auteurs ont montré que des cryptes intestinales isolées de l'iléon de souris déficientes pour *Nod2* présentent un plus faible pouvoir bactéricide, affectant la composition du microbiote (Petnicki-Ocwieja et al., 2009). Toutefois, de manière contradictoire, une autre étude n'a trouvé aucune association entre la diminution de la production des défensines et les mutations de *NOD2* dans des tissus iléaux de patients atteints de la MC (Simms et al., 2008). En outre, chez des souris *nod2*<sup>-/-</sup>, des altérations dans la formation des cellules calciformes, une diminution de leur nombre et de la sécrétion de mucines (Ramanan et al., 2014; Al Nabhani et al., 2016) ainsi qu'un développement anormal des plaques de Peyer, avec un excès des cellules M, caractérisé par une perméabilité paracellulaire accrue et une réponse immunitaire excessive ont été constatés, comparativement aux souris sauvages (**Figure 12**) (Barreau et al., 2007).

Puisque NOD2 joue un rôle important dans la reconnaissance des bactéries, son implication dans le maintien du microbiote intestinal a largement été étudié. Chez l'Homme, des études ont démontré des associations entre les mutations de *NOD2* et des altérations du microbiote, avec une augmentation des bactéries *Escherichia coli* et une réduction des bactéries *Clostridia* ou du genre *Firmicutes* (Frank et al., 2011; Li et al., 2012; Knights et al., 2014). De plus, l'observation de dysbiose chez des souris déficientes pour *Nod2* a aussi confirmé le rôle de NOD2 dans la régulation du microbiote intestinal (Petnicki-Ocwieja et al., 2009; Mondot et al., 2012; Ramanan et al., 2014; Al Nabhani et al., 2016; Aschard et al., 2019). Enfin, plus particulièrement, NOD2 est impliqué dans le contrôle des bactéries pathogènes telles que *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria monocytogenes*, *Citrobacter rodentium*, *E. coli* ou *Campylobacter jejuni*. En effet, la susceptibilité à l'infection dans des modèles murins déficients pour *Nod2* est augmentée ou diminuée selon le pathogène testé (Al Nabhani et al., 2017).





**FIGURE 12 : Rôle de NOD2 dans l'homéostasie intestinale et dans le contexte de la maladie de Crohn.**

**Homéostasie :** En condition homéostasique, NOD2 joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale *via* la production de peptides anti-microbiens par les cellules de Paneth et *via* la sécrétion de mucus par les cellules caliciformes. La stimulation de NOD2 avec du MDP active NF-κB. NOD2 régule négativement la signalisation impliquant le TLR2, limitant ainsi l'activation de NF-κB par TLR2. NOD2 est également impliqué dans l'autophagie car il recrute ATG16L1 au niveau du site d'entrée des bactéries, permettant l'élimination des bactéries par l'autophagie. **Maladie de Crohn :** Dans le cas de la MC, les mutations de *NOD2* sont associées à une diminution de la production d' $\alpha$ -défensines et de mucus, menant à une altération de l'intégrité de la barrière intestinale. La mutation de *NOD2* incapable de reconnaître le MDP n'active pas NF-κB (« perte de fonction »). Toutefois, la mutation de *NOD2* incapable de réguler négativement la signalisation TLR2 à la suite de la reconnaissance de peptidoglycane (PNG), mène à la sur-activation de NF-κB (« gain de fonction »). Cela entraîne une augmentation de l'expression de l'IL-12, IL-1 $\beta$ , et IFN- $\gamma$ , conduisant à des dommages des cellules épithéliales et au recrutement de cellules immunitaires au niveau du tissu enflammé. Les mutations de *NOD2* résultent également en une absence du recrutement d'ATG16L1 et donc, un défaut de l'autophagie. Adaptée de (de Bruyn and Vermeire, 2017).

Abréviations : CMH II : *complexe majeur d'histocompatibilité de classe II*, DAMP : *damaged-associated molecular pattern*, MDP : *muramyl dipeptide*, PAMP : *pathogen-associated molecular pattern*, PNG : *peptidoglycane*, TCR : *T-cell receptor*, Th1 : *lymphocyte T helper type 1*, TLR : *toll-like receptor*.



### I.4.1.2 Gènes impliqués dans l'autophagie

La macro-autophagie, communément appelée autophagie, est un processus cellulaire eucaryote conservé au cours de l'évolution. Il permet le maintien de l'homéostasie cellulaire en condition physiologique et de stress *via* la dégradation lysosomale d'éléments cytoplasmiques, tels que des organites cellulaires endommagés, des agrégats protéiques ou encore des pathogènes intracellulaires (Larabi et al., 2020a). Le processus autophagique sera entièrement détaillé dans le Chapitre 3 : Autophagie, de ce manuscrit.

Parmi les polymorphismes associés à la MC, plusieurs gènes impliqués dans l'autophagie ont été identifiés, tels que *ATG16L1*, *IRGM*, *ULK1* (*unc-51 like autophagy activating kinase 1*), *NDP52* (*nuclear dot protein 52*, également appelé *CALCOCO2*, *calcium binding and coiled-coil domain 2*) ou encore *LRRK2* (*leucine-rich repeat kinase 2*) (Henderson and Stevens, 2012; Larabi et al., 2020a). Les études fonctionnelles menées sur chacun des gènes seront développées dans le Chapitre 3 : Autophagie de ce manuscrit.

### I.4.1.3 Facteurs épigénétiques

L'épigénétique est définie comme l'étude des changements héréditaires mitotiques dans l'activité des gènes, sans modifier la séquence d'ADN. Au cours de la mitose, les marques épigénétiques sont transmises aux cellules filles, montrant la stabilité de l'épigénome. Toutefois, cet épigénome peut être modifié de façon dynamique dans le temps par des facteurs environnementaux (Ventham et al., 2013). Plusieurs études ont étayé l'implication des mécanismes épigénétiques, incluant les ARN non-codants, la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des protéines histones dans le diagnostic, le développement et/ou la chronicité de la MC. Ainsi, l'épigénétique met en lumière de nouvelles perspectives dans la compréhension de l'étiologie de la MC (Aleksandrova et al., 2017).

#### I.4.1.3.1 micro-ARN

Généralement composés de 18 à 23 nucléotides, les ARN non-codants tels que les miARN, inhibent la traduction en se liant aux régions 3'-UTR (*untranslated transcribed region*) des ARNm cibles. Diverses études ont révélé l'importance des ARN non-codants dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans de nombreux processus biologiques essentiels, comme la barrière intestinale, l'inflammation ou encore l'autophagie (Bartel, 2009; Pasquinelli, 2012; Ventham et al., 2013; Kalla et al., 2015; Jung et al., 2021). Une première étude a rapporté une altération du profil des miARN dans la muqueuse colique de patients atteints de la MC, comparativement à des individus sains (Fasseu et al., 2010). Depuis, plusieurs études se sont intéressées à l'expression des miARN chez des patients atteints de la MC, identifiant de nombreux miARN dérégulés (James et al., 2020). De manière intéressante, parmi les 190 miARN identifiés comme associés à la MC, 26 d'entre eux régulent spécifiquement l'expression de gènes codant des enzymes impliquées dans les modifications épigénétiques, les miARN hsa-miR-192-5p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-1, hsa-miR-101-3p et hsa-miR-375, étant par

exemple impliqués dans la régulation de l'expression des gènes *DNMT3A* (*DNA methyltransferase 3 $\alpha$* ) et *DNMT3B* (*DNA methyltransferase 3 $\beta$* ) qui contrôlent la méthylation de l'ADN (Fernández-Ponce et al., 2021).

#### I.4.1.3.2 Méthylation de l'ADN

La méthylation consiste à ajouter un groupement méthyle de façon covalente aux cytosines appartenant aux îlots « cytosine-guanine » dinucléotides (CpG, *cytosine-phosphate-guanine*) de l'ADN. Cette modification est associée à une répression transcriptionnelle, empêchant ainsi les facteurs de transcription de se fixer sur les régions promotrices cibles (Ventham et al., 2013).

Chez les patients atteints de la MC, des études ont décrit un profil de méthylation de l'ADN spécifique au sein de plusieurs types cellulaires (Adams et al., 2014; Sadler et al., 2016; Yim et al., 2020). En effet, il a été rapporté un profil de méthylation caractéristique chez les patients atteints de la MC ayant une atteinte iléale, comparativement à des individus sains, avec 1 117 sites différenciellement méthylés, dont 50 significativement (Nimmo et al., 2012; de Lange et al., 2017). Les sites différenciellement méthylés affectent notamment des gènes impliqués dans l'immunité innée et acquise, qui sont des voies essentielles contribuant à la pathogenèse de la MC (Nimmo et al., 2012). Il a également été mis en évidence des changements de méthylation de l'ADN au sein des cellules épithéliales intestinales, corrélant avec le nombre de rechutes et le recours aux biothérapies (Howell et al., 2018). Enfin, des travaux récents ont constaté 18 253 régions significativement différenciellement méthylées au sein de cellules adipeuses dérivées de cellules souches, entre des patients atteints de la MC et des sujets sains, indiquant une signature de méthylation de l'ADN spécifique chez les patients (Serena et al., 2020).

#### I.4.1.3.3 Modification des histones

Le nucléosome est la sous-unité de la chromatine comprenant 146 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones (2 H2A, 2 H2B, 2 H3 et 2 H4). Ce complexe est appelé l'euchromatine lorsqu'il est faiblement compacté et l'hétérochromatine quand, au contraire, cet assemblage est fortement compacté, limitant l'accès des facteurs de transcription à l'ADN. Ainsi, l'état de compaction de l'ADN autour des histones est un mécanisme de régulation de l'expression des gènes (Fogel et al., 2017). Les modifications post-traductionnelles des histones, en particulier l'acétylation, sont associées à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans les réponses inflammatoires.

Un niveau d'acétylation global plus élevé de l'histone H4 a été constaté dans des biopsies enflammées et dans des plaques de Peyer issues de patients atteints de la MC, comparativement à des tissus d'individus sains et des tissus non enflammés issus de patients, suggérant une association entre l'acétylation des histones et l'inflammation intestinale dans la MC. Dans deux modèles *in vivo* de colite, cette étude a également montré que l'histone H4 est significativement plus acétylée dans les tissus enflammés des animaux présentant une colite, comparé aux animaux contrôles (Tsaprouni et al., 2011). Paradoxalement, l'incubation d'inhibiteurs d'histone

désacétylase (HDAC) avec des cellules épithéliales murines et humaines a un effet protecteur et régénérateur, avec une diminution de la perméabilité membranaire et une augmentation de l'expression des protéines de jonctions serrées (Friedrich et al., 2019). Par ailleurs, une altération significative de la triméthylation de la lysine-4 sur l'histone H3 (H3K4me3) a été rapportée au sein de cellules épithéliales isolées de biopsies iléales chez des patients pédiatriques atteints de la MC, naïfs de traitements. Cette même étude a également montré une corrélation entre l'expression de ces gènes cibles et la sévérité de l'inflammation intestinale (Kelly et al., 2018). De plus, une étude récente a rapporté que les patients atteints de la MC colonisés par les bactéries AIEC (adherent-invasive *Escherichia coli*) présentent un niveau d'acétylation de l'histone H3 plus élevé, comparativement aux patients non colonisés par des Entérobactéries (Chervy et al., 2022). Grâce à des modèles *in vitro* et *in vivo*, cette étude a montré que l'expression de HDAC1 limite la colonisation de la muqueuse intestinale par les AIEC, tandis que l'expression de HDAC5 la favorise. D'une manière intéressante, les expressions de HDAC1 et de HDAC5 corrélaient, respectivement, négativement et positivement avec la quantité d'Entérobactéries associées à la muqueuse iléale des patients atteints de la MC. Enfin, cette étude a également observé une dérégulation de l'expression de HDAC1 et HDAC5 chez les patients porteurs d'AIEC comparativement aux patients non colonisés par des Entérobactéries (Chervy et al., 2022).

Pour conclure sur les facteurs génétiques, les études à l'échelle du génome ont permis d'identifier de nombreux *loci* de prédisposition à la MC. Des corrélations entre les mutations et les phénotypes iléaux de la MC ont également été établies pour plusieurs gènes. Concernant les facteurs épigénétiques, l'ensemble de ces travaux montre que les altérations épigénétiques existent chez les patients atteints de la MC, renforçant le fait qu'il ne faut pas négliger l'implication des facteurs épigénétiques dans la physiopathologie de la MC.

## I.4.2 Facteurs microbiens

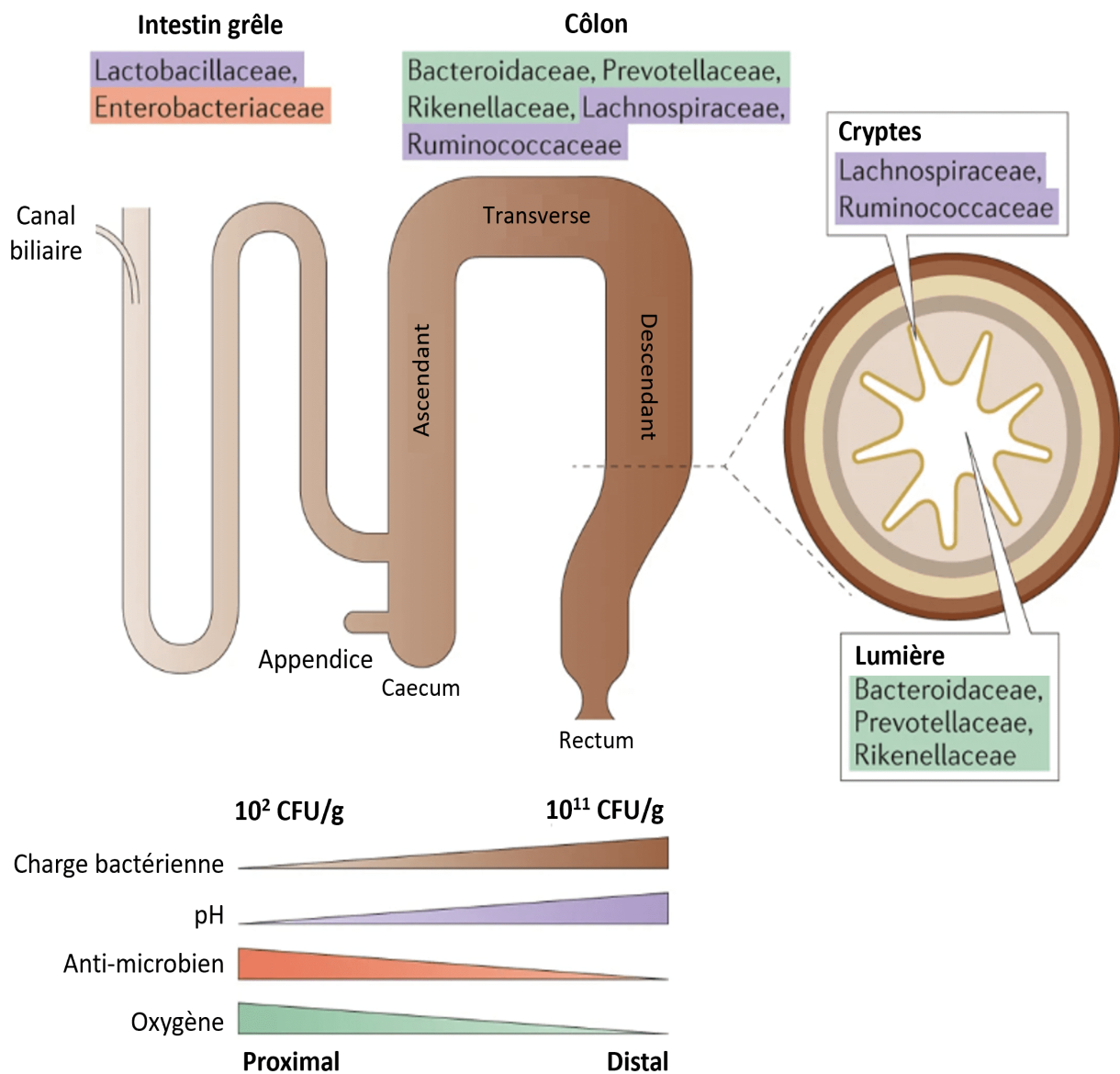
### I.4.2.1 Généralités sur le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est l'ensemble des micro-organismes qui peuplent le tractus digestif d'un individu. En effet, le tractus digestif héberge environ  $10^{12}$  micro-organismes vivant en symbiose avec l'hôte. Initialement estimé à 10 micro-organismes pour 1 cellule humaine (Cani, 2018), ce rapport a récemment été revu et serait plus proche d'un ratio de 1 : 1 (Walker and Hoyles, 2023). Considéré comme un organe à part entière, le microbiote intestinal est majoritairement composé de bactéries, mais aussi de champignons, d'archées et de virus d'eucaryotes et procaryotes (Sausset et al., 2020). Plus de mille espèces de bactéries résident dans le tractus digestif et il est estimé que le microbiome total contient environ 150 fois plus de gènes (métagénome) que celui de l'Homme (Prakash et al., 2011). Les bactéries intestinales appartiennent à quatre *phyla* principaux : Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobactéries et Actinobactéries. Ces bactéries augmentent graduellement en nombre et diversité le long des segments du tractus digestif, de l'estomac au côlon. En effet, le microbiote est le plus abondant dans le côlon, estimé à  $10^{11}$  bactéries/mL de contenu luminal, et le plus diversifié, avec de nombreuses

Phyla dominants dans l'intestin :

Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia

Familles prédominantes dans :



**FIGURE 13 : Distribution du microbiote bactérien le long du tractus digestif chez l'Homme.**

Les familles bactériennes dominantes (les couleurs correspondent aux embranchements) dans l'intestin grêle et le côlon reflètent les différences physiologiques existantes le long de l'intestin. En effet, un gradient d'oxygène, de peptides anti-microbiens (y compris les acides biliaires, sécrétés par le canal biliaire) et de pH, limite la densité bactérienne au sein de l'intestin grêle, tandis que le côlon présente une charge bactérienne élevée. Une coupe transversale du côlon montre les familles présentes dans la lumière intestinale et les cryptes. Adaptée de (Donaldson et al., 2016).

Abréviation : CFU : *colony-forming unit*.

espèces anaérobies strictes (Donaldson et al., 2016). Chez l'adulte sain, les phyla Firmicutes et Bacteroidetes dominent le microbiote intestinal (**Figure 13**) (Cani, 2018).

Le microbiote intestinal participe à l'ensemble des fonctions de l'intestin, qui lui fournit une niche écologique et garantit la disponibilité de certains nutriments. Il est nécessaire au développement et à la maturation du système immunitaire et sa tolérance vis-à-vis des micro-organismes commensaux (Round and Mazmanian, 2009; Honda and Littman, 2016). Par ailleurs, le microbiote contribue à la production de vitamines non synthétisables par l'hôte (vitamines K et B), la synthèse d'acides aminés ainsi que la bio-transformation d'acides biliaires et de différents substrats alimentaires en produits métabolisables et sources d'énergies pour l'hôte et le microbiote (Prakash et al., 2011). Un des exemples les plus connus est la production par le microbiote d'acides gras à chaînes courtes (AGCC) tels que le butyrate (source d'énergie majeure des cellules épithéliales), l'acétate (substrat primaire de la synthèse du cholestérol) et le propionate (réduit les niveaux de cholestérol), absorbés au niveau du caecum et du côlon (Hu et al., 2018a). Enfin, le microbiote assure des fonctions structurales et histologiques de l'épithélium intestinal, notamment en régulant la couche de mucus, la croissance et la différenciation des cellules épithéliales ainsi que le développement des cryptes et villosités intestinales (Prakash et al., 2011). Par conséquent, le microbiote intestinal humain est un écosystème complexe dont les interactions avec l'hôte forment un équilibre fragile, pouvant être rompu dans de nombreuses pathologies, y compris les MICI.

### I.4.2.2 Rôle du microbiote intestinal dans la MC

Le rôle du microbiote intestinal et de son déséquilibre, appelé dysbiose, dans l'étiologie de la MC a été confirmé par de nombreuses études *in vivo*. En effet, dans des modèles murins de colite induite chimiquement ou des modèles transgéniques développant spontanément une colite, les animaux élevés en condition axénique sont protégés de la maladie (Contractor et al., 1998; Matsumoto et al., 1998; Tlaskalová-Hogenová et al., 2005). De façon intéressante, il a été montré que les signes de la MC sont transférés aux animaux receveurs à la suite d'une transplantation du microbiote fécal (TMF) d'un patient atteint de la MC à des souris axéniques. La transplantation d'un microbiote simplifié associé à la MC ou la TMF d'un donneur atteint de la MC induit le développement et/ou l'aggravation de l'inflammation intestinale chez des souris receveuses axéniques (Eun et al., 2014; Nagao-Kitamoto et al., 2016; Britton et al., 2019). Enfin, la MC se localise préférentiellement au niveau de l'iléon et du côlon, segments du tractus digestif les plus colonisés par des bactéries, ce qui renforce l'implication du microbiote dans le développement de la MC.

### I.4.2.3 Dysbiose chez les patients atteints de la maladie de Crohn

Une dysbiose est une altération de la diversité et de la composition du microbiote intestinal, qu'elle soit microbienne, virale ou fongique. Plusieurs études ont constaté une dysbiose chez les patients atteints de la MC,

avec une diminution de l'abondance et des modifications du microbiote intestinal (Frank et al., 2007; Gevers et al., 2014; Pascal et al., 2017; Alam et al., 2020). La diversité du microbiote intestinal est réduite dans un tissu enflammé par rapport à un tissu non enflammé chez un même patient atteint de la MC (Sepehri et al., 2007). Enfin, une étude a montré que le microbiote intestinal des patients atteints de la MC est instable au cours du temps, comparativement à celui des individus sains (Seksik et al., 2003).

#### I.4.2.3.1 Microbiote fongique

Le rôle du microbiote fongique dans l'étiologie de la MC a été suggéré par la détection d'anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* dans le sérum des patients atteints de la MC (McKenzie et al., 1990; Vermeire et al., 2001; Halfvarson et al., 2005). Les taxa les plus représentés au sein du microbiote fongique sont les Ascomycètes et les Basidiomycètes. Dans ce contexte, plusieurs études ont constaté une augmentation du ratio Basidiomycètes/Ascomycètes chez les patients atteints de la MC (Mukhopadhyaya et al., 2015; Sokol et al., 2017; Limon et al., 2019). Plus spécifiquement, chez les patients atteints de la MC, des travaux ont révélé une réduction de *Saccharomyces cerevisiae* ainsi qu'une plus forte abondance de *Candida albicans*, *C. tropicalis* et d'autres taxa de *Candida*, supposant un rôle de *Candida* dans la pathogenèse de la MC (Li et al., 2014; Chehoud et al., 2015; Liguori et al., 2016; Li et al., 2019).

De plus, une augmentation de l'abondance de *Malassezia restricta*, liée à la présence d'un polymorphisme dans le gène *CARD9*, a été observée chez les patients atteints de la MC, comparé à des sujets sains (Limon et al., 2019). Enfin, il a été montré des corrélations entre les modifications du microbiote bactérien et fongique, supposant l'existence d'altérations inter-règnes spécifiques à la MC (Hoarau et al., 2016; Sokol et al., 2017). Dans ce contexte, une étude a rapporté que la présence de *S. cerevisiae* est associée à un environnement intestinal favorable pour le développement de bactéries bénéfiques telles que *Faecalibacterium*, tandis que l'absence de levures ou la présence d'autres espèces de levures est associée à la présence de bactéries potentiellement pathogènes (Di Paola et al., 2020).

#### I.4.2.3.2 Microbiote viral

Le microbiote viral est principalement composé des bactériophages *Caudovirales* et *Microviridae* (Reyes et al., 2010; Minot et al., 2013). Les patients atteints de la MC présentent une augmentation de la richesse en bactériophages, avec une expansion significative des *Caudovirales* couplée à une diminution de la richesse et diversité bactérienne, comparé à des sujets contrôles (Pérez-Brocal et al., 2013; Norman et al., 2015). Une étude a démontré que les patients atteints de la MC présentent une altération de la composition du virome, le core de phages virulents étant remplacé par des bactériophages dits tempérés (phages s'intégrant au génome bactérien lors du cycle lysogénique) (Clooney et al., 2019). En effet, plus de *Caudovirales* ont été observés dans les tissus, les lavages intestinaux et les selles de patients pédiatriques atteints de la MC, comparativement



**TABEAU 1 : Principaux changements du microbiote bactérien associés à la maladie de Crohn.**

Les modifications au niveau des genres et des espèces sont observées chez les patients atteints de la MC, comparativement aux patients contrôles. Les espèces les plus altérées se trouvent dans l'embranchement des Firmicutes. Les flèches descendantes (en bleu) indiquent une diminution, les flèches ascendantes (en rouge) montrent une augmentation et les doubles flèches (en jaune) indiquent des résultats conflictuels selon les études, montrant une augmentation ou une diminution. Adapté de (Wu et al., 2023).

Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	<i>B. fragilis</i> ↑
				<i>Phocaeicola</i>	<i>P. vulgatus</i> ↑
				<i>Prevotella</i>	
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> ↑
				<i>Actinobacillus</i>	
				<i>Desulfovibrio</i>	
Actinobacteria	Actinomycetia	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium</i>	
				<i>Eubacterium</i>	<i>E. rectale</i> ↓
				<i>Blautia</i>	<i>B. obeum</i> ↓ <i>B. coccoides</i> ↓
Firmicutes	Clostridia	Eubacteriales	Lachnospiraceae	<i>Roseburia</i>	<i>R. intestinalis</i> ↓ <i>R. hominis</i> ↓
				<i>Mediterraneibacter</i>	<i>R. gnavus</i> ↓
				<i>Faecalibacterium</i>	<i>F. prausnitzii</i> ↓
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Akkermansiaceae	<i>Lactobacillus</i>	
				<i>Enterococcus</i>	
				<i>Akkermansia</i>	<i>A. muciniphila</i> ↓
Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	<i>Fusobacterium</i>	<i>F. varium</i> ↑ <i>F. nucleatum</i> ↓

à des sujets sains (Wagner et al., 2013; Fernandes et al., 2019). Par ailleurs, des phages spécifiques de *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Lactococcus* ont été identifiés dans les selles de patients japonais atteints de la MC (Imai et al., 2022). Ces modifications du virome sont associées à des perturbations du microbiote intestinal, avec une réduction de *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* et *Roseburia* ainsi qu'une augmentation des *Enterobacteriaceae*, indiquant une fois de plus des altérations inter-règnes (Imai et al., 2022).

Certains virus eucaryotes pourraient également participer au développement de la MC *via* l'aggravation de l'inflammation intestinale. En effet, une abondance plus importante de *Hepeviridae* et un niveau plus faible de *Virgaviridae* ont été constatés au niveau des muqueuses de patients atteints de la MC n'ayant reçu aucun traitement par rapport aux individus contrôles (Ungaro et al., 2019). De la même manière, des études utilisant des modèles murins transgéniques ont montré que l'infection avec le virus eucaryote *Norovirus* contribue au développement de l'inflammation intestinale (Cadwell et al., 2010; Basic et al., 2014).

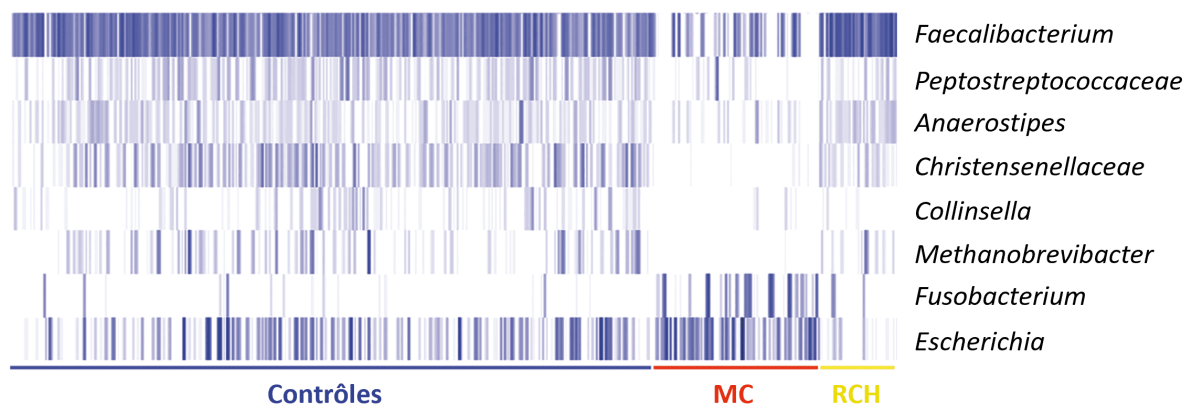
### I.4.2.3.3 Microbiote bactérien

Chez les patients atteints de la MC, l'abondance et la diversité de la population bactérienne sont altérées de façon délétère dans les fèces ou associées à la muqueuse (Frank et al., 2007; Png et al., 2010; Khanna and Raffals, 2017). Globalement, il en résulte une abondance plus importante des Protéobactéries et Bacteroidetes, accompagnée d'une plus faible proportion de certains Firmicutes (Frank et al., 2007; Walker et al., 2011; Wright et al., 2015).

La réduction du phylum Firmicutes est majoritairement caractérisée par une diminution l'abondance de *Roseburia inulinivorans* ou de *Blautia faecis*, ainsi que de *Faecalibacterium prausnitzii*, l'une des espèces productrices de butyrate les plus abondantes, connue pour ses effets protecteurs et anti-inflammatoires (Joossens et al., 2011; Fujimoto et al., 2013; Takahashi et al., 2016). En effet, 43 espèces de Firmicutes ont été identifiées chez des sujets sains contre seulement 13 chez des patients atteints de la MC, avec une diminution de *F. prausnitzii* (Shen et al., 2017). Par ailleurs, une réduction de *F. prausnitzii* au niveau iléal est principalement retrouvée chez les patients ayant une atteinte iléale de la maladie (Lopez-Siles et al., 2014) et est associée à un risque élevé de récurrence endoscopique 6 mois post-opératoire (Sokol et al., 2008). Enfin, une méta-analyse rassemblant 231 patients a montré que l'abondance de *F. prausnitzii* est réduite chez les patients atteints de la MC en phase active par rapport aux patients en rémission, indiquant que *F. prausnitzii* pourrait être un marqueur de l'activité de la MC (**Tableau 1**) (Prosberg et al., 2016).

En parallèle, il a été constaté une augmentation de l'abondance des Protéobactéries, représentant la flore dominante chez 30 % des patients atteints de la MC (Kotlowski et al., 2007; Sasaki et al., 2007; Morgan et al., 2012). L'expansion des Protéobactéries est majoritairement caractérisée par une augmentation des *E. coli*, en particulier des AIEC (Darfeuille-Michaud et al., 1998, 2004), qui sont des bactéries associées à, ou ayant enva-





**FIGURE 14 : Signature bactérienne de la maladie de Crohn basée sur 8 genres bactériens.**

Validation du potentiel discriminant entre la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) de l'association de 8 genres bactériens dans une cohorte de 2 045 échantillons de selles, incluant 1 247 sujets contrôles, 339 patients atteints de la MC et 158 patients atteints de la RCH. Chaque barre bleue représente la présence du groupe bactérien pour chaque sujet avec le gradient de couleurs : blanc = absent, bleu clair = faible abondance relative et bleu foncé = forte abondance relative. La MC se caractérise par un profil d'abondance pour ces 8 genres bactériens différents par rapport à la RCH et aux individus contrôles. Adaptée de (Pascal et al., 2017).

hies la muqueuse iléale et colique, retrouvées chez 21 à 62 % des patients atteints de la MC contre 0 à 19 % des sujets contrôles (Darfeuille-Michaud et al., 1998, 2004; Baumgart et al., 2007; Martinez-Medina et al., 2009b; Raso et al., 2011). Une étude clinique récente a rapporté une réduction des Protéobactéries après 6 mois de traitement avec l'Adalimumab (anti-TNF- $\alpha$ ), seulement chez les patients atteints de la MC répondeurs (Ribaldone et al., 2019). Par ailleurs, d'autres espèces bactériennes, connues pour leur rôle néfaste dans l'homéostasie intestinale, sont également retrouvées de manière plus importante chez les patients atteints de la MC, telles que *Ruminococcus torques* et *Ruminococcus gnavus* (Png et al., 2010; Joossens et al., 2011), *Bacteroides fragilis*, *L. monocytogenes*, *Mycobacterium avium paratuberculosis*, *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Shigella*, *Klebsiella* ou encore *Salmonella* (De Hertogh et al., 2008; Azimi et al., 2018; Khan et al., 2019). Certains de ces micro-organismes ont été proposés comme micro-organismes potentiellement impliqués dans le développement de la MC (De Hertogh et al., 2008). Plus particulièrement, *Ruminococcus gnavus* est une bactérie mucolytique, c'est-à-dire capable de dégrader le mucus, et induit la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  par les cellules dendritiques (Henke et al., 2019). Son expansion pourrait donc expliquer le fait que davantage de bactéries sont localisées dans le mucus des patients atteints de la MC (Schultsz et al., 1999; Png et al., 2010). À l'inverse, *Akkermansia muciniphila*, une autre bactérie mucolytique, est diminuée chez les patients atteints de la MC, comparativement aux sujets sains (Png et al., 2010). Plus récemment, *Proteus mirabilis*, un potentiel pathobionte, a été corrélé positivement avec le score d'activité de la MC et associé à la pathogenèse en activant des voies pro-inflammatoires chez des souris axéniques. La prévalence et l'abondance de *P. mirabilis* sont également plus élevées dans les selles et dans les muqueuses de patients atteints de la MC, que chez des sujets contrôles (Zhang et al., 2021). Enfin, une étude récente a rapporté une association entre des souches de *Klebsiella pneumoniae* et la sévérité de la MC. Il a été révélé que *K. pneumoniae* est significativement enrichie dans les selles de patients atteints de la MC en phase active par rapport aux patients en phase de rémission. De plus, le transfert de souches de *K. pneumoniae* isolées de patients atteints de la MC à des souris *il10<sup>-/-</sup>* exacerbe l'inflammation intestinale (**Tableau 1**) (Federici et al., 2022).

De façon intéressante, Pascal et co-auteurs ont suggéré une signature microbienne qui permettrait de détecter la MC : une diminution de l'abondance des bactéries *Peptostreptococcaceae*, *Faecalibacterium*, *Methanobrevibacter*, *Anaerostipes*, *Collinsella* et *Christensenellaceae*, couplée à une augmentation de l'abondance de *Escherichia* et *Fusobacterium* (**Figure 14**) (Pascal et al., 2017). Plus récemment, une étude a montré qu'une composition spécifique du microbiote iléal lors de la chirurgie pouvait être prédictif de la récurrence endoscopique (Sokol et al., 2020a). Ainsi, des signatures microbiennes spécifiques pourraient être utilisées pour aider à diagnostiquer la MC, en particulier si elles sont systématiquement présentes à des niveaux plus élevés chez les patients que chez les témoins.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que les altérations du microbiote intestinal induisent également des modifications métaboliques. En effet, comparé aux individus sains, 12 % des voies métaboliques sont affectées chez les patients atteints de MICI (Morgan et al., 2012). Les travaux actuels rapportent une réduction de la production d'acides aminés, d'AGCC et d'acides biliaires secondaires accompagnée d'une augmentation du stress oxydant, du transport des acides aminés et du sulfate ainsi que du système de sécrétion de type III (T3SS, *type 3 secretion system*) et la sécrétion de toxine chez les patients atteints de MICI (Kostic et al., 2014; Zuo and Ng, 2018; Li et al., 2022). Par conséquent, il est essentiel d'étudier le métabolome associé au microbiote intestinal chez les patients atteints de la MC afin de mieux comprendre la maladie.

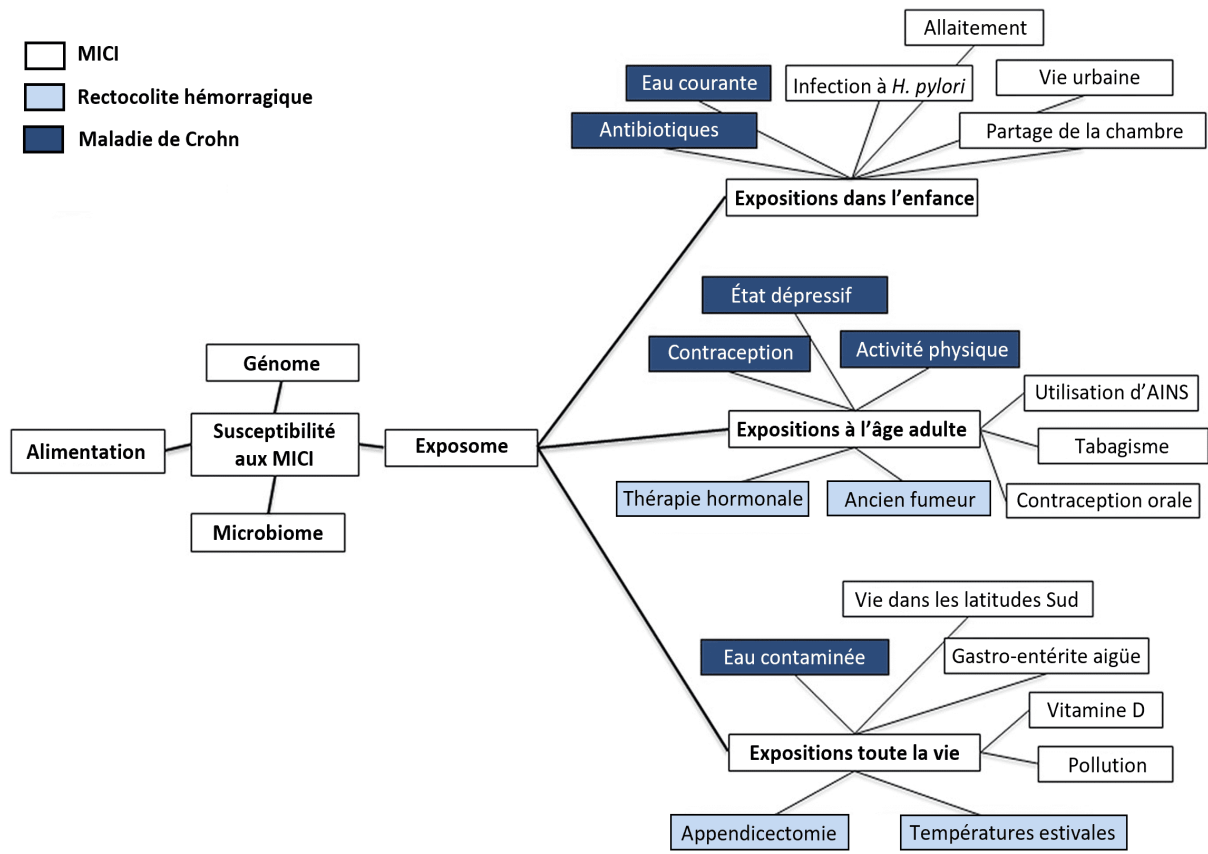
Enfin, les similitudes entre la symptomatologie à la suite d'une infection par des bactéries pathogènes appartenant aux espèces *Mycobacterium*, *Helicobacter*, *Yersinia*, *Listeria*, *Bacteroides*, *Clostridioides* ou encore *Campylobacter* et celle observée dans les MICI, laissent penser qu'un déclencheur pathogène pourrait être à l'origine de l'apparition des MICI (Bosca-Watts et al., 2015).

### **- *Yersinia***

Malgré des études conflictuelles, les espèces du genre *Yersinia* pourraient contribuer à l'apparition et à la persistance de l'inflammation intestinale chez les patients atteints de la MC (Hugot et al., 2003). La MC et la Yersiniose sont des maladies qui partagent des aspects communs, tels qu'une inflammation intestinale concentrée autour de l'épithélium associé au follicule et pouvant progresser en ulcères plus diffus et plus profonds (Grützkau et al., 1990; Fujimura et al., 1996). Chez les patients atteints de la MC, mais aussi chez des sujets contrôles, diverses études ont révélé la présence d'espèces de *Yersinia* au niveau intestinal (Lamps et al., 2003; Knösel et al., 2009; Leu et al., 2013). L'étude la plus récente s'intéressant à la présence de *Yersinia* dans 470 échantillons, a montré sa présence dans 7,6 % des échantillons iléaux de patients atteints de la MC contre 7,9 % des échantillons contrôles (Le Baut et al., 2018). Ainsi, chez l'Homme, les espèces de *Yersinia* sont habituellement peu présentes au niveau iléal, que ce soit chez des sujets malades ou sains. Bien que NOD2 joue un rôle critique dans la réponse de l'hôte lors de l'infection par *Y. pseudotuberculosis*, d'autres études sont nécessaires pour déterminer si ce genre bactérien pourrait être impliqué dans la MC (Meinzer et al., 2008, 2012; Al Nabhani et al., 2017).

### **- *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis***

*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) est également suspectée dans la pathogénèse de la MC. En effet, dans le sang périphérique, les granulomes et les biopsies, l'ADN de MAP a été plus fréquemment retrouvée chez les patients atteints de la MC que chez les individus sains (Autschbach et al., 2005; Nazareth et al., 2015; Mintz and Lukin, 2023). Ici encore, les données sont contradictoires puisque certaines méta-analyses ont rapporté l'association entre MAP et la MC (Feller et al., 2007; Abubakar et al., 2008), ce qui n'est pas montré par une autre étude (Naser et al., 2014). En clinique, des études ont démontré l'administration



**FIGURE 15 : Résumé des facteurs environnementaux impliqués dans les MICI.**

L'exposome représente l'ensemble des facteurs environnementaux auxquels un individu est exposé de la période néo-natale et au cours de sa vie, pouvant influencer le développement d'une MICI. Les facteurs environnementaux représentés sur la figure peuvent être protecteurs ou à risque dans le développement d'une MICI. Adaptée de (van der Sloot et al., 2017).

Abréviation : AINS : *anti-inflammatoires non stéroïdiens*.

de nitroimidazoles ou macrolides ainsi qu'une combinaison d'antibiotiques anti-mycobactéries (Feller et al., 2010; Khan et al., 2011) ou l'administration en combinaison de rifabutine, clofazimine et clarithromycine (Borody et al., 2002; Shafran et al., 2002; Borody et al., 2007) induiraient une rémission clinique et histologique chez les patients ayant une MC active. Toutefois, dans une autre étude, bien que 66 % des patients étaient en rémission après 16 semaines de traitement, aucune différence concernant la récurrence n'a été observée entre le groupe traité et le groupe placebo après 2 ans de traitement (Selby et al., 2007). Toutes ces données remettent donc en question le rôle de MAP dans l'étiologie de la MC. Enfin, récemment, une nouvelle thérapie RHB-104 (RedHill Biopharma®) combinant trois antibiotiques (rifabutine, clofazimine et clarithromycine) a montré des résultats encourageants *in vitro* (Alcedo et al., 2016), et est en cours d'étude chez des patients ayant une MC modérée à sévère. Les résultats semblent prometteurs puisque davantage de patients sont en rémission clinique après 16 et 24 semaines de traitement, comparativement au groupe placebo (Savarino et al., 2019; Honap et al., 2021). Toutefois, il est nécessaire de garder en tête que ces antibiotiques destinés à éliminer les mycobactéries, ciblent aussi d'autres espèces bactériennes du microbiote intestinal. Par conséquent, ils pourraient éliminer des espèces bactériennes néfastes, conduisant à une amélioration des symptômes dans l'étiologie de la MC, sans pour autant valider le rôle causal de MAP (Mintz and Lukin, 2023).

### - AIEC, adherent-invasive *Escherichia coli*

De nombreuses études ont démontré que les bactéries AIEC pourraient contribuer au développement, au maintien et/ou l'aggravation de la MC. L'implication des AIEC dans la MC sera détaillée dans le Chapitre 2 : AIEC, de ce manuscrit.

Par conséquent, tous ces travaux s'intéressant au rôle du microbiote intestinal dans la MC démontrent qu'il ne s'agit pas d'une maladie infectieuse à proprement parler. En effet, aucun micro-organisme pathogène n'est spécifiquement associé à la MC. L'implication des facteurs microbiens est complexe et implique des bactéries pathobiontes telles que les AIEC. Ces bactéries n'impactent pas négativement l'hôte en condition homéostasique, mais vont tirer profit d'une modification de l'environnement intestinal, pour induire/exacerber l'inflammation intestinale.

### I.4.3 Facteurs environnementaux

Plusieurs études épidémiologiques soutiennent le rôle des facteurs environnementaux dans l'étiologie de la MC (**Figure 15**) : (i) une augmentation de l'incidence de la MC dans des pays nouvellement industrialisés ayant adopté un mode de vie occidental (alimentation riche en sucres, en gras et pauvre en fibres) (Molodecky et al., 2012; Chen et al., 2019), (ii) une augmentation de l'incidence de la MC en une ou deux générations chez les migrants ayant quitté une région avec une faible prévalence de la MC pour rejoindre une région avec une forte prévalence (Tsironi et al., 2004; Kaplan and Ng, 2016; Ng et al., 2017; Fiorino et al., 2021). De plus, le

taux de jumeaux monozygotes où les deux individus sont atteints de MICI n'est que de 20 à 50 %, montrant que des facteurs environnementaux sont impliqués dans le développement de la MC (Thompson et al., 1996; Orholm et al., 2000; Halfvarson et al., 2003).

### I.4.3.1 Tabac

Le tabagisme est le premier facteur environnemental à avoir été identifié et associé à la MC (Mahid et al., 2006; Hlavaty et al., 2013). En effet, le tabagisme multiplie par deux le risque de développer la MC par rapport aux non-fumeurs et augmente de façon dose-dépendante le risque de poussées, de complications intestinales, d'hospitalisation, de recours aux corticoïdes et à la chirurgie ainsi que la récurrence post-opératoire chez les patients atteints de la MC (Sutherland et al., 1990; Picco and Bayless, 2003; Cosnes, 2010; To et al., 2016; Underner et al., 2016). L'exposition au tabagisme *in utero* et/ou durant l'enfance augmenterait le risque d'hospitalisation dans les 3 ans qui suivent le diagnostic (Lindoso et al., 2018). En outre, plusieurs travaux ont montré que le tabagisme favorise la progression de la maladie d'un phénotype inflammatoire (B1) vers un phénotype sténosant/pénétrant (B2/B3) (Lakatos et al., 2013; Nunes et al., 2013). La baisse de la fréquence du tabagisme n'affecte pas les signes cliniques, mais les patients qui arrêtent de fumer pendant plus d'un an présentent une maladie moins sévère que ceux n'ayant pas arrêté (Cosnes et al., 2001; Seksik et al., 2009; Higuchi et al., 2012). Le mécanisme privilégié serait lié à des altérations du microbiote intestinal et du système immunitaire induits par le tabagisme (Verschuere et al., 2011; Bergeron et al., 2012). En effet, une réduction de la diversité microbienne associée à une diminution de l'espèce *F. prausnitzii* ainsi qu'une augmentation de l'espèce *Bacteroides-Prevotella* ont été constatées chez les fumeurs, comparé aux non-fumeurs (Benjamin et al., 2012; Shanahan et al., 2018). Enfin, une étude plus récente a rapporté un lien entre le tabagisme et le variant à risque *ATG16L1<sup>T300A</sup>* dans l'altération de la fonction des cellules de Paneth chez les patients atteints de la MC ainsi que dans un modèle murin exprimant cette mutation (Liu et al., 2018c).

### I.4.3.2 Régime alimentaire

#### I.4.3.2.1 Régime alimentaire occidental

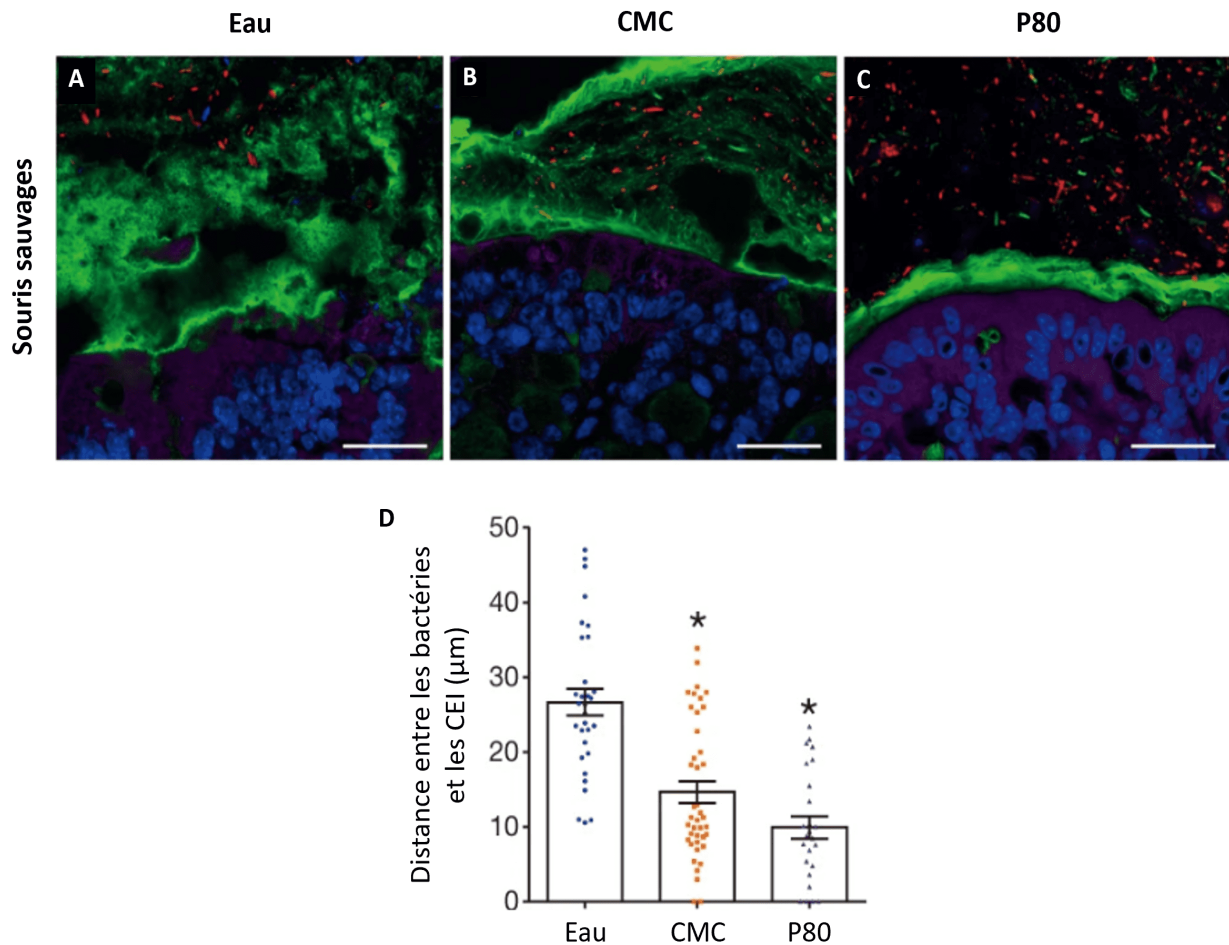
Le régime alimentaire est l'un des principaux facteurs environnementaux impliqués dans l'étiologie de la MC, et plus particulièrement, la consommation d'un régime alimentaire de type occidental, appelé « *Western diet* ». Riche en graisses, en sucres, en acides gras polyinsaturés n-6, en protéines animales et appauvri en fibres, ce régime favorise le développement de la MC (Chiba et al., 2019; Lo et al., 2020; Gill et al., 2022). En effet, une étude récente a démontré que ce type de régime est associé à un risque accru de développer la MC (Peters et al., 2022). Au contraire, grâce à leurs fibres, les fruits et les légumes jouent un rôle protecteur dans la survenue de la maladie. Une étude prospective a rapporté que la consommation de fibres (en particulier issues

de fruits) sur le long terme est associée à un moindre risque de développer la MC (Ananthakrishnan et al., 2013). Ces effets s'expliquent par la capacité des bactéries du microbiote intestinal à métaboliser les fibres, conduisant à la production d'AGCC, connus pour leurs effets anti-inflammatoires et protecteurs sur la barrière intestinale (Kelly et al., 2015; Zhang et al., 2022b), réduisant la translocation des *E. coli* à travers les plaques de Peyer (Roberts et al., 2010).

De plus, la consommation d'un régime de type occidental augmente la perméabilité intestinale, induit des altérations dans la composition du microbiote intestinal et favorise le développement d'une inflammation intestinale à bas bruit, ce qui expliquerait l'impact négatif de ce régime sur le développement de la MC (Christ et al., 2019; Rohr et al., 2020; Malesza et al., 2021). Une étude s'est intéressée à l'influence d'un changement de mode de vie et de régime alimentaire sur le microbiote intestinal. En effet, des individus originaires d'un pays non occidental (Thaïlande) ayant migré vers les États-Unis présentent un microbiote fonctionnellement altéré, avec une diversité plus faible et une substitution des souches *Prevotella* par des souches *Bacteroides*, comparativement aux individus vivant en Thaïlande (Vangay et al., 2018). De la même manière, une autre étude a révélé que le microbiote intestinal d'enfants africains, dont le régime est en majorité végétarien et riche en fibres, est enrichi en bactéries du genre *Prevotella* et *Xylanibacter*, comparativement au microbiote d'enfants européens consommant un régime occidental, qui est enrichi en *Enterobacteriaceae* (De Filippo et al., 2010). Enfin, le microbiote des individus consommant un régime riche en protéines animales présente une diminution des espèces appartenant aux Firmicutes capables de métaboliser les fibres, comparativement au microbiote des personnes consommant un régime riche en fibres (David et al., 2014).

L'impact d'un régime enrichi en sucres et en graisses (HF/HS, *high fat/high sugar*) sur la composition du microbiote intestinal a également été démontré dans différents modèles animaux. En effet, de nombreuses études ont montré qu'une modification du microbiote intestinal, avec une hausse du ratio Firmicutes/Bacteroidetes et des Protéobactéries chez des animaux ayant suivi un régime HF/HS, engendre une légère inflammation intestinale accompagnée d'une augmentation de la perméabilité intestinale et de certains troubles métaboliques (Hildebrandt et al., 2009; Turnbaugh et al., 2009; Johnson et al., 2015; Bisanz et al., 2019; Singh et al., 2020).

De façon similaire, d'autres études ont rapporté qu'un régime HF/HS induit une augmentation de la perméabilité intestinale caractérisée par une diminution de l'expression de la protéine occludine, ce qui entraîne une inflammation ou l'exacerbe dans un modèle murin présentant une iléite (Kim et al., 2012; Gruber et al., 2013). En plus des altérations microbiennes, ce régime pourrait perturber l'immunité de l'hôte *via* l'augmentation de la perméabilité intestinale, la diminution du niveau de lymphocytes Treg au sein du côlon et une augmentation des marqueurs pro-inflammatoires (Levine et al., 2018; Schreiner et al., 2020). En effet, l'apport accru en graisses saturées engendre une augmentation des réponses inflammatoires médiées par les lymphocytes Th1 chez des animaux déficients pour l'*Il-10*, favorisant le développement d'une colite.



**FIGURE 16 : Impact des émulsifiants alimentaires sur la localisation du microbiote intestinal.**

Des souris de type sauvage ont été exposées à de l'eau ou de l'eau contenant 1,0 % de CMC (*carboxymethylcellulose*) ou de P80 (*polysorbate 80*) pendant 12 semaines. (A-C) Analyse par microscopie confocale de la localisation du microbiote, avec le mucus marqué par la protéine MUC2 (en vert), les bactéries (en rouge) et l'ADN (en bleu) - échelle : 20 µm. (D) Distance entre les bactéries et les cellules épithéliales intestinales (CEI) par condition. Les clichés de microscopie montrent (A) qu'en situation physiologique les bactéries sont à distance de l'épithélium intestinal (environ 25 µm). Toutefois, chez les souris sauvages ayant reçu (B) du CMC ou (C) du P80, une réduction de la distance entre les bactéries et l'épithélium d'environ 50 % est observée (D). Cet empiètement du microbiote intestinal dans le mucus corrèle avec une réduction de l'épaisseur de la couche de mucus. Adaptée de (Chassaing et al., 2015b).



Cet effet s'expliquerait par une modification de la composition en acides biliaires de l'hôte, entraînant une plus grande disponibilité du sulfate utilisable par le pathobionte *Bilophila wadsworthi* (Devkota et al., 2012; Sartor, 2012). De plus, la consommation d'un régime HF/HS par les souris CEABAC10 (*carcinoembryonic antigen bacterial artificial chromosome 10*), un modèle murin de MC, réduit l'épaisseur de la couche de mucus, augmente la perméabilité intestinale et engendre une dysbiose caractérisée par une hausse de la population d'*E. coli* et une baisse de la production d'AGCC. En outre, ce régime favorise la colonisation intestinale par les AIEC et *L. monocytogenes* de façon microbiote-dépendante (Martinez-Medina et al., 2014; Agus et al., 2016; Las Heras et al., 2019). Enfin, les changements du microbiote intestinal engendrés par un régime de type occidental affectent également la fonction des cellules de Paneth avec une diminution de la sécrétion de peptides anti-microbiens, diminuent l'épaisseur de la couche de mucus, favorisant ainsi le passage des bactéries (Guo et al., 2017; Schroeder et al., 2018; Liu et al., 2021b).

Chez des souris colonisées par un microbiote humain, un régime appauvri en fibres facilite le développement des bactéries qui dégradent le mucus, entraînant la dégradation de la couche protectrice de mucus et augmentant la susceptibilité à l'infection par des pathogènes (Desai et al., 2016). Par conséquent, des interventions nutritionnelles, avec la mise en place d'un régime individualisé, pourraient être bénéfiques pour la prise en charge des patients atteints de la MC. Dans ce cadre, l'ESPEN (*european society for clinical nutrition and metabolism*) de 2019 recommande une alimentation riche en fibres et acides gras oméga 3 et pauvre en oméga 6 dans la prévention de la MC (Jaramillo et al., 2023).

### I.4.3.2.2 Additifs alimentaires

La consommation de produits transformés, voire ultra-transformés, présents dans le régime de type occidental, est associée à un risque de développer la MC (Narula et al., 2021). En effet, ces produits contiennent de multiples additifs alimentaires, tels que les émulsifiants ou encore la maltodextrine, dont la consommation a été corrélée positivement à l'incidence de la MC en Amérique du Nord, en Europe et au Japon (Roberts et al., 2013). Plus particulièrement, Chassaing et co-auteurs se sont intéressés à deux émulsifiants alimentaires couramment utilisés dans les produits transformés afin d'améliorer la texture et prolonger leur durée de conservation : le carboxyméthylcellulose (CMC) et le polysorbate 80 (P80) (Chassaing et al., 2017, 2022; Naimi et al., 2021). Il a été démontré que l'administration de CMC ou de P80 à des souris entraîne une invasion de la couche de mucus par des bactéries du microbiote intestinal ainsi que des altérations de la composition du microbiote associées à une augmentation de son potentiel pro-inflammatoire (**Figure 16**). Ces animaux développent également une inflammation intestinale, de bas grade chez des souris sauvages, ou sévère chez des souris génétiquement prédisposées (Chassaing et al., 2015b; Viennois and Chassaing, 2018). Chez l'Homme, un essai clinique récent a comparé le microbiote intestinal d'individus sains ayant suivi un régime alimentaire dépourvu d'émulsifiants à celui d'individus ayant suivi un régime enrichi en CMC (15 g/jour) pendant 11 jours. Comparativement aux

individus contrôles, la consommation de CMC entraîne une perturbation de la composition du microbiote intestinal, ainsi que des modifications du métabolome fécal avec une diminution des métabolites bénéfiques pour la santé comme les acides aminés libres et les AGCC (Chassaing et al., 2022). Enfin, de façon intéressante, il a été rapporté que le CMC et le P80 impactent directement le comportement des AIEC. L'exposition des bactéries aux émulsifiants induit l'expression de gènes de virulence et augmente leur motilité ainsi que leur capacité d'adhésion à des cellules épithéliales en culture (Viennois et al., 2020).

L'impact négatif de la maltodextrine, un épaississant alimentaire, sur la défense anti-microbienne dans l'intestin est bien connu (Nickerson et al., 2015). Effectivement, dans un modèle murin il a été montré que l'administration de maltodextrine augmente le stress du réticulum endoplasmique dans les cellules épithéliales intestinales (CEI), ce qui entraîne une diminution de la production de mucus et augmente la susceptibilité à la colite (Laudisi et al., 2019). *In vitro*, l'exposition des AIEC à la maltodextrine entraîne l'expression des pili de type I, favorisant la formation de biofilm par la souche de référence AIEC LF82 (Lille-France 82) et l'adhésion bactérienne aux CEI en culture (Nickerson and McDonald, 2012). Par conséquent, la consommation d'additifs alimentaires induit des altérations du microbiote intestinal et de la couche de mucus, favorisant le développement d'un environnement intestinal pro-inflammatoire et la colonisation intestinale par des espèces bactériennes pro-inflammatoires.

Enfin, la liste n'est pas exhaustive, d'autres additifs ou contaminants alimentaires tels que les microparticules, les traces de détergents et les carraghénanes, induiraient la réduction de l'épaisseur de la couche de mucus permettant la colonisation de la muqueuse intestinale par les bactéries et l'induction d'une inflammation chronique (Swidsinski et al., 2009; Chassaing et al., 2015b). En modèle murin de colite induite, l'ingestion de dioxyde de titane (Ruiz et al., 2017), de fer (Chua et al., 2013), d'aluminium (Pineton de Chambrun et al., 2014), ou encore de zinc a également été incriminée dans l'aggravation de l'inflammation intestinale.

### I.4.3.3 Autres facteurs environnementaux

#### I.4.3.3.1 Sédentarité

Le rôle de l'activité physique dans la prévention et l'amélioration du pronostic des patients atteints de MICI a été montré (Chen et al., 2019). Généralement, les patients atteints de la MC sont physiquement moins actifs que la population globale (van Langenberg et al., 2015; Gatt et al., 2019). Par rapport aux femmes sédentaires, une étude a révélé que le risque de développer la MC diminue de 44 % chez les femmes actives (Khalili et al., 2013). La pratique d'une activité physique serait bénéfique pour les patients atteints de la MC car elle améliore la santé mentale, la qualité de vie, le statut nutritionnel et surtout, elle réduit l'inflammation (Bilski et al., 2014; Khalafi and Symonds, 2020). Effectivement, un effet anti-inflammatoire de l'activité physique a été constaté dans des modèles *in vivo* d'inflammation (Saxena et al., 2012; Bilski et al., 2015; Mazur-Bialy et al., 2017). Chez les souris CEABAC10 infectées par les AIEC, l'activité physique spontanée induit l'expression des pro-

téines de jonctions serrées, la production d'AGCC et module de façon positive le microbiote intestinal, diminuant ainsi l'inflammation intestinale (Maillard et al., 2019). Récemment, une étude a rapporté que l'association de l'activité physique avec de l'huile de lin a des effets positifs sur la composition du microbiote intestinal et la production de butyrate (Plissonneau et al., 2022). En conclusion, la mise en place de programmes d'activité physique pourrait être une stratégie thérapeutique complémentaire pour prolonger les périodes de rémissions et améliorer la qualité de vie des patients atteints de la MC.

#### I.4.3.3.2 Carence en vitamine D

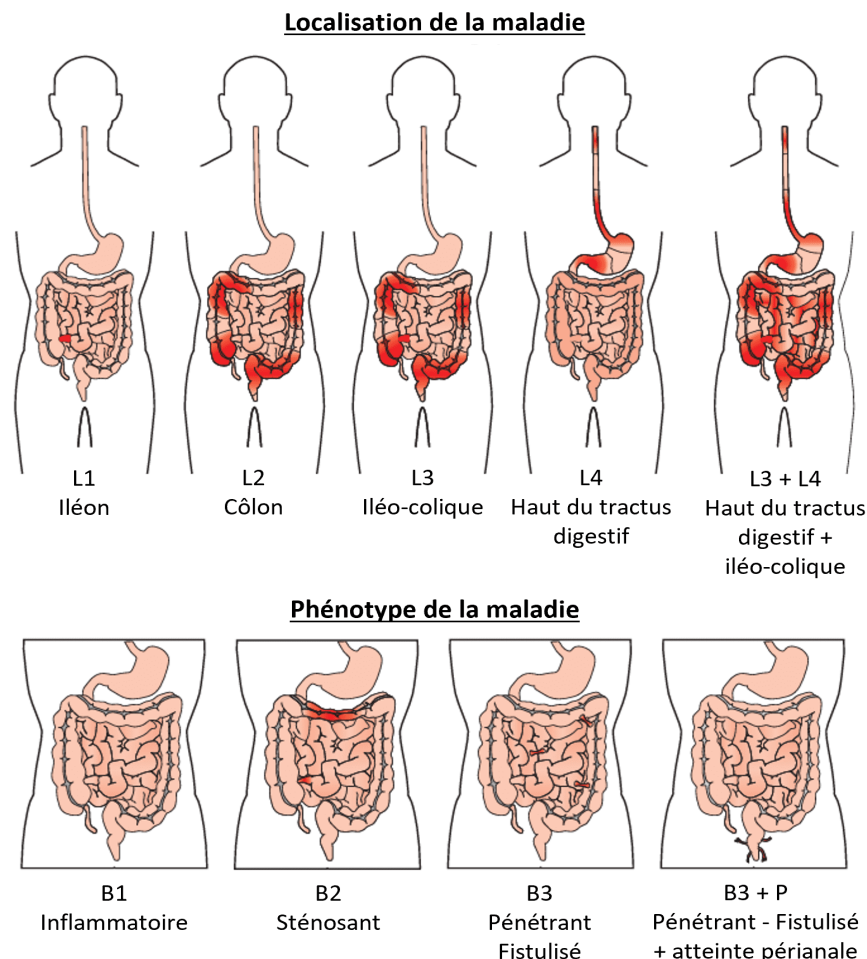
Une association entre des polymorphismes dans le gène codant pour le VDR (*vitamin D receptor*) et la susceptibilité de développer la MC a été mise en évidence (Xue et al., 2013). Une étude prospective incluant 72 719 femmes sur 22 ans, période durant laquelle 122 cas de MC ont été déclarés, a montré une diminution du risque de développer la MC chez des femmes ayant un fort taux plasmatique de 25-hydroxy vitamine D (seuil > 30 ng/mL) (Ananthkrishnan et al., 2012). Par ailleurs, des niveaux sériques plus faibles de vitamine D ont été observés chez des patients présentant une forme active de la MC, comparativement aux patients en rémission (Ham et al., 2014). Une exacerbation de la colite induite au DSS a été constatée chez des souris déficientes pour le *Vdr* ou présentant un défaut de vitamine D (Froicu and Cantorna, 2007; Lagishetty et al., 2010), suggérant le rôle anti-inflammatoire de la vitamine D (Cantorna, 2010; Kamen and Tangpricha, 2010). Enfin, une étude a démontré qu'une déficience en vitamine D prédispose au dysfonctionnement de la barrière intestinale induite par les AIEC (Assa et al., 2015).

#### I.4.3.3.3 Autres facteurs environnementaux

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

Par conséquent, différents facteurs environnementaux semblent être impliqués dans la pathogenèse de la MC. Toutefois, les mécanismes sous-jacents ne sont pas toujours clairement décrits, indiquant que d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre l'influence de l'environnement sur le développement, le maintien et/ou la progression de la MC. Chez l'Homme, les facteurs environnementaux interagissent également avec des facteurs génétiques, épigénétiques et microbiens rendant difficiles les études qui pourraient valider le rôle causal de ces facteurs.

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



**FIGURE 17 : Localisation et phénotype de la maladie de Crohn selon la classification de Montréal.**

La classification de Montréal catégorise les patients selon leur âge lors du diagnostic, la localisation et le phénotype de la maladie, qui sont des informations cruciales pour le pronostic. L4 : modificateur qui peut être ajouté à la classification L1-L3 en cas d'atteinte du tractus digestif haut. P : modificateur qui peut être ajouté à la classification B1-B3 en cas d'atteinte périanale. Adaptée de (Satsangi et al., 2006; Baumgart and Sandborn, 2012).

## I.5 Diagnostic de la maladie de Crohn

Le diagnostic de la MC est difficile étant donné qu'aucun test unique ne permet à lui seul de l'établir. En effet, le diagnostic repose sur l'observation de manifestations cliniques ainsi que sur l'identification et la caractérisation de lésions intestinales grâce à des examens endoscopiques, radiologiques et histologiques. Une fois le diagnostic établi et les atteintes/lésions caractérisées, la classification de Montréal est utilisée pour distinguer les malades en fonction de la localisation et du phénotype de la maladie (**Figure 17**).

### I.5.1 Symptômes et signes cliniques

Hétérogènes et peu spécifiques, les symptômes de la MC dépendent principalement de la sévérité de l'inflammation, de la localisation et du phénotype de la maladie. Les symptômes les plus fréquents sont des douleurs abdominales (de type syndrome appendiculaire), des diarrhées chroniques accompagnées de sang dans les selles et de signes généraux comme de la fatigue, de la fièvre, une perte de poids, de l'anémie, etc. Des fistules ou des ulcères périanaux peuvent également être observés chez les patients (Roda et al., 2020). De plus, des manifestations extra-digestives sont constatées chez 43 % des patients, telles que des atteintes oculaires, dermatologiques, vasculaires, respiratoires, hépato-biliaires et inflammatoires (Vavricka et al., 2011).

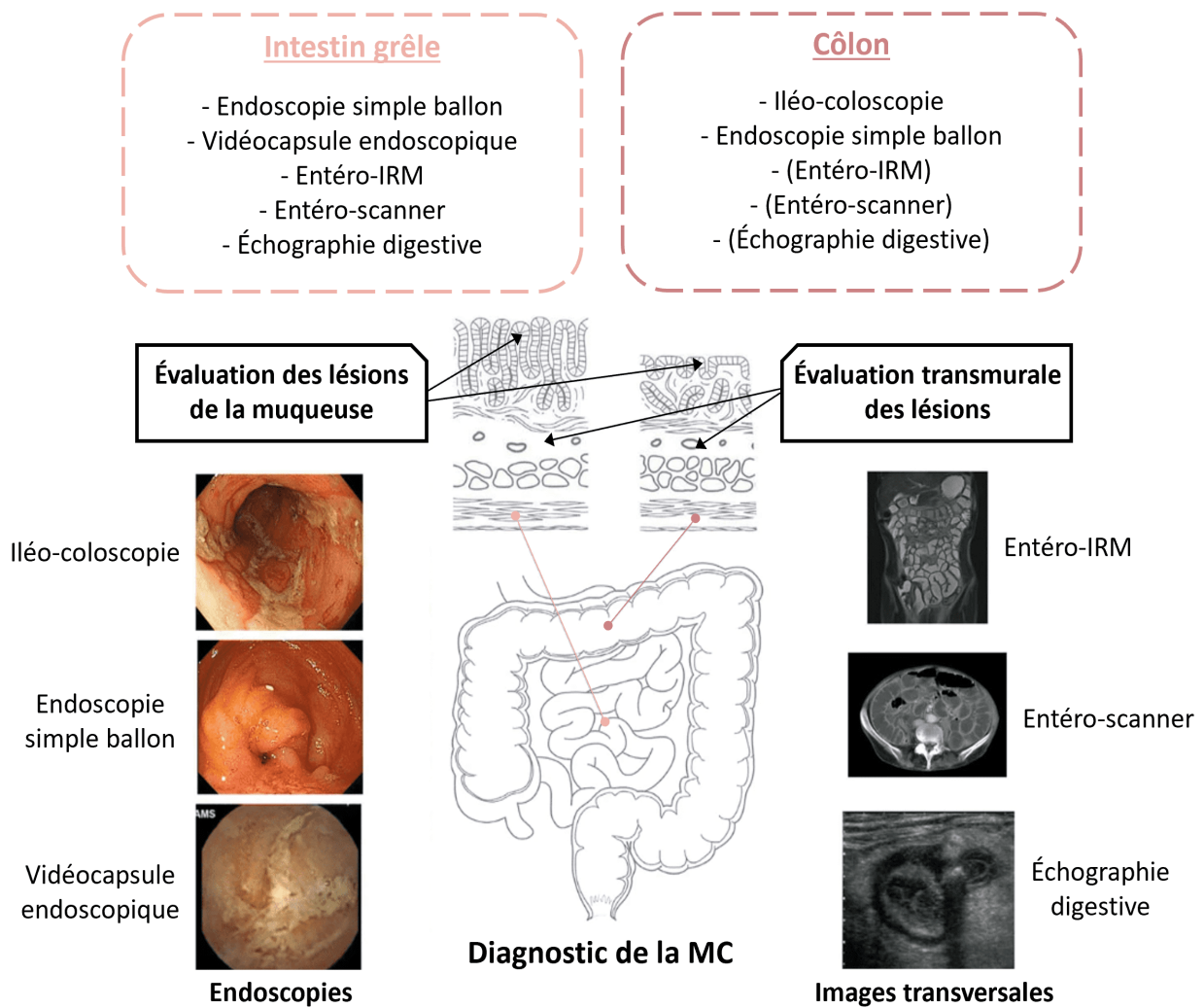
### I.5.2 Examens endoscopiques et radiologiques

Les examens endoscopiques sont primordiaux dans le diagnostic de la MC afin d'évaluer le pronostic, l'étendue et l'intensité des lésions, la réponse à un traitement et de surveiller l'apparition d'une éventuelle dysplasie. L'iléo-coloscopie avec biopsie est l'examen de référence pour diagnostiquer la MC (Spiceland and Lodhia, 2018). Elle permet de détecter des lésions inflammatoires, érosions aphteuses ou des ulcères, réparties de façon inégale avec des intervalles de muqueuse saine au niveau de l'iléon et/ou du côlon. Dans le cas où l'iléo-coloscopie s'avère normale mais qu'une MC est toujours suspectée, la vidéocapsule endoscopique ou l'endoscopie simple ballon est mise en place pour détecter des lésions qui seraient présentes plus haut dans le tractus digestif (**Figure 18**) (Pennazio et al., 2015; Roda et al., 2020).

Des examens d'imagerie complémentaires tels que l'entéro-IRM (imagerie par résonance magnétique), l'entéro-scanner et l'échographie digestive, sont réalisés pour mieux évaluer la réponse aux traitements, l'étendue des lésions ou encore détecter d'éventuelles complications (sténose, fistule ou abcès) (**Figure 18**). Bien que l'échographie digestive soit un examen non-invasif, peu coûteux et qui n'utilise pas de radiations, l'entéro-IRM et l'entéro-scanner sont les plus utilisés grâce à leur meilleure sensibilité et spécificité (Takenaka et al., 2020).

### I.5.3 Analyses histologiques

Afin de confirmer le diagnostic de la MC ou de réaliser un diagnostic différentiel, un examen histologique est effectué sur la biopsie réalisée lors de l'iléo-coloscopie. L'observation d'une distorsion discontinue des cryptes intestinales, d'inflammation, d'une architecture irrégulière des villosités intestinales de l'iléon ou encore



**FIGURE 18 : Examens endoscopiques et radiologiques utilisés pour le diagnostic de la maladie de Crohn.** De nouvelles techniques d'examens endoscopiques et radiologiques permettent une évaluation plus précise des lésions endoscopiques. D'une part, l'iléo-coloscopie, l'endoscopie simple ballon et la vidéocapsule endoscopique contribuent à l'évaluation des lésions de la muqueuse. D'autre part, l'entéro-IRM (imagerie par résonance magnétique), l'entéro-scanner et l'échographie digestive permettent l'évaluation transmurale des lésions. Les méthodes d'imageries sont complémentaires des examens endoscopiques, que ce soit pour le diagnostic ou pour évaluer la réponse aux traitements. Adaptée de (Takenaka et al., 2020)



de granulome épithélioïde, permet la confirmation du diagnostic de la MC. Le granulome épithélioïde est la lésion la plus significative associée au diagnostic histologique de la MC qui est observée dans 30 % des cas au diagnostic (Turner et al., 2014; Torres et al., 2017; Roda et al., 2020). Il s'agit d'un amas de cellules épithéliales et immunitaires incluant les macrophages et les lymphocytes T, accompagnée de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-23, IL-17 et TNF- $\alpha$ ) (Matsumoto et al., 2001).

L'observation de « *creeping fat* », une extension du tissu adipeux viscéral métaboliquement active qui recouvre les intestins et qui joue un rôle important de la régulation de l'inflammation intestinale, est également une caractéristique spécifique de la MC (Mao et al., 2019).

### 1.5.4 Bio-marqueurs

L'utilisation de bio-marqueurs sériques ou fécaux, plus ou moins spécifiques de la MC, permet de suivre la progression et l'activité de la maladie. La CRP (*C-reactive protein*) est un bio-marqueur sérique de l'inflammation aiguë, non spécifique du tractus digestif. Bien qu'elle soit utilisée pour évaluer l'activité de la maladie, un tiers des patients ne présente pas d'augmentation de la CRP, même en cas de périodes de poussées inflammatoires. De plus, la corrélation entre le niveau de CRP et l'activité endoscopique observée chez les patients atteints de la MC est modérée et variable selon les études (Solem et al., 2005; Mosli et al., 2015; Chen et al., 2020).

En outre, parmi les autres bio-marqueurs sériques, des anticorps peuvent aussi être employés pour affiner le diagnostic et différencier la MC de la RCH. Les anticorps *anti-Saccharomyces cerevisiae* (ASCA, *anti-Saccharomyces cerevisiae antibody*) sont des anticorps de type IgA ou IgG capables de reconnaître des résidus mannoses présents sur la paroi de la levure *S. cerevisiae*, mais aussi chez d'autres micro-organismes ou sur des protéines de l'hôte. La prévalence des ASCA est de 60 à 70 % chez les patients atteints de la MC, 10 à 15 % chez les patients atteints de RCH et de moins de 5 % chez des sujets sains (Zhou et al., 2016). Toutefois, l'implication de *S. cerevisiae* dans l'induction de la synthèse de ces anticorps n'a pas été clairement élucidée. Les auto-anticorps pANCA (*perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody*) reconnaissent des antigènes présents dans le cytoplasme des neutrophiles polynucléaires. Les pANCA sont détectés dans 10 à 15 % des cas de MC, 60 à 70 % des cas de RCH et moins de 5 % dans la population contrôle (Mitsuyama et al., 2016).

Actuellement, la calprotectine fécale est considérée comme le bio-marqueur de référence pour évaluer la MC. En effet, produite et sécrétée par les neutrophiles polynucléaires et les macrophages, la calprotectine fécale est une protéine formée par un hétéro-complexe des protéines S100A8 et S100A9. Elle est positivement corrélée avec l'infiltration des neutrophiles polynucléaires au sein de la muqueuse intestinale, reflétant ainsi l'inflammation digestive. De façon pertinente, plusieurs études ont rapporté une corrélation entre le taux de calprotectine fécale et l'activité de la MC évaluée par iléo-coloscopie (Sipponen et al., 2008; D'Haens et al., 2012; Sipponen and Kolho, 2015; Koelink et al., 2020). En effet, pour détecter la présence d'ulcérations endo-

scopiques, signe d'une inflammation active, une valeur seuil de 250 µg de calprotectine/g de matière fécale est retenue (Bressler et al., 2015). Ce bio-marqueur est également prédictif de la réponse à une thérapie ainsi que de la rechute post-opératoire chez les patients atteints de la MC asymptomatiques (Boschetti et al., 2015a,b; Vernia et al., 2020).

Enfin, d'autres bio-marqueurs fécaux non-invasifs des MICI ont également été identifiés, comme CHI3L1 (*chitinase 3-like-1*) (Aomatsu et al., 2011; Buisson et al., 2016) et MMP-9 (*matrix metalloprotease-9*) (Buisson et al., 2018). Exprimée par plusieurs types cellulaires tels que les macrophages ou les neutrophiles, CHI3L1 possède une forte affinité de liaison pour la chitine. Une étude a mis en évidence une corrélation entre les niveaux fécaux de CHI3L1 et l'activité de la MC évaluée par iléo-coloscopie. En effet, il a été révélé qu'une valeur seuil de 13,7 ng de CHI3L1/g de matière fécale est prédictive de lésions actives chez les patients atteints de MICI (Aomatsu et al., 2011). De la même manière, Buisson et co-auteurs ont démontré que le niveau fécal de CHI3L1 et de MMP-9 corrèle avec l'activité endoscopique de la maladie (Buisson et al., 2016, 2018). Une valeur seuil supérieure à 15 ng de CHI3L1 et 350 ng de MMP-9/g de matière fécale permet de détecter des ulcérations endoscopiques (Buisson et al., 2016, 2018). Par conséquent, CHI3L1 et MMP-9 semblent être des bio-marqueurs fiables afin de détecter l'activité endoscopique dans la MC.

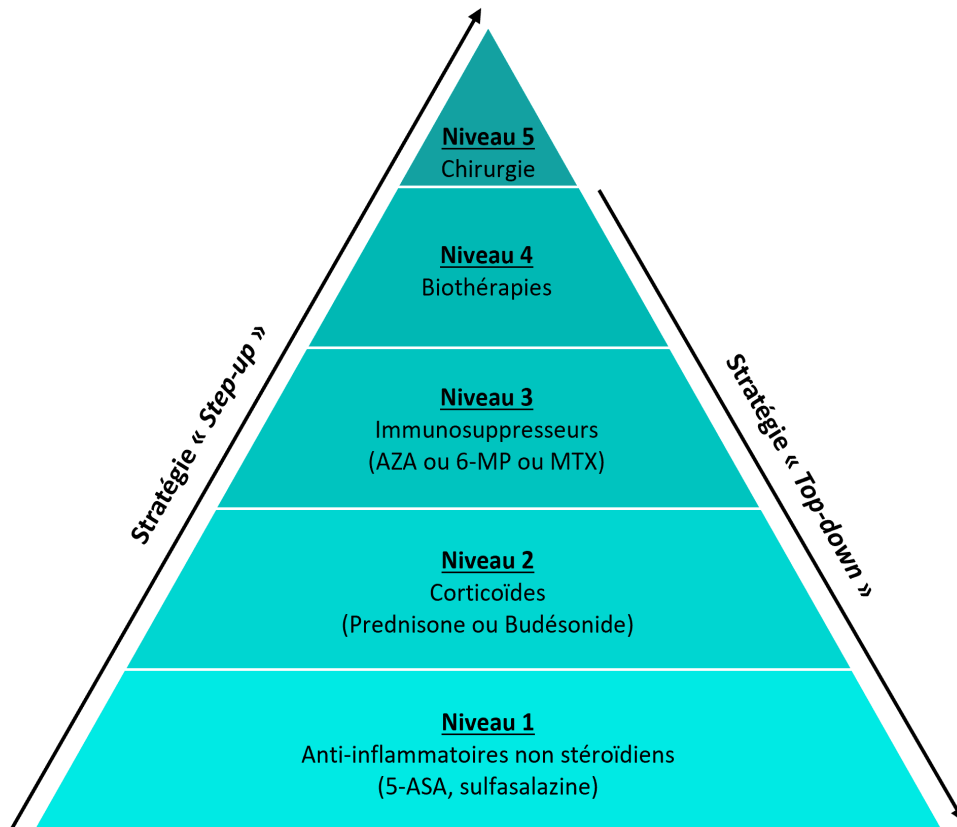
## I.6 Prise en charge thérapeutique de la maladie de Crohn

Tout d'abord, il est primordial de noter que la prise en charge thérapeutique de la MC n'est pas curative et vise seulement à cicatriser la muqueuse et soulager les symptômes des patients (Peyrin-Biroulet et al., 2014). En effet, les traitements ont pour objectif d'atteindre une rémission clinique et endoscopique caractérisée par l'absence d'ulcération à l'iléo-coloscopie ainsi que le soulagement des diarrhées et des douleurs abdominales. La cicatrisation de la muqueuse est prédictive d'un risque plus faible d'hospitalisation, de rechute clinique, de recours à la chirurgie et d'expansion de la destruction intestinale (Pineton de Chambrun et al., 2010; Peyrin-Biroulet et al., 2011).

### I.6.1 Arsenal thérapeutique disponible dans la maladie de Crohn

Actuellement, les traitements disponibles pour la MC en France sont : les anti-inflammatoires tels que les dérivés salicylés (salazosulfasalazine, olsalazine et mésalazine), les corticoïdes (budésonide, prédnisolone), les immunosuppresseurs (le méthotrexate et les thiopurines incluant l'azathioprine et la 6-mercaptopurine), ou encore les biothérapies anti-intégrines telles que le vedolizumab (anticorps ciblant l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  impliquée dans la migration des lymphocytes vers le tractus digestif) et les biothérapies anti-TNF- $\alpha$  (adalimumab, infliximab, certolizumab pegol), anti-interleukines 12/23 (ustekinumab, qui est un anticorps ciblant la sous-unité p40 commune à l'IL-12 et l'IL-23) ou encore anti-JAK (*janus kinase*) (Gomollón et al., 2017). De nos jours, la classe thérapeutique la plus efficace dans la MC sont les anti-TNF- $\alpha$  qui induisent et maintiennent une cicatrisation de la muqueuse intestinale, en particulier chez les patients ayant une forme modérée à sévère de





**FIGURE 19 : Stratégies thérapeutiques utilisées dans la maladie de Crohn.**

La stratégie dite « *Step-up* » (à gauche) est réservée aux formes légères à modérées de la maladie. Elle consiste en une approche thérapeutique progressive selon l'activité de la maladie, pouvant ainsi aller de l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens jusqu'à la chirurgie dans les cas les plus sévères. La stratégie dite « *Top-down* » (à droite) est destinée aux patients présentant une forme sévère de la maladie. Elle est basée sur un traitement plus agressif dès le début de la prise en charge avec l'utilisation de biothérapies couplées généralement à un immunosuppresseur. Adaptée de (Aloi et al., 2014).

Abréviations : 5-ASA : 5-aminosalicylés, 6-MP : 6-mercaptopurine, AZA : aziathropine, MTX : methotrexate.

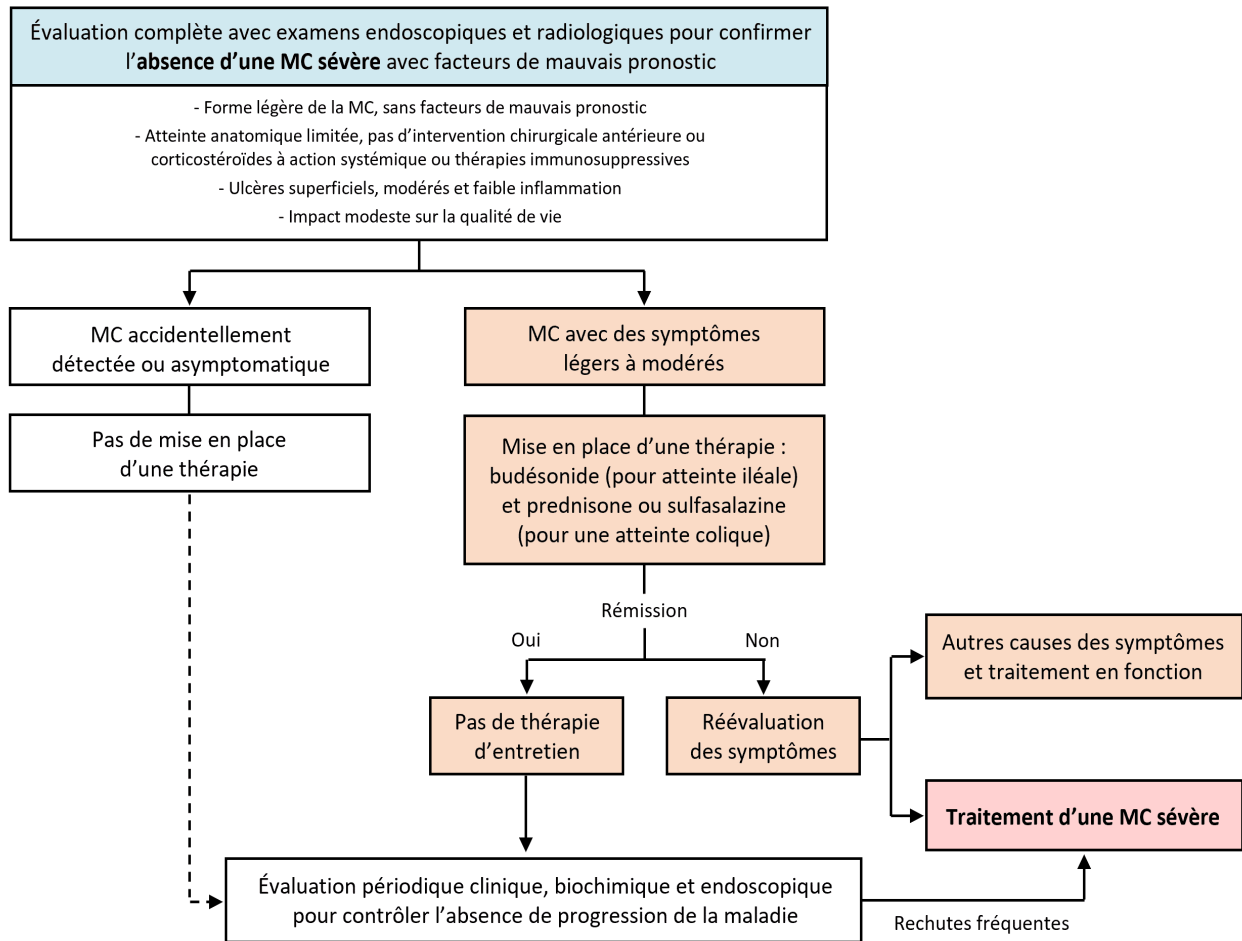
la MC (Adegbola et al., 2018). Enfin, l'opération chirurgicale est également envisagée, notamment chez les patients développant des complications et/ou qui ne tolèrent pas les traitements. Cependant, bien que les récurrences post-opératoires soient fréquentes, environ 50 % des patients auront une intervention chirurgicale dans les 10 ans suivant leur diagnostic et un tiers d'entre eux auront recours à la chirurgie plusieurs fois (Cosnes et al., 2012). Toutefois, le retrait des segments atteints ne protège pas des récurrences. Effectivement, dans l'année qui suit l'opération, une récurrence endoscopique est constatée chez 35 à 85 % des patients, alors que 10 à 38 % des patients présentent une récurrence clinique (Buisson et al., 2012).

Deux principales stratégies thérapeutiques existent : la stratégie conventionnelle, dite « *Step-up* » et la stratégie descendante, dite « *Top-down* » (**Figures 19 et 20**). La stratégie conventionnelle « *Step-up* » a pour objectif d'améliorer les symptômes en adaptant de façon progressive les traitements selon la sévérité et l'évolution de la maladie. Cette stratégie est réservée aux formes légères de la maladie sans facteur de mauvais pronostic ni de complication. Elle utilise des 5-aminosalicylés, puis des corticoïdes, des immunosuppresseurs et des biothérapies (anti-TNF- $\alpha$ , anti-intégrines, anti-IL-12/23) (Peyrin-Biroulet et al., 2015). Chez des patients à risque de maladie sévère et évolutive, la stratégie descendante « *Top-down* » consiste à instaurer de façon précoce un traitement plus agressif tel qu'une biothérapie (anti-TNF- $\alpha$ ) couplée à un immunosuppresseur dès les premières poussées de la maladie (Chen et al., 2014). En clinique, des études ont rapporté des résultats controversés concernant l'efficacité de ces deux stratégies dans la cicatrisation endoscopique, le contrôle des symptômes et la rémission des patients. En effet, dans certaines études, l'efficacité des deux stratégies est similaire, tandis que dans d'autres, la stratégie « *Top-down* » semble être plus efficace que la stratégie « *Step-up* » (D'Haens et al., 2008; Khanna et al., 2015; Tsui and Huynh, 2018). Ainsi, l'utilisation d'un traitement initial fort pose deux questions : quels sont les risques de cette stratégie chez des patients qui n'auraient peut-être eu qu'une évolution légère de la maladie ? Et quelle sera la tolérance à long terme de ce genre de traitement ? Malheureusement, à l'heure actuelle il n'existe pas de stratégie thérapeutique de type médecine personnalisée dans la MC, expliquant les taux d'échec de ces deux stratégies (Chen et al., 2014). Les molécules proposées ne traitent que l'inflammation de façon non spécifique, et non la cause de la maladie, elles ne permettent donc pas d'en modifier l'évolution naturelle.

## I.6.2 Approches thérapeutiques ciblant les agents pathogènes

Le rôle du microbiote intestinal dans le développement et/ou la chronicité de la MC est bien connu et décrit (voir section I.4.2. Facteurs microbiens, de ce Chapitre), ce qui a conduit au développement de diverses stratégies thérapeutiques ciblant le microbiote intestinal, avec notamment l'utilisation d'antibiotiques, de prébiotiques, de probiotiques, de symbiotiques et de la transplantation du microbiote fécal.

## Stratégie « Step-up »



## Stratégie « Top-down »

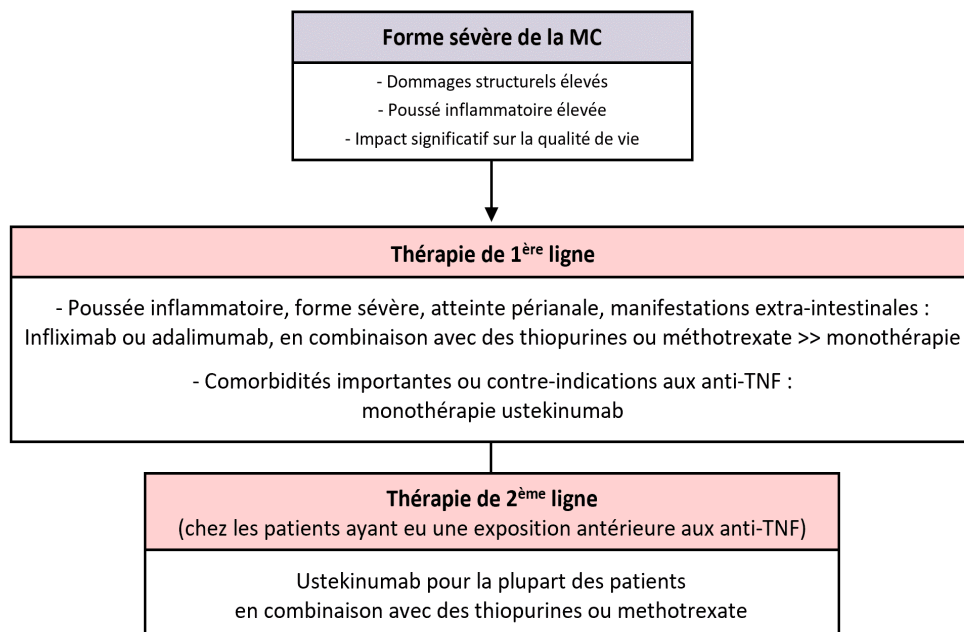


FIGURE 20 : Stratégies thérapeutiques « Step-up » et « Top-down » utilisées dans la maladie de Crohn. Adaptée de (Nguyen et al., 2020).

### I.6.2.1 Antibiotiques

Deux approches peuvent être envisagées concernant l'utilisation d'antibiotiques dans la MC : (i) influencer l'évolution de la MC en diminuant les concentrations bactériennes dans la lumière intestinale et en altérant la composition du microbiote intestinal, en faveur des bactéries bénéfiques ou (ii) cibler spécifiquement des bactéries potentiellement impliquées dans la pathogénèse de la maladie (Nitzan et al., 2016). Les antibiotiques les plus utilisés sont le métronidazole, la ciprofloxacine, la rifaximine et la clarithromycine. Les antibiotiques ont pour objectif d'améliorer les symptômes cliniques de la MC, mais également de traiter les complications infectieuses telles que les abcès et les infections post-opératoires (Nitzan et al., 2016). Certains essais cliniques ont confirmé l'efficacité des antibiotiques en monothérapie ou en combinaison avec d'autres traitements, sur l'amélioration des symptômes et la rémission de la MC (Su et al., 2015; Patterson, 2021). En effet, une méta-analyse incluant 10 études cliniques (832 patients au total) a rapporté que la prise d'antibiotiques est associée à une amélioration clinique de la maladie de 56,1 % chez les patients du groupe traité contre 37,9 % chez les patients du groupe placebo (Wang et al., 2012). D'autres études ont révélé que les antibiotiques entretiennent les rémissions cliniques et préviennent la récurrence post-opérative (Rutgeerts et al., 1995; Khan et al., 2011; Jigarano et al., 2014). Malgré des essais cliniques encourageants, leur utilisation n'est préconisée qu'en traitement de seconde ligne chez des patients présentant des complications septiques, afin d'éviter les effets secondaires non négligeables engendrés par la prise d'antibiotiques tels que l'infection à *Clostridioides difficile*, la résistance aux antibiotiques, les altérations du microbiote ainsi que l'augmentation de la concentration bactérienne lors de l'arrêt du traitement (Mowat et al., 2011; Gomollón et al., 2017; Lichtenstein et al., 2018).

### I.6.2.2 Probiotiques, prébiotiques, post-biotiques et symbiotiques

Étant donné qu'une dysbiose intestinale participe potentiellement à la pathogénèse de la MC chez des individus génétiquement prédisposés, des stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation de prébiotiques, probiotiques, post-biotiques et symbiotiques ont été développées pour moduler le déséquilibre du microbiote intestinal observé chez les patients atteints de la MC.

**Probiotiques** : Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte. Les mécanismes d'action potentiels des probiotiques sur la prévention et le contrôle des MICI incluent la production de métabolites anti-microbiens, la suppression de bactéries pathogènes par compétition pour la niche, la modulation du système immunitaire, l'augmentation des réponses anti-inflammatoires et l'amélioration de la fonction barrière de l'épithélium intestinal (Khan et al., 2019). Les souches probiotiques les plus testées chez les patients atteints de la MC sont *Lactobacillus GG*, *Lactobacillus johnsonii*, *E. coli* Nissle 1917 et *Saccharomyces boulardii* (Khanna and Raffals, 2017). Toutefois, due à une mauvaise stratification des patients dans les études, les essais cliniques testant une supplémentation en probiotiques dans le traitement de la MC exposent des résultats contradictoires sur le

maintien de la rémission et la prévention de la récurrence post-opératoire. En effet, sur 12 essais cliniques, 7 ne présentent pas d'effet bénéfiques des probiotiques (Coqueiro et al., 2019), tandis qu'une étude en 2015 a rapporté une amélioration dans la prévention de la rechute post-opératoire chez les patients ayant pris un mélange de quatre souches de *Lactobacillus*, trois souches de *Bifidobacterium* et une souche de *Streptococcus salivarius* sous-espèce *thermophilus* (VSL#3TM) (Fedorak et al., 2015). Par conséquent, l'utilisation des probiotiques demeure très controversée et n'est à l'heure actuelle pas recommandée dans la MC (Coqueiro et al., 2019).

**Prébiotiques** : Un prébiotique est un substrat utilisé sélectivement par les micro-organismes de l'hôte pour exercer un effet bénéfique sur la santé (Gibson et al., 2017). Les prébiotiques sont des aliments non digestibles, principalement des glucides ou des fibres alimentaires. Un essai clinique testant une supplémentation en fructo-oligosaccharides chez les patients atteints de la MC en phase active n'a pas montré d'effets bénéfiques comparativement au groupe placebo (Benjamin et al., 2011). Cependant, dans le cadre de la MC, les essais cliniques sont peu nombreux et ne suffisent pas à conclure quant à leur efficacité (Lichtenstein et al., 2016; Khan et al., 2019).

**Post-biotiques** : Un post-biotique est une préparation de métabolites bactériens qui confère un bénéfice sur la santé de l'hôte. Les plus connus sont les acides gras à chaînes courtes, produits par des bactéries dites anti-inflammatoires, telle que *F. prausnitzii*. *In vitro* et *in vivo*, les résultats suggèrent les bienfaits de ces métabolites bactériens sur l'homéostasie du système immunitaire avec une stimulation des réponses anti-inflammatoires et immuno-modulatrices (Aggeletopoulou et al., 2019; Russo et al., 2019). De plus, une étude *ex vivo* a montré une diminution des réponses inflammatoires dans un modèle de culture d'organe après un traitement avec des post-biotiques (Tsilingiri et al., 2012). Toutefois, bien que des essais cliniques soient nécessaires pour évaluer clairement leur efficacité, les post-biotiques pourraient être un potentiel traitement durant une période de poussée chez les patients atteints de MICI.

**Symbiotiques** : Les symbiotiques correspondent à une combinaison de pré- et probiotiques dont l'objectif est de restaurer et/ou maintenir le microbiote intestinal en bonne santé en favorisant son implantation et sa croissance. Ils sont considérés comme une nouvelle approche dans le traitement des MICI (Khan et al., 2019). Peu d'études cliniques ont été menées dans le cadre de la MC, mais l'efficacité des symbiotiques semble prometteur. En effet, dans une cohorte de 35 patients présentant une MC active, la prise d'un symbiotique comprenant *B. longum*/Synergy ITM (inuline et oligofructose), a révélé une diminution de l'activité clinique de la maladie et du score histologique, comparativement au groupe placebo (Steed et al., 2010). En revanche, dans une autre étude clinique, la prise d'un mélange contenant quatre espèces probiotiques et quatre prébiotiques (Synbiotic 2000TM) n'a pas permis de diminuer le risque de récurrence post-opératoire chez des patients atteints de la MC (Chermesh et al., 2007). En conclusion, comme les pré- et probiotiques, la supplémentation en symbiotique n'est pas recommandée dans le traitement de la MC et d'autres études sont nécessaires pour évaluer l'efficacité de ce type de traitement (Wasilewski et al., 2015).

### I.6.2.3 Transplantation du microbiote fécal

La TMF est considérée comme une approche innovante et robuste de manipulation du microbiote intestinal qui pourrait être prometteuse dans le traitement des MICI. La TMF consiste à introduire de la matière fécale d'un donneur sain dans le tractus gastro-intestinal d'un patient receveur pour rééquilibrer son microbiote intestinal. Actuellement, la seule utilisation en routine de la TMF concerne le traitement des colites infectieuses récalcitrantes à *Clostridioides difficile* avec un taux d'efficacité de plus de 80 %, à la fois lors d'une administration par la coloscopie ou par l'administration orale de la matière fécale encapsulée (Weingarden and Vaughn, 2017; Saha and Khanna, 2019).

La TMF a été utilisée pour prendre en charge les infections à *C. difficile* chez les patients atteints de la MC et s'est avérée efficace chez la majorité des patients, avec une diminution ou une résolution complète de la diarrhée associée à l'infection (Anderson et al., 2012). Concernant le traitement des MICI, une analyse systématique de 18 études portant sur l'effet d'une TMF incluant 122 patients atteints de la MC ou de RCH a rapporté une rémission de 22 % des patients atteints de RCH et de 61 % des patients atteints de la MC (Colman and Rubin, 2014). De même, une étude menée sur 19 patients atteints de la MC a démontré par la coloscopie qu'une TMF, en une dose unique, permet d'améliorer les symptômes cliniques de 58 % des patients traités. Ce résultat est accompagné d'une hausse du niveau des Treg au niveau de la *lamina propria* des patients receveurs ainsi que d'une plus grande diversité microbienne, suggérant ainsi un rétablissement de la balance microbienne et une diminution de l'inflammation (Vaughn et al., 2016). Cependant, une fois de plus, les résultats obtenus par différents essais cliniques concernant l'utilisation de la TMF dans le traitement de la MC sont contradictoires. En effet, une étude a montré un effet modeste d'une seule dose de TMF après un mois, sur l'amélioration clinique et endoscopique chez 3 patients atteints de la MC répondeurs sur les 10 patients testés, alors que 2 patients ont présenté des effets délétères avec de nouvelles poussées (Gutin et al., 2019). Par ailleurs, une étude pilote n'a rapporté aucune implantation significative du microbiote du donneur après 6 semaines chez des patients atteints de la MC ayant reçu une dose de TMF, et ce malgré une diminution du score endoscopique et du taux de la CRP (Sokol et al., 2020b). Par conséquent, le recours à la TMF dans la MC reste controversé et de nouvelles études cliniques sont essentielles pour évaluer son efficacité thérapeutique. En outre, une standardisation de la sélection du donneur idéal, de la préparation et l'application du matériel fécal reste indispensable pour envisager la TMF comme potentielle thérapie (Shen et al., 2017).

Pour conclure, bien que certaines études cliniques sur les antibiotiques, les pré- et pro-biotiques et la TMF soient pleines d'espoir, de grandes avancées scientifiques sont nécessaires afin de soulager les symptômes et améliorer la qualité de vie des patients atteints de la MC, notamment concernant le mode d'administration de ces molécules pour maximiser leurs effets au niveau intestinal, sans qu'elles soient détruites plus haut dans le tractus digestif (Yang et al., 2023).

# Chapitre II : *Escherichia coli* adhérents et invasifs (AIEC) associés la maladie de Crohn

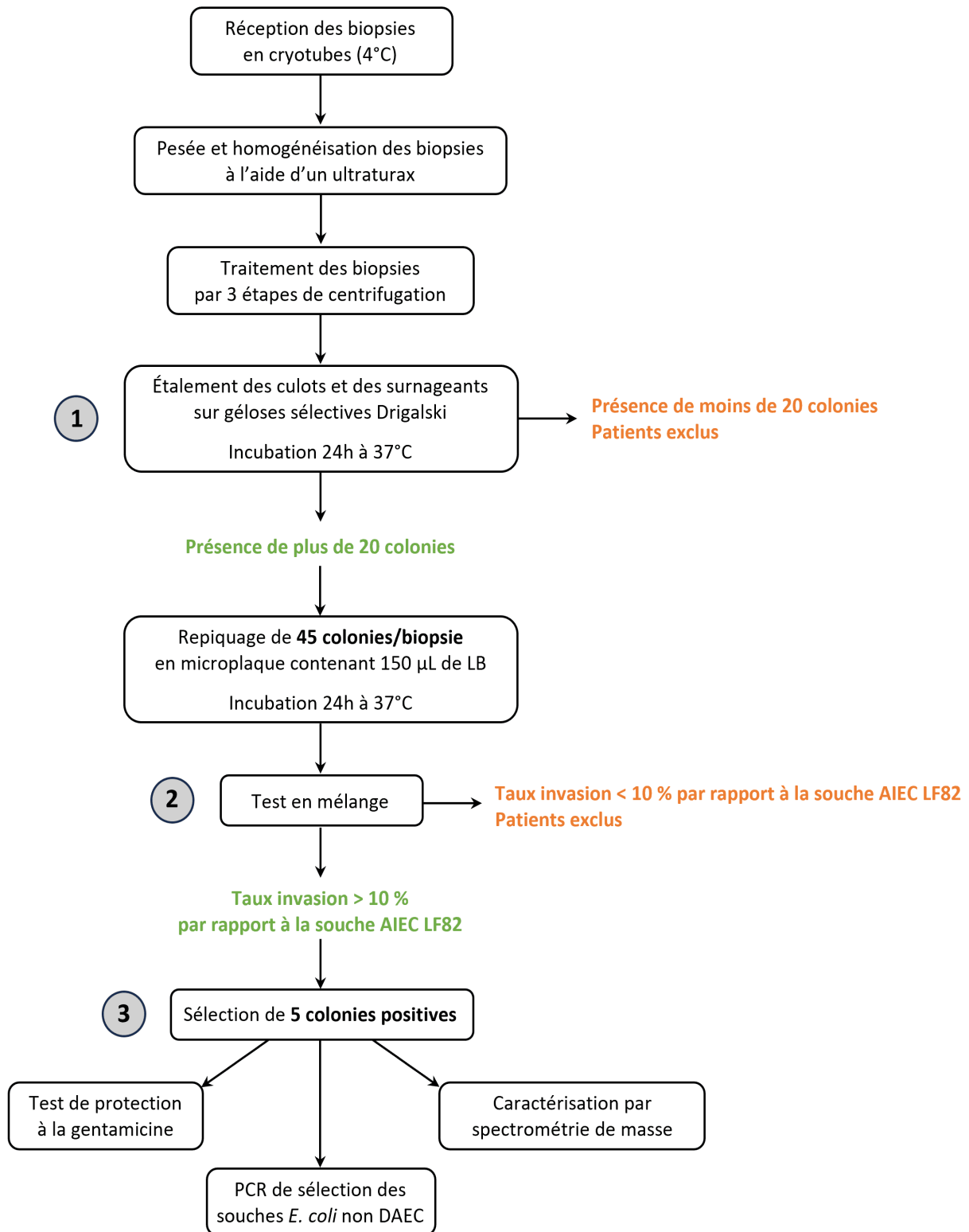
## II.1 Présentation du pathovar AIEC associé à la maladie de Crohn

### II.1.1 Définition

Une augmentation de la prévalence de souche particulière d'*E. coli* a été rapportée chez les patients atteints de la MC (Darfeuille-Michaud et al., 2004). Ces souches ne présentent aucun facteur de virulence retrouvé chez d'autres pathotypes d'*E. coli* responsables de diarrhées aiguës. Ainsi, il y a 25 ans, un nouveau pathovar a été défini et dénommé AIEC pour « *adherent-invasive E. coli* » (Darfeuille-Michaud et al., 1998; Boudeau et al., 1999). Les AIEC ont la capacité d'adhérer et d'envahir les CEI ainsi que de survivre et se répliquer en macrophages induisant la sécrétion de TNF- $\alpha$  par ces derniers, sans engendrer de mort cellulaire (Boudeau et al., 1999; Glasser et al., 2001). Depuis cette définition, d'autres propriétés des AIEC ont été mises en avant, telles que leur capacité à perturber la fonction barrière de l'épithélium (Sasaki et al., 2007; Denizot et al., 2012), à moduler le microbiote intestinal (Chassaing et al., 2014; Martinez-Medina et al., 2014; Agus et al., 2016) et à former des biofilms extracellulaires (Martinez-Medina et al., 2009b) ou intracellulaires (Prudent et al., 2021). Les AIEC sont des pathobiontes, c'est-à-dire des bactéries commensales ou pathogènes opportunistes ayant acquis des mutations patho-adaptatives au cours de leur évolution. Les AIEC tirent avantage de prédispositions génétiques et/ou d'un environnement intestinal particulier pour coloniser la muqueuse intestinale et induire ou exacerber l'inflammation. En effet, les AIEC jouent un rôle dans l'induction et/ou le maintien de l'inflammation intestinale dans des modèles pré-cliniques de la MC, renforçant leur implication dans la pathogenèse de cette maladie (Carvalho et al., 2009; Chassaing et al., 2014; Bretin et al., 2018; Schmitz et al., 2019).

### II.1.2 Prévalence

Les AIEC sont principalement associés à l'iléon plutôt qu'au côlon, et leur prévalence fluctue entre 21 à 62 % chez les patients atteints de la MC contre 0 à 19 % chez les patients contrôles, signifiant donc que les individus sains peuvent être porteurs de souches AIEC sans pour autant développer la MC (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Baumgart et al., 2007; Martinez-Medina et al., 2009a; Raso et al., 2011; O'Brien et al., 2017). Par ailleurs, certains génotypes d'*E. coli* sont plus fréquemment associés aux lésions iléales de la MC (Masseret et al., 2001) et chaque patient pourraient héberger plusieurs souches d'*E. coli* (Tyakht et al., 2018). Deux méta-



**FIGURE 21 : Protocole d'identification des patients porteurs d'AIEC à partir des biopsies.**

Après réception des biopsies des patients en cryotubes, la caractérisation du statut AIEC des patients est réalisée en plusieurs étapes : (1) dénombrement des Entérobactéries associées aux biopsies, (2) test d'invasion des souches en mélange en cellules épithéliales intestinales I-407, et (3) test de caractérisation bactérienne.

Abréviations : AIEC : *adherent-invasive Escherichia coli*, DAEC : *diffusely adherent Escherichia coli strain*.



analyses récentes ont révélé que la prévalence des AIEC est de 29 % chez les patients atteints de la MC contre 9 % chez les sujets contrôles (Kamali Dolatabadi et al., 2021; Nadalian et al., 2021). De plus, il a été récemment montré que la présence d'AIEC au niveau de la pièce opératoire de patients atteints de la MC prédit la récurrence endoscopique 6 mois post-opératoire. De même, leur présence au niveau de l'iléon terminal des patients 6 mois post-opératoire est associée à un taux plus élevé de lésions iléales précoces, suggérant que les AIEC pourraient être impliquées dans l'initiation ou les phases précoces de la MC (Buisson et al., 2023).

### II.1.3 Identification des AIEC

À ce jour, aucun gène ou marqueur moléculaire spécifique et commun aux AIEC n'a été mis en évidence, ce qui rend difficile leur identification chez les patients atteints de la MC porteurs d'AIEC (O'Brien et al., 2017). Une étude de génomique a élaboré un algorithme à partir de l'identification de SNP dans le génome des AIEC par rapport aux souches non-AIEC, prédisant le phénotype AIEC avec une précision de 84 % (Camprubí-Font et al., 2018). Toutefois, sur d'autres collections de souches AIEC issues de différentes cohortes, la précision de la prédiction chute à 61 % (Camprubí-Font et al., 2018, 2020). De plus, comparativement aux souches non-AIEC, il a été révélé que les souches AIEC présentent une prévalence plus élevée du gène *pic*, impliqué dans la capacité d'invasion des souches, ainsi qu'une résistance plus importante à l'ampicilline (Camprubí-Font et al., 2020). Une étude plus récente s'intéressant aux OMP (*outer membrane protein*) des AIEC et d'une souche d'*E. coli* commensale a identifié trois gènes : *fitA*, *eefC* et *chuA*, qui pourraient être de potentiels bio-marqueurs des AIEC (Saitz et al., 2022). Toutefois, d'autres études sont nécessaires afin de valider ces potentiels marqueurs dans d'autres collections de souches AIEC.

Par conséquent, actuellement, le seul moyen d'identifier les patients porteurs d'AIEC repose toujours sur un processus chronophage. Brièvement, les biopsies iléales de patient sont broyées et étalées sur des géloses sélectives Drigalski qui permettent l'isolement des Entérobactéries. Après une incubation à 37°C pendant 24h, 45 colonies sont repiquées et testées en mélange sur des CEI I-407 afin d'évaluer leur capacité d'adhésion et d'invasion par un test de protection à la gentamicine. Les souches présentant un pourcentage d'invasion supérieur à 10 % de celui de la souche de référence AIEC LF82, sont considérées comme « invasives », et 5 d'entre elles sont ensuite identifiées par PCR et spectrométrie de masse (**Figure 21**) (Darfeuille-Michaud et al., 1998, 2004). Isolée au niveau d'une lésion iléale chronique chez un patient atteint de la MC, la souche d'*E. coli* LF82 est la souche AIEC de référence principalement étudiée au laboratoire (Darfeuille-Michaud et al., 1998, 2004).

Une étude récente a révélé une méthode plus rapide et moins invasive pour détecter les AIEC chez les patients atteints de la MC. En effet, il a été rapporté que le taux d'anticorps sériques totaux anti-*E. coli* est plus élevé chez les patients porteurs d'AIEC que chez les patients non porteurs. Ainsi, le taux de ces anticorps semble

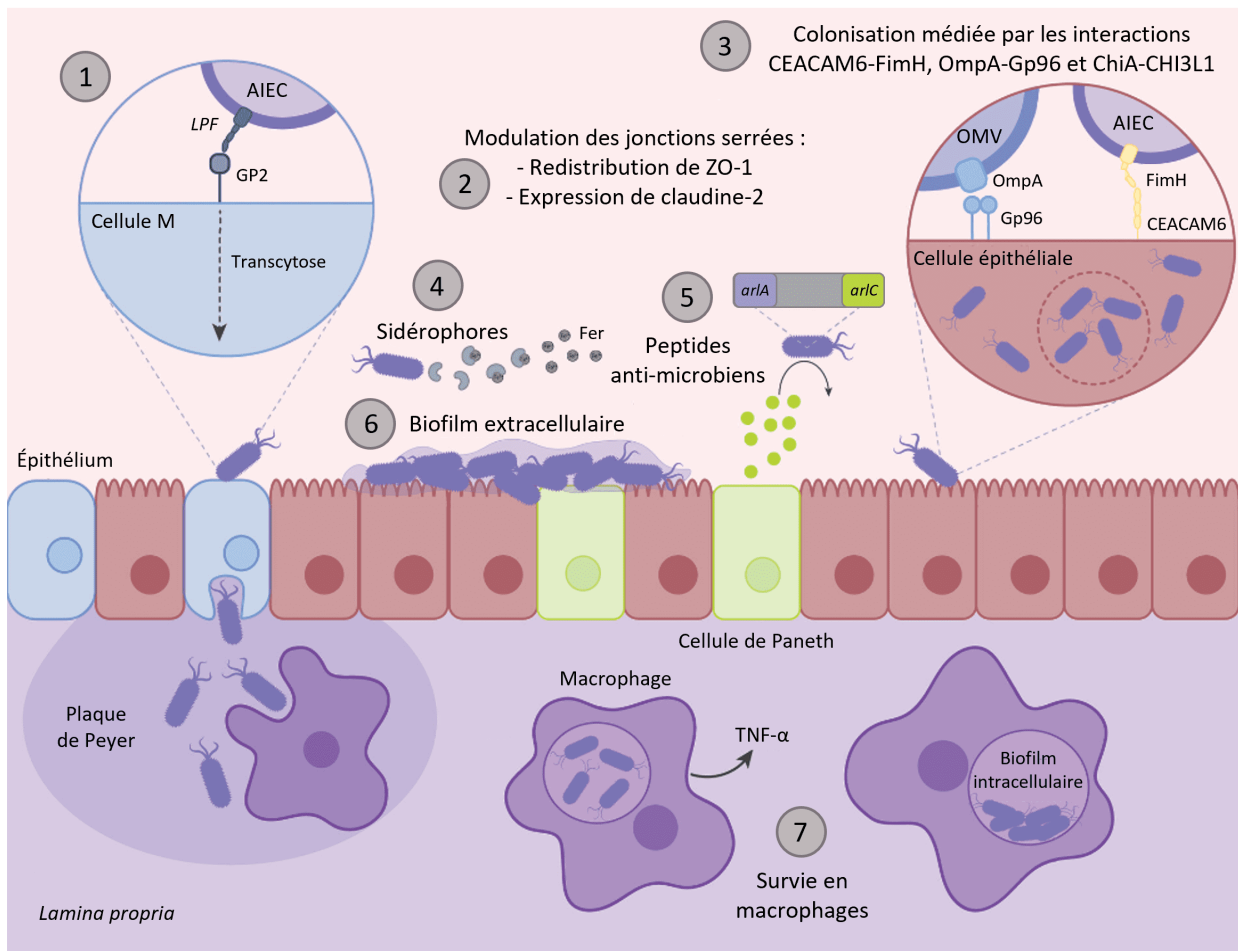
être un bio-marqueur pertinent pour identifier les patients atteints de la MC porteurs d'AIEC (Buisson et al., 2021). Enfin, une étude impliquant des patients atteints de la MC appelée « MOlecular BIomarkers and Adherent and Invasive *Escherichia coli* (AIEC) Detection Study in Crohn's Disease Patients » (MOBIDIC) est en cours pour évaluer la relation entre les bio-marqueurs non invasifs et la détection des AIEC dans les biopsies intestinales. L'objectif est de développer un algorithme prédictif du portage AIEC, cependant les résultats de cet essai n'ont pas encore été publiés (NCT02882841).

## II.2 Caractéristiques des AIEC

Les bactéries AIEC ont fait l'objet de nombreuses études afin d'élucider leur rôle dans l'étiologie de la MC. Dans ce contexte, différents facteurs de virulence ont été identifiés, permettant aux AIEC par exemple, d'accéder à l'épithélium intestinal (*vat-AIEC*, *fliC*, *ar1A*, *ar1C*), d'adhérer et d'envahir les CEI (*fimH*, *chiA*, *yfgL*, *ompA*, *ibeA*), de survivre en macrophages (*htrA*, *dsbA*, *gipA*) ou de leur procurer un avantage sélectif dans l'environnement intestinal (*pduC*, *chuA*) (Palmela et al., 2018).

### II.2.1 Traversée de la couche de mucus par les AIEC

La couche protectrice de mucus qui recouvre la surface de l'épithélium intestinal joue un rôle central dans la protection contre de nombreux pathogènes intestinaux tels que *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* et *Salmonella enterica* (Josenhans et al., 2020). Elle est composée de glycoprotéines formant un gel appelées mucines, sécrétées par des cellules caliciformes spécialisées (Forstner, 1995). Les structures glucidiques des mucines sont ciblées par les bactéries pathogènes pour leur fixation sur la muqueuse intestinale, évitant ainsi leur élimination par le transit naturel (Derrien et al., 2010). Chez les patients atteints de la MC, la couche de mucus est essentiellement continue et comparable à une muqueuse de patients sains. Toutefois, une expression et une glycosylation anormale des mucines ont été observées, rendant la couche de mucus plus pénétrable par les bactéries commensales et pathogènes (Buisine et al., 2001; Moehle et al., 2006; Strugala et al., 2008; Dorofeyev et al., 2013; Sicard et al., 2017). Une étude *in vitro* sur des CEI a révélé que l'infection par la souche AIEC LF82 diminue l'expression de deux mucines, MUC2 et MUC5A (Elatrech et al., 2015). Par ailleurs, il a été montré que les AIEC sécrètent la mucinase Vat-AIEC, dont l'expression est régulée par les acides biliaires et les mucines, leur permettant de dégrader et traverser la couche de mucus, en diminuant sa viscosité, pour atteindre et coloniser les CEI (Gibold et al., 2016). De plus, l'expression de cette mucinase confère aux AIEC une meilleure capacité à coloniser le tube digestif des souris CEABAC10 (Carvalho et al., 2009; Gibold et al., 2016). Les souris CEABAC10, mimant la susceptibilité à développer la MC, surexpriment le récepteur CEACAM6 (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6*) humain au niveau colique (Carvalho et al., 2008).



**FIGURE 22 : Mécanismes de virulence et de colonisation des AIEC dans l'intestin.**

(1) Les LPF (*long polar fimbriae*) des AIEC se lient à la glycoprotéine 2 (GP2) de la surface cellulaire afin d'utiliser les cellules M comme porte d'entrée dans la *lamina propria* par transcytose. (2) Les AIEC sont capables de moduler l'expression des protéines des jonctions serrées afin d'altérer la fonction barrière de l'épithélium intestinal. (3) Les AIEC envahissent les cellules épithéliales intestinales (CEI) à l'aide des pili de type I. La forte affinité de la sous-unité FimH pour le récepteur cellulaire CEACAM6 augmente la capacité d'invasion des AIEC. Une fois à l'intérieur des CEI, les cellules AIEC lysent la vacuole d'endocytose et survivent dans la cellule en se répliquant dans le cytoplasme. La protéine OmpA, qui compose les OMV, a une forte affinité pour la protéine Gp96 de la surface cellulaire, ce qui permet aux OMV de potentiellement délivrer des effecteurs bactériens dans les CEI. (4) Les AIEC sont capables d'acquérir le fer, un métabolite essentiel, à partir de l'environnement intestinal, par la libération de plusieurs types de sidérophores qui échappent à l'immunité nutritionnelle de l'hôte et entrent en compétition avec d'autres bactéries. (5) Certaines souches AIEC sont résistantes aux peptides anti-microbiens libérés par les cellules de Paneth de l'hôte, grâce aux gènes *arlA* et *arlC*, permettant une meilleure colonisation de l'intestin. (6) Les AIEC sont capables de former des biofilms résistants à la surface de l'épithélium intestinal qui peuvent favoriser la colonisation à long terme et la persistance dans l'intestin. (7) Une fois dans la *lamina propria*, les AIEC sont engloutis par les macrophages, ce qui déclenche une réponse inflammatoire médiée par la libération de TNF- $\alpha$ . Après phagocytose, les AIEC survivent et se répliquent dans les macrophages en persistant dans le phagolysosome *via* la formation de biofilms. Adaptée de (Zangara et al., 2023).

Abréviations : CEACAM6 : *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6*, OMV : *outer membrane vesicle*.

Par ailleurs, certaines souches AIEC peuvent résister aux peptides anti-microbiens (défensines) présents dans la couche de mucus et impliqués dans le maintien de l'homéostasie intestinale en éliminant les bactéries (Zasloff, 2002). En effet, McPhee et co-auteurs ont identifié deux gènes, *arlA* et *arlC*, impliqués dans la résistance aux peptides anti-microbiens dans la souche AIEC NRG857c isolée chez un patient atteint de la MC. Le gène *arlA* code pour une protéine de la famille Mig-14 impliquée dans la résistance aux défensines et *arlC* code pour une protéase de la membrane externe (**Figure 22**) (McPhee et al., 2014).

## II.2.2 Adhésion des AIEC aux cellules épithéliales intestinales

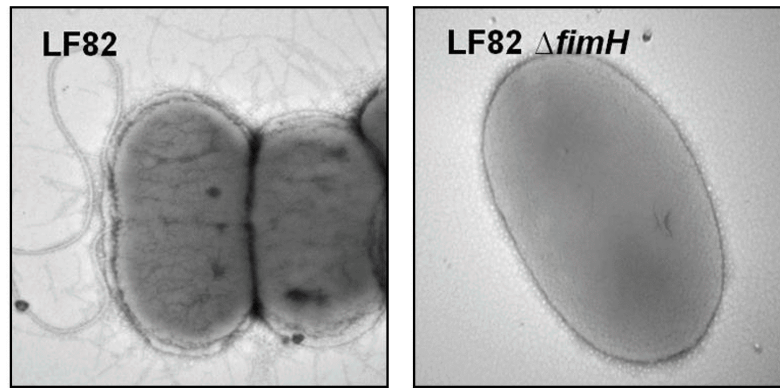
Une fois la couche de mucus traversée, les AIEC arrivent au contact de l'épithélium intestinal. Les AIEC vont adhérer fortement aux CEI, avant de les envahir et de rejoindre le compartiment sous-muqueux. Lors d'une inflammation intestinale, la barrière épithéliale est altérée et des récepteurs spécifiques sont anormalement exprimés au niveau de cet épithélium, favorisant la colonisation par les AIEC (Smith et al., 2013).

### II.2.2.1 Interaction FimH-CEACAM6

Différentes stratégies sont développées par les AIEC pour interagir et envahir les CEI. Actuellement, l'interaction la plus caractérisée est l'interaction entre FimH des AIEC et la protéine CEACAM6 de la cellule hôte. FimH est l'adhésine située à l'extrémité des pili de type I permettant l'adhésion des bactéries aux CEI et l'invasion des cellules hôtes (**Figure 23**) (Boudeau et al., 2001). CEACAM6, quant à lui, est un récepteur fortement exprimé au niveau de la muqueuse iléale lésée chez 35 % des patients atteints de la MC, alors qu'il n'est pas exprimé en conditions physiologiques (Barnich et al., 2007; Barnich and Darfeuille-Michaud, 2010). Ainsi, les AIEC interagissent avec les résidus mannosylés présents sur CEACAM6 *via* FimH. Cette interaction est facilitée par des mutations patho-adaptatives dans le gène *fimH*, conférant aux AIEC une forte capacité d'adhésion à l'épithélium intestinal et une résistance à l'élimination par le péristaltisme intestinal (Dreux et al., 2013). Plus récemment, une étude a montré que les glycanes oligomannoses exposés à la surface des cellules en apoptose sont les cibles de liaison des AIEC, favorisant d'avantage la colonisation par les AIEC. Enfin, les auteurs ont également identifié deux glycanes oligomannoses (Asn-197 et Asn-224) sur CEACAM6 qui pourraient être de potentiels récepteurs pour FimH (Dumych et al., 2018).

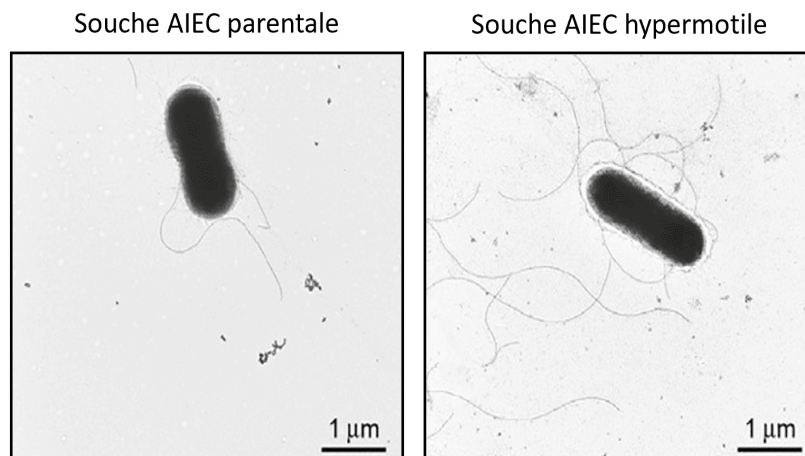
### II.2.2.2 Interaction ChiA-CHI3L1

L'adhésion des AIEC à l'épithélium de l'hôte est également médiée par l'interaction entre ChiA et la protéine CHI3L1 de l'hôte (Mizoguchi, 2006; Chen et al., 2011). Le gène bactérien *chiA*, codant pour une chitinase, a été identifié chez les AIEC comme étant impliqué dans l'interaction avec les CEI. Cinq polymorphismes conservés au sein du gène *chiA* ont été identifiés dans des souches d'*E. coli* pathogènes par rapport aux souches d'*E. coli* non pathogènes, indiquant que ces polymorphismes seraient associés à la virulence des AIEC *via* leur liaison accrue à CHI3L1 (Low et al., 2013). La protéine CHI3L1 contient un domaine de liaison



**FIGURE 23 : Production de flagelle et de pili de type I par la souche AIEC LF82 sauvage.**

Observation des flagelles et des pili de type I produits par la souche AIEC LF82 sauvage (à gauche) par microscopie électronique à transmission. Au contraire, la souche AIEC LF82 délétée pour *fimH* (à droite) n'est plus capable de produire des flagelles et des pili de type I ( $\times 40\ 000$ ). Adaptée de (Dreux et al., 2013).



**FIGURE 24 : Évolution et adaptation des AIEC à l'hôte avec la sélection d'un profil hypermotile.**

Observation des flagelles produits par la souche AIEC parentale (à gauche) et par la souche AIEC hypermotile (à droite) par microscopie électronique. La souche AIEC hypermotile possède plus de flagelles, et ces derniers sont plus longs que ceux produits par la souche parentale - échelle : 1  $\mu\text{m}$ . Adaptée de (Elhenawy et al., 2019).

à la chitine et est principalement surexprimée par les CEI et les macrophages de la *lamina propria* lors d'une inflammation intestinale (Mizoguchi, 2006; Chen et al., 2011), facilitant l'adhésion et l'internalisation des bactéries et aggravant la colite dans un modèle murin (Mizoguchi, 2006). Ainsi, l'interaction est médiée par le domaine de liaison à la chitine de ChiA, qui reconnaît CHI3L1, et plus spécifiquement, la N-glycosylation du résidu asparagine 68 (**Figure 22**) (Low et al., 2013).

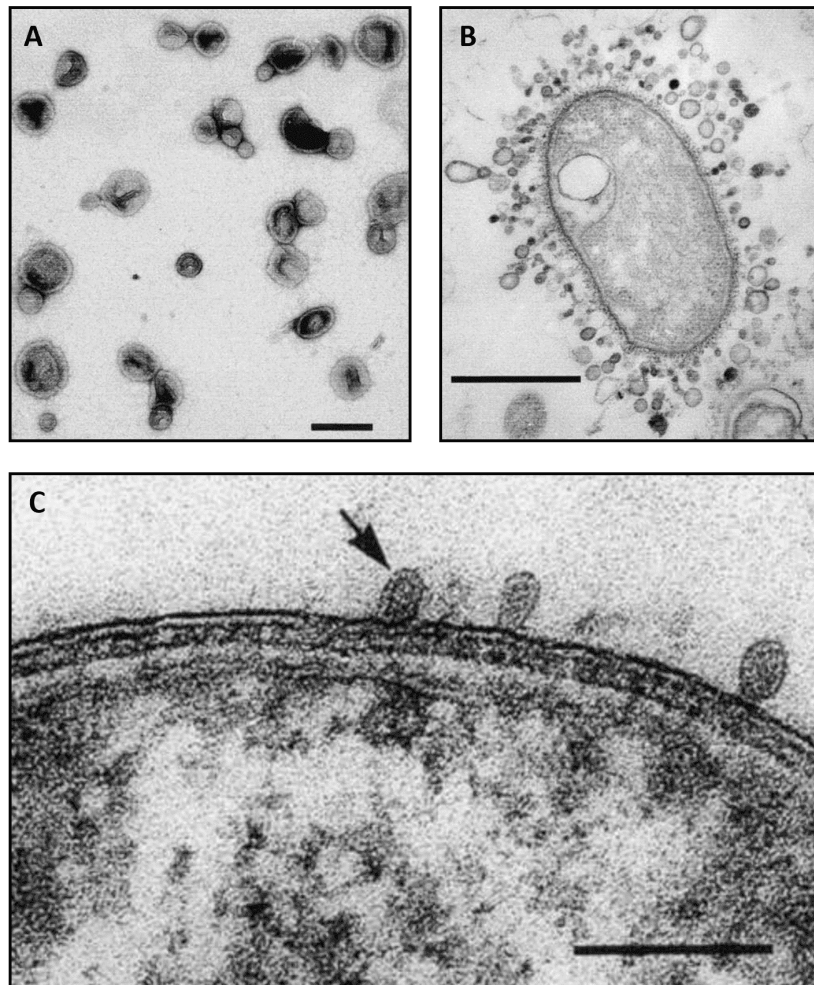
### II.2.2.3 Production de flagelles par les AIEC

Exprimés en présence d'acides biliaires ou de mucines, les flagelles sont des éléments retrouvés à la surface des AIEC permettant la locomotion et la mobilité bactérienne afin de traverser la couche de mucus pour atteindre l'épithélium intestinal, ainsi que d'adhérer et d'envahir les CEI (Barnich et al., 2003; Sevrin et al., 2020). En effet, le mutant isogénique de la souche AIEC LF82 délété du gène *fliC*, codant pour la flagelline FliC, composant majeur du flagelle, n'exprime plus que quelques pili de type I et n'est plus capable d'adhérer ni d'envahir les CEI en culture (Barnich et al., 2003), ni de traverser la couche de mucus chez des souris mono-colonisées (Sevrin et al., 2020). Il a également été révélé que les AIEC sont capables de réguler finement la production de leurs flagelles dans l'environnement intestinal. En effet, au contact de l'épithélium intestinal, l'expression de *fliC* est inhibée, permettant aux AIEC de persister durablement dans le tractus digestif en évitant une hyper-activation du système immunitaire (Sevrin et al., 2020). Enfin, une étude a rapporté que la transmission naturelle entre souris a conduit à l'évolution et à la sélection de souches AIEC ayant un phénotype hypermotile (**Figure 24**). Le séquençage du génome a révélé que l'hypermotilité des souches est due à l'intégration d'une séquence d'insertion mobile, renforçant l'invasion des AIEC. De plus, contrairement à une souche sauvage, une souche AIEC surexprimant de façon constitutive *fliC*, induit une réponse inflammatoire incontrôlée chez la souris conduisant à la clairance rapide des AIEC dans l'intestin (Elhenawy et al., 2019).

### II.2.2.4 Interaction OmpA-Gp96

Certaines bactéries à Gram négatif produisent des vésicules par bourgeonnement de leur membrane externe, appelées OMV (*outer membrane vesicle*), leur permettant d'interagir avec d'autres cellules procaryotes ou des cellules eucaryotes (Jan, 2017). Composées de LPS, de protéines de membrane externe et périplasmiques et de phospholipides, ces vésicules sont capables de transporter des toxines, des adhésines, des acides nucléiques et des composés immunomodulateurs affectant les cellules hôtes (**Figure 25**) (Jan, 2017). Comme la majorité des bactéries pathogènes (Wai et al., 1995; Horstman and Kuehn, 2002), la souche AIEC LF82 produit des OMV, de façon dépendante du gène *yfgl* (Rolhion et al., 2005). OmpA (*outer membrane protein A*), une protéine de surface des OMV, interagit avec le récepteur cellulaire Gp96 de l'hôte qui est fortement exprimé au pôle apical des CEI de l'iléon des patients atteints de la MC. L'interaction entre OmpA et Gp96 facilite l'entrée des AIEC et la fusion des OMV avec les CEI, induisant ainsi la libération dans la cellule hôte de protéines et molécules qui restent encore à identifier (**Figure 22**) (Rolhion et al., 2010, 2011).





**FIGURE 25 : Vésicules de membrane externe (OMV) observées par microscopie électronique à transmission.**

(A) OMV isolées, purifiées et colorées négativement à partir de surnageants de culture de *Pseudomonas aeruginosa* - échelle : 250 nm. (B) Coupe d'une bactérie à Gram négatif isolée au sein d'un biofilm d'eau douce libérant une quantité importante d'OMV - échelle : 1  $\mu$ m. (C) Coupe de *P. aeruginosa* montrant le développement des OMV avant d'être libérées par la cellule dans le milieu extracellulaire - échelle : 250 nm. Adaptée de (Beveridge, 1999).

### II.2.2.5 Interaction LPF-cellules M

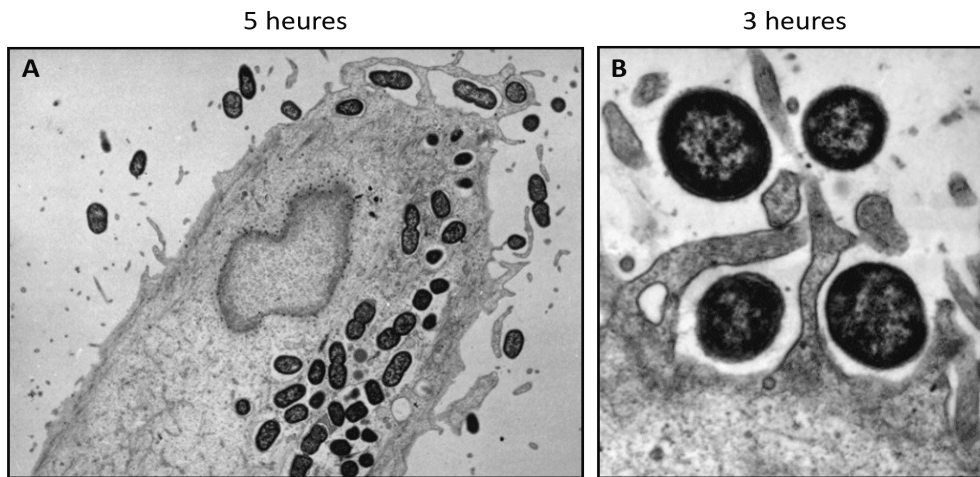
Les LPF (*long polar fimbriae*) sont de longues structures filamenteuses présentes aux pôles de la bactérie indispensables pour l'adhésion des AIEC aux cellules M, cellules épithéliales spécifiques à la surface des plaques de Peyer, qui favoriseraient la translocation des AIEC vers la *lamina propria* (Chassaing et al., 2011, 2013; Keita et al., 2020). En effet, une étude a démontré que la souche AIEC LF82 est capable d'interagir avec les plaques de Peyer humaines ou murines isolées, *via* les LPF, et de transloquer à travers des monocouches de cellules M. Cette étude a également rapporté que la prévalence des souches AIEC possédant l'opéron *lpf* est plus élevée chez les patients atteints de la MC que chez les patients contrôles (Chassaing et al., 2011). Les AIEC se lient aux cellules M *via* l'interaction entre les LPF et la glycoprotéine 2 (GP2), exprimée sur la membrane apicale des cellules M, favorisant la réponse immunitaire mucoale contre les AIEC. Un défaut de GP2 de l'hôte modifie la transcytose des bactéries possédant les pili de type I à travers les cellules M et réduit la réponse immunitaire des plaques de Peyer, démontrant que GP2 sert de récepteur pour la transcytose (**Figure 22**) (Hase et al., 2009).

Enfin, la délétion du gène *gipA* (*growth in Peyer's patches*), gène favorisant la réplication intra-macrophagique et la survie bactérienne dans les plaques de Peyer, abolit la capacité de la souche AIEC LF82 à interagir avec et envahir les plaques de Peyer, mais également à transloquer à travers la barrière intestinale *in vitro* et *in vivo* dans le modèle murin CEACAC10 (Vazelle et al., 2016).

### II.2.2.6 Formation de biofilms

Les biofilms sont des communautés de bactéries attachées à des surfaces et maintenues ensemble par une matrice extracellulaire auto-produite composée de diverses molécules d'ADN extracellulaire, de protéines et de polysaccharides, selon l'espèce bactérienne (Joo and Otto, 2012). La formation de biofilms confère aux bactéries une résistance plus élevée aux antibiotiques et à la clairance par le système immunitaire. En présence de signaux environnementaux spécifiques, les bactéries peuvent alors se disséminer à partir de leurs biofilms, déclenchant une réponse pro-inflammatoire dans l'intestin et provoquant des phases de poussées caractéristiques de la MC (Mansour et al., 2023). La capacité des AIEC à former des biofilms à la surface des CEI (Martinez-Medina et al., 2009b) a été montré dans un modèle pré-clinique murin (Elhenawy et al., 2021). En effet, cette capacité nécessite le facteur bactérien  $\sigma E$ , codé par le gène *rpoE* (Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2013), qui est activé en réponse à divers stress liés à la production ou au repliement des protéines de l'enveloppe bactérienne, comme la pression osmotique rencontrée dans le tractus digestif (Rolhion et al., 2007). Le facteur  $\sigma E$  régule également l'expression de l'opéron *waaWVL* nécessaire à la formation de biofilms et à la colonisation de la muqueuse intestinale par les AIEC (**Figure 22**) (Chassaing et al., 2015a).





**FIGURE 26 : Cellules épithéliales Hep-2 infectées par la souche AIEC LF82 observées par microscopie électronique à transmission.**

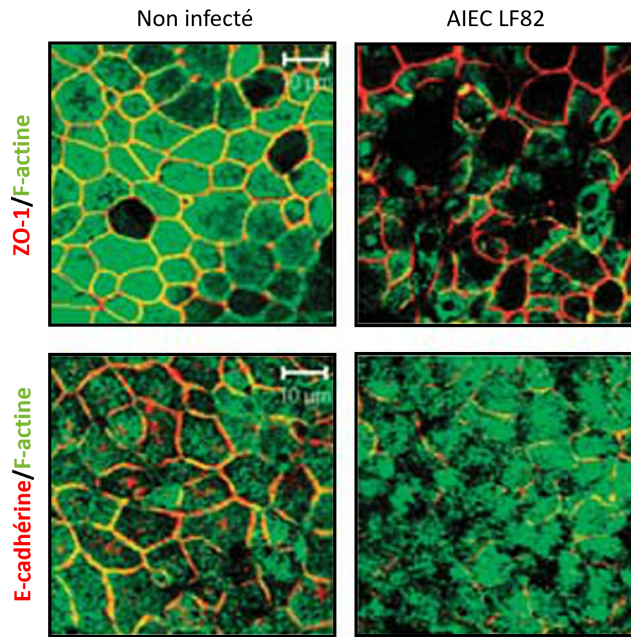
(A) Adhésion et invasion de la souche AIEC LF82 aux cellules épithéliales Hep-2 à 5 heures post-infection ( $\times 6\ 200$ ). (B) Formation d'élancements membranaires par les cellules Hep-2 qui englobent les bactéries adhérentes pour leur internalisation à 3 heures post-infection ( $\times 21\ 600$ ). Adaptée de (Boudeau et al., 1999).

### II.2.3 Invasion des cellules épithéliales intestinales par les AIEC

Après avoir traversé la couche de mucus et adhéré aux CEI, les AIEC peuvent également envahir, persister, voire même se répliquer dans les CEI. Certaines souches AIEC sécrètent l'invasine IbeA qui est une protéine de la membrane externe interagissant avec les récepteurs de l'hôte telle que la vimentine. IbeA est essentielle dans le processus d'invasion des AIEC et est actuellement la seule invasine caractérisée chez les AIEC. *In vitro*, la délétion de *ibeA* dans une souche AIEC altère sa capacité à envahir les CEI, les cellules M, et à survivre dans les macrophages, sans affecter sa capacité d'adhésion (Cieza et al., 2015). De façon intéressante, ces résultats ont été confirmés par une analyse récente du transcriptome *in vivo* des AIEC, qui a révélé que l'expression du gène *ibeA* est régulée positivement au début de la phase d'infection de l'hôte (Elhenawy et al., 2021).

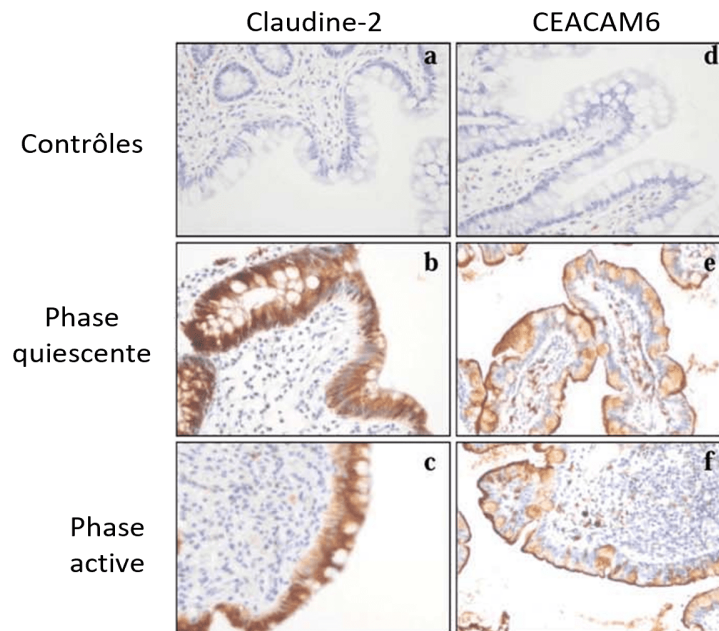
De plus, l'internalisation de la souche AIEC LF82 dans les CEI requiert le recrutement des microtubules et une polymérisation active de l'actine afin de former des élongations membranaires à la surface des cellules infectées, englobant ainsi les bactéries adhérentes (**Figure 26**) (Boudeau et al., 1999). Des structures morphologiques similaires ont également été observées lors de la macropinocytose induite par *Shigella* ou *Salmonella*, via leur T3SS (Dunn and Valdivia, 2010). L'analyse du génome de la souche AIEC LF82 a permis de mettre en évidence que de multiples souches AIEC possèdent des gènes codant pour les composants de deux systèmes de sécrétion de type VI (T6SS, *type 6 secretion system*) (Miquel et al., 2010). Initialement décrit pour son rôle dans la compétition inter-bactérienne, le T6SS est actuellement connu pour être impliqué dans l'augmentation de la multiplication bactérienne en macrophages, la diminution des réponses immunitaires de l'hôte ou encore l'interaction avec le système de microtubules de l'hôte, favorisant l'internalisation des bactéries dans les cellules hôtes (Navarro-Garcia et al., 2019). Toutefois, le rôle de ces deux T6SS dans la pathogénèse des AIEC reste encore à élucider.

Récemment, l'utilisation de la technique de séquençage TIS (*transposon-insertion sequencing*) également appelée Tn-Seq (*transposon sequencing*), a permis à Elhenawy et co-auteurs de découvrir que les AIEC utilisent un T4SS (*type 4 secretion system*) essentiel pour la formation de biofilms à la surface des CEI (Elhenawy et al., 2021). En effet, la souche AIEC NRG857c délétée pour le T4SS est incapable de coloniser ou de persister dans l'intestin de souris sauvages, et de s'agréger et de former des micro-colonies à la surface des CEI *in vitro*, contrairement à la souche sauvage. Ainsi, ces résultats suggèrent que la formation de biofilms médiée par le T4SS favorise la colonisation stable de l'hôte par les AIEC et que cela peut être un élément important de la persistance des AIEC. De façon intéressante, l'opéron *tra* codant pour le T4SS est significativement enrichi dans le microbiote des patients atteints de la MC par rapport aux patients contrôles (Elhenawy et al., 2021). Cependant, l'opéron *tra* n'est présent que dans 12 souches AIEC sur les 40 analysées, suggérant la présence de régulateurs supplémentaires dans la formation de biofilms pour permettre aux AIEC sans T4SS d'être compétitifs (Elhenawy et al., 2021).



**FIGURE 27 : Altération de la fonction barrière de l'épithélium intestinal par la souche AIEC LF82.**

L'infection des cellules Caco-2 différenciées par la souche AIEC LF82 induit une déstabilisation des jonctions serrées visualisée par la redistribution des protéines ZO-1 (*zonula occluden*) (en rouge, panel du haut) et E-cadhérine (en rouge, panel du bas), comparativement à la condition non infectée. Le cytosquelette d'actine est marqué en vert - échelle : 10  $\mu$ m. Adaptée de (Sasaki et al., 2007).



**FIGURE 28 : Expression de claudine-2 et de CEACAM6 dans les biopsies iléales de patients atteints de la maladie de Crohn.**

Coloration immunohistochimique (a-c) de la claudine-2 et (d-f) de CEACAM6 sur des biopsies iléales de patients contrôles (a,d), de patients atteints de la MC en phase quiescente (b,e) ou de patients atteints de la MC en phase d'inflammation aiguë (c,f) ( $\times 400$ ). Adaptée de (Denizot et al., 2012).

## II.2.4 Déstabilisation de la fonction barrière de l'épithélium par les AIEC

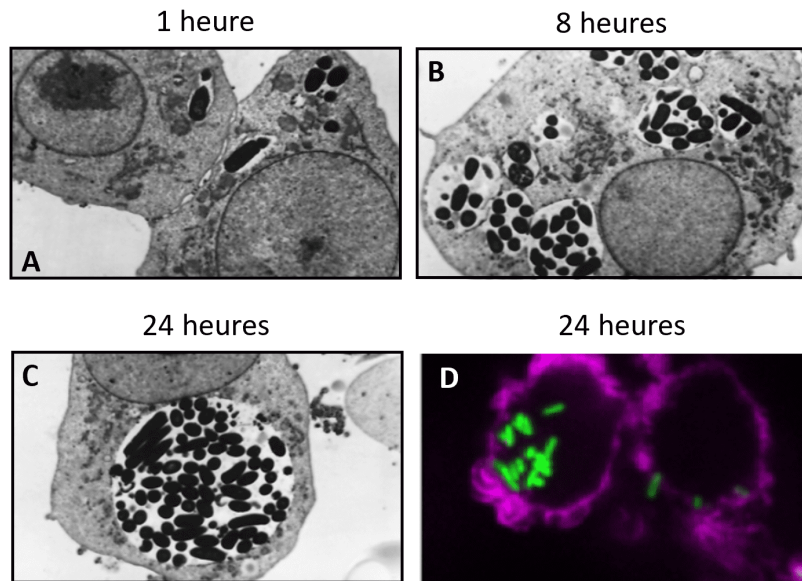
Les CEI sont inter-connectées par des jonctions serrées et des protéines de jonction adhérentes pour créer une barrière sélectivement perméable essentielle pour protéger l'hôte contre les bactéries pathogènes et leurs toxines (Turner, 2009; Peterson and Artis, 2014). Un déficit de la fonction barrière est fréquemment observé chez les patients atteints de la MC et est prédictif de rechutes (Michielan and D'Incà, 2015). Ainsi, différentes études se sont intéressées aux conséquences de l'infection par les AIEC sur la fonction barrière de l'épithélium intestinal.

En effet, des défauts de fonction et de structure des protéines de jonction ont été constatés chez les patients atteints de la MC et en modèles murins de MICI (Landy et al., 2016). D'une part, *in vitro*, il a été rapporté que l'infection par des AIEC isolés de patients atteints de la MC induit une diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées ZO-1 et E-cadhérine, une désorganisation de la F-actine ainsi que la diminution de la résistance électrique trans-épithéliale d'une monocouche de CEI (**Figure 27**) (Sasaki et al., 2007; Wine et al., 2009). D'autre part, chez les souris CEABAC10, l'infection par les AIEC entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale et l'induction de l'expression de la claudine-2 formant des pores dans les CEI, altérant ainsi l'intégrité de la muqueuse intestinale (**Figure 22**). Cette étude a également rapporté une surexpression de la claudine-2 et de CEACAM6 dans des biopsies iléales de patients atteints de la MC en phase active ou quiescente (**Figure 28**) (Denizot et al., 2012). En outre, les souris CEABAC10 sont très sensibles à la colite induite au DSS et présentent une augmentation anormale de la perméabilité intestinale sans signe d'inflammation, confirmant un défaut de barrière à l'état d'équilibre lors de la surexpression de CEACAM6 (Denizot et al., 2012). Par conséquent, ces résultats suggèrent que les AIEC et la surexpression de CEACAM6 sont impliqués dans l'augmentation de la perméabilité observée chez les patients atteints de la MC, altérant l'intégrité de la muqueuse.

Enfin, un régime riche en graisses et une carence en vitamine D sont également associés à une altération de la fonction barrière. Un régime riche en graisses et en sucres favorise la colonisation par les AIEC (Martinez-Medina et al., 2014) et une carence en vitamine D prédispose au dysfonctionnement de la barrière induite par les AIEC (Assa et al., 2015).

## II.2.5 Survie et réplication des AIEC dans les cellules immunitaires

Les AIEC expriment différents gènes clés qui favorisent leur survie ainsi que leur réplication dans un environnement spécifique, tels que les macrophages. Les macrophages sont des cellules immunitaires qui limitent la dissémination bactérienne par phagocytose et par présentation d'antigènes pour activer les cellules immunitaires adaptatives (Steinbach and Plevy, 2014). Chez les patients atteints de la MC, les macrophages se trouvent en plus grand nombre dans les tissus enflammés (Naser et al., 2011).



**FIGURE 29 : Macrophages J774-A1 et THP1 infectés par la souche AIEC LF82.**

(A-C) Macrophages murins J774-A1 infectés par la souche AIEC LF82 observés par microscopie électronique à transmission. (A) À 1 heure post-infection, les bactéries AIEC LF82 sont internalisées dans un autophagosome ( $\times 7\ 200$ ). (B) À 8 heures post-infection, les bactéries AIEC LF82 sont capables de survivre et de se répliquer, augmentant la taille des vacuoles ( $\times 7\ 200$ ). (C) À 24 heures post-infection, les bactéries AIEC LF82 se trouvent dans une large et unique vacuole après fusion des phagosomes entre eux ( $\times 7\ 200$ ). Adaptée de (Glasser et al., 2001). (D) Macrophages dérivés des monocytes THP-1 infectés par la souche AIEC LF82 observés par microscopie confocale. Macrophages marqués par l'actine (en violet) infectés par la souche AIEC LF82-GFP (en vert) à 24 heures post-infection - échelle : 5  $\mu\text{m}$ . Adaptée de (Demarre et al., 2019).

Après phagocytose par les macrophages murins J774, les souches AIEC isolées de patients atteints de la MC peuvent survivre et se répliquer, tout en résistant à l'activité bactéricide de ces cellules pendant au moins cinq jours, sans induire la mort des macrophages infectés qui sécrètent des taux importants de TNF- $\alpha$  (**Figure 29**). Les capacités des AIEC à survivre et à se répliquer dans les macrophages sont dues à l'induction des gènes *htrA*, *dsbA*, *hfq* et *gipA* dans la vacuole phagocytaire (Glasser et al., 2001). Les gènes *htrA* et *dsbA* codant respectivement pour une protéine de résistance à un stress (Bringer et al., 2005) et une oxydoréductase (Bringer et al., 2007), contribuent à la survie et à la réplication des AIEC intra-macrophagiques. Les gènes *hfq* et *gipA* codant respectivement pour une chaperonne à ARN essentielle pour l'adaptation des bactéries à un stress chimique (Simonsen et al., 2011) et un facteur permettant la colonisation des plaques de Peyer (Vazaille et al., 2016), facilitent également la réplication et la survie des AIEC en macrophages. Par ailleurs, dans les macrophages dérivés de monocytes de patients atteints de la MC, la souche AIEC LF82 se réplique de façon plus importante que dans les macrophages isolés de patients contrôles (Vazaille et al., 2015). De plus, il a été rapporté qu'un défaut de l'autophagie dans les macrophages isolés de patients atteints de la MC est associé à une augmentation de la réplication intracellulaire des AIEC (Buisson et al., 2019). Enfin, contrairement à ce qui a été constaté dans les macrophages ou les CEI, une étude a démontré que la souche AIEC LF82 peut également envahir et se répliquer au sein des neutrophiles humains entraînant leur mort cellulaire par l'autophagie (Chargui et al., 2012).

De plus, des travaux réalisés sur des macrophages murins ont révélé que la souche AIEC LF82 prolifère dans une vacuole possédant les caractéristiques d'un phagolysosome mature (Bringer et al., 2006; Lapaquette et al., 2012). Toutefois, les mécanismes sous-jacents de l'adaptation des AIEC à la survie et la réplication dans les macrophages ne sont pas encore totalement compris. Il a été montré qu'après phagocytose de la souche AIEC LF82 par les macrophages, les voies de stress bactérien peuvent agir comme signaux secondaires pour ralentir la croissance bactérienne. L'activation de cette voie de stress dans les macrophages entraîne des changements phénotypiques créant deux populations d'AIEC dans les phagolysosomes. En effet, une population d'AIEC continue de se répliquer, tandis que l'autre persiste sans se répliquer et présente une tolérance accrue aux composants du système immunitaire inné et aux antibiotiques, démontrant que les stress intracellulaires peuvent créer une hétérogénéité phénotypique au sein de la souche AIEC LF82 (Demarre et al., 2019). Une étude récente a révélé qu'après l'arrêt de la croissance bactérienne induit par le stress, la reprise de la réplication de la souche AIEC LF82 coïncide avec la formation de biofilms intracellulaires composés d'une matrice dans les phagolysosomes. Ceci favorise la persistance à long terme de la souche AIEC LF82 à l'intérieur des macrophages, probablement par le biais de la capture du fer ou de l'évitement des systèmes de défense innée de l'hôte (**Figure 22**) (Prudent et al., 2021). Par conséquent, ces données démontrent que les AIEC ont évolué pour survivre et se répliquer dans les macrophages grâce à l'acquisition d'une régulation spécifique des gènes et des réponses au stress essentiels pour leur survie dans des phagolysosomes.

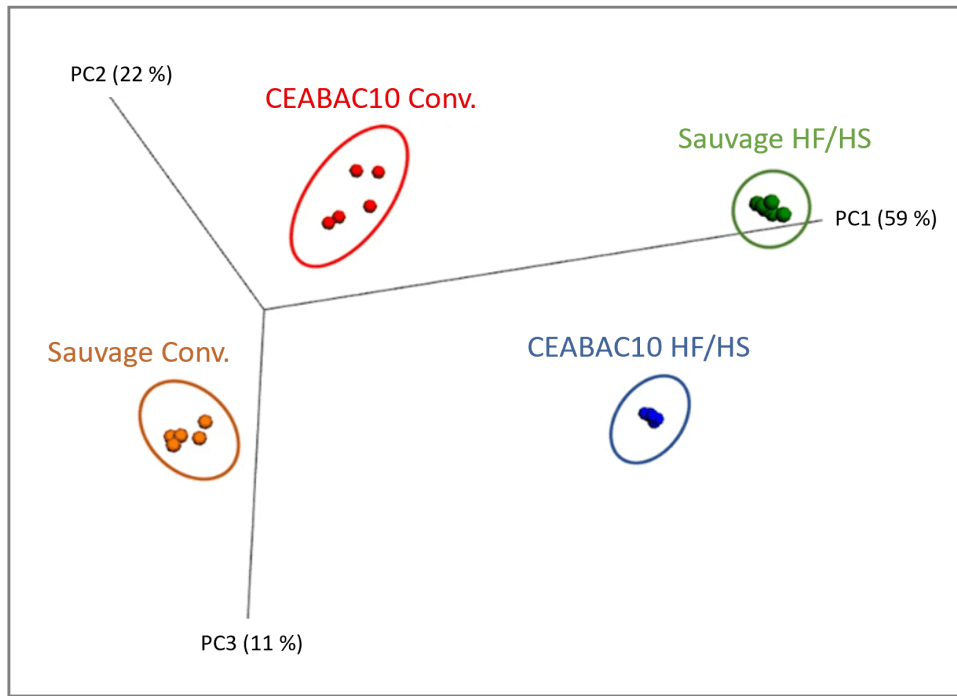


## II.2.6 Induction de la production de cytokines pro-inflammatoires par les AIEC

Plusieurs études ont rapporté que les AIEC activent les réponses pro-inflammatoires dans les cellules hôtes. Par exemple, l'expression du flagelle est directement impliquée dans la réponse inflammatoire intestinale. En effet, la flagelline est un motif moléculaire associé aux microbes (MAMP, *microbe-associated molecular pattern*) reconnu par les récepteurs du système immunitaire inné : le récepteur transmembranaire TLR5, récepteur de la flagelline bactérienne (Gewirtz et al., 2001), et le récepteur cytoplasmique NLRC4 (*NLR family CARD4*) (Chassaing et al., 2014; Zhao and Shao, 2015). Le rôle pro-inflammatoire de la flagelline a été confirmé dans un modèle murin d'infection par les AIEC. Cette étude a constaté que l'infection par la souche AIEC LF82 augmente l'expression de TLR5 et NLRC4 et aggrave la colite induite par le DSS chez les souris, caractérisée par de sévères dommages histo-pathologiques et une expression accrue de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-6 de façon dépendante de l'expression de la flagelline (Carvalho et al., 2008). De plus, chez les souris CEABAC10, la souche AIEC LF82 persiste au niveau intestinal, provoquant une colite sévère caractérisée par une inflammation de la muqueuse avec une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-17 ainsi qu'une diminution de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Carvalho et al., 2009). De la même manière, il a été démontré que l'infection par les AIEC de souris déficientes pour l'*Il-10* engendre une inflammation intestinale chronique caractérisée par l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-12 et IL-13 au niveau intestinal et la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-17 par les cellules T CD4<sup>+</sup> (Guo et al., 2018; Schmitz et al., 2019). Par ailleurs, chez des souris *il-10*<sup>-/-</sup>, l'infection par la souche AIEC LF82 exacerbe la colite et, contrairement aux souris non infectées, les souris infectées présentent une diminution du miARN let7b, une expression accrue du récepteur TLR4, activé par le LPS, et une sécrétion accrue des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$  dans les cellules épithéliales du côlon (Guo et al., 2018). Enfin, *in vitro*, les macrophages infectés par la souche AIEC LF82 sécrètent de plus grande quantité de TNF- $\alpha$ , favorisant la réplication intracellulaire des AIEC (Bringer et al., 2012). Cependant, il a été récemment rapporté que cette réplication intracellulaire peut être limitée par des anticorps anti-TNF- $\alpha$  dans les macrophages issus de patients atteints de la MC, *via* la modulation l'expression de la Flotillin-1 et de CHI3L1 (Douadi et al., 2022). Enfin, les cytokines pro-inflammatoires sont connues pour moduler la localisation et l'expression des protéines de jonction, induisant une altération de la fonction barrière (Al-Sadi et al., 2009). Par conséquent, l'infection par les AIEC altère la fonction barrière de l'épithélium intestinal de façon directe comme expliqué précédemment, ou indirecte à travers la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules infectées.

## II.2.7 Impact des AIEC sur le microbiote intestinal

L'altération du microbiote intestinal est une caractéristique de la MC et joue probablement un rôle principal dans la pathogenèse de la maladie. Des études ont démontré que les AIEC peuvent avoir un effet sur la composition globale du microbiote intestinal.



**FIGURE 30 : Impact d'un régime alimentaire de type occidental sur le microbiote fécal de souris CEABAC10 ou sauvages.**

Les souris CEABAC10 (*carcinoembryonic antigen bacterial artificial chromosome 10*) et sauvages ont été traitées avec un régime conventionnel (Conv.) ou un régime riche en graisses et en sucres (HF/HS, *high fat high sugar*) pendant 18 semaines (N = 5 par groupe Conv. et N = 6 par groupe HF/HS). Représentation de l'analyse en coordonnées principales (PCoA, *principal coordinate analysis*) montrant le regroupement des souris en fonction de la composition globale de leur microbiote fécal. Adaptée de (Agus et al., 2016).



D'une part, l'infection par la souche AIEC LF82 de souris génétiquement prédisposées et déficientes pour le gène codant la protéine EIF2AK4 (*eukaryotic translation initiation factor 2  $\alpha$  kinase 4*), également appelée GCN2 (*general control nonderepressible 2*), induit un défaut de l'élimination des AIEC par l'autophagie (Bretin et al., 2016) ainsi qu'une modification de la composition du microbiote, menant à une inflammation intestinale, comparativement aux souris non infectées (Bretin et al., 2018).

D'autre part, les souris déficientes pour le gène *Tlr5* développent une colite spontanée en partie à cause de leur incapacité à gérer les protéobactéries (Vijay-Kumar et al., 2007; Carvalho et al., 2012). En effet, dans ce modèle, des souris axéniques ont été infectées avec la souche AIEC LF82 avant d'être placées dans un environnement classique permettant l'implantation d'un microbiote complexe. L'infection de ces souris entraîne une inflammation intestinale chronique associée à des altérations de la composition du microbiote intestinal, avec notamment une perte de la diversité microbienne ainsi qu'une augmentation de son potentiel pro-inflammatoire. De plus, par rapport aux souris sauvages et *tlr5*<sup>-/-</sup> non infectées, des niveaux accrus de flagelline et de LPS ont été retrouvés dans les fèces de souris infectées, tous deux ayant un grand potentiel pour activer la réponse immunitaire innée (Chassaing et al., 2014). De la même manière, l'infection par des AIEC de souris *tlr5*<sup>-/-</sup> possédant un microbiote contrôlé appelé ASF (*altered schaedler flora*, communauté de huit micro-organismes dépourvus de bactéries pathogènes/pathobiontes qui coexistent dans l'intestin et favorisent le développement d'un système immunitaire intestinal normal), engendre des altérations de la composition du microbiote intestinal, caractérisées par des niveaux plus élevés de flagelline et de LPS (Chassaing and Gewirtz, 2018).

En outre, un changement de la composition du microbiote, avec une augmentation des Proteobacteria et une réduction des Firmicutes, a été constaté chez des souris CEABAC10 ayant reçu un régime de type occidental riche en graisses et en sucres. La modification du microbiote intestinal à la suite de ce régime favorise l'implantation des *E. coli* associés aux muqueuse iléales, caecales et coliques, ainsi que la colonisation par les AIEC associés à la MC (**Figure 30**) (Agus et al., 2016). De façon intéressante, dans un modèle murin de colite induite au DSS, l'infection par les AIEC aggrave la dysbiose et rend les souris résistantes au rétablissement du microbiote après une transplantation fécale (Zhilu et al., 2021). Par ailleurs, dans une cohorte chinoise de patients atteints de la MC, la présence des AIEC au niveau de l'iléon a été corrélée avec une dysbiose du microbiote plus sévère, caractérisée par une diminution de la diversité et de l'abondance des Firmicutes (Zhilu et al., 2021). Enfin, plus récemment, chez les patients atteints de la MC, une signature spécifique du microbiote a été associée à la colonisation par les AIEC, avec un enrichissement de *Ruminococcus gnavus* (Buisson et al., 2023).

En conclusion, ces différentes études indiquent que la colonisation intestinale par les AIEC impacte de façon négative la composition du microbiote intestinal, et participerait au développement ainsi qu'au maintien de la MC. Ces résultats suggèrent donc que la prédisposition génétique de l'hôte peut aider les AIEC à induire une inflammation chronique *via* l'altération de la composition du microbiote intestinal.

## II.2.8 Résistance des AIEC aux antibiotiques

Peu d'études se sont intéressées aux profils de résistance aux antibiotiques des souches AIEC. Les souches d'*E. coli* isolées de patients atteints de la MC ont tendance à être plus résistantes aux antibiotiques que les souches d'*E. coli* provenant d'individus sains, ce qui est probablement lié à l'utilisation d'antibiotiques chez les patients atteints de MICI (Martinez-Medina et al., 2020). Il a récemment été révélé que les souches AIEC sont, en moyenne, résistantes à quatre antibiotiques ou plus, contre deux antibiotiques pour les souches non-AIEC. De plus, la résistance aux antibiotiques  $\beta$ -lactamines est plus fréquente chez les souches AIEC (50 %) que chez les souches non-AIEC (22 %), tandis que la fréquence de résistance est similaire pour les tétracyclines, les aminosides et les quinolones (Dogan et al., 2013; Martinez-Medina et al., 2020). Enfin, définie par la norme internationale proposée comme la non-sensibilité acquise à au moins un agent appartenant à trois catégories d'antibiotiques ou plus (Magiorakos et al., 2012), la multirésistance est deux fois plus fréquente dans les souches AIEC (Martinez-Medina et al., 2020). Ainsi, de nombreuses souches AIEC satisfont à la définition de « superbactéries ».

## II.3 Facteurs de l'hôte régulant les capacités d'adhésion, d'invasion et de répliation intracellulaire des AIEC

Les capacités d'adhésion, d'invasion et de survie des AIEC en CEI et en macrophages sont certainement favorisées par des facteurs environnementaux et génétiques liés à l'hôte. En effet, dans le modèle murin CEA-BAC10, la colonisation des AIEC est facilitée après l'administration d'antibiotiques (Drouet et al., 2012), d'un traitement au DSS induisant une colite (Carvalho et al., 2008) ou encore d'un régime riche en graisses et en sucres (Martinez-Medina et al., 2014). Ainsi, ces différentes études mettent en lumière le lien étroit entre les facteurs génétiques, environnementaux et infectieux dans la pathogénèse de la MC.

### II.3.1 Influence de l'alimentation sur la capacité de colonisation des AIEC

L'environnement intestinal peut être impacté par l'alimentation, notamment chez les personnes vivant dans les pays développés et ayant un mode de vie occidental. Le régime alimentaire occidental, enrichi en graisses saturées, en protéines animales, en acides gras polyinsaturés n-6 et en sucres raffinés, est associé à un risque élevé de développer la MC (Chapman-Kiddell et al., 2010; Chiba et al., 2019; Levine et al., 2020). L'objectif de plusieurs études est de mieux appréhender l'impact d'un régime HF/HS sur le micro-environnement intestinal et sur l'infection par les AIEC. Chez les souris CEABAC10, le régime HF/HS (utilisé comme un régime de type occidental) induit une dysbiose avec un enrichissement important de la population d'*E. coli*. De plus, ce régime augmente la perméabilité intestinale, diminue l'épaisseur de la couche de mucus ainsi que la concentration en acides gras à chaînes courtes. Par conséquent, le régime HF/HS induit une inflammation à bas bruit et facilite

la colonisation de la muqueuse intestinale par les AIEC de manière dépendante du microbiote (Martinez-Medina et al., 2014; Agus et al., 2016). Les patients atteints de la MC présentent fréquemment des carences en vitamines B9 et B12 (donneurs de groupements méthyles), favorisant l'expression de CEACAM6 et la colonisation intestinale par les AIEC (Denizot et al., 2015). Ainsi, ces observations montrent que la composition du régime alimentaire peut moduler l'expression de gènes clés chez l'hôte, favorisant ainsi la colonisation par les AIEC de la muqueuse intestinale.

### II.3.2 Protection des cellules épithéliales intestinales par l'hôte

Les CEI peuvent se protéger de l'invasion bactérienne grâce à certains facteurs exprimés par l'hôte. Par exemple, la formation de biofilms par la souche AIEC LF82 est empêchée par le sucre N-acétylglucosamine présent dans la couche de mucus, qui interagit avec NagC, un senseur bactérien impliqué dans la régulation de la production des fimbriae de type I (Sicard et al., 2018). Par ailleurs, les CEI expriment plusieurs types d'endo- et exoprotéases pour protéger l'hôte contre la colonisation bactérienne. Plus particulièrement, la méprine induit le clivage protéolytique des pili de type I de la souche AIEC LF82, réduisant ainsi sa capacité à se lier aux résidus mannosylés sur les récepteurs de l'hôte. En effet, le pré-traitement de la souche AIEC LF82 avec de la méprine diminue sa capacité d'adhésion et d'invasion aux CEI T84 (Vazeille et al., 2011). Cependant, une réduction de l'expression de la méprine a été constatée chez les patients atteints de la MC et favoriserait la colonisation de la muqueuse intestinale par les AIEC.

### II.3.3 Autophagie, mécanisme de défense de l'hôte contre les infections

Les SNP dans des gènes de l'autophagie comme *IRGM*, *NOD2* ou *ATG16L1*, qui sont associés à une augmentation de la susceptibilité de développer la MC, entraînent un défaut d'élimination des bactéries intracellulaires, contribuant ainsi au développement de l'inflammation de la muqueuse intestinale (Lapaquette et al., 2017).

Au cours d'une infection bactérienne, le récepteur NOD2 interagit directement avec ATG16L1, induisant le recrutement de la machinerie autophagique au site d'entrée des bactéries pour initier l'autophagie (Travassos et al., 2010). Or, en présence des variants à risque de ces gènes associés à la MC, l'interaction entre la protéine NOD2 et ATG16L1 est altérée, ce qui empêche le recrutement de la machinerie autophagique et donc l'élimination des bactéries intracellulaires (Travassos et al., 2010). De plus, lors d'une infection par les AIEC, l'altération de l'expression d'*ATG16L1* ou d'*IRGM* dans les macrophages THP-1 ou de *NOD2* dans des macrophages péritonéaux isolés de souris *nod2*<sup>-/-</sup>, conduit à une augmentation de la réplication intracellulaire des AIEC ainsi que la sécrétion d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  (Lapaquette et al., 2012). Enfin, une étude a montré que l'infection par les AIEC de cellules qui surexpriment *NOD2* entraîne une plus forte expression d'*ATG16L1*, menant à la réduction de la survie des AIEC ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Negrini et al., 2016).

De la même manière, le contrôle de la réplication intracellulaire des AIEC dans les cellules épithéliales est altéré par la présence des variants à risque *ATG16LI*<sup>T300A</sup> (Lapaquette et al., 2010) ou *IRGM*<sup>C313T</sup> (Brest et al., 2011) associés à la MC. Les monocytes isolés de patients atteints de la MC porteurs du variant à risque *ATG16LI*<sup>T300A</sup> ne sont pas capables d'éliminer les bactéries AIEC intracellulaires, contrairement aux patients porteurs de l'allèle *ATG16LI* sauvage (Sadaghian Sadabad et al., 2015). En outre, il a été rapporté que des polymorphismes dans les gènes *ULK1* et *IRGM* dans les macrophages issus de patients atteints de la MC sont liés à un dysfonctionnement de l'autophagie, et donc à un défaut dans le contrôle de la réplication intracellulaire des AIEC (Elliott et al., 2015; Vazeille et al., 2015; Buisson et al., 2019). Par conséquent, les AIEC peuvent tirer profit d'un défaut de l'autophagie pour persister et se répliquer au sein des macrophages de patients atteints de la MC, favorisant ainsi la réponse pro-inflammatoire.

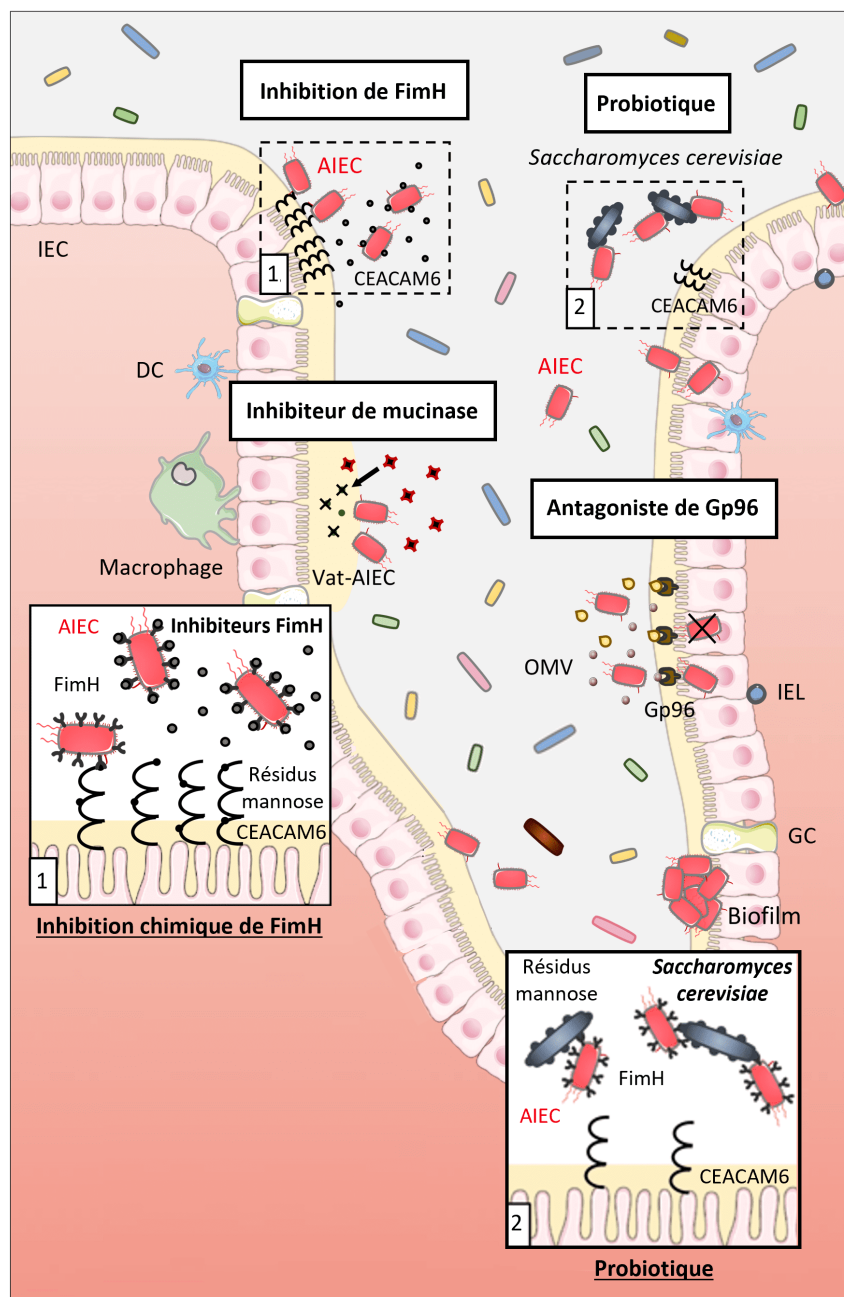
Enfin, *PTPN2* (*protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2*), un autre gène de l'autophagie, est également impliqué dans la régulation de la fonction barrière et de la réponse inflammatoire. Une nouvelle souche murine d'AIEC a été identifiée chez des souris déficientes pour *Ptpn2*, révélant l'importance de *PTPN2* dans le contrôle de l'expansion des AIEC (Scharl et al., 2009; Spalinger et al., 2016, 2018; Shawki et al., 2020). De plus, la perte de *PTPN2* dans les macrophages engendre une augmentation de l'entrée des bactéries ainsi qu'un défaut de l'autophagie associé à une acidification anormale des lysosomes. Les souris déficientes pour *Ptpn2* spécifiquement dans les cellules myéloïdes sont plus sensibles à l'infection par les AIEC (Spalinger et al., 2021). L'interaction entre les AIEC et l'autophagie sera largement détaillée dans le Chapitre 3 : Autophagie de ce manuscrit.

## II.4 Stratégies thérapeutiques ciblant les AIEC

### II.4.1 Inhibition de l'interaction entre les AIEC et l'épithélium intestinal

#### II.4.1.1 Probiotiques

Comme détaillé dans la section I.6.2.2. Probiotiques, prébiotiques, post-biotiques et symbiotiques du Chapitre 1 : Maladie de Crohn, de ce manuscrit, les probiotiques capables d'inhiber l'interaction entre les AIEC et les cellules hôtes représenteraient une bonne option thérapeutique pour les patients atteints de la MC et porteurs d'AIEC. En effet, des travaux menés *in vitro* ont démontré une diminution de la survie et de la croissance des AIEC lors de la co-culture avec *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. reuteri* 1063 et le prébiotique inuline (Van den Abbeele et al., 2016). De plus, la pré-incubation des CEI I-407 avec la souche probiotique *E. coli* Nissle 1917 avant l'infection par des souches AIEC ou la co-incubation d'*E. coli* Nissle 1917 avec des souches AIEC, inhibe fortement la capacité des AIEC à adhérer aux cellules I-407 et à les envahir, soulignant que *E. coli* Nissle 1917 pourrait être efficace chez les patients atteints de la MC pour prévenir ou limiter la colonisation par les AIEC (Boudeau et al., 2003). Par ailleurs, Sivignon et co-auteurs, ont étudié l'effet probiotique de la levure *S.*



**FIGURE 31 : Stratégies de prévention de la colonisation par les AIEC chez les patients atteints de la maladie de Crohn.**

(1) Des molécules anti-adhésives inhibant l'adhésine FimH ou (2) une souche probiotique telle que *Saccharomyces cerevisiae* contenant des résidus de mannose dans sa paroi cellulaire peuvent inhiber l'interaction FimH-CEACAM6 par compétition, en se liant à FimH qui est exprimé à la surface des bactéries. D'autres stratégies sont également intéressantes pour empêcher la colonisation par les AIEC, telles que l'utilisation d'un antagoniste de Gp96 pour bloquer l'interaction OmpA-Gp96 ou l'utilisation d'un inhibiteur de la mucinase Vat-AIEC pour empêcher la dégradation du mucus et la colonisation par les AIEC. Adaptée de (Chervy et al., 2020).

Abréviations : CEACAM6 : *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6*, DC : *dendritic cells*, GC : *goblet cells*, IEC : *intestinal epithelial cells*, IEL : *intra-epithelial lymphocytes*, OMV : *outer membrane vesicle*.

*cerevisiae* CNCM I-3856 sur la capacité des AIEC à interagir avec les CEI, car les levures présentent une forte teneur en résidus mannose sur leur paroi cellulaire qui peuvent être reconnus par les pili de type I des bactéries AIEC. *S. cerevisiae* CNCM I-3856 inhibe fortement l'adhésion de la souche AIEC LF82 aux CEI en culture et aux entérocytes isolés de patients atteints de la MC, grâce à l'agglutination des bactéries AIEC sur la levure *via* les pili de type I (Sivignon et al., 2015a). Enfin, chez les souris CEABAC10 infectées par la souche AIEC LF82, *S. cerevisiae* CNCM I-3856 diminue la colonisation intestinale des AIEC et empêche l'augmentation de la perméabilité intestinale et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Sivignon et al., 2015a). Par conséquent, *S. cerevisiae* pourrait être une bonne option thérapeutique pour les patients atteints de la MC déjà colonisés ou susceptibles d'être colonisés par des AIEC, en empêchant l'interaction entre FimH et CEACAM6 (**Figure 31**). Toutefois, d'autres études sont nécessaires pour déterminer si des résultats similaires sont obtenus dans différents modèles *in vivo* et si l'administration de souches prébiotiques ou probiotiques aux patients atteints de la MC pourrait constituer une approche thérapeutique appropriée.

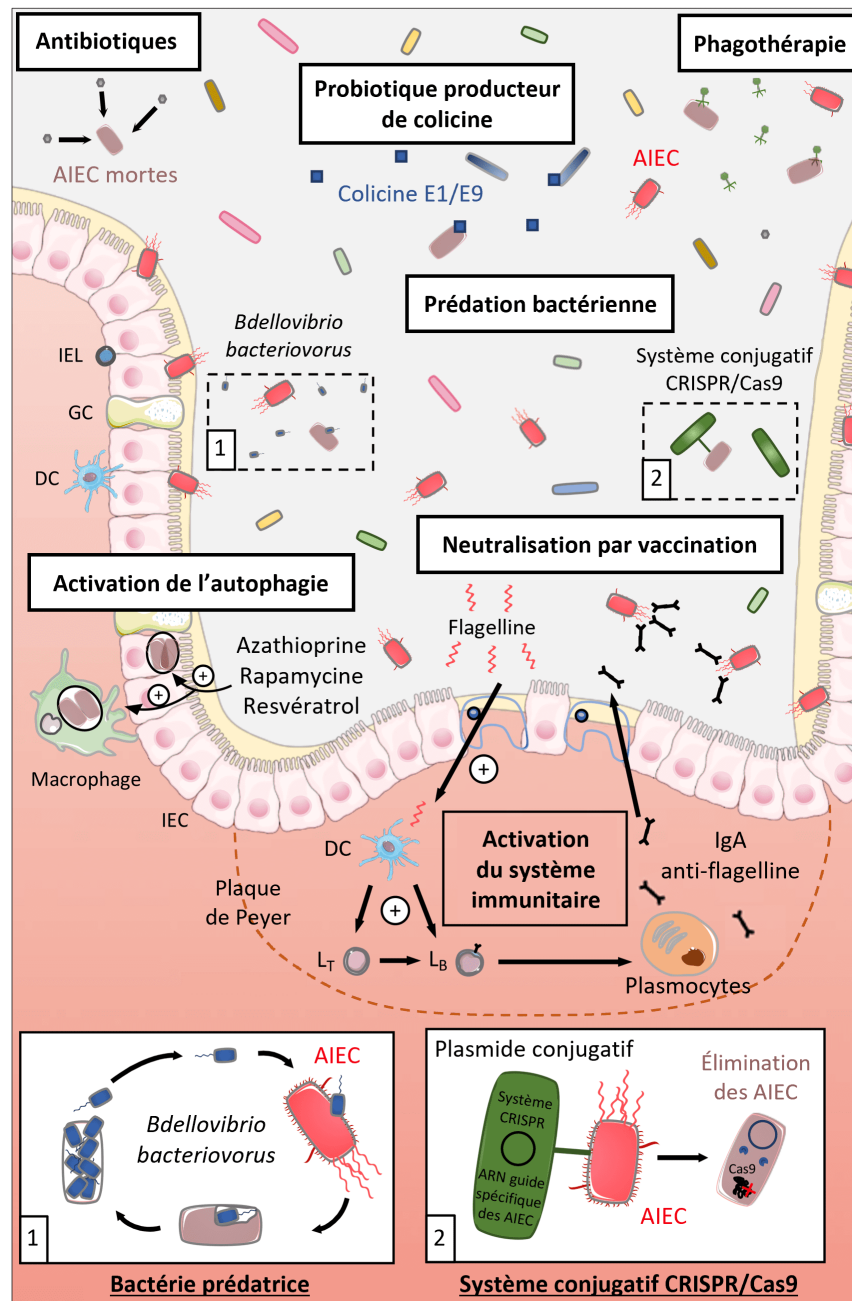
### II.4.1.2 Inhibition de l'adhésion des AIEC à l'aide de composés chimiques

Les recherches se sont concentrées sur le développement de molécules anti-adhésives afin de saturer le domaine de reconnaissance de FimH et inhiber ainsi son interaction avec CEACAM6 pour limiter la colonisation des AIEC. Par exemple, *in vitro*, les thiazolylaminomannosides et les glycopolymères à base de mannose présentent une forte affinité pour FimH, inhibant l'adhésion de la souche AIEC LF82 aux CEI (Chalopin et al., 2016). *Ex vivo*, ces deux composés ont également empêché l'adhésion de la souche AIEC LF82 à la muqueuse colique de souris CEABAC10 à de très faibles concentrations, démontrant leur fort potentiel anti-adhésif (Brument et al., 2013; Yan et al., 2015). En outre, il a également été rapporté que les dérivés de l'heptylmannoside réduisent considérablement l'adhésion de la souche AIEC LF82 aux CEI T84, diminuent la quantité de bactéries associées à la muqueuse et dans les fèces de souris CEABAC10 infectées par la souche AIEC LF82 et améliore la colite et l'inflammation intestinale chez ces souris (Sivignon et al., 2015b). En conclusion, cibler FimH avec des molécules anti-adhésives semble être une méthode prometteuse pour limiter l'adhésion des AIEC aux CEI (**Figure 31**). Cette stratégie devait être évaluée dans le cadre d'un essai clinique utilisant la molécule EB8018/TAK-018, qui bloque FimH, afin de déterminer son effet sur la récurrence endoscopique post-opératoire chez 96 patients atteints de la MC (phase 2a, NCT03943446). Cependant, l'entreprise pharmaceutique Takeda a récemment mis fin à cet essai.

### II.4.1.3 Autres stratégies

Bloquer l'interaction OmpA-Gp96 serait une alternative thérapeutique intéressante pour inhiber la colonisation des AIEC. Il existe un antagoniste de Gp96, le peptide synthétique Gp96-II, qui protège les souris contre l'inflammation intestinale *in vitro* et *in vivo* (Nold-Petry et al., 2017). Ainsi, il serait pertinent de tester cet an-





**FIGURE 32 : Stratégies visant à éliminer les AIEC chez les patients atteints de la maladie de Crohn.**

Les bactéries AIEC pourraient être éliminées par certains antibiotiques ou par une souche probiotique productrice de colicine ou encore par des bactériophages ciblant spécifiquement les AIEC. (1) Certaines stratégies de prédation bactérienne sont également à l'étude, où les AIEC seraient spécifiquement ciblées par des bactéries prédatrices ou (2) par des bactéries hébergeant le système conjugatif CRISPR-Cas9 avec un ARN guide spécifique dirigé contre les AIEC. L'activation de l'autophagie par des médicaments pharmacologiques chez les patients atteints de la MC est également étudiée pour favoriser l'élimination des AIEC. Enfin, une approche vaccinale basée sur l'administration de flagelline pourrait être un moyen de neutraliser les bactéries AIEC via la production d'immunoglobuline A (IgA) anti-flagelline. Adaptée de (Chervy et al., 2020).

Abréviations : CEACAM6 : *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6*, CRISPR-Cas9 : *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*, DC : *dendritic cells*, GC : *goblet cells*, IEC : *intestinal epithelial cells*, IEL : *intra-epithelial lymphocytes*, LB : *lymphocytes B*, LT : *lymphocytes T*.

tagoniste dans un contexte d'infection par les AIEC pour déterminer s'il empêche l'interaction OmpA-Gp96 et la colonisation des AIEC *in vitro* et *in vivo*, tout en recherchant de nouveaux antagonistes de Gp96 (**Figure 31**).

Enfin, il est intéressant de noter que les AIEC possèdent une mucinase Vat-AIEC capable de dégrader le mucus pour accéder à l'épithélium intestinal. Ainsi, le développement d'inhibiteurs de mucinase pourrait également représenter une option thérapeutique efficace pour mieux prendre en charge les patients atteints de la MC colonisés par des AIEC (**Figure 31**).

## II.4.2 Élimination des AIEC

### II.4.2.1 Antibiotiques

Les antibiotiques semblent être la première approche logique pour manipuler le microbiote des patients atteints de la MC et éliminer les AIEC. Plusieurs antibiotiques ont été testés pour traiter la MC, comme la ciprofloxacine, les aminoglycosides ou la rifaximine (**Figure 32**) (Kerman and Deshpande, 2014; Nitzan et al., 2016). Par exemple, une étude a montré de manière intéressante que la rifaximine réduit les capacités d'adhésion et d'invasion des souches AIEC aux cellules T84 et limite la sécrétion de la chimiokine pro-inflammatoire IL-8, *via* la régulation de l'expression des gènes de virulence et de la motilité (Dogan et al., 2018). Actuellement, sur la base de ces données pré-cliniques, un essai clinique randomisé en double aveugle (TEOREM, phase 2, NCT02620007) visant à évaluer l'effet d'un traitement de 12 semaines par la ciprofloxacine et la rifaximine sur la rémission endoscopique chez des patients atteints de la MC iléale et porteurs d'AIEC est en cours.

### II.4.2.2 Utilisation de colicines

Les colicines, produites par des bactéries à Gram négatif, constituent la famille de bactériocines la mieux caractérisée capable de tuer d'autres bactéries de façon hautement sélective et spécifique par le biais d'une activité nucléase, d'une activité de formation de pores ou par l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (Kleanthous et al., 1998; Riley and Wertz, 2002). Il a été démontré que les colicines E1 et E9 purifiées ainsi qu'une souche commensale d'*E. coli* produisant naturellement la colicine E1, détruisent les biofilms de la souche AIEC LF82. Ces colicines E1 et E9 induisent également la destruction des AIEC adhérents aux CEI et des AIEC intra-macrophagiques *in vitro* sans entraîner de toxicité cellulaire. Ainsi, les colicines pourraient être une approche thérapeutique pertinente pour cibler sélectivement les AIEC. Elles pourraient être administrées sous forme de protéines purifiées ou par l'intermédiaire d'un probiotique producteur de colicine, une souche d'*E. coli* Nissle 1917 produisant de la colicine existe déjà (**Figure 32**) (Kotłowski, 2016).



### II.4.2.3 Thérapie par les bactériophages

Les bactériophages sont des virus capables d'infecter les bactéries qui sont présents dans divers environnements, y compris le tractus gastro-intestinal humain (Reyes et al., 2010; Hoyles et al., 2014). Les bactériophages sont très spécifiques ; ils ne ciblent qu'un nombre limité de souches bactériennes au sein d'une espèce donnée, limitant leur impact sur la composition du microbiote intestinal. Jusqu'à présent, aucune preuve n'a été rapportée que la thérapie par les phages provoque des effets indésirables (Galtier et al., 2016; Sarker et al., 2016). L'utilisation d'un cocktail de trois bactériophages capables d'infecter les AIEC *in vitro* et *ex vivo*, diminue la colonisation intestinale de la souche AIEC LF82 ainsi que la réponse pro-inflammatoire chez les souris CEA-BAC10 et les souris sauvages traitées au DSS (**Figure 32**). De plus, les bactériophages ont pu se répliquer *ex vivo* sur des biopsies iléales de patients atteints de la MC et infectés par la souche AIEC LF82, démontrant ainsi leur efficacité potentielle sur la muqueuse intestinale (Galtier et al., 2017). Par ailleurs, une étude récente a évalué l'efficacité et la spécificité d'un cocktail de sept phages (EcoActive) contre 210 souches cliniques AIEC et 43 souches non-*E. coli* appartenant aux 12 genres bactériens les plus courants, généralement associés au microbiote intestinal humain d'une personne saine. Ce cocktail s'est montré efficace *in vitro* contre 95 % des souches AIEC sans lyser les souches non-*E. coli* commensales. *In vivo*, une seule administration du cocktail ne parvient pas à atténuer l'inflammation lors d'une infection par la souche AIEC LF82, tandis que les souris ayant reçu le cocktail deux fois par jour pendant 15 jours sont protégées des manifestations cliniques et microscopiques de l'inflammation (Titécot et al., 2022). Enfin, ce cocktail fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase 2, en double aveugle, randomisé et contrôlé par placebo (NCT03808103). Cet essai vise à étudier l'effet de l'administration orale du cocktail de bactériophages spécifiques des AIEC (EcoActive) sur l'activité de la maladie, les marqueurs inflammatoires et la charge en AIEC dans une cohorte de 30 patients atteints de la MC.

### II.4.2.4 Prédation et compétition bactérienne

#### II.4.2.4.1 Prédation bactérienne

La bactérie *Bdellovibrio bacteriovorus* est un prédateur des bactéries à Gram négatif qui joue le rôle « d'équilibre écologique » dans plusieurs habitats et qui colonise faiblement la muqueuse intestinale de patients atteints de MICI par rapport aux patients contrôles (Stolp and Starr, 1963; Iebba et al., 2013). *B. bacteriovorus* migre et rencontre des bactéries proies grâce à son long flagelle, puis envahit la proie pour se répliquer, conduisant à la mort de la proie et à la libération de *B. bacteriovorus* (Rendulic et al., 2004; Lambert et al., 2006). Sur des biofilms préformés et en développement, il a été observé que *B. bacteriovorus* possède une activité prédatrice contre la souche AIEC LF82 en réduisant l'adhésion et l'invasion des cellules Caco-2 (**Figure 32**). *In vivo*, les larves de *Galleria mellonella* présentent un taux de survie accru lors de l'infection par la souche AIEC LF82 pré-incubée avec *B. bacteriovorus*, démontrant que *B. bacteriovorus* limite la pathogénicité des AIEC ou la susceptibilité de l'hôte à être colonisée (Bonfiglio et al., 2019). Ainsi, *B. bacteriovorus* pourrait re-

présenter une stratégie thérapeutique intéressante pour limiter la prolifération des AIEC chez les patients atteints de la MC. Toutefois, il reste nécessaire d'identifier les conséquences de la présence de cette bactérie sur la composition globale du microbiote, car elle pourrait cibler plus largement les bactéries à Gram négatif, ce qui pourrait ouvrir une niche écologique supplémentaire pour la colonisation des AIEC.

#### II.4.2.4.2 Conjugaison bactérienne et CRISPR

La conjugaison est l'un des mécanismes de transfert horizontal de gènes les plus efficaces utilisés par les bactéries pour transférer des îlots de pathogénicité et des gènes de résistances aux antibiotiques aux bactéries voisines. Un plasmide conjugatif a été utilisé avec succès pour transférer le système CRISPR-Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*) d'*E. coli* à *Salmonella enterica*, ce qui a permis de tuer *Salmonella* (Hamilton et al., 2019). Cette stratégie a également été utilisée pour éliminer sélectivement des gènes de résistances aux antibiotiques chez *Enterococcus faecalis* *in vitro* et *in vivo* (Rodrigues et al., 2019). Ainsi, l'hypothèse serait que l'utilisation de bactéries probiotiques, hébergeant un plasmide conjugatif codant pour le système CRISPR-Cas9 et un ARN guide ciblant un gène spécifique d'*E. coli* ou, plus spécifiquement, ciblant des polymorphismes très répandus dans les souches AIEC (mutations patho-adaptatives de FimH par exemple), conduirait à l'élimination spécifique et contrôlée des bactéries AIEC sans altérer les autres membres du microbiote. Cette stratégie permettrait donc d'éliminer des souches très spécifiques dans un environnement multi-bactérien (**Figure 32**).

### II.4.3 Interventions nutritionnelles

Les interventions nutritionnelles sont d'un grand intérêt pour limiter la colonisation des AIEC et favoriser l'expansion des bactéries bénéfiques dans le microbiote des patients atteints de la MC. Il a été révélé qu'un régime alimentaire déficient en vitamines B9 et B12 entraîne une surexpression de CEACAM6 favorisant la colonisation intestinale des AIEC (Denizot et al., 2015). Une autre étude a montré que le métabolisme des AIEC s'orientait vers le catabolisme de la L-sérine dans l'intestin enflammé permettant de favoriser la réplication des AIEC au détriment des bactéries commensales, et que la déplétion de la sérine dans le régime alimentaire limitait la réplication des AIEC dans des conditions inflammatoires (Kitamoto et al., 2020). De plus, il a été démontré que l'exposition des AIEC à la maltodextrine, un polysaccharide dérivé de l'hydrolyse de l'amidon, induit l'expression des pili de type I, favorisant la formation de biofilms par la souche AIEC LF82 et l'adhésion aux CEI *in vitro* (Nickerson and McDonald, 2012). Ainsi, une stratégie diététique pourrait consister à compléter le régime alimentaire des patients atteints de la MC et porteurs d'AIEC par les vitamines B9 et B12, afin de prévenir l'expression anormale de CEACAM6, et de limiter les apports en sérine et en maltodextrine pour empêcher la prolifération et la colonisation intestinale des AIEC. Enfin, des prébiotiques pourraient également être proposés aux patients pour favoriser la croissance et l'activité des bactéries protectrices qui limiteraient l'implantation des AIEC.

## II.4.4 Activation de l'autophagie

Chez les patients atteints de la MC présentant des polymorphismes dans les gènes associés à l'autophagie, l'activation de l'autophagie par des médicaments pharmacologiques pourrait être une solution thérapeutique intéressante pour limiter la persistance des AIEC et l'inflammation. Lapaquette et co-auteurs ont démontré que l'induction pharmacologique (rapamycine) de l'autophagie inhibe la réplication intracellulaire de la souche AIEC LF82 et la libération de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages de souris *nod2*<sup>-/-</sup> (Lapaquette et al., 2012). L'azathioprine, un médicament actuellement utilisé dans le traitement des MICI, active l'autophagie dans les macrophages THP-1 *in vitro*, améliorant la clairance des AIEC intracellulaires et réduisant la réponse pro-inflammatoire. Ce médicament active également l'autophagie dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC, *peripheral blood mononuclear cell*) de patients, y compris dans les PBMC exprimant le variant à risque *ATG16L1*<sup>T300A</sup> associé à la MC (Hooper et al., 2019). En outre, une étude récente a révélé que le resvératrol, un polyphénol présent dans certains fruits comme les raisins et les mûres, stimule l'autophagie et favorise la clairance des AIEC *in vitro* dans les CEI par l'autophagie (**Figure 32**) (Al Azzaz et al., 2018).

## II.4.5 Vaccination

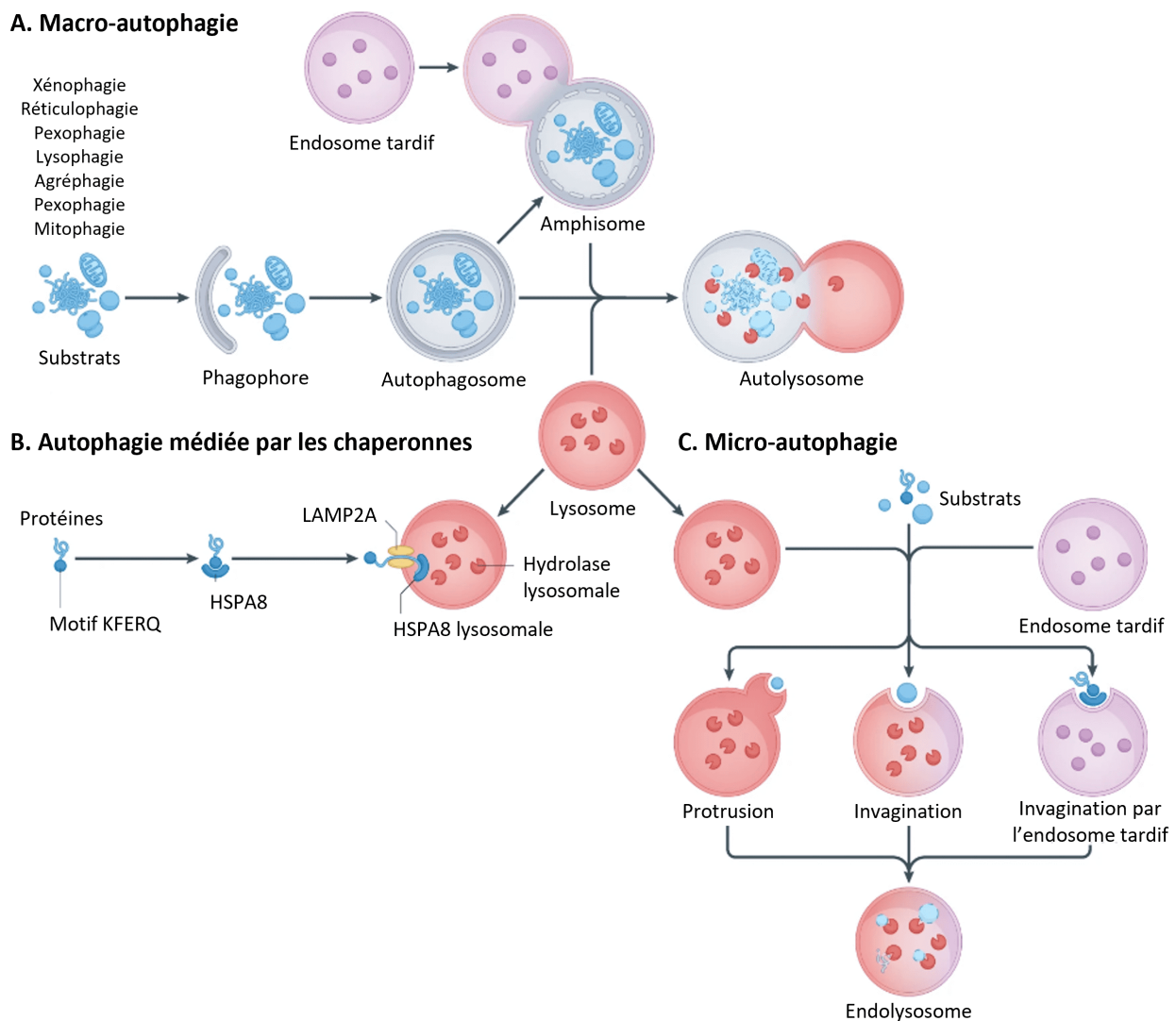
### II.4.5.1 Vaccination contre la flagelline

La flagelline est un déclencheur connu de la réponse inflammatoire intestinale par l'activation de TLR5. Des niveaux accrus de flagelline ont été observés dans les fèces lors de l'infection par la souche AIEC LF82 chez des souris *tlr5*<sup>-/-</sup> (Chassaing et al., 2014). L'administration hebdomadaire de flagelline à des souris sauvages entraîne une augmentation des niveaux d'IgA anti-flagelline dans le sérum et les fèces, ainsi qu'une altération de la composition du microbiote intestinal associée à une augmentation des bactéries ciblées par des IgA. Cette administration de flagelline entraîne aussi une réduction des niveaux de flagelline fécale et une diminution du potentiel pro-inflammatoire du microbiote (Tran et al., 2019). Ainsi, la stimulation de l'immunité adaptative contre la flagelline pourrait être un moyen de réduire la persistance des AIEC dans l'intestin et de limiter l'inflammation (**Figure 32**). Il convient de noter que les AIEC sont fortement ciblées par les IgA dans le microbiote des patients atteints de spondyloarthrite associée à la MC, renforçant l'hypothèse selon laquelle une stratégie vaccinale à base de flagelline pourrait être bénéfique pour les patients atteints de la MC (Viladomiu et al., 2017).

### II.4.5.2 Vaccination contre les sidérophores

Pour survivre dans l'intestin enflammé, les Entérobactéries acquièrent le fer, un élément nutritif essentiel, en libérant des sidérophores. Une étude récente a mis en œuvre une stratégie basée sur l'immunisation ciblant le sidérophore entérobactine afin de réduire la prolifération des AIEC dans l'intestin enflammé. En utilisant des

souris *il10<sup>-/-</sup>* ou un modèle murin de colite induite au DSS, les auteurs ont montré que l'immunisation avec l'entérobactine induit une forte production d'anticorps muqueux et sériques contre ce sidérophore. Les souris immunisées contre l'entérobactine présentent une amélioration de la colite ainsi qu'une diminution de la colonisation et des AIEC associés à la muqueuse intestinale (Gerner et al., 2022). Par conséquent, les sidérophores pourraient être des cibles thérapeutiques potentielles pour réduire la colonisation par les AIEC chez les patients atteints de la MC.



**FIGURE 33 : Trois types d'autophagie dans les cellules mammifères.**

Trois types d'autophagie sont retrouvés dans les cellules mammifères : la macro-autophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes et la micro-autophagie. (A) Au cours de la macro-autophagie, les composants cytoplasmiques sont progressivement capturés par une double membrane appelée phagophore. Après fermeture, les autophagosomes matures peuvent fusionner avec le lysosome ou un endosome tardif pour former, respectivement, un autolysosome ou un amphisome. Plusieurs types de composants cytoplasmiques peuvent être capturés par la macro-autophagie et le processus prend alors le nom spécifique correspondant au matériel dégradé (xénophagie pour les pathogènes intracellulaires, réticulophagie pour le réticulum endoplasmique, mitophagie pour les mitochondries, etc.). (B) L'autophagie médiée par les chaperonnes implique la reconnaissance des substrats autophagiques tels que les protéines mal repliées par des protéines de la famille des HSP. Cette étape est suivie de la translocation du substrat autophagique au travers de la membrane du lysosome de manière dépendante de LAMP2A. (C) Enfin, au cours de la micro-autophagie, les composants cytoplasmiques sont capturés par invagination ou protrusion directe de la membrane du lysosome. Adaptée de (Wang et al., 2023).

Abréviations : HSP : *heat shock protein*, LAMP2A : *lysosome-associated membrane protein type 2A*.

# Chapitre III : Autophagie

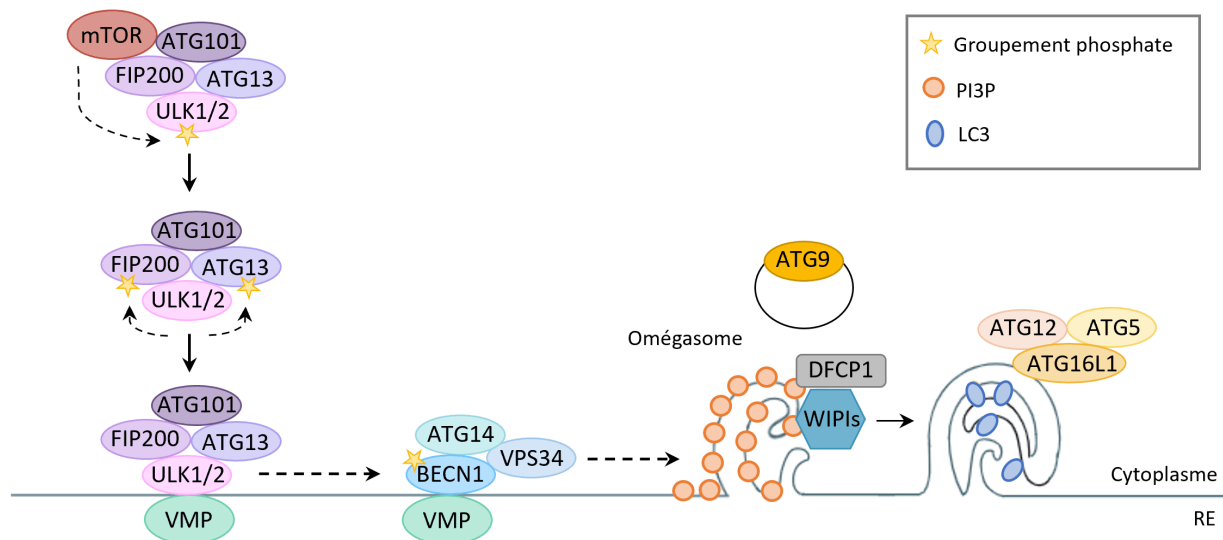
## III.1 Généralités

Le terme « autophagie » a été utilisé pour la première fois dans les années 1860, toutefois ce n'est qu'en 1963 que Christian de Duve utilisa ce terme sous sa définition actuelle. L'autophagie désigne un processus cellulaire qui permet le maintien de l'homéostasie cellulaire, par lequel le contenu cytoplasmique est délivré aux lysosomes pour être dégradé ou recyclé. Par la suite, Yoshinori Ohsumi a reçu le prix Nobel de physiologie et médecine en 2016, pour la découverte des gènes liés à l'autophagie (ATG, *autophagy-related gene*) chez la levure dans les années 1990 (Tsukada and Ohsumi, 1993; Kirkin, 2020).

Actuellement, trois types d'autophagies ont été décrites chez les mammifères : la micro-autophagie, l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (CMA, *chaperone-mediated autophagy*) et la macro-autophagie (Galluzzi et al., 2017). Lors de la micro-autophagie, les substrats intracellulaires sont capturés dans le cytoplasme par protrusion ou invagination des membranes lysosomales. Au cours de la CMA, les substrats cibles contenant un motif consensus unique « KFREQ » sont sélectivement reconnus par des protéines chaperonnes de la famille HSP (*heat shock protein*), déclenchant ainsi la translocation des substrats au travers des membranes lysosomales de manière dépendante de LAMP2A (*lysosome-associated membrane protein type 2A*). Lors de la macro-autophagie, une membrane d'isolation séquestre une petite portion du cytoplasme contenant du matériel soluble et des organites pour former un autophagosome, qui fusionnera ensuite avec un lysosome, formant ainsi un autolysosome (**Figure 33**). Enfin, ces trois types d'autophagie se terminent par la dégradation ou le recyclage du contenu cytoplasmique capturé, par le lysosome (Galluzzi et al., 2017). Dans ce manuscrit, seul le mécanisme de la macro-autophagie sera détaillé.

## III.2 Mécanismes moléculaires de la macro-autophagie

La macro-autophagie, appelée autophagie dans la suite de ce manuscrit, se déroule en trois étapes successives : (i) l'initiation, au cours de laquelle se forme la membrane d'isolation, (ii) l'élongation de la membrane et enfin (iii) la maturation de l'autophagosome et la dégradation de son contenu après fusion avec le lysosome (Yin et al., 2016).



**FIGURE 34 : Initiation de la formation des autophagosomes.**

Une fois activé, le complexe ULK est recruté sur la membrane du RE grâce à l'interaction de la protéine ULK1 avec les protéines VMP présentes dans la membrane du RE. La phosphorylation de la protéine BECN1 par ULK1 induit l'activation de la protéine VPS34 permettant la production de PI3P dans la membrane du RE. La synthèse de PI3P initie la formation de l'omégasome sur lequel sera recruté le complexe WIPI qui recrutera à son tour le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 nécessaire à l'élongation de l'autophagosome. Adaptée de (van Beek et al., 2018).

Abréviations : ATG : *autophagy-related gene*, DFPC1 : *double FYVE-domain containing protein 1*, LC3 : *light chain 3*, mTOR : *mechanistic target of rapamycin*, PI3P : *phosphatidylinositol-3-phosphate*, RE : *réticulum endoplasmique*, ULK : *unc-51 like autophagy activating kinase*, VMP : *vacuole membrane protein*, VPS : *vacuolar protein sorting*, WIPI : *WD repeat protein interacting with phosphoinositides*.

### III.2.1 Initiation

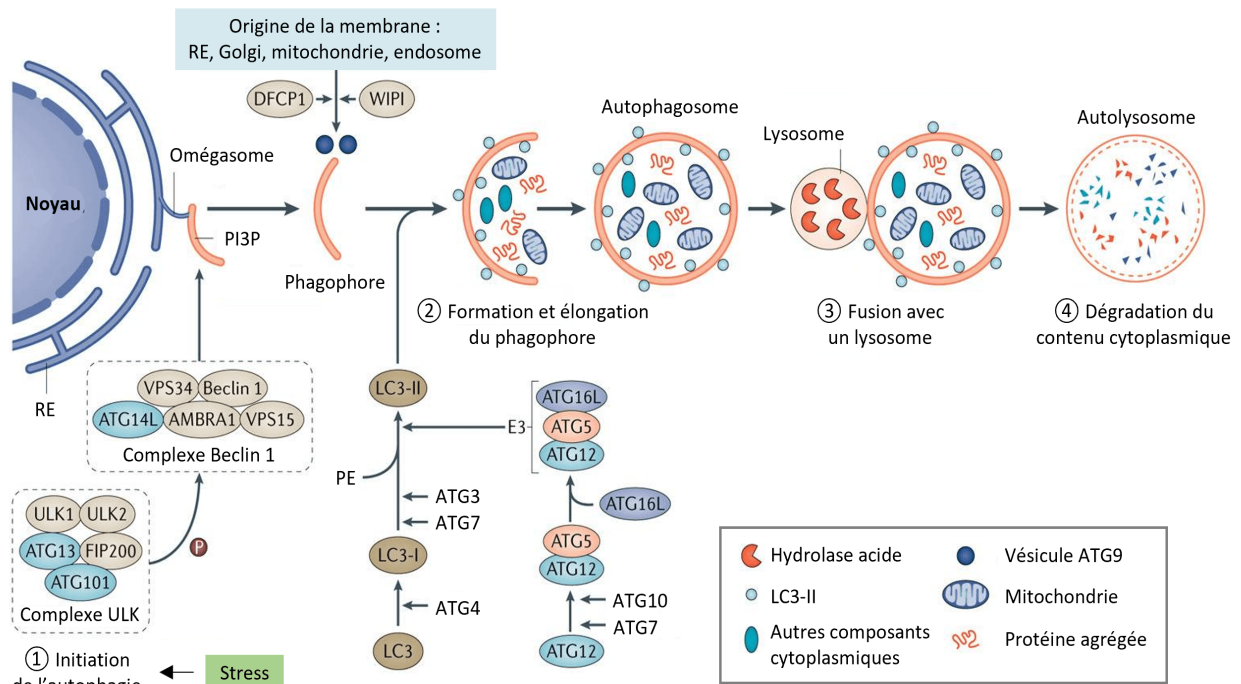
**Recrutement des complexes ULK et Beclin 1** : L'initiation de l'autophagie nécessite le recrutement du complexe ULK (*unc-51 like autophagy activating kinase*) composé des protéines ULK1/2, ATG13 et FIP200 (*focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa*) (Ganley et al., 2009). Les signaux activateurs de l'autophagie entraînent la phosphorylation de la sérine-556 d'ULK1, qui va, à son tour, phosphoryler ATG13 et FIP200, activant ainsi le complexe ULK. Ce complexe est ensuite recruté au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (Karanasios et al., 2013) en interagissant avec les protéines transmembranaires VMP (*vacuole membrane protein*) situées dans la membrane du RE, induisant la formation du phagophore (Koyama-Honda et al., 2013). La localisation d'ULK1 au niveau de la membrane du RE engendre le recrutement du complexe PI3K de classe III (*phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3*) composé des protéines Beclin 1 (BECN1), ATG14 et VPS34 (*vacuolar protein sorting 34*). Au niveau de la membrane du RE, la protéine BECN1 interagit également avec les protéines VMP (**Figure 34**) (Molejon et al., 2013).

**Formation de l'omégasome** : La phosphorylation de BECN1 par ULK1 active la protéine VPS34, induisant la production de PI3P (*phosphatidylinositol-3-phosphate*) nécessaire à la formation des autophagosomes (Russell et al., 2013). Ainsi, la présence enrichie de PI3P au sein de la membrane du RE permet la formation d'une structure appelée omégasome (Ktistakis et al., 2011). Cette structure donne naissance à une membrane isolée, appelée phagophore, qui formera par la suite l'autophagosome (**Figure 34**). Cependant, la source intracellulaire de cette membrane reste incertaine. Celle-ci pourrait provenir de membranes recyclées issues du RE, de la mitochondrie, de l'appareil de Golgi ou encore des endosomes, et son origine dépendrait certainement du type cellulaire ainsi que des conditions physiologiques et de croissance de la cellule (Wei et al., 2018).

**Recrutement de la machinerie d'élongation** : Le phagophore enrichi en PI3P est reconnu par le complexe WIPI (*WD repeat protein interacting with phosphoinositides*) capable de se lier au PI3P. Les protéines WIPI (WIPI 1, 2, 3 et 4) font le lien entre la production de PI3P et la lipidation de la protéine MAP1LC3/LC3 (*microtubule-associated protein 1-light chain 3/light chain 3*), une étape cruciale pour l'élongation du phagophore. WIPI2 recrute à son tour le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 et WIPI1, essentiels pour l'élongation du phagophore et la lipidation de LC3, respectivement (**Figure 34**). WIPI4 interagit avec ATG2 et cette interaction est également importante pour la lipidation de LC3, mais reste encore mal caractérisée. Enfin, la fonction de WIPI3 reste à identifier (Proikas-Cezanne et al., 2015).

**Recrutement de la protéine ATG9** : La protéine ATG9 participe également à la biogenèse des membranes autophagosomales. En effet, lors de l'induction de l'autophagie, la protéine ATG9, une protéine transmembranaire, est transportée de l'appareil de Golgi aux endosomes tardifs, puis aux membranes des autophagosomes (**Figure 34**) (Takahashi et al., 2011). Ce trafic permettrait de fournir au phagophore des composants lipidiques issus de divers compartiments cellulaires (Mizushima et al., 2011).





**FIGURE 35 : Le processus de la macro-autophagie.**

L'autophagie est un processus en plusieurs étapes qui comprend l'initiation de l'autophagie, la formation et l'élongation du phagophore, la fusion avec un lysosome et la dégradation du contenu cytoplasmique. (1) Lors de l'initiation de l'autophagie à la suite d'un stress, le complexe ULK (composé des protéines ULK1, ULK2, ATG13, FIP200 et ATG101) phosphoryle des composants du complexe Beclin 1 afin de (2) promouvoir la formation du phagophore. Le complexe Beclin 1 (composé des protéines VPS34, VPS15, BECN1, ATG14L et AMBRA1) produit du PI3P au niveau de l'omégasome, permettant le recrutement de protéines capables de se lier au PI3P pour assurer l'expansion du phagophore. L'acheminement de la membrane provenant d'autres sources vers le phagophore en expansion nécessite des protéines de liaison au PI3P, les protéines WIPI et la protéine DFCP1, ainsi que la protéine transmembranaire ATG9 sous la forme de vésicules. Ensuite, le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L et LC3, participent à l'élongation et la fermeture du phagophore. La conversion de la forme LC3-I cytosolique en LC3-II membranaire (conjuguée au PE) indique l'induction de l'autophagie et la formation de l'autophagosome. (3) L'autophagosome fusionne ensuite avec un lysosome pour former un autolysosome, (4) dans lequel la membrane interne de l'autophagosome et le contenu cytoplasmique sont dégradés par les hydrolases lysosomales et finalement libérés pour être recyclés. Adaptée de (Tang et al., 2020).

Abréviations : ATG : *autophagy-related gene*, DFCP1 : *double FYVE-domain containing protein 1*, FIP200 : *focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa*, LC3 : *light chain 3*, PE : *phosphatidyléthanolamine*, PI3P : *phosphatidylinositol-3-phosphate*, RE : *réticulum endoplasmique*, ULK : *unc-51 like autophagy activating kinase*, VPS : *vacuolar protein sorting*, WIPI : *WD repeat protein interacting with phosphoinositides*.

### III.2.2 Élongation

L'étape d'élongation permet au phagophore de capturer des composants lipidiques nécessaires pour son expansion, qui est assurée par l'activité de deux complexes de conjugaison, ATG12-ATG5-ATG16L1 et LC3/GABARAP (*gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*) (Nakatogawa, 2013).

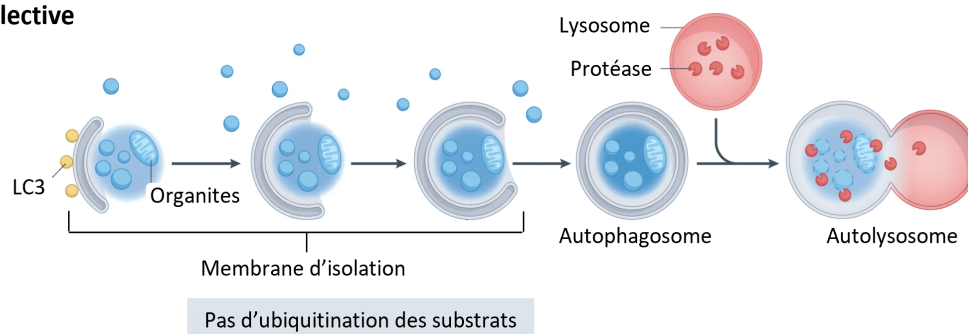
**Système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1** : Le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1 est d'abord formé par l'activation d'ATG12 par ATG7 de manière ATP-dépendante (Tanida et al., 1999), induisant l'acheminement d'ATG12 vers ATG10. ATG12 se lie alors de manière covalente à ATG5, ce qui forme le conjugué ATG12-ATG5, libérant ainsi ATG10 (Mizushima et al., 1998). La protéine ATG16L1 s'associe ensuite de manière non covalente à ce conjugué pour former le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1, situé au niveau de la membrane externe du phagophore (**Figure 35**) (Mizushima et al., 2003).

**Système de conjugaison LC3/GABARAP** : LC3 (comprenant LC3A, B, B2 et C) et GABARAP (comprenant GABARAP, -L1, -L2) sont deux familles de protéines pouvant être lipidées selon le même principe impliquant le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1 (Nath et al., 2014). Ces deux familles de protéines seront regroupées sous le terme LC3 pour simplifier la lecture dans le reste de ce manuscrit. La protéine LC3 non mature, appelée pro-LC3, est clivée par ATG4 pour donner la forme cytosolique LC3-I pouvant être activée par ATG7. La forme LC3-I est ensuite transférée à ATG3 avant d'être liée de manière covalente à une phosphatidyléthanolamine (PE), un phospholipide membranaire, pour former le complexe LC3-PE ou LC3-II (Kabeya et al., 2000). La forme LC3-II, qui est présente au niveau de la membrane externe et interne, est essentielle dans la formation de l'autophagosome (Kabeya et al., 2000). La forme LC3-II associée à la membrane externe de l'autophagosome pourra être délipidée et recyclée au cours de la maturation, contrairement à la forme LC3-II associée à la membrane interne, qui sera dégradée lors de la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (Yu et al., 2012). Ces caractéristiques font de LC3-II un marqueur pertinent de l'autophagie (Klionsky et al., 2021). De plus, en augmentant l'activité d'ATG3, le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 participe à l'étape de lipidation de LC3 (Hanada et al., 2007; Lystad et al., 2019). Ainsi, l'élongation des extrémités du phagophore conduit à sa fermeture pour créer un autophagosome (**Figure 35**) (Mizushima et al., 2002).

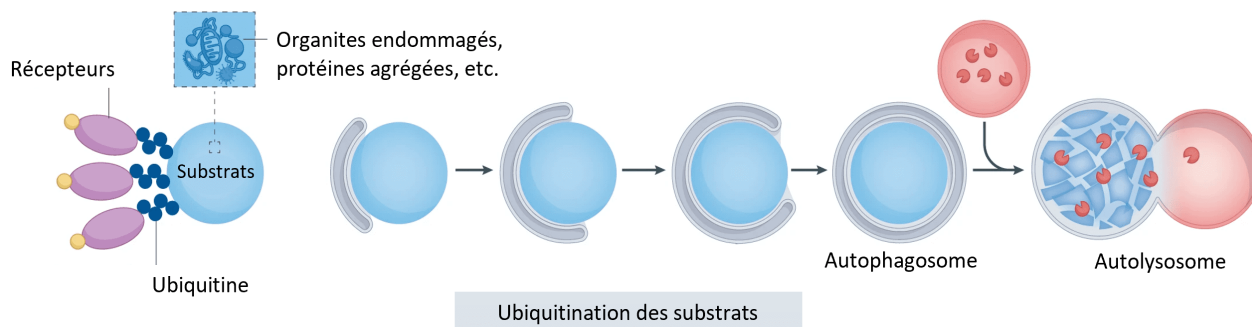
### III.2.3 Maturation et dégradation du contenu par le lysosome

La maturation de l'autophagosome nécessite l'activité d'ATG4, qui dissocie le complexe LC3-II associé à la membrane externe de l'autophagosome et empêche l'accumulation d'autophagosomes non fermés dans la cellule (Yu et al., 2012). Une fois fermé, l'autophagosome peut soit directement fusionner avec un lysosome, soit fusionner premièrement avec un endosome pour former une vacuole intermédiaire appelée amphisome, qui fusionne elle-même avec un lysosome, formant ainsi, dans les deux cas, un autolysosome. Cela induit l'acidification de l'autolysosome ainsi que la dégradation du contenu intra-luminal et de la membrane interne

### A. Autophagie non sélective



### B. Autophagie sélective



**FIGURE 36 : Autophagie non sélective et autophagie sélective.**

(A) Dans le cas de l'autophagie non sélective, la formation de la membrane d'isolation/phagophore est initiée dans le réticulum endoplasmique à la suite d'un signal de stress tel que la privation de nutriments. Ce processus se produit de façon aléatoire et aboutit à l'engloutissement du cytosol et des organites dans les autophagosomes, qui fusionnent finalement avec le lysosome, permettant la digestion du contenu par des enzymes lysosomales.

(B) Dans le cas de l'autophagie sélective, les autophagosomes sont formés *de novo* directement sur des cibles spécifiques. La reconnaissance de ces cibles varie en fonction du type d'autophagie sélective. L'ubiquitination, médiée par plusieurs ligases E3, est un signal majeur pour la reconnaissance des cibles à dégrader facilitant le recrutement des récepteurs de l'autophagie, qui se regroupent à la surface de la cible. Ces récepteurs sont capables de recruter le complexe ULK et de servir de plateforme pour lier les membranes d'isolation aux cibles par l'intermédiaire de la liaison aux protéines LC3 lipidées. Il s'ensuit une expansion de la membrane d'isolation et la séquestration sélective des cibles par les autophagosomes. Il convient de noter que ces autophagosomes sont souvent plus grands que les autophagosomes ordinaires générés par la voie de l'autophagie non sélective, afin de pouvoir accueillir des substrats volumineux tels que des organites entiers. Adaptée de (Vargas et al., 2022).

Abréviations : LC3 : *light chain 3*, ULK : *unc-51 like autophagy activating kinase*.

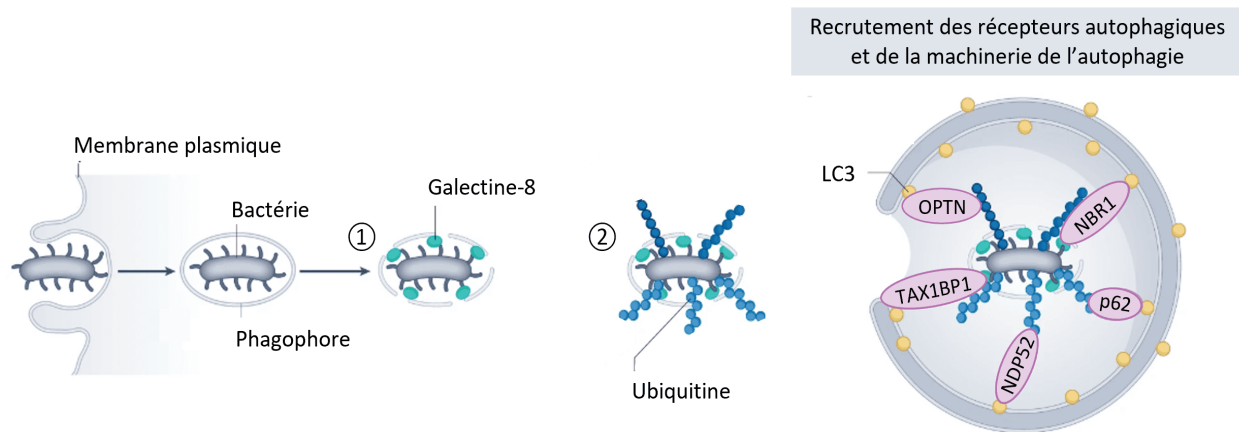
par les enzymes lysosomales (Zhao and Zhang, 2019). Enfin, grâce à des transporteurs lysosomaux, les produits de dégradation sont libérés dans le cytosol et recyclés par la cellule (**Figure 35**) (Tong et al., 2010).

### III.3 Autophagie et réponse aux bactéries intracellulaires : la xénophagie

L'autophagie est un processus qui peut être caractérisé de « non sélectif » ou « sélectif ». Au cours de l'autophagie non sélective, des petites portions du cytoplasme sont séquestrées et dégradées. Le mécanisme d'autophagie sélective, quant à lui, nécessite l'intervention de récepteurs de l'autophagie qui reconnaissent de façon spécifique les composants cellulaires à éliminer (**Figure 36**). En effet, l'autophagie sélective est initiée par l'ubiquitination du substrat spécifiquement ciblé afin d'être reconnu par des récepteurs de l'autophagie (Boyle and Randow, 2013). Une fois reconnu par les récepteurs, le substrat est adressé au sein d'un autophagosome, qui se transforme par la suite en autolysosome pour la dégradation sélective du substrat (Lamark and Johansen, 2021). L'autophagie sélective est nommée selon la fonction du substrat qui est ciblé, par exemple : mitophagie pour l'élimination des mitochondries, pexophagie pour les peroxysomes, ribophagie pour les ribosomes, réticulophagie pour le RE, lipophagie pour les gouttelettes lipidiques, lysophagie pour les lysosomes, agréphagie pour les protéines agrégées et enfin xénophagie pour les pathogènes intracellulaires (bactéries, virus et champignons) (Lamark and Johansen, 2021).

#### III.3.1 Récepteurs de la xénophagie

Les récepteurs de l'autophagie sélective jouent un rôle essentiel en ciblant spécifiquement les micro-organismes intracellulaires marqués par l'ubiquitine. L'ubiquitine agit comme une molécule de signalisation importante dans la xénophagie. En effet, les pathogènes intracellulaires peuvent potentiellement être reconnus par différents récepteurs capables de se lier aux molécules d'ubiquitine présentes à la surface des bactéries, tels que l'Optineurine (OPTN, *optic neuropathy inducing*) (Wild et al., 2011), NBR1 (*neighbor of BRCA1 gene protein 1*) (Kirkin et al., 2009; Waters et al., 2009), TAX1BP1 (*tax1 binding protein 1*) (Tumbarello et al., 2015), p62/SQSTM1 (*sequestosome 1*) (Zheng et al., 2009) et NDP52 (Thurston et al., 2009) (**Figure 37**). Ces récepteurs de l'autophagie sélective, communément appelés SLR (*sequestosome-1 like receptor*) (Deretic, 2012) dû à leur organisation et mode de reconnaissance similaire à p62, sont généralement caractérisés par la présence : (i) d'une région d'interaction avec LC3 (LIR, *LC3-interacting region*) qui permet la liaison aux protéines de la famille LC3 ancrées dans la double membrane de l'autophagosome, (ii) de domaines d'homomère ou d'hétéro-oligomérisation, et (iii) d'un ou plusieurs domaines de liaison à l'ubiquitine en partie C-terminale (UBA, *ubiquitin-associated domain*) impliqués dans la reconnaissance des pathogènes ubiquitinés (Johansen and Lamark, 2020). Ainsi, les récepteurs de l'autophagie interagissent, d'une part, avec le micro-organisme ubiquitiné dans le cytoplasme *via* leur domaine UBA, et d'autre part, avec LC3/GABARAP porté par le phagophore grâce à leur région LIR, adressant ainsi leur cible de manière spécifique vers la machinerie autophagique



### FIGURE 37 : Recrutement des récepteurs de l'autophagie sélective pendant la xénophagie.

Les bactéries sont englouties par les cellules de l'hôte dans des phagosomes, générant parfois des niches de ré-plication pour la croissance bactérienne, telles que les SCV (*Salmonella-containing vacuole*). *Salmonella* peut s'échapper de ces vacuoles en provoquant la rupture de leur membrane, ce qui leur permet d'accéder au cytoplasme. (1) D'une part, les vacuoles endommagées peuvent être marquées par la galectine-8 dans le cytosol. La galectine-8 se lie aux glycanes de l'hôte, qui sont normalement retrouvés à l'intérieur de la vacuole, induisant le recrutement de NDP52, un récepteur de l'autophagie. (2) D'autre part, les *Salmonella* cytosoliques peuvent être marquées par l'ubiquitine *via* l'activité de plusieurs ligases E3, provoquant également le recrutement des récepteurs de l'autophagie. Ainsi, dans les deux cas, la liaison des récepteurs de l'autophagie à la galectine-8 et/ou à l'ubiquitine, engendre le recrutement de la machinerie autophagique facilitant la formation des autophagosomes. Les principaux récepteurs de la xénophagie sont TAX1BP1, NDP52, p62, OPTN et NBR1. Adaptée de (Vargas et al., 2022).

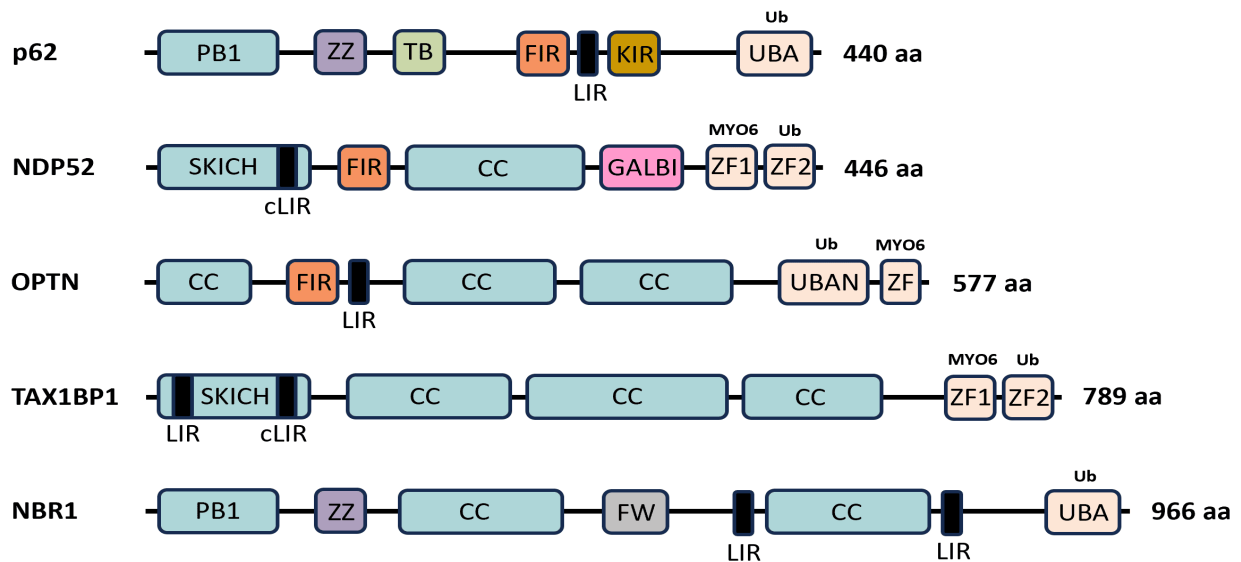
Abréviations : NBR1 : *neighbor of BRCA1 gene protein 1*, NDP52 : *nuclear dot protein 52*, OPTN : *optineurine (optic neuropathy inducing)*, p62/SQSTM1 : *sequestosome 1*, TAX1BP1 : *tax1 binding protein 1*.

(**Figure 38**) (Kim et al., 2016a). Étant donné que les récepteurs de l'autophagie présentent une redondance fonctionnelle importante, il peut en résulter le recrutement de deux récepteurs ou plus sur le même pathogène intracellulaire. De plus, le fonctionnement de certains de ces récepteurs repose sur l'activité de la kinase TBK1 (*TANK-binding kinase 1*). En effet, la phosphorylation de p62 (Pilli et al., 2012) et de l'OPTN (Wild et al., 2011; Richter et al., 2016) par TBK1, augmente leur affinité de liaison à LC3 ainsi qu'aux molécules d'ubiquitine présentes à la surface des substrats. Enfin, les récepteurs peuvent également favoriser la formation des autophagosomes en interagissant avec des complexes de la machinerie centrale de l'autophagie (Chang et al., 2021; Goodall et al., 2022) ainsi que la maturation des autophagosomes (Johansen and Lamark, 2020). Le rôle de chaque récepteur autophagique dans la formation et/ou la maturation des autophagosomes sera détaillé dans les sections III.3.1.1. Optineurine; III.3.1.2. NDP52; III.3.1.3. p62; III.3.1.4. TAX1BP1 et III.3.1.5. NBR1.

### III.3.1.1 Optineurine

L'optineurine (OPTN) est une protéine fortement conservée de 74 kDa, qui est exprimée dans différents tissus tels que le cerveau, le foie et le cœur (Slowicka and van Loo, 2018; Qiu et al., 2022). L'OPTN est composée de plusieurs domaines structuraux : deux domaines appelés « Coiled-Coil » (CC) qui assurent son oligomérisation, une région LIR, un domaine de liaison à l'ubiquitine (UBAN, *ubiquitin-binding ABIN and NEMO domain*) et un domaine en doigt de zinc (ZF, *zinc finger domain*), qui permet également la reconnaissance des molécules d'ubiquitine (Kim et al., 2016a; Slowicka and van Loo, 2018; Qiu et al., 2022). Le domaine UBAN de l'OPTN est également présent dans les protéines ABIN (*A20-binding inhibitor of NF-κB*) et NEMO (*NF-κB essential modulator*, également connu sous le nom de IKK $\gamma$ ), d'où son nom UBAN (**Figure 38**) (Clark et al., 2013). À ce jour, plusieurs fonctions biologiques de l'OPTN ont été identifiées. En effet, l'OPTN peut interagir avec un grand nombre de protéines comme ATG9A, LC3, MYO6 (myosine 6), TBK1 et les chaînes d'ubiquitine à la surface des substrats, pour exercer ses fonctions dans différentes étapes de l'autophagie (Hattula and Peränen, 2000; Park et al., 2006; Tumbarello et al., 2012; Yamano et al., 2020). Il a été démontré que l'OPTN joue un rôle essentiel dans la mitophagie (Wong and Holzbaur, 2014; Heo et al., 2015; Lazarou et al., 2015; Moore and Holzbaur, 2016), la réticulophagie (Tschurtschenthaler et al., 2017), l'agrégation (Korac et al., 2013) et la xénophagie (Wild et al., 2011) par le biais de la signalisation de l'ubiquitine. De plus, l'OPTN est activement impliqué dans la formation (Lazarou et al., 2015; Bansal et al., 2018) et la maturation des autophagosomes (Tumbarello et al., 2012), ainsi que dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (**Tableau 2**) (Zhu et al., 2007; Nagabhushana et al., 2011). Dans cette section, seul le rôle de l'OPTN dans la xénophagie bactérienne sera détaillé, ainsi que ses autres fonctions dans la formation et la maturation des autophagosomes et dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B.





**FIGURE 38 : Structure des récepteurs de l'autophagie sélective.**

Les récepteurs autophagiques sont généralement caractérisés par la présence : (i) d'une région d'interaction avec LC3 (LIR) qui permet la liaison aux protéines de la famille LC3 ancrées dans la double membrane de l'autophagosome (**en noir**), (ii) de domaines d'holo- ou d'hétéro-oligomérisation (**en bleu**), et (iii) d'un ou plusieurs domaines de liaison à l'ubiquitine (UBA, UBAN ou ZF) (**en beige**). **p62** (440 aa), comprend sept domaines : un domaine PB1 qui est impliqué dans les interactions protéines-protéines et assure son oligomérisation, un domaine ZZ qui assure sa liaison à deux ions zinc, un domaine TB pour sa liaison avec la protéine TRAF6, une région FIR pour se lier à FIP200 et induire l'autophagie, une région LIR, une région KIR pour son interaction avec Keap1, ainsi qu'un domaine UBA. **NDP52** (446 aa), comprend sept domaines : un domaine SKICH qui est impliqué dans les interactions protéines-protéines et assure son oligomérisation, une région LIR non canonique (cLIR) qui se lie préférentiellement à LC3C, une région FIR, un domaine CC pour son oligomérisation, une région GALBI qui assure sa liaison à la Galectine-8 ainsi qu'un domaine de liaison à l'ubiquitine composé de deux doigts de zinc (ZF) pour se lier à l'ubiquitine et à la myosine 6. **OPTN** (577 aa), comprend sept domaines : trois domaines CC, une région FIR, une région LIR, un domaine UBAN ainsi qu'un domaine ZF, qui permettent tous deux sa liaison à l'ubiquitine. **TAX1BP1** (789 aa), comprend huit domaines : un domaine SKICH, une région LIR, une région cLIR, trois domaines CC ainsi qu'un domaine de liaison à l'ubiquitine composé de deux doigts de zinc (ZF) pour se lier à l'ubiquitine et à la myosine 6. **NBR1** (966 aa), comprend huit domaines : un domaine PB1, un domaine ZZ, deux domaines CC, un domaine FW contenant quatre résidus tryptophane impliqué dans les interactions protéines-protéines, deux régions LIR ainsi qu'un domaine UBA. Ainsi, les récepteurs autophagiques interagissent à la fois avec la bactérie ubiquitinée dans le cytoplasme *via* leur domaine de liaison à l'ubiquitine et avec LC3 porté par le phagophore, grâce à leur région d'interaction avec LC3, adressant leur cible de manière spécifique vers la machinerie autophagique.

Abréviations : CC : *coiled-coil domain*, cLIR : *non-canonical LC3-interacting region*, FIR : *FIP200-interacting region*, FW : *four tryptophane region*, GALBI : *galectine-8-binding region*, KIR : *Keap1-interacting region*, LIR : *LC3-interacting region*, MYO6 : *myosine 6*, PB1 : *phox and bem1 domain*, SKICH : *skeletal muscle and kidney enriched inositol phosphatase carboxyl homology domain*, TB : *TRAF6-binding domain*, Ub : *Ubiquitine*, UBA : *ubiquitin-associated domain*, UBAN : *ubiquitin-binding in ABIN and NEMO domain*, ZF : *zinc finger domain*, ZZ : *ZZ-type zinc finger domain*.

### III.3.1.1.1 L'OPTN dans la xénophagie bactérienne

Plusieurs études ont élucidé le rôle de l'OPTN dans la xénophagie. L'OPTN peut se lier à la protéine LC3 via son domaine LIR et à l'ubiquitine via ses domaines UBAN et ZF, afin d'adresser les bactéries intracellulaires ubiquitinées vers les autophagosomes. En effet, lors de l'infection des cellules par *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, l'OPTN s'associe aux bactéries recouvertes d'ubiquitine et recrute TBK1. TBK1 phosphoryle l'OPTN dans son domaine LIR au niveau de la sérine-177, augmentant son affinité de liaison aux chaînes d'ubiquitine et à LC3, et favorisant ainsi la clairance de *S. Typhimurium* par la xénophagie (Wild et al., 2011; Richter et al., 2016; Slowicka et al., 2016). L'OPTN se lie préférentiellement aux chaînes linéaires de poly-ubiquitine liées à la lysine-63 (K63) plutôt qu'aux chaînes liées à la lysine-48 (K48) ou aux substrats marqués par des chaînes de mono-ubiquitine (Gleason et al., 2011). L'ubiquitination linéaire à la surface des bactéries induit le recrutement de l'OPTN et de NEMO, induisant respectivement, l'autophagie sélective et l'activation du complexe IKK (*inhibitor of  $\kappa$ B kinase*) (composé de IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et IKK $\gamma$ ) et donc la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, ce qui permet ainsi de limiter la prolifération bactérienne (Noad et al., 2017; van Wijk et al., 2017). De plus, *in vivo* les poissons-zèbres déficients pour l'*Optn* et infectés par *S. Typhimurium* présentent un risque de mortalité plus élevé par rapport aux poissons-zèbres contrôles (Chew et al., 2015). Enfin, les souris déficientes pour l'*Optm* sont plus sensibles à l'infection par *S. Typhimurium*, ce qui confirme l'importance de l'OPTN dans la clairance bactérienne (Slowicka et al., 2016).

### III.3.1.1.2 L'OPTN dans la formation et la maturation des autophagosomes

En plus de son rôle dans la reconnaissance des pathogènes intracellulaires, l'OPTN est un récepteur multifonctionnel impliqué dans différentes étapes de l'autophagie, notamment la formation et la maturation des autophagosomes. En effet, de plus en plus d'études suggèrent que l'OPTN participe activement à différentes étapes de la formation des autophagosomes, y compris l'initiation du phagophore et l'interaction avec LC3 (Li et al., 2018; Evans and Holzbaur, 2020). Lors de l'initiation, l'OPTN recrute le complexe ULK vers les sites d'initiation de l'autophagie pour initier la biogenèse des phagophores (Lazarou et al., 2015). En outre, l'OPTN facilite le recrutement du complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 au niveau du phagophore, augmentant ainsi la production de LC3-II (Bansal et al., 2018). Enfin, l'OPTN interagit d'une part, avec ATG9A pour recruter des vésicules ATG9 afin d'aider localement à la formation de la membrane de l'autophagosome et d'autre part, avec LC3 pour adresser cette membrane au niveau des substrats (Richter et al., 2016; Yamano et al., 2020).

Par ailleurs, l'OPTN joue un rôle essentiel dans la maturation des autophagosomes grâce à ses interactions avec la MYO6 et les membres de la famille LC3 (Tumbarello et al., 2012). La MYO6 est le seul moteur de myosine non conventionnel connu, qui se déplace le long des filaments d'actine dans la direction opposée (Buss et al., 2004). L'OPTN interagit directement avec la MYO6, qui se lie à TOM1 (*target of myb1 membrane*



**TABLEAU 2 : Rôles des récepteurs autophagiques dans l'autophagie sélective, l'autophagie non sélective et la régulation de différentes voies de signalisation.**

Le texte en couleur grise indique des résultats conflictuels entre les études. Adapté de (Lamark and Johansen, 2021; Vargas et al., 2022).

Récepteur	Autophagie sélective	Autophagie non sélective	Régulation des voies de signalisation
<b>OPTN</b>	<p><b>Mitophagie</b> (Heo et al., 2015 ; Lazarou et al., 2015 ; Wong and Holzbaaur, 2014 ; Moore and Holzbaaur, 2016)</p> <p><b>Xénophagie</b> (Wild et al., 2011)</p> <p><b>Agréphagie</b> (Korac et al., 2013)</p> <p><b>Réticulophagie</b> (Tschurtschenthaler et al., 2017)</p>	<p><b>Formation des autophagosomes</b> (Lazarou et al., 2015 ; Bansal et al., 2018)</p> <p><b>Maturation des autophagosomes</b> (Tumbarello et al., 2012)</p>	<p><b>Régulation de la voie NF-κB</b> (Zhu et al., 2007 ; Nagabhushana et al., 2011 ; Tanishima et al., 2017 ; Montecalvo et al., 2017)</p>
<b>NDP52</b>	<p><b>Mitophagie</b> (Heo et al., 2015 ; Lazarou et al., 2015 ; Moore and Holzbaaur, 2016)</p> <p><b>Xénophagie</b> (Thurston et al., 2009 ; Thurston et al., 2012)</p>	<p><b>Formation des autophagosomes</b> (Lazarou et al., 2015 ; Ravenhill et al., 2019 ; Vargas et al., 2019)</p> <p><b>Maturation des autophagosomes</b> (Verlhac et al., 2015 ; Tumbarello et al., 2012)</p>	<p><b>Régulation de la voie NF-κB</b> (Inomata et al., 2012 ; Ellinghaus et al., 2013)</p> <p><b>Rôle nucléaire dans la régulation de l'expression des gènes et de la structure de l'ADN</b> (Fili et al., 2017 ; Dos santos et al., 2023)</p>
<b>p62</b>	<p><b>Mitophagie</b> (Heo et al., 2015 ; Matsumoto et al., 2015)</p> <p><b>Xénophagie</b> (Zheng et al., 2009)</p> <p><b>Agréphagie</b> (Bjorkoy et al., 2005 ; Kirkin et al., 2009 ; Pankiv et al., 2005)</p> <p><b>Réticulophagie</b> (Yang et al., 2016 ; Ji et al., 2019)</p> <p><b>Pexophagie</b> (Kim et al., 2008 ; Deosaran et al., 2013 ; Yamashita et al., 2014)</p> <p><b>Lysophagie</b> (Hung et al., 2013 ; Papadopoulos et al., 2017)</p>	<p><b>Formation des autophagosomes</b> (Turco et al., 2019)</p>	<p><b>Régulation de la voie NF-κB</b> (Wooten et al., 2005 ; Nakamura et al., 2010 ; Kim and Ozato, 2009)</p> <p><b>Régulation de la voie Keap1-Nrf2</b> (Komatsu et al., 2010 ; Ishimura et al., 2014)</p>
<b>TAX1BP1</b>	<p><b>Mitophagie</b> (Heo et al., 2015 ; Moore and Holzbaaur, 2016)</p> <p><b>Xénophagie</b> (Tumbarello et al., 2015)</p> <p><b>Agréphagie</b> (Sarraf et al., 2020)</p> <p><b>Lysophagie</b> (Koerver et al., 2019 ; Eapen et al., 2021)</p>	<p><b>Maturation des autophagosomes</b> (Tumbarello et al., 2012)</p>	<p><b>Régulation de la voie NF-κB</b> (Iha et al., 2008 ; Nakano et al., 2013)</p>
<b>NBR1</b>	<p><b>Xénophagie</b> (Mostowy et al., 2011 ; Manzanillo et al., 2013 ; Franco et al., 2017)</p> <p><b>Agréphagie</b> (Kirkin et al., 2009)</p> <p><b>Pexophagie</b> (Deosaran et al., 2013 ; Yamashita et al., 2014)</p>		

*trafficking protein*) afin d'adresser les membranes endosomales vers les autophagosomes, ce qui est nécessaire pour la fusion autophagosome-lysosome (Hu et al., 2019). Par conséquent, le recrutement des complexes ULK et ATG12-ATG5-ATG16L1, des vésicules ATG9 et la liaison de l'OPTN avec la MYO6 sont des mécanismes essentiels induisant la formation et la maturation des autophagosomes au cours de l'autophagie.

### III.3.1.1.3 L'OPTN dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B

Outre son rôle de récepteur dans l'autophagie sélective et dans la formation et la maturation des autophagosomes, l'OPTN joue un rôle important dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. Initialement, des études *in vitro* ont identifié l'OPTN comme un régulateur négatif de la signalisation NF- $\kappa$ B induite par le TNF. En effet, l'OPTN présente une forte homologie de séquence avec NEMO, le régulateur central du complexe IKK qui inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B (Zhu et al., 2007; Clark et al., 2013). L'OPTN et NEMO possèdent un domaine de liaison à l'ubiquitine similaire, qui facilite la liaison aux chaînes de poly-ubiquitine K63 (Gleason et al., 2011). L'OPTN entre en compétition avec NEMO pour la liaison aux chaînes de poly-ubiquitine K63 présentes sur RIPK1 (*receptor-interacting protein kinase 1*), perturbant ainsi la formation du complexe IKK et diminuant l'activation de NF- $\kappa$ B induite par le TNF (Schwamborn et al., 2000; Zhu et al., 2007; Sudhakar et al., 2019). Des études structurelles ont montré que la liaison de l'ubiquitine *via* le domaine UBAN de l'OPTN est essentielle pour la suppression de l'activation de NF- $\kappa$ B (Nakazawa et al., 2016). De plus, l'OPTN interagit avec CYLD (*cylindromatose*), une enzyme déubiquitinase qui clive les chaînes linéaires d'ubiquitine K63 des protéines, telles que NEMO et RIPK1, afin de bloquer la signalisation NF- $\kappa$ B (Nagabhushana et al., 2011). Par ailleurs, l'OPTN a également été identifié comme un partenaire de liaison de IRAK-1 (*interleukin-1 receptor-associated kinase-1*), où il supprime l'activation de NF- $\kappa$ B en réponse à la stimulation des récepteurs IL-1 $\beta$  et TLR en empêchant la poly-ubiquitination de TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) (Tanishima et al., 2017). Enfin, il a été démontré que l'OPTN supprime l'activation de NF- $\kappa$ B induite par les récepteurs des cellules T et la production de TNF, d'une manière dépendante de la liaison à l'ubiquitine (Montecalvo et al., 2017). Cependant, le rôle de l'OPTN dans la signalisation NF- $\kappa$ B reste encore à éclaircir *in vivo*. En effet, les souris exprimant une mutation ponctuelle de l'*Optn* abolissant l'activité de liaison aux chaînes de poly-ubiquitine (Gleason et al., 2011), ainsi que les souris dépourvues du domaine UBAN entier (Munitic et al., 2013) ou du domaine de liaison à TBK1, présentent des réponses NF- $\kappa$ B normales (Meena et al., 2016). Les souris déficientes pour l'*Optn* ont un développement normal sans aucun signe d'inflammation. Aucune différence dans l'activation de NF- $\kappa$ B n'a pu être observée chez les souris déficientes pour l'*Optn* ou les fibroblastes dérivés de ces souris lors d'un traitement au TNF- $\alpha$  ou au LPS (Slowicka et al., 2016).

### III.3.1.1.4 Lien entre l'OPTN et la maladie de Crohn

Une étude a montré une association entre l'OPTN et la MC. En effet, une étude transcriptomique de macrophages de patients atteints de la MC et de patients contrôles a révélé que le gène codant pour l'OPTN est sous-exprimé chez environ 10 % des patients atteints de la MC, qu'ils ont appelés patients « OPTN<sup>low</sup> » (Smith et al., 2009, 2015). Cette diminution d'expression génique est associée à une diminution du taux de la protéine *Optn* ainsi qu'à une réduction de la sécrétion de cytokines par les macrophages lors d'une infection bactérienne (Smith et al., 2015). Les macrophages de souris déficientes pour l'OPTN (Chew et al., 2015) et de patients « OPTN<sup>low</sup> » (Smith et al., 2015) sécrètent des niveaux plus faibles de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 après une stimulation par des *E. coli* inactivés par la chaleur, par rapport aux cellules contrôles. Par ailleurs, les souris déficientes pour l'*Optn* sont plus sensibles à la colite induite par *Citrobacter rodentium*, à la péritonite induite par *E. coli* (Chew et al., 2015) et à l'infection par *S. Typhimurium* (Slowicka et al., 2016). L'ensemble de ces données suggère que la xénophagie médiée par l'OPTN est essentielle pour limiter la prolifération bactérienne dans la pathogenèse de la MC.

### III.3.1.2 NDP52

NDP52 est un récepteur crucial de l'autophagie de 52 kDa. Selon les bases de données du « Human Protein Atlas » (<http://www.proteinatlas.org>), NDP52 est largement exprimé dans tous les types de tissus humains, tels que le pancréas, le cerveau, le tube gastro-intestinal, le foie, la peau, etc. En tant que récepteur de l'autophagie, NDP52 contient un domaine N-terminal SKICH (*skeletal muscle and kidney enriched inositol phosphatase carboxyl homology domain*) (Fu et al., 2018), un motif LIR non canonique (cLIR, *non-canonical LC3-interacting region*) (von Muhlinen et al., 2012), un domaine central CC pour son oligomérisation (Fu et al., 2018), une région d'interaction avec la galectine-8 (GALBI, *galectine-8-binding region*) (Thurston et al., 2012) et un domaine de liaison à l'ubiquitine composé de deux domaines ZF en C-terminal (**Figure 38**) (von Muhlinen et al., 2012). NDP52 est capable d'interagir avec tous les orthologues humains de la famille LC3/GABARAP, mais il se lie sélectivement à LC3C *via* son domaine cLIR, facilitant le recrutement de la machinerie autophagique autour des substrats à dégrader (Ivanov and Roy, 2009; Thurston et al., 2009; von Muhlinen et al., 2012). Enfin, NDP52 utilise son domaine de liaison à l'ubiquitine composé de deux domaines ZF pour médier ses interactions avec MYO6 pour la maturation des autophagosomes et les molécules d'ubiquitine présentes à la surface des bactéries (Morriswood et al., 2007; Tumbarello et al., 2012; Xie et al., 2015; Hu et al., 2019). Il a été démontré que NDP52 est un récepteur multifonctionnel impliqué essentiellement dans la xénophagie (Thurston et al., 2009, 2012) et la mitophagie (Heo et al., 2015; Lazarou et al., 2015; Moore and Holzbaur, 2016). NDP52 est également activement impliqué dans la formation (Lazarou et al., 2015; Ravenhill et al., 2019; Vargas et al., 2019) et la maturation des autophagosomes (Tumbarello et al., 2012; Verlhac et al., 2015) ainsi que dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Inomata et al., 2012; Ellinghaus et al., 2013). Enfin, des travaux

**TABLEAU 3 : Pathogènes ciblés par NDP52 au cours de la xénophagie.**

Souche bactérienne	Référence
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	(Thurston et al., 2009 ; Thurston et al., 2012)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	(Thurston et al., 2009)
<i>Shigella flexneri</i>	(Mostowy et al., 2011)
<i>Listeria monocytogenes</i>	(Mostowy et al., 2011)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(Watson et al., 2012)

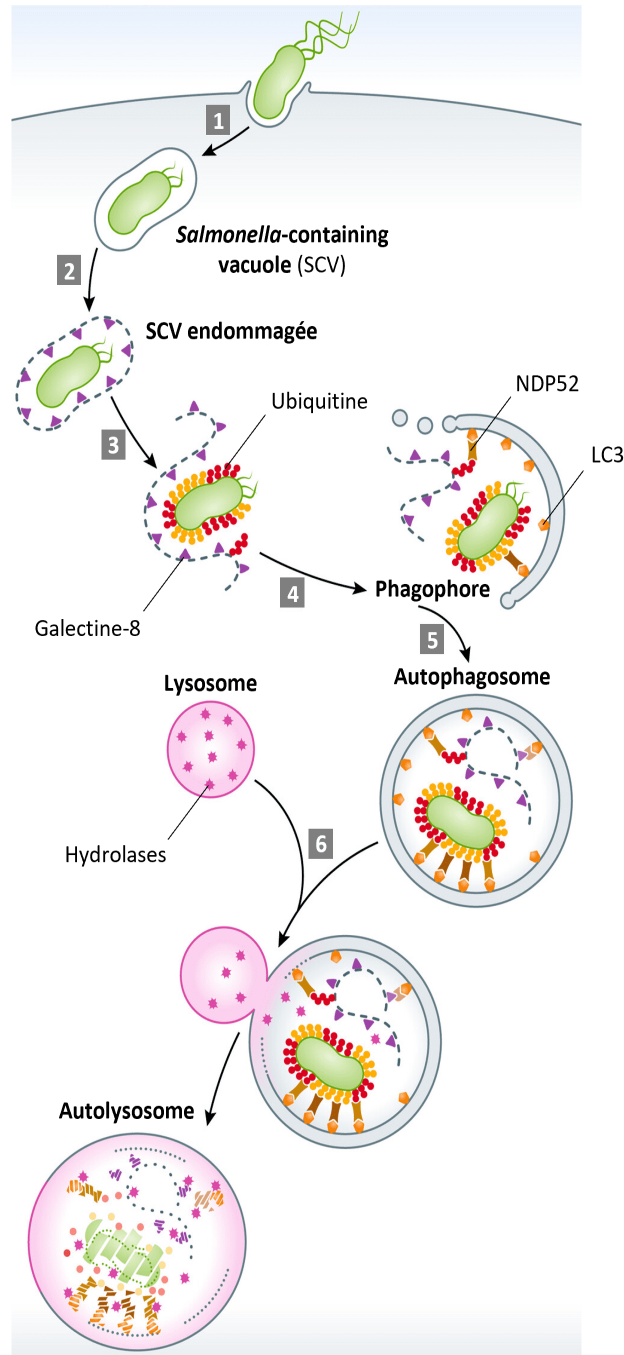
récents ont identifié un rôle nucléaire de NDP52 dans la régulation de l'expression des gènes et de la structure de l'ADN (**Tableau 2**) (Fili et al., 2017; Dos Santos et al., 2023). Dans cette section, seul le rôle de NDP52 dans la xénophagie bactérienne sera développé, ainsi que ses autres fonctions dans la formation et la maturation des autophagosomes, dans la régulation de l'expression des gènes et de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B.

### III.3.1.2.1 NDP52 dans la xénophagie bactérienne

Plusieurs études ont montré que NDP52 cible divers pathogènes intracellulaires, dont *Streptococcus pyogenes* (Thurston et al., 2009), *S. Typhimurium* (Thurston et al., 2009, 2012), *Shigella flexneri* (Mostowy et al., 2011), *L. monocytogenes* (Mostowy et al., 2011) et *M. tuberculosis* (Watson et al., 2012) vers l'autophagie pour leur dégradation sélective (**Tableau 3**). Les bactéries intracellulaires peuvent s'échapper de leurs vacuoles et se répliquer dans le cytoplasme des cellules. Les bactéries, en particulier *S. Typhimurium* qui est le modèle de xénophagie bactérienne le plus étudié, sont détectées par le système immunitaire inné et marquées par des chaînes de poly-ubiquitine, qui servent de signal de reconnaissance à NDP52 pour recruter la machinerie autophagique (**Figure 39**) (Xie et al., 2015). Une étude a révélé que l'extrémité C-terminale de NDP52 contient deux domaines ZF : un ZF dynamique non canonique (ZF1) et un ZF canonique de type C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (ZF2). Le domaine ZF2 se lie spécifiquement à la mono-ubiquitine ou à différents types de chaînes d'ubiquitine, y compris les chaînes d'ubiquitine K48, K63 et M1, pour cibler les pathogènes en vue de leur dégradation autophagique (Xie et al., 2015; Thurston et al., 2016).

De plus, *S. Typhimurium* peut être reconnue par NDP2 par un autre signal de reconnaissance que l'ubiquitine. En effet, *S. Typhimurium* établit sa principale niche intracellulaire dans une vacuole, appelée SCV (*Salmonella-containing vacuole*), dès qu'elle entre en contact avec les cellules hôtes. Les SCV prolifèrent dans le cytosol de l'hôte, entraînant une rupture de la membrane des SCV ainsi que l'exposition des glycanes de l'hôte, qui sont normalement situés à l'intérieur des SCV. Les galectines se lient aux glycanes et s'accumulent rapidement sur les SCV endommagées. Cette concentration de galectines n'est pas seulement utilisée comme marqueur de la membrane rompue, mais elle joue également un rôle essentiel dans la reconnaissance des pathogènes intracellulaires. En effet, NDP52 se lie à la galectine-8 qui est associée aux membranes des vacuoles endommagées contenant des bactéries intracellulaires, grâce à son domaine GALBI (Thurston et al., 2012). Ce recrutement initial de NDP52 vers les bactéries intracellulaires *via* la galectine-8 facilite la liaison de NDP52 à l'ubiquitine sur les bactéries et augmente le pourcentage de *S. Typhimurium* situées dans des autophagosomes LC3-positifs et limite la croissance de *S. Typhimurium* (**Figure 39**) (Thurston et al., 2012).

NDP52 est également capable d'interagir avec d'autres protéines pour réguler la xénophagie, tels que les protéines Rab. Ces protéines sont des régulateurs clés du trafic intracellulaire des membranes et de la biogenèse des organites qui contrôlent l'autophagie sélective (Nozawa et al., 2012; Haobam et al., 2014). Minowa-Nozawa et co-auteurs, ont démontré que, lors d'une infection par des GAS (*Group A Streptococcus*), Rab35 s'accumule



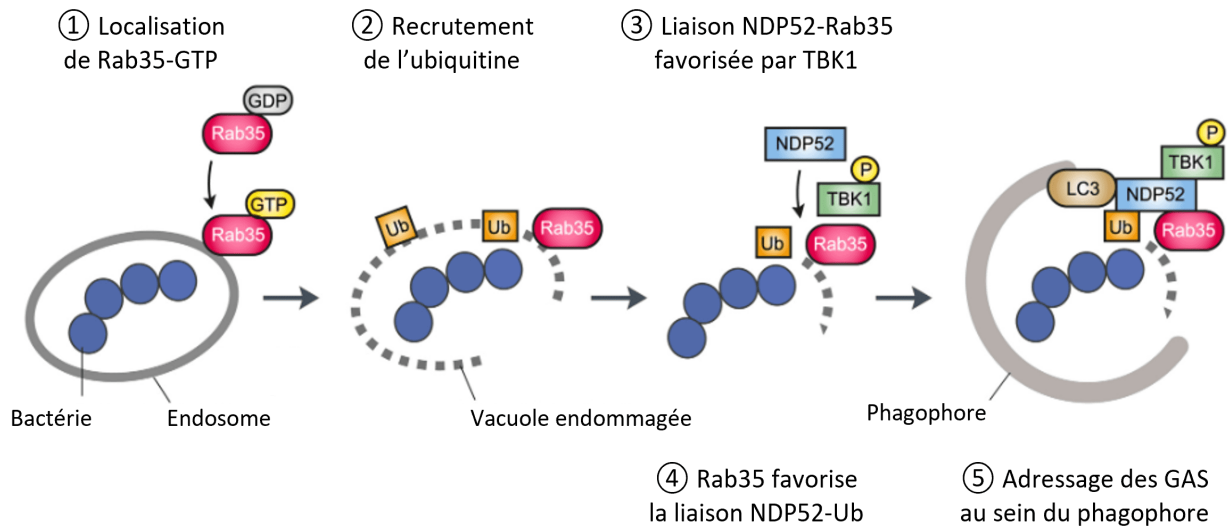
**FIGURE 39 : Rôle du récepteur NDP52 dans l'élimination de *Salmonella Typhimurium* par la xénophagie.**

(1) *Salmonella* pénètre dans les cellules de l'hôte en formant des SCV qui les protège du système de surveillance de l'hôte et sert de niche de réplication. (2) Les SCV peuvent être endommagées, permettant ainsi l'accès aux protéines cytosoliques de l'hôte. (3) Les glycanes exposés, qui sont normalement présents sur la face interne de la vacuole, servent de signaux de danger reconnus par les galectines. Ensuite, *Salmonella* est détectée par des ligases E3 qui génèrent un manteau d'ubiquitine dense, composé de différentes chaînes et liaisons d'ubiquitine autour de *Salmonella*. (4) Les galectines et l'ubiquitine recrutent NDP52, qui adresse *Salmonella* dans les phagophores marqués par LC3. (5) Enfin, les autophagosomes contenant *Salmonella* vont mûrir et (6) fusionner avec un lysosome pour leur dégradation spécifique. Adaptée de (Tripathi-Giesgen et al., 2021).

dans les endosomes contenant les bactéries et la forme active de Rab35 liée au GTP se lie directement aux bactéries internalisées, induisant le recrutement de NDP52. Rab35 favorise l'interaction entre NDP52 et l'ubiquitine, ce qui est facilité par la kinase TBK1, qui s'associe à NDP52. Ainsi, Rab35 et TBK1 régulent le recrutement de NDP52 au niveau des mitochondries endommagées et des autophagosomes afin de promouvoir respectivement, la mitophagie et la maturation des autophagosomes (**Figure 40**) (Minowa-Nozawa et al., 2017). De plus, le domaine SKICH de NDP52 peut se lier directement à deux protéines adaptatrices, NAP1 et TBKBP1 (*TANK-binding kinase 1-binding protein 1*, également connue sous le nom de SINTBAD), qui à leur tour, peuvent recruter TBK1 (Ryzhakov and Randow, 2007; Thurston et al., 2009; Li et al., 2016; Fu et al., 2018). Le recrutement du complexe TBK1 par NDP52 et l'activité kinase de TBK1 sont tous deux nécessaires au processus d'autophagie sélective médié par NDP52 (Thurston et al., 2009, 2016). Enfin, Parkin, une ligase E3, est impliquée dans le recrutement de NDP52 au niveau des phagosomes de *M. tuberculosis* lors de l'infection, car la suppression de Parkin 2 diminue la colocalisation de *M. tuberculosis* avec NDP52, p62 ainsi que NBR1 (Manzanillo et al., 2013). Par conséquent, NDP52 reconnaît les chaînes d'ubiquitine et la galectine-8 sur les SCV, et grâce à différentes interactions protéiques, NDP52 est capable d'activer la xénophagie.

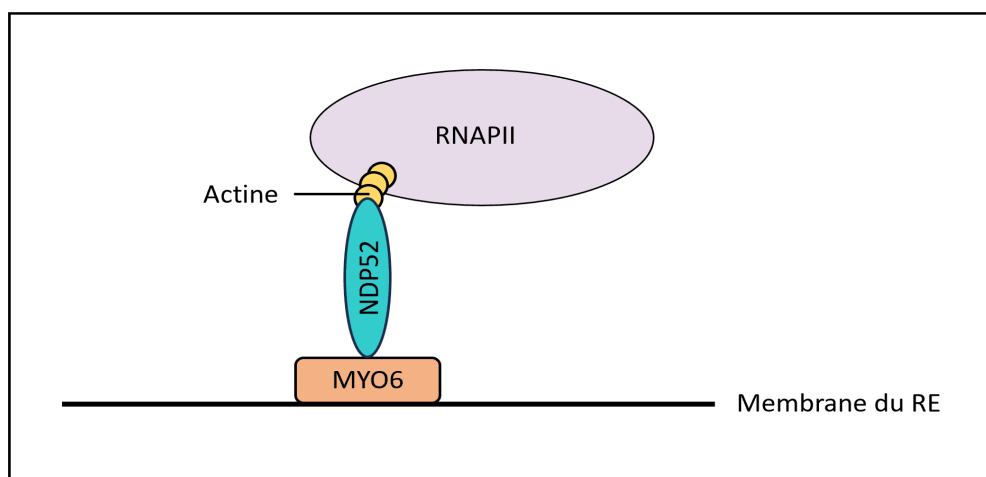
### III.3.1.2.2 NDP52 dans la formation et la maturation des autophagosomes

En plus de son rôle dans la reconnaissance des pathogènes intracellulaires, NDP52 est impliqué dans d'autres étapes de l'autophagie, notamment la formation et la maturation des autophagosomes. Des études suggèrent que NDP52 facilite la biogenèse des membranes d'isolation directement à la surface des mitochondries et des pathogènes intracellulaires destinés à être dégradés. En effet, il a précédemment été rapporté qu'en l'absence de NDP52 et de l'OPTN, le recrutement du complexe ULK vers les mitochondries est altéré, suggérant que les récepteurs ont la capacité de recruter la machinerie autophagique vers les mitochondries (Lazarou et al., 2015). De plus, des travaux récents ont révélé que NDP52 peut former un complexe trimérique avec FIP200 et NAP1, qui sont respectivement, des sous-unités des complexes ULK et TBK1, qui sont essentiels pour la formation des autophagosomes autour des mitochondries endommagées et des bactéries intracellulaires (Ravenhill et al., 2019; Vargas et al., 2019; Fu et al., 2021). L'interaction entre NDP52 et FIP200 est également facilitée par l'activité de TBK1 (Vargas et al., 2019). De manière cohérente, une étude récente a mis en évidence que NDP52 stimule l'affinité membranaire de FIP200 et d'ULK (Shi et al., 2020a,b). Conformément à ces observations, d'autres travaux sur NDP52, l'OPTN et TAX1BP1 utilisant un système d'autophagie *in vitro* entièrement reconstitué ont démontré que tous ces récepteurs ont la capacité de recruter des protéines de la machinerie autophagique (Chang et al., 2021). Dans l'ensemble, ces résultats conduisent au modèle selon lequel NDP52, l'OPTN et TAX1BP1 agissent en tandem pour initier la mitophagie en stimulant la biogenèse de l'autophagosome directement sur les mitochondries endommagées marquées par l'ubiquitine par le biais de leur interaction avec les principaux composants de l'autophagie.



**FIGURE 40 : Recrutement de NDP52 au niveau des bactéries intracellulaires ubiquitinées par Rab35 au cours de la xénophagie.**

Au cours d'une infection par des GAS (*Group A Streptococcus*), la protéine Rab35 liée au GTP (forme active) se situe au niveau de la membrane de la vacuole contenant les bactéries. Les GAS sont ensuite capables de s'échapper de cette vacuole et peuvent être marqués par l'ubiquitine. La présence de Rab35 au niveau de la vacuole et la présence de l'ubiquitine au niveau de la bactérie, engendrent le recrutement de NDP52. Ainsi, la liaison de NDP52 à Rab35 est facilitée par la kinase TBK1, ce qui permet à Rab35 de renforcer l'interaction entre NDP52 et l'ubiquitine. Enfin, NDP52 se lie à LC3, adressant ainsi les GAS au sein du phagosome pour leur dégradation sélective. Adaptée de (Minowa-Nozawa et al., 2017).



**FIGURE 41 : Rôle de NDP52 dans la régulation de l'expression des gènes.**

La myosine 6 (MYO6) se lie au réticulum endoplasmique (RE) et est ensuite activée par NDP52 (ou CoCoA, un co-activateur transcriptionnel), ce qui lui permet de se lier à l'ARN polymérase II (RNAPII, RNA *polymerase II*) via l'actine. Adaptée de (Fili et al., 2017).



Par ailleurs, NDP52 est nécessaire pour l'étape de maturation des autophagosomes contenant *S. Typhimurium*. La maturation des autophagosomes nécessite le transport des endosomes à proximité des autophagosomes pour assurer la fusion des vésicules dans l'autophagosome et l'endo/lysosome. Une étude de Verlhac et co-auteurs a révélé que NDP52 se lie d'une part à LC3A, LC3B, ou GABARAPL2 (Verlhac et al., 2015), et d'autre part à MYO6 (Tumbarello et al., 2012). L'interaction NDP52-MYO6 favorise le trafic intracellulaire des autophagosomes contenant des bactéries vers l'extrémité des filaments d'actine pour faciliter la fusion avec le lysosome, entraînant ainsi la dégradation de *S. typhimurium* (Verlhac et al., 2015). Par conséquent, NDP52 est un récepteur multifonctionnel de la xénophagie, capable d'initier la formation de phagophores en recrutant les complexes ULK et TBK1, *via* FIP200 et NAP1. NDP52 peut également fixer les substrats aux membranes des phagophores par l'intermédiaire de LC3. Et enfin, NDP52 favorise la maturation des autophagosomes en interagissant avec MYO6.

### III.3.1.2.3 NDP52 dans la régulation de l'expression des gènes et de la structure de l'ADN

Bien que NDP52 ait été initialement identifié dans le noyau et qu'il soit exprimé dans toute la cellule (Korioth et al., 1995; Sternsdorf et al., 1997), il n'y a que récemment qu'une fonction nucléaire a été mise en évidence. Une étude très récente a utilisé une approche multidisciplinaire pour caractériser les rôles nucléaires de NDP52 dans l'expression des gènes et la régulation de la structure de l'ADN (Dos Santos et al., 2023). NDP52 se lie spécifiquement et avec une grande affinité à l'ADN double brin, entraînant des changements dans la structure de l'ADN *in vitro* (Dos Santos et al., 2023). Cette étude a également exploré l'interactome nucléaire de NDP52, qui montre un enrichissement pour les protéines impliquées dans la structure de l'ADN et la régulation des nucléosomes. Ces résultats supposent donc une fonction possible de NDP52 dans la régulation de la chromatine (Dos Santos et al., 2023). Par ailleurs, de manière intrigante, NDP52 partage 70 % d'identité de séquence avec CoCoA, un co-activateur de transcription connu, suggérant un rôle potentiel de NDP52 dans la transcription (Yang et al., 2006). De plus, MYO6 joue un rôle nucléaire important dans la transcription, la réparation de l'ADN et la régulation de la chromatine et interagit avec l'ARN polymérase II (RNAPII, *RNA polymerase II*) (Cook et al., 2020). Le complexe MYO6-NDP52 se lie à RNAPII, sur les sites d'initiation de la transcription (**Figure 41**). Ces résultats suggèrent que NDP52 participe à la transcription de part : (i) sa grande homologie avec le co-activateur de la transcription CoCoA, (ii) sa colocalisation et sa liaison avec le complexe RNAPII et (iii) sa déplétion diminue le niveau de l'ARNm *in vitro* (Fili et al., 2017). Par conséquent, il est supposé que NDP52 peut avoir une fonction de régulation de l'expression des gènes, tout comme CoCoA, qui est lui aussi un partenaire de MYO6 (Fili et al., 2017).

### III.3.1.2.4 NDP52 dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et lien avec la maladie de Crohn

Il a été démontré que NDP52 participe à la diminution de l'inflammation en régulant négativement la signalisation NF- $\kappa$ B (Inomata et al., 2012; Ellinghaus et al., 2013). Une étude de séquençage de l'exome entier de 42 patients atteints de la MC et d'individus sains, a révélé une association entre la susceptibilité de développer la MC et une mutation faux-sens commune, appelée Val248Ala (SNP rs2303015), entraînant le remplacement de la valine par l'alanine en position 248 dans le domaine CC de NDP52 (Ellinghaus et al., 2013). Il a été montré que le variant à risque *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* est toujours recruté au niveau des mitochondries pour exercer la mitophagie, ce qui n'est pas le cas pour un mutant dépourvu du domaine de liaison à l'ubiquitine (Thurston et al., 2009; Lazarou et al., 2015). De plus, Ellinghaus et co-auteurs ont rapporté que la protéine NDP52 sauvage est capable de réduire l'activation de NF- $\kappa$ B en réponse au poly(I:C) (*polyinosinic-polycytidylic acid*), un agoniste des TLR, dans les cellules HeLa, ce que n'est pas capable de faire la protéine mutée *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* associée à la MC (Ellinghaus et al., 2013). Par conséquent, le rétro-contrôle négatif sur la signalisation TLR exercé par NDP52 est altéré par le variant à risque *NDP52<sup>Val248Ala</sup>*, provoquant ainsi une inflammation plus importante chez les patients atteints de la MC, ce qui pourrait être l'un des mécanismes sous-jacents de l'implication de ce variant dans la pathogenèse de cette maladie (Ellinghaus et al., 2013).

### III.3.1.3 p62

La protéine p62 est une protéine multifonctionnelle hautement conservée d'un poids moléculaire de 62 kDa, qui se trouve dans le cytoplasme sous forme de points ou d'agrégats dispersés et peut être transportée entre le cytoplasme et le noyau (Park et al., 1995; Pankiv et al., 2007). Composée de 440 acides aminés, p62 comprend six domaines, dont un domaine PB1 (*phox et bem1 domain*) qui permet son oligomérisation, un domaine en doigt de zinc de type ZZ (*ZZ-type zinc finger domain*), un domaine de liaison à TRAF6 (TB, *TRAF6-binding domain*), une région LIR, une région d'interaction avec Keap1 (KIR, *Keap1-interacting region*), une région d'interaction avec FIP200 (FIR, *FIP200-interacting region*) et un domaine UBA (**Figure 38**) (Pankiv et al., 2007; Zhou et al., 2023). Découvert en 1995 (Park et al., 1995), le récepteur p62 fut le premier récepteur identifié et décrit pour son rôle majoritaire dans l'agrégation (Bjørkøy et al., 2005; Pankiv et al., 2007; Kirkin et al., 2009) et la xénophagie (Zheng et al., 2009). Il reste à ce jour le récepteur le plus étudié, et de nombreuses études ont démontré que p62 joue également un rôle dans la lysophagie (Hung et al., 2013; Papadopoulos et al., 2017), la pexophagie (Kim et al., 2008; Deosaran et al., 2013; Yamashita et al., 2014), la réticulophagie (Yang et al., 2016; Ji et al., 2019) et dans une moindre mesure, dans la mitophagie (Heo et al., 2015; Matsumoto et al., 2015). De plus, p62 est également activement impliqué dans la formation des autophagosomes (Turco et al., 2019) ainsi que dans la régulation de la voie de signalisation Keap1 (*kelch-like ECH-associated protein 1*)-Nrf2

**TABLEAU 4 : Pathogènes ciblés par p62 au cours de la xénophagie.**

Souche bactérienne	Mécanisme pendant l'infection bactérienne	Référence
<i>Listeria monocytogenes</i>	Xénophagie	(Mostowy et al., 2011)
<i>Shigella flexneri</i>	Xénophagie : p62 cible les <i>Shigella</i> piégées dans des cages de septine	(Mostowy et al., 2011)
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	Xénophagie	(Zheng et al., 2009 ; Cemma et al., 2011)
	Activation de la voie Keap1-Nrf2	(Ishimura et al., 2014)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Xénophagie	(Watson et al., 2012 ; Sakowski et al., 2015)
	Activation de la voie Keap1-Nrf2	(Bonilla et al., 2013)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Xénophagie	(Wang et al., 2016)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Xénophagie	(Wang et al., 2021)

(*nuclear erythroid-related factor 2*) (Komatsu et al., 2010; Ishimura et al., 2014). Son rôle dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Wooten et al., 2005; Kim and Ozato, 2009; Nakamura et al., 2010) nécessite de plus amples recherches (**Tableau 2**). Enfin, même en absence d'interaction avec LC3, p62 est localisé au niveau du phagophore et est dégradé au cours du flux autophagique, ce qui fait de la diminution de l'accumulation de p62 un marqueur de l'activation d'une autophagie fonctionnelle (Klionsky et al., 2021). Dans cette section, seul le rôle de p62 dans la xénophagie bactérienne sera détaillé, ainsi que ses autres fonctions dans la formation des autophagosomes et dans la régulation des voies de signalisation Keap1-Nrf2 et NF- $\kappa$ B.

### III.3.1.3.1 p62 dans la xénophagie bactérienne

Le rôle de p62 dans la xénophagie a principalement été étudié dans le contrôle de la réplication intracellulaire de *S. Typhimurium* (Zheng et al., 2009). D'autres études ont également montré que diverses espèces bactériennes, telles que *Shigella flexneri* (Mostowy and Cossart, 2012), *L. monocytogenes* (Mostowy et al., 2011) et *M. tuberculosis* (Watson et al., 2012) sont spécifiquement adressées, *via* p62, au sein d'autophagosomes natifs positifs pour LC3 en vue de leur dégradation (**Tableau 4**). Dans des expériences d'infection *ex vivo* utilisant des macrophages, p62 colocalise avec *M. tuberculosis* et contrôle sa réplication. Dans ce même modèle d'infection, la suppression de p62 augmente la survie de *M. tuberculosis* (Sakowski et al., 2015). De plus, une étude a révélé un mécanisme unique de la xénophagie de l'hôte déclenchée par la liaison de l'ubiquitine à une protéine de surface bactérienne. De façon intrigante, au cours de l'infection des macrophages, la protéine de surface Rv1468c de *M. tuberculosis*, une protéine contenant un domaine de liaison à l'ubiquitine de type eucaryote, peut être reconnue par l'ubiquitine de l'hôte. La liaison directe de l'ubiquitine à Rv1468c, mais pas l'ubiquitination par les ligases E3, recrute le récepteur p62 pour adresser les mycobactéries dans les autophagosomes LC3-positifs. La perturbation de l'interaction Rv1468c-ubiquitine réduit la clairance de *M. tuberculosis* par la xénophagie dans les macrophages et augmente la charge bactérienne chez les souris présentant des réponses inflammatoires élevées (Chai et al., 2019). Enfin, la suppression de Parkin 2 diminue la colocalisation de *M. tuberculosis* avec NDP52, p62 ainsi que NBR1 (Manzanillo et al., 2013).

Des modulateurs supplémentaires de p62, qui fonctionnent dans la régulation de la xénophagie, ont été rapportés. Par exemple, TBK1 joue un rôle important dans la promotion de la xénophagie en activant p62 *via* la phosphorylation de la sérine-403 dans le domaine UBA de p62, permettant le recrutement de p62 sur les pathogènes intracellulaires recouverts d'ubiquitine et induisant son auto-oligomérisation. La phosphorylation du domaine UBA améliore fortement l'activité de p62 et est impliquée dans l'élimination de *M. tuberculosis* par l'autophagie (Pilli et al., 2012). Au cours de l'autophagie sélective, l'auto-oligomérisation de p62 joue un rôle crucial dans l'acheminement des substrats ubiquitinés vers la voie autophagique, un processus piloté par le domaine PB1 (Nakamura et al., 2010). Le domaine UBA de p62 reconnaît ensuite l'enveloppe d'ubiquitine des

pathogènes et s'y lie, tandis que le domaine LIR de p62 interagit avec LC3 présent sur le phagophore. En outre, le domaine TB de p62 interagit avec TRAF6, activant la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Min et al., 2018).

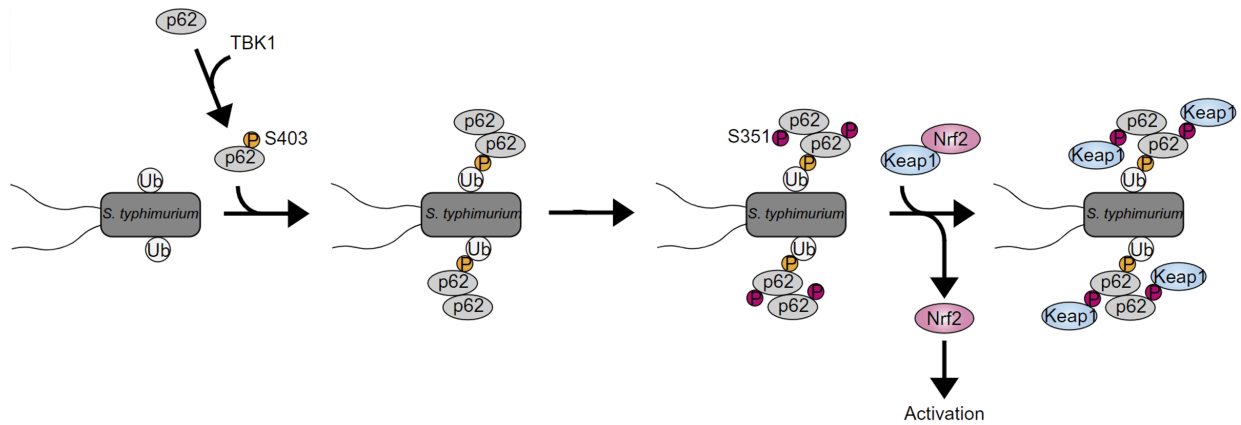
Par ailleurs, p62 agit en collaboration avec d'autres récepteurs de l'autophagie tels que NDP52 afin d'adresser *S. Typhimurium* (Cemma et al., 2011), *L. monocytogenes* (Mostowy et al., 2011) et *Shigella flexneri* (Mostowy et al., 2011) au sein des autophagosomes. Les septines, un type de protéines conservées se liant au GTP, forment des cages autour des *Shigella* intracellulaires, mais pas des *Listeria*, pour limiter la prolifération bactérienne (Mostowy et al., 2011). Au cours de l'infection par *Shigella*, p62 et NDP52 sont recrutés de manière inter-dépendante dans les cages de septine contenant *Shigella* et régulent mutuellement leur activité xénophagique (Mostowy et al., 2011). Cependant, lorsque les cellules hôtes sont envahies par *Listeria*, p62 et NDP52 peuvent être recrutés indépendamment l'un de l'autre. De même, une autre étude a suggéré que, bien que partageant une cinétique de recrutement similaire pour *S. Typhimurium*, p62 et NDP52 sont recrutés indépendamment l'un de l'autre pour cibler différents micro-domaines entourant les bactéries afin de faciliter la xénophagie (Cemma et al., 2011).

### III.3.1.3.2 p62 dans la formation des autophagosomes

Le rôle de p62 dans la formation des autophagosomes n'a été élucidé que dernièrement. En effet, p62 est capable de recruter le complexe ULK au niveau des substrats ubiquitinés grâce à sa liaison directe avec FIP200 à travers son domaine FIR (Turco et al., 2019), entraînant la formation d'autophagosomes directement sur les substrats à dégrader pour leur élimination spécifique.

### III.3.1.3.3 p62 dans la régulation de la voie de signalisation Keap1-Nrf2

La fonction anti-microbienne de p62 ne se limite pas à la xénophagie, puisque p62 active la voie Keap1-Nrf2 (Jain et al., 2010; Komatsu et al., 2010; Ichimura et al., 2013), l'un des principaux mécanismes de défense cellulaire contre le stress oxydatif. Dans des conditions normales, le facteur de transcription Nrf2 est constitutivement dégradé par la voie protéasomale. Son partenaire de liaison, Keap1, est un adaptateur qui cible en continu Nrf2 pour sa dégradation (Taguchi et al., 2011). Cependant, lors de l'infection par *S. Typhimurium*, p62 est recruté au niveau du pathogène puis phosphorylé sur la sérine-351 dans son domaine KIR, ce qui engendre une augmentation de l'affinité de p62 pour Keap1 et donc une séquestration de Keap1 au niveau de *S. Typhimurium* et un échappement de Nrf2 à la dégradation (Ichimura et al., 2013; Ishimura et al., 2014). En plus de la phosphorylation de la sérine-351, l'oligomérisation de p62 est nécessaire pour la localisation de Keap1 au niveau de *S. Typhimurium*. En conséquence, Nrf2 est stabilisé, puis il se transloque vers le noyau et se lie aux éléments de réponse anti-oxydante de l'ADN pour induire la transcription des gènes qui codent pour les protéines anti-oxydantes (Harvey et al., 2011). Les substrats autophagiques ubiquitinés, ainsi que p62 phospho-



**FIGURE 42 : Activation de la voie Keap1-Nrf2 par p62 pendant la xénophagie.**

La voie de signalisation Keap1-Nrf2 est l'un des principaux mécanismes de défense cellulaire contre le stress oxydatif. En réponse à une infection par *Salmonella*, la sérine-403 du domaine UBA de p62 est phosphorylée par TBK1, ce qui favorise la translocation de p62 au niveau des *Salmonella* ubiquitinées. Par la suite, la sérine-351 du domaine KIR de p62 est phosphorylée, induisant la séquestration de Keap1 sur *Salmonella*. En conséquence, Nrf2 est stabilisé, puis il se transloque dans le noyau pour induire la transcription des gènes codant pour des protéines anti-oxydantes. Adaptée de (Ishimura et al., 2014).

Abréviations : Keap1 : *kelch-like ECH-associated protein 1*, KIR : *Keap1-interacting region*, Nrf2 : *nuclear erythroid-related factor 2*, p62/SQSTM1 : *sequestosome 1*, TBK1 : *TANK-binding kinase 1*, Ub : *ubiquitine*, UBA : *ubiquitin-associated domain*.

rylé et le complexe Keap1, sont dégradés par l'autophagie, entraînant l'élimination des composants cytotoxiques (**Figure 42**) (Taguchi et al., 2011; Ichimura et al., 2013). De la même façon, il a été rapporté que dans les macrophages dépourvus d'*ATG7* et infectés par *M. tuberculosis*, p62 s'accumule, est phosphorylé sur la sérine-351 de son domaine KIR, ce qui active Nrf2 et induit ainsi l'expression des gènes cibles de Nrf2, entraînant une augmentation du nombre de *M. tuberculosis* dans les phagosomes (Bonilla et al., 2013).

#### III.3.1.3.4 p62 dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B

La propriété d'hétérodimérisation du domaine PB1 de p62 permet sa liaison aux domaines PB1 d'autres protéines, permettant ainsi à p62 de réguler de façon directe ou indirecte la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. En effet, il a été montré que les domaines PB1 de MEKK3 (*mitogen-activated protein kinase kinase 3*), une MAPK kinase, et de p62 s'hétérodimérisent (Nakamura et al., 2010). Le complexe p62-MEKK3 se lie à TRAF6, qui régule l'ubiquitination du complexe IKK et l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Yang et al., 2001). De plus, l'inhibition de l'expression de p62 supprime l'activation de NF- $\kappa$ B médiée par MEKK3 (Nakamura et al., 2010). p62 est connu pour induire la production de cytokines pro-inflammatoires *via* la poly-ubiquitination de TRAF6 et ainsi l'activation de NF- $\kappa$ B (Duran et al., 2008). Une fois ubiquitiné, TRAF6 facilite l'assemblage de chaînes de poly-ubiquitine K63 conduisant à l'activation du complexe IKK et à la signalisation NF- $\kappa$ B (Wooten et al., 2005). Contrairement à ces résultats, d'autres études ont révélé que la signalisation p62 est également impliquée dans les réponses anti-inflammatoires. Par exemple, p62 inhibe la formation du complexe MYD88 (*myeloid differentiation primary response 88*)-TRAF6, un processus vital pour supprimer l'expression de l'IL-6 (Into et al., 2010), et la surexpression de p62 diminue la production de cytokines pro-inflammatoires (Kim and Ozato, 2009). Enfin, il a également été constaté que p62 diminue l'inflammation en réponse à l'adiponectine après une stimulation par le LPS dans les macrophages (Tilija Pun and Park, 2017). Par conséquent, bien que p62 soit impliqué dans la régulation de la voie NF- $\kappa$ B, des recherches plus approfondies sont nécessaires pour entièrement élucider son rôle.

#### III.3.1.4 TAX1BP1

TAX1BP1, également connu sous le nom de T6BP (*Traf6-binding protein*) ou CALCOCO3 (*calcium binding and coiled-coil domain 3*) (Morriswood et al., 2007) est un proche paralogue de NDP52. La protéine TAX1BP1 a été conservée au cours de l'évolution (Tumbarello et al., 2015) et est exprimée dans tous les types de tissus, avec une expression plus importante dans les reins et le cerveau (Sarraf et al., 2020). TAX1BP1 est composé d'un domaine SKICH, un domaine cLIR, un domaine central d'oligomérisation contenant trois régions CC et un domaine de liaison à l'ubiquitine contenant deux domaines ZF (**Figure 38**) (Morriswood et al., 2007; Verstrepen et al., 2011; Ceregido et al., 2014; Fu et al., 2018). TAX1BP1 est un récepteur impliqué dans la mitophagie (Heo et al., 2015; Moore and Holzbaur, 2016), la xénophagie (Tumbarello et al., 2015) et récemment dans l'agréphagie (Sarraf et al., 2020) et la lysophagie (Koerver et al., 2019; Eapen et al., 2021).



De plus, TAX1BP1 est également activement impliqué dans la maturation des autophagosomes (Tumbarello et al., 2012) ainsi que dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Iha et al., 2008; Nakano et al., 2013) (**Tableau 2**). Dans cette section, seul le rôle de TAX1BP1 dans la xénophagie bactérienne sera développé, ainsi que ses autres fonctions dans la maturation des autophagosomes et dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B.

#### III.3.1.4.1 TAX1BP1 dans la xénophagie bactérienne

Le rôle de TAX1BP1 dans la xénophagie a été mis en évidence pour la première fois par une étude en 2015, qui montre son implication dans la clairance de *S. Typhimurium* cytosolique (Tumbarello et al., 2015). Au cours de l'infection, TAX1BP1 est recruté par des *S. Typhimurium* ubiquitinées, tandis que la suppression de l'expression de TAX1BP1 conduit à une accumulation des *S. Typhimurium* ubiquitinées dans le cytosol des cellules HeLa. Les auteurs ont également confirmé que TAX1BP1 peut se lier à LC3B, LC3C, GABARAPL1 et L2 sur la membrane externe des autophagosomes, permettant à un plus grand nombre de phagophores de se développer en autophagosomes pour capturer les bactéries cytosoliques (Tumbarello et al., 2015). Le domaine ZF2 de TAX1BP1 interagit avec les chaînes de poly-ubiquitine K63 présentes sur *S. Typhimurium*, ce qui favorise la clairance autophagique des bactéries (Iha et al., 2008; Tumbarello et al., 2015). De plus, Fu et co-auteurs ont révélé que le domaine SKICH de TAX1BP1 peut interagir avec la sous-unité NAP1 de TBK1, s'associant ainsi indirectement à TBK1. TBK1 peut phosphoryler TAX1BP1 pour promouvoir son affinité envers les chaînes d'ubiquitine sur les bactéries ainsi que LC3 (Tumbarello et al., 2015; Fu et al., 2018). Le rôle de TAX1BP1 dans la xénophagie a également été récemment étendue à la prise en charge de *M. tuberculosis* (Budzik et al., 2020; Bell et al., 2021). Les auteurs ont démontré que la perte de TAX1BP1 dans les macrophages conduisait à une accumulation de *M. tuberculosis* marqué par l'ubiquitine, ainsi qu'à une diminution de *M. tuberculosis* situé dans des autophagosomes LC3-positifs, suggérant que TAX1BP1 recrute *M. tuberculosis* vers le phagophore (Budzik et al., 2020). Enfin, tout comme NDP52, TAX1BP1 se lie également à la galectine-8 (Bell et al., 2021), ce qui permet un recrutement direct du pathogène intracellulaire au niveau du phagophore. La perturbation de l'interaction galectine-8-TAX1BP1 entraîne une diminution du nombre de *M. tuberculosis* retrouvés dans des autophagosomes TAX1BP1- et LC3-positifs (Bell et al., 2021). Par conséquent, au cours de l'infection, l'ensemble de ces études implique fortement TAX1BP1 en tant que récepteur ciblant *M. tuberculosis* et *S. Typhimurium* pour leur dégradation par la xénophagie.

#### III.3.1.4.2 TAX1BP1 dans la maturation des autophagosomes

En plus de son rôle dans la reconnaissance des pathogènes intracellulaires, TAX1BP1 est également impliqué dans d'autres étapes de l'autophagie, en particulier la maturation des autophagosomes. En effet, TAX1BP1 interagit d'une part, avec les protéines LC3 associées à l'autophagosome et d'autre part, avec MYO6, permet-

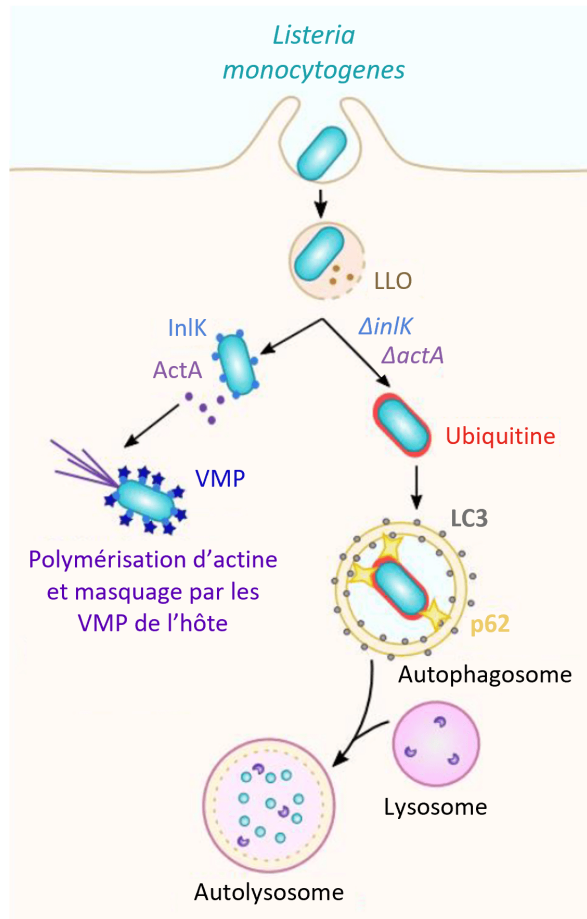
tant l'adressage des autophagosomes vers la voie endo-lysosomale et donc la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Tumbarello et al., 2012; Hu et al., 2018b).

### III.3.1.4.3 TAX1BP1 dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B

Initialement, les études menées sur TAX1BP1 concernaient son rôle dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. Il a été mis en avant que les fibroblastes embryonnaires de souris déficientes pour *Tax1bp1* présentent une signalisation NF- $\kappa$ B accrue en réponse à une stimulation par le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  (Iha et al., 2008; Nakano et al., 2013). Notamment, ces effets ont été reproduits *in vivo* puisque les souris déficientes pour *Tax1bp1* naissent normales, mais développent une valvulite cardiaque inflammatoire, meurent prématurément et sont hypersensibles à l'inflammation provoquée par le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  (Iha et al., 2008; Nakano et al., 2013).

### III.3.1.5 NBR1

NBR1 a été découvert comme un récepteur de l'autophagie sélective principalement en raison de son interaction et de sa similarité structurale avec p62 (Kirkin et al., 2009; Waters et al., 2009). Chez l'homme, NBR1 est beaucoup moins abondant dans la plupart des types de cellules que p62, avec une différence de 10 à presque 100 fois au niveau protéique (Wang et al., 2015). Selon « The Human Protein Atlas », les deux protéines sont exprimées dans la plupart des tissus avec peu de spécificité tissulaire. Les récepteurs NBR1 et p62 partagent un domaine N-terminal PB1, un domaine ZZ, un motif LIR et un domaine UBA en C-terminal. En outre, NBR1 est composé de deux domaines CC et d'un domaine en plus appelé domaine FW impliqué dans les interactions protéine-protéine (**Figure 38**) (Deosaran et al., 2013). Le domaine PB1 est également impliqué dans les interactions avec d'autres protéines contenant un domaine PB1 (comme p62), tandis que les domaines CC assurent son oligomérisation. Le domaine UBA se lie à l'ubiquitine et aux substrats ubiquitinés, et le domaine LIR se lie aux protéines de la famille LC3 (Johansen and Lamark, 2020). Le domaine FW a été nommé ainsi parce qu'il contient quatre résidus de tryptophane (W) hautement conservés, mais il peut aussi être appelé domaine NBR1-like ou NBR1 (Kraft et al., 2010). Par exemple, le domaine FW se lie à la protéine MAP1B (*microtubule-associated protein 1B*) associée aux microtubules et à TAX1BP1 (Turco et al., 2021). NBR1 a d'abord été identifié pour sa collaboration avec p62 dans l'agrégation (Kirkin et al., 2009). Son rôle dans la xénophagie (Mostowy et al., 2011; Manzanillo et al., 2013; Franco et al., 2017), qui est moins connu, et dans la pexophagie (Deosaran et al., 2013; Yamashita et al., 2014), n'a été étudié que bien plus tard (**Tableau 2**). Dans cette section, seul le rôle de NBR1 dans la xénophagie bactérienne sera développé.



**FIGURE 43 : Évitement de la reconnaissance de *Listeria monocytogenes* par l'autophagie.**

Après son entrée dans la cellule, *Listeria monocytogenes* s'échappe de sa vacuole d'endocytose en sécrétant la listériolysine O (LLO). Libre dans le cytoplasme, elle exprime la protéine ActA qui permet la polymérisation de l'actine de la cellule hôte et la protéine InlK ancrée à la surface de la bactérie, qui recrute les protéines VMP (*vault major protein*) de l'hôte, empêchant ainsi sa reconnaissance par l'autophagie. Un mutant pour les protéines ActA ( $\Delta actA$ ) et InlK ( $\Delta inlK$ ) est ubiquitiné, recrutant p62 et conduisant à la séquestration et la dégradation de la bactérie dans un autolysosome.

### III.3.1.5.1 NBR1 dans la xénophagie bactérienne

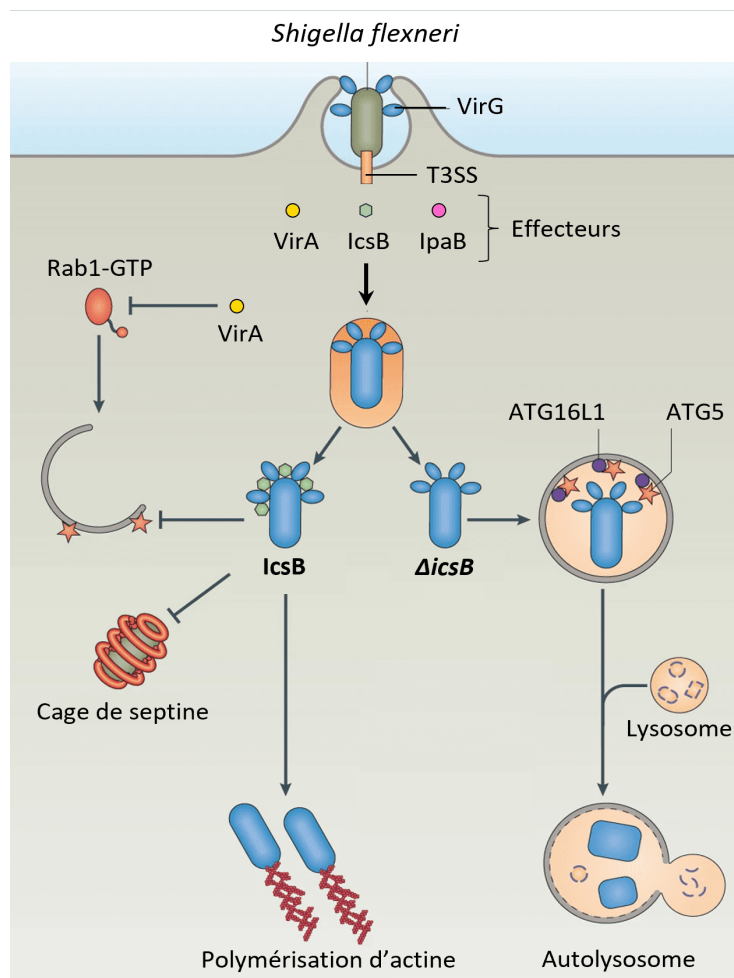
Les bactéries intracellulaires exposées dans le cytosol sont marquées par des chaînes d'ubiquitine et séquestrées dans les autophagosomes par des récepteurs se liant à l'ubiquitine (Goodall et al., 2022). NBR1, NDP52 et p62 sont recrutés au niveau de *M. tuberculosis* (Manzanillo et al., 2013) et de *S. flexneri* (Mostowy et al., 2011) intracellulaires. En effet, lors d'une infection par *S. flexneri*, NBR1 est nécessaire au recrutement de p62 et NDP52, même si le mécanisme reste encore inconnu (Mostowy et al., 2011). Lors d'une infection par *M. tuberculosis*, NBR1 et p62 sont recrutés au niveau du pathogène de manière dépendante de Parkin 2, une ligase E3, étant donné que la suppression de Parkin 2 diminue la colocalisation de *M. tuberculosis* avec NDP52, p62 ainsi que NBR1 (Manzanillo et al., 2013). NBR1 peut également être recruté par Smurf1, une autre ligase E3, au niveau de *M. tuberculosis* et de *L. monocytogenes* (Franco et al., 2017). De plus, les souris dépourvues de *Parkin 2* ou de *Smurf1* sont plus sensibles à l'infection par *M. tuberculosis*, ce qui suggère que les deux ligases E3 sont importantes pour le recrutement de NBR1 et la xénophagie qui s'ensuit (Manzanillo et al., 2013; Franco et al., 2017). Par ailleurs, la protéine de surface Rv1468c de *M. tuberculosis* se lie aux chaînes de poly-ubiquitine et recrute NBR1, de manière dépendante de l'UBA (Chai et al., 2019). NBR1 est également recruté dans les vésicules contenant des GAS de manière dépendante de Tollip. La suppression de Tollip empêche le recrutement de NBR1, NDP52 et TAX1BP1 dans les vésicules contenant des GAS (Lin et al., 2020).

## III.3.2 Échappement des bactéries à la xénophagie

Bien que les bactéries intracellulaires soient ciblées par la xénophagie pour être éliminées, certaines d'entre elles développent diverses stratégies pour détourner l'autophagie à leur avantage en sécrétant des facteurs de virulence (Hu et al., 2020). Ces effecteurs leur permettent d'éviter d'être reconnues par la machinerie autophagique, de limiter l'induction de ce processus, voire même de le détourner pour assurer leur propre réplication (Riebisch et al., 2021).

### III.3.2.1 Évitement de la reconnaissance par la machinerie autophagique

L'une des stratégies développées par les bactéries pour se protéger de la dégradation par la xénophagie est d'éviter d'être reconnues par la machinerie autophagique. Par exemple, *L. monocytogenes* est capable de s'échapper du phagosome en exprimant la listériolysine O (LLO) (Cossart et al., 1989). Si l'activité de la LLO est insuffisante pour permettre aux bactéries d'échapper à l'autophagie, celles-ci sont capables de former des phagosomes, appelés SLAP (*spacious Listeria-containing phagosomes*), générés de manière dépendante de l'autophagie, permettant ainsi aux bactéries de se développer lentement. De plus, *L. monocytogenes* sécrète les effecteurs ActA et InlK, qui, respectivement, empêche son ubiquitination (Yoshikawa et al., 2009) et masque sa surface en se liant aux protéines cytoplasmiques MVP (*major vault protein*) de l'hôte (Dortet et al., 2011),



**FIGURE 44 : Évitement de la reconnaissance de *Shigella flexneri* par l'autophagie.**

Après son entrée dans la cellule, *Shigella flexneri* sécrète plusieurs effecteurs grâce à son système de sécrétion de type III (T3SS, *type 3 secretion system*). L'effeteur bactérien IpaB est responsable de la lyse de sa vacuole d'endocytose. Dans le cas de la bactérie sauvage, l'effeteur IcsB se lie à la protéine de surface bactérienne VirG pour bloquer ATG5, inhibant l'initiation de l'autophagie et la formation de cages de septine autour des bactéries. De plus, l'effeteur VirA inactive Rab1, inhibant également la formation d'autophagosome. Ainsi, la bactérie sauvage n'est pas prise en charge dans un autophagosome et peut se disséminer en recrutant à un de ses pôles la machinerie eucaryote nécessaire à la polymérisation de l'actine. Au contraire, dans le cas d'un mutant pour la protéine IcsB ( $\Delta$ icsB), celui-ci continue à exposer la protéine VirG à sa surface, qui est reconnue par ATG5, ciblant ainsi les bactéries vers les autophagosomes pour leur dégradation, induisant ainsi la séquestration et la dégradation de la bactérie dans un autophagosome. Adaptée de (Huang and Brumell, 2014).

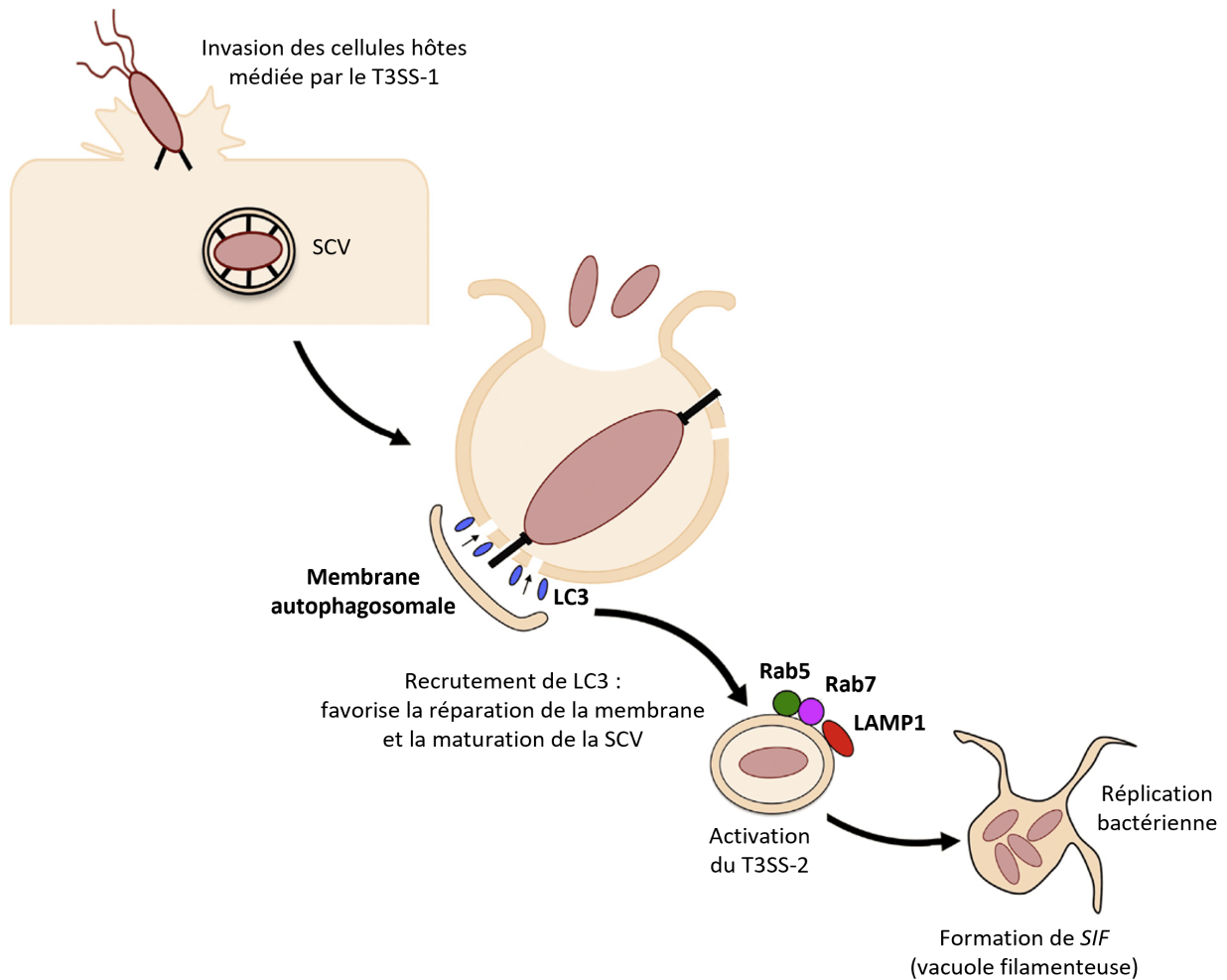
évitant ainsi sa reconnaissance par l'autophagie (**Figure 43**) (Yoshikawa et al., 2009; Mitchell et al., 2015). Enfin, les phospholipases C, PlcA et PlcB de *L. monocytogenes* empêchent la formation de PI3P, bloquant la lipidation de LC3 et ainsi l'autophagie (**Tableau 5**) (Mitchell et al., 2015).

De même, *Shigella flexneri* est capable de s'échapper du phagosome en sécrétant son effecteur IcsB qui cache sa propre protéine de membrane externe VirG, inhibant ainsi le recrutement d'ATG5 et donc l'adressage de la bactérie vers le phagosome (Ogawa et al., 2005). IcsB, en association avec le facteur VirA, bloque le recrutement de LC3 à la vacuole et facilite l'échappement de *S. flexneri* des vacuoles LC3-positives formées (**Figure 44**) (Campbell-Valois et al., 2015). De plus, IcsB empêche aussi le recrutement des protéines ubiquitine et le recrutement de p62 et de NDP52 (Mostowy et al., 2011). IcsB recrute également Toca-1 (*transducer of CDC42-dependent actin assembly-1*) pour inhiber l'agrégation de NDP52 et LC3 afin d'échapper à la xénophagie (**Tableau 5**) (Baxt and Goldberg, 2014).

Appartenant aux bactéries intracellulaires obligatoires, *Rickettsia parkeri* pourrait échapper à la xénophagie de la cellule hôte et se propager facilement de cellule en cellule. Encodée par toutes les espèces de *Rickettsia* séquencées, l'enzyme Pat1 (*patatin-like phospholipase A2*) permet à *Rickettsia parkeri* d'échapper à la reconnaissance de p62 en évitant le recrutement de poly-ubiquitine (Borgo et al., 2022). De plus, *R. parkeri* utilise ses deux protéines-lysine méthyltransférases (PKMT 1/2, *protein lysine methyltransferase*) pour méthyler les résidus lysine des protéines de la membrane externe, empêchant ainsi son ubiquitination et son ciblage par l'autophagie (Engström et al., 2021). Enfin, *R. parkeri* utilise la protéine OmpB (*outer membrane protein B*) de la membrane externe pour bloquer l'ubiquitination des protéines de la surface bactérienne et la reconnaissance ultérieure par les récepteurs de l'autophagie. OmpB est également nécessaire à la formation d'une couche de protection semblable à une capsule autour de la bactérie (**Tableau 5**) (Engström et al., 2019).

### III.3.2.2 Inhibition de l'induction de l'autophagie

Afin d'éviter la dégradation par la xénophagie, les bactéries sont capables de bloquer l'induction de l'autophagie et la formation de l'autophagosome. Par exemple, grâce à l'expression du T3SS, *S. Typhimurium* peut altérer la membrane de la SCV afin de détourner la machinerie autophagique pour réparer les dommages subis par la membrane. Cela empêche l'exposition des bactéries au cytosol et permet le recrutement des protéines Rab5, Rab7 et LAMP1 (*lysosome-associated membrane glycoprotein 1*) induisant la maturation progressive de la SCV ainsi que la survie et la réplication intracellulaire de la bactérie (**Figure 45**) (Kreibich et al., 2015). *S. Typhimurium* sécrète plus de 30 protéines effectrices dans le cytosol de l'hôte via son T3SS2 (Figueira et al., 2013), ce qui entraîne le recrutement de la kinase FAK (*focal adhesion kinase*) à la surface du SCV, activant la voie AKT-mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) et bloquant ainsi l'autophagie dans les macrophages, les cellules épithéliales et les fibroblastes (Owen et al., 2014). De plus, la protéine effectrice SseL de *S. Typhimu-*



**FIGURE 45 : Contournement de la machinerie autophagique par *Salmonella Typhimurium* pour éviter sa dégradation par l'autophagie.**

Après internalisation par les cellules hôtes, *Salmonella* réside dans une vacuole appelée SCV (*Salmonella-containing vacuole*) et peut endommager cette dernière grâce à l'expression d'un premier système de sécrétion de type III (T3SS-1, *type 3 secretion system 1*), qui est nécessaire à l'invasion bactérienne. *Salmonella* est capable d'utiliser la machinerie autophagique pour réparer les dommages induits aux SCV en recrutant, dans un premier temps, les protéines LC3 associées à la membrane autophagosomale. Ceci permet, dans un second temps, le recrutement des protéines Rab5, Rab7 et LAMP1 (*lysosome-associated membrane glycoprotein 1*) afin de permettre la maturation du compartiment réparé et l'expression d'un deuxième T3SS (T3SS-2, *type 3 secretion system 2*) par la bactérie, provoquant la formation d'une vacuole filamenteuse, appelée SIF (*Salmonella-induced filament*), facilitant ainsi la survie bactérienne. Adaptée de (Owen and Casanova, 2015).



rium élimine les agrégats d'ubiquitine associés à la surface de la SCV, inhibant le recrutement de p62 et LC3, diminuant son ciblage vers l'autophagosome et favorisant ainsi sa réplication (**Tableau 5**) (Mesquita et al., 2012).

Par ailleurs, *Legionella pneumophila* inhibe sa reconnaissance par l'autophagie et donc la formation de l'autophagosome, en injectant la cystéine protéase RavZ dans le cytoplasme des cellules hôtes, qui est le seul facteur bactérien identifié inhibant directement les composants du processus autophagique. RavZ déconjugue de façon irréversible LC3 de la PE (Choy et al., 2012), empêchant ainsi l'adressage vers les autophagosomes (**Figure 46**). *L. pneumophila* échappe également à la xénophagie en perturbant le recrutement de p62 dans la vacuole LCV (*L. pneumophila*-containing vacuole). En effet, *L. pneumophila* sécrète des effecteurs de la famille SidE qui ubiquitinent de façon non canonique les protéines de la vacuole LCV (Qiu et al., 2016), empêchant p62 de reconnaître efficacement les bactéries et donc d'initier la xénophagie (**Tableau 5**) (Omotade and Roy, 2020).

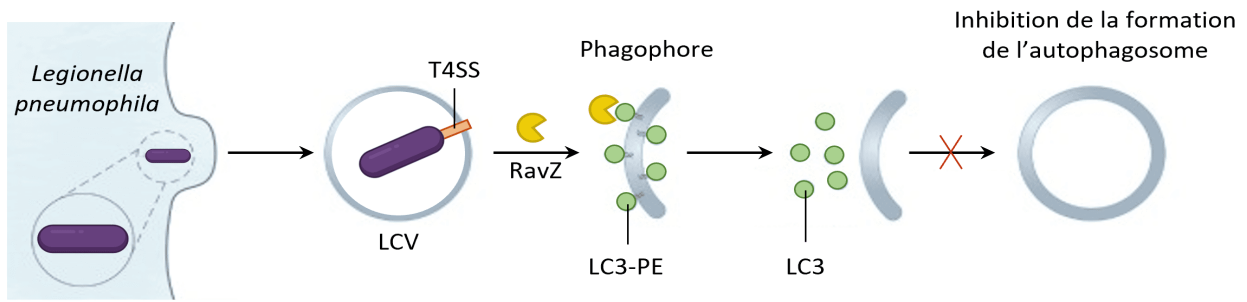
Enfin, l'interaction entre ATG16L1 et la protéine C3 du complément qui opsonise les bactéries, joue un rôle important dans l'initiation de la xénophagie. En effet, *L. monocytogenes* opsonisée par la protéine C3 est dégradée par l'autophagie grâce à l'interaction C3-ATG16L1. En revanche, *S. flexneri* et *S. Typhimurium* expriment les omptines, des protéases de membrane externe, qui clivent la protéine C3, leur permettant ainsi d'échapper à la dégradation autophagique médiée par la protéine C3 (**Figure 47**) (Sorbara et al., 2018).

### III.3.2.3 Dégradation des récepteurs de la xénophagie

Pour échapper à la xénophagie, certaines bactéries sont capables de dégrader les récepteurs de l'autophagie afin qu'elles ne soient pas adressées dans les autophagosomes. Par exemple, dans le cas d'une infection par les GAS, la cystéine protéase SpeB dégrade les récepteurs de l'autophagie p62, NBR1 et NDP52 dans les cellules, échappant ainsi à la xénophagie et favorisant sa réplication (Barnett et al., 2013). De plus, il a été rapporté qu'au cours de l'infection par *Streptococcus pneumoniae*, CbpC, qui est exposé à la surface cellulaire du pneumocoque, pouvait se lier à p62 et agir comme un leurre pour la dégradation autophagique d'ATG14, supprimant la xénophagie et favorisant ainsi la survie bactérienne dans les cellules hôtes (Shizukuishi et al., 2020). Enfin, une étude plus récente a démontré que lors d'une infection par *M. tuberculosis*, la protéine PPM1A (*protein phosphatase Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-dependent 1A*) inhibe la xénophagie en déphosphorylant directement p62, entraînant une altération de l'élimination de *M. tuberculosis* dans les cellules hôtes (**Tableau 5**) (Berton et al., 2022).

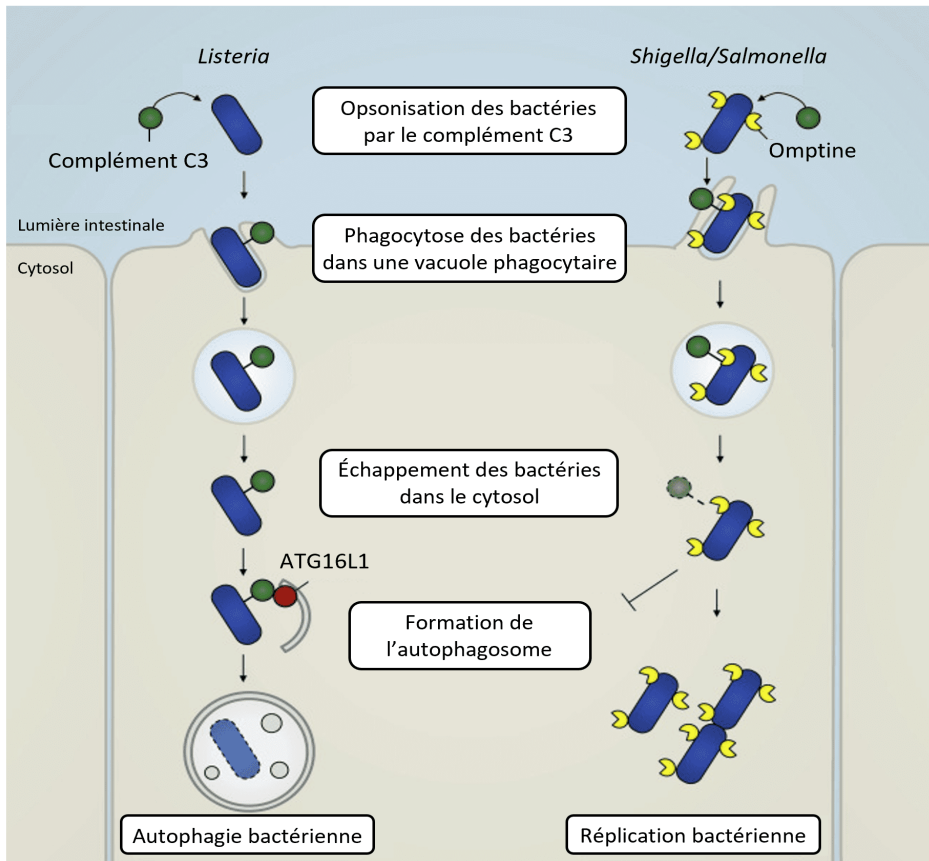
### III.3.2.4 Utilisation de l'autophagosome comme niche de réplication

Plutôt que de l'inhiber, certaines bactéries induisent l'autophagie pour l'utiliser à leur profit en bloquant la maturation de l'autophagosome afin de s'en servir comme niche de réplication. Dans ce cas précis, au lieu de



**FIGURE 46 : Clivage de la forme LC3-PE associée aux phagophores par *Legionella pneumophila* pour éviter sa dégradation par l'autophagie.**

Après internalisation par les cellules hôtes, *Legionella* réside dans une vacuole appelée LCV (*Legionella-containing vacuole*). Grâce à l'expression d'un système de sécrétion de type IV (T4SS, *type 4 secretion system*), *Legionella* peut sécréter la protéine effectrice RavZ. RavZ est une cystéine protéase capable de cliver de façon irréversible la forme LC3-PE (phosphatidyléthanolamine) associée aux phagophores, inhibant ainsi la formation de l'autophagosome. Adaptée de (Mei et al., 2021).



**FIGURE 47 : Clivage de la protéine C3 du complément par *Shigella flexneri* et *Salmonella Typhimurium* pour éviter leur dégradation par l'autophagie.**

Dans la muqueuse intestinale, les bactéries extracellulaires sont opsonisées par la protéine C3 du complément. Dans le cas des *Listeria* intracellulaires (à gauche), les bactéries recouvertes par la protéine C3 s'échappent vers le cytosol et sont ciblées par l'autophagie grâce à l'interaction entre C3 et ATG16L1. Dans le cas des *Shigella* ou *Salmonella* intracellulaires (à droite), ces bactéries expriment des omptines à leur surface, qui éliminent la protéine C3 recouvrant les bactéries de façon à ce que les bactéries cytosoliques échappent à la restriction de l'autophagie médiée par le complément C3. Adaptée de (Sancho-Shimizu and Mostowy, 2018).

favoriser l'élimination des bactéries, l'autophagie facilite l'acquisition de nutriments par les bactéries intracellulaires. En effet, des bactéries comme *Y. pseudotuberculosis* (Moreau et al., 2010), *Coxiella burnetii* (Voth et al., 2011), *Francisella tularensis* (Checroun et al., 2006) et *Staphylococcus aureus* (Schnaith et al., 2007) sont capables de bloquer la maturation et la fusion des autophagosomes avec les lysosomes pour s'en servir comme source de nutriments pour leur prolifération. Par ailleurs, les bactéries AIEC survivent dans les neutrophiles en bloquant l'autophagie au stade de l'autolysosome (Chargui et al., 2012). De plus, même si les mécanismes nécessitent de plus amples recherches, l'exploitation de la machinerie autophagique par *S. aureus* requière la sécrétion de la toxine Hla (*hemolysine- $\alpha$* ). Bien que la toxine Hla provoque une réponse autophagique, cette voie est dysfonctionnelle, comme l'indique l'accumulation de la forme LC3-II dans les lysats cellulaires obtenus à partir de cellules intoxiquées, et empêche la maturation des autophagosomes (Mestre et al., 2010).

La manipulation de la xénophagie à travers l'inhibition de la maturation des autophagosomes a bien été étudiée chez *M. tuberculosis*. Les effecteurs de *M. tuberculosis* ESX-1 (*ESAT-6 secretion system-1*), un système de sécrétion de type VII, inhibent le recrutement de Rab7 sur les autophagosomes, empêchant ainsi leur maturation (Chandra et al., 2015). Une autre protéine effectrice de *M. tuberculosis*, PtpA, une tyrosine phosphatase, inhibe la fusion phagosome-lysosome en phosphorylant la protéine vacuolaire VPS33B (*vacuolar protein sorting 33B*), qui est le régulateur de la fusion membranaire (Bach et al., 2008) et les VTPases (Wong et al., 2011). De plus, la protéine EIS (*enhanced intracellular survival*) de *M. tuberculosis* inhibe également l'autophagie en activant la voie AKT-mTOR via l'augmentation de l'IL-10 (Duan et al., 2016). Enfin, *M. tuberculosis* utilise l'effecteur SapM pour hydrolyser le PI3P phagosomal et lier Rab7 afin d'inhiber, respectivement, la maturation des phagosomes et des autophagosomes (**Tableau 5**) (Vergne et al., 2005; Hu et al., 2015).

### III.3.2.5 Inhibition de la voie de l'inflammation de l'hôte

De façon intrigante, certaines bactéries, dont *Salmonella*, *Shigella* et *Legionella*, ont développé des enzymes de type ligases E3 qui utilisent spécifiquement le système d'ubiquitine de l'hôte en leur faveur. Ceci est surprenant car ces pathogènes ne possèdent pas de gènes codant pour l'ubiquitine. Ces effecteurs interagissent avec les ligases E3 de l'hôte pour moduler leurs fonctions de différentes manières afin d'inhiber la signalisation de l'immunité innée. Par exemple, *Salmonella* module la signalisation de l'immunité innée en sécrétant la protéine effectrice SopA, une ligase E3 qui cible deux ligases E3 de l'hôte TRIM56 et TRIM65 (*tripartite motif*) impliquées dans l'expression de l'IFN- $\beta$  (Kamanova et al., 2016). SopA poly-ubiquitine TRIM56 et TRIM65 entraînant leur dégradation protéasomale et inhibant ainsi leur expression (Fiskin et al., 2017). De plus, une grande famille de protéines bactériennes effectrices sécrétées par un sous-ensemble de bactéries pathogènes a été décrite : les nouvelles ligases E3 (NEL, *novel E3 ligase*), qui ne partagent aucune homologie de structure avec un membre quelconque des familles des ligases eucaryotes. Par exemple, la NEL SspH1 sécrétée par *Sal-*

**TABLEAU 5 : Protéines effectrices sécrétées par les bactéries pour détourner ou échapper à la machinerie autophagique de l'hôte.**

(Suite du tableau page suivante) Adapté de (Sharma et al., 2018; Tripathi-Giesgen et al., 2021).

Pathogène	Effecteur	Mode d'action	Référence
<i>Salmonella</i> Typhimurium	SseL	Élimine les agrégats d'ubiquitine associés aux SCV, inhibant le recrutement de p62 et LC3	(Mesquita et al., 2012)
	SseG SseF	Interagit avec Rab1, bloquant le recrutement d'ULK1 et empêchant l'initiation de l'autophagie	(Feng et al., 2018)
	SopA	Ubiquitine les ligases E3 de l'hôte TRIM65 et TRIM56, bloquant l'expression d'IFN- $\gamma$ et de STING	(Fiskin et al., 2017)
	SspH1	Ubiquitine Parkin1, entraînant sa dégradation protéasomale et inhibant la voie NF- $\kappa$ B	(Haraga and Miller, 2003, 2006 ; Rohde et al., 2007)
	SspH2	Active la signalisation NOD1	(Bhavsar et al., 2013)
	SlrP	Ubiquitine la thiorédoxine de l'hôte, induisant la mort cellulaire de l'hôte	(Bernal-Bayard and Ramos-Morales, 2009)
<i>Listeria monocytogenes</i>	InlK	Cache la surface bactérienne en recrutant des MVP, empêchant l'ubiquitination	(Dortet et al., 2011)
	ActA	Recrute le complexe Arp2/3 et Ena/VASP pour masquer la surface bactérienne et éviter la reconnaissance par l'autophagie	(Yoshikawa et al., 2009)
	PlcA PlcB	Inhibe la maturation des pré-autophagosomes	(Mitchell et al., 2015)
<i>Legionella pneumophila</i>	RavZ	Déconjugue de façon irréversible la forme LC3-PE, empêchant l'adressage vers les autophagosomes + inhibe le recrutement de l'ubiquitine aux LCV	(Choy et al., 2012 ; Kubori et al., 2017)
	RavD	Hydrolyse spécifiquement les chaînes d'ubiquitine M1, inhibant l'activité de LUBAC et l'activation de NF- $\kappa$ B	(Wan et al., 2019)
	Effecteurs de la famille SidE	Ubiquitine de façon non canonique les LCV, empêchant la reconnaissance par p62	(Qiu et al., 2016 ; Omotade and Roy, 2020)
<i>Rickettsia parkeri</i>	OmpB	Agit comme un bouclier protecteur empêchant la reconnaissance par la machinerie autophagique	(Engstrom et al., 2019)
	PKMT1/2	Modifie la lysine des protéines de la membrane externe par des groupes méthyles, empêchant leur reconnaissance par la machinerie d'ubiquitine de l'hôte	(Engstrom et al., 2021)
	Pat1	Évite le recrutement de poly-ubiquitine, échappant à la reconnaissance de p62	(Borgo et al., 2022)

*monella* induit l'ubiquitination de PKN1 (*serine/threonine-protein kinase N1*) inhibant la réponse inflammatoire NF- $\kappa$ B de l'hôte (**Tableau 5**) (Haraga and Miller, 2003, 2006; Rohde et al., 2007).

Le complexe LUBAC (*linear ubiquitin assembly complex*), une ligase E3, est composé de trois sous-unités : HOIL-1L (*heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase 1L*), HOIP (*HOIL-1 interacting protein*) et SHARPIN (*shank-associated RH domain interacting protein*). Les NEL IpaH1.4 et IpaH2.5 sécrétées par *Shigella* interagissent directement avec HOIL-1L et fixent les chaînes d'ubiquitine K48 à HOIP, entraînant sa dégradation protéasomale et l'inhibition de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (de Jong et al., 2016). De plus, la NEL IpaH9.8 de *Shigella* supprime la voie MAPK en favorisant la dégradation de la protéine MAPKK (*mitogen-activated proteine kinase kinase*) (Rohde et al., 2007) et inhibe également la signalisation NF- $\kappa$ B en dégradant NEMO (Ashida et al., 2010). La NEL IpaH4.5 entraîne l'ubiquitination de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B, inhibant également l'activation de NF- $\kappa$ B induite par le TNF- $\alpha$  *in vitro* (Wang et al., 2013) et favorise la poly-ubiquitination K48 de TBK1, induisant sa dégradation protéasomale et l'inhibition de l'autophagie (**Tableau 5**) (Zheng et al., 2016).

Enfin, plus récemment, il a été montré que *Legionella pneumophila* sécrète l'effecteur RavD, une déubiquitinase qui clive exclusivement les chaînes d'ubiquitine M1 des vacuoles contenant des *Legionella* et supprime la signalisation NF- $\kappa$ B au cours de l'infection (**Tableau 5**) (Wan et al., 2019). RavD est actuellement la seule déubiquitinase bactérienne connue, car des effecteurs ayant une activité déubiquitinase provenant d'autres pathogènes intracellulaires pourraient passer inaperçus étant donné que les déubiquitinases bactériennes sont très divergentes des déubiquitinases eucaryotes (Hermanns and Hofmann, 2019).

### III.3.2.6 Modulation des miARN de l'hôte contrôlant l'autophagie

L'infection par des pathogènes intracellulaires peut modifier l'expression des miARN de l'hôte qui modulent l'expression des protéines de l'autophagie et interfèrent avec le bon déroulement de ce processus (**Figure 48**). Par exemple, *via* l'activation des voies ERK-MAPK et NF- $\kappa$ B, *M. tuberculosis* induit l'expression du miR-27a qui cible l'ARNm codant pour le transporteur d'ions Ca<sup>2+</sup> CACNA2D3 (*voltage-dependent calcium channel subunit  $\alpha$ -2/ $\delta$ -3*) situé sur le RE, ce qui diminue la signalisation Ca<sup>2+</sup>, inhibant ainsi la formation de l'autophagosome et favorisant la survie intracellulaire de *M. tuberculosis* (Liu et al., 2018b). Cette bactérie contrôle également l'initiation de l'autophagie *via* l'augmentation des miR-30a et miR-125a, qui inhibent respectivement, *BECN1* et *UVRAG* (*UV radiation resistance-associated gene protein*) (Chen et al., 2015; Kim et al., 2015). Au cours de l'infection par *M. tuberculosis*, l'augmentation du miR-144-5p réprime l'autophagie en inhibant *DRAM2* (*DNA damage regulated autophagy modulator 2*), une protéine de l'autophagie qui interagit avec *BECN1* et *UVRAG* pour activer le complexe Beclin 1 (Kim et al., 2017). Enfin, *M. tuberculosis* interfère avec l'autophagie de façon générale en induisant l'expression du miR-33, qui diminue l'expression de plusieurs protéines de l'autophagie (*ATG5*, *ATG12*, *MAP1LC3B*, *UVRAG* et *LAMP1*) et en ciblant l'ARNm

(Suite tableau 5)

Pathogène	Effecteur	Mode d'action	Référence
<i>Shigella flexneri</i>	IcsB	Se lie à VirG, ligand pour ATG5, inhibant l'adressage vers les phagophores + réprime le recrutement de LC3, NDP52 et p62 + se lie à VirA, favorisant l'échappement de <i>Shigella</i> des vacuoles LC3-positives	(Ogawa et al., 2005 ; Baxt and Goldber, 2014 ; Mostowy et al., 2011 ; Campbell-Valois et al., 2015)
	VirA	Inactive Rab1, inhibant la formation d'autophagosomes et la sécrétion d'IL-8 par les cellules infectées	(Dong et al., 2012)
	IpaH 1.4	Interagit avec HOIL-1L et fixe les chaînes d'ubiquitine K48 sur HOIP, déclenchant sa dégradation protéasomale et l'inhibition de la voie NF-κB	(de Jong et al., 2016)
	IpaH 2.5	Interagit avec HOIL-1L et fixe les chaînes d'ubiquitine K48 sur HOIP, déclenchant sa dégradation protéasomale et l'inhibition de la voie NF-κB	(de Jong et al., 2016)
	IpaH 4.5	Se lie à la sous-unité p65 de NF-κB, inhibant la voie NF-κB + favorise la dégradation de TBK1 par poly-ubiquitination K48, bloquant la réponse autophagique de l'hôte	(Wang et al., 2013 ; Zheng et al., 2016)
	IpaH 9.8	Favorise la dégradation de MAPKK, inhibant la voie MAPK + ubiquitine NEMO, entraînant sa dégradation protéasomale et inhibant la voie NF-κB	(Rohde et al., 2007 ; Ashida et al., 2010)
	IpaH 0722	Ubiquitine TRAF2, induisant sa dégradation protéasomale et inhibant l'activation de la voie NF-κB médiée par PKC	(Ashida et al., 2013)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	SapM	Hydrolyse le PI3P et se lie à Rab7, inhibant la maturation des phagosomes et des autophagosomes	(Vergne et al., 2005 ; Hu et al., 2015)
	PknG	Ubiquitine TRAF2 et TAB1, inhibant la signalisation NF-κB + bloque la fusion phagosome-lysosome	(Wang et al., 2021 ; Pradhan et al., 2018)
	Eis	Active la voie AKT-mTOR <i>via</i> l'activation de l'IL-10, inhibant l'autophagie	(Duan et al., 2016)
	PtpA	Phosphoryle les protéines VPS33B et V-ATPases, empêchant la fusion phagosome-lysosome	(Bach et al., 2008 ; Wong et al., 2011)
	PPM1A	Déphosphoryle directement p62, inhibant la xénophagie	(Berton et al., 2022)
	ESAT-6	Empêche le recrutement de Rab7 sur les autophagosomes, inhibant leur maturation	(Chandra et al., 2015)
GAS (Group A Streptococcus)	SpeB	Dégrade p62, NDP52 et NBR1 dans le cytosol de l'hôte, échappant à la xénophagie	(Barnett et al., 2013)

*PRKAA1* (*protein kinase amp-activated catalytic subunit  $\alpha 1$* ) qui code pour la sous-unité  $\alpha$  de l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) (Ouimet et al., 2016).

À l'inverse, l'infection par *Mycobacterium bovis* augmente le miR-17 afin de réprimer *ULK* (Duan et al., 2015) pour favoriser la survie des mycobactéries. *M. bovis* augmente le niveau du miR-20a inhibant *ATG7* et *ATG16L1*, nécessaires à la maturation de l'autophagosome (Guo et al., 2016). De même, l'augmentation du miR-144-3p au cours de l'infection par le BCG (Bacille de Calmette et Guérin) compromet la formation de l'autophagosome en réduisant le niveau d'*ATG4A* (Guo et al., 2017).

La fixation du miR-196 à *IRGM* est altérée par le polymorphisme C313T d'*IRGM* associé à la MC, entraînant une perte de régulation du gène *IRGM*, un défaut de l'autophagie ainsi qu'une augmentation de la réplication intracellulaire des bactéries AIEC. En effet, ce miR diminue l'expression d'*IRGM*, mais pas celle du variant à risque puisque le SNP est localisé dans la région de l'ARNm qui interagit avec le miR-196 (Brest et al., 2011). De plus, il a été montré que la souche AIEC LF82 réprime l'expression d'*ATG16L1* et réduit l'élimination des AIEC par l'autophagie en augmentant les niveaux des miR-106b et miR-93 dans de nombreuses lignées cellulaires humaines (Lu et al., 2014a).

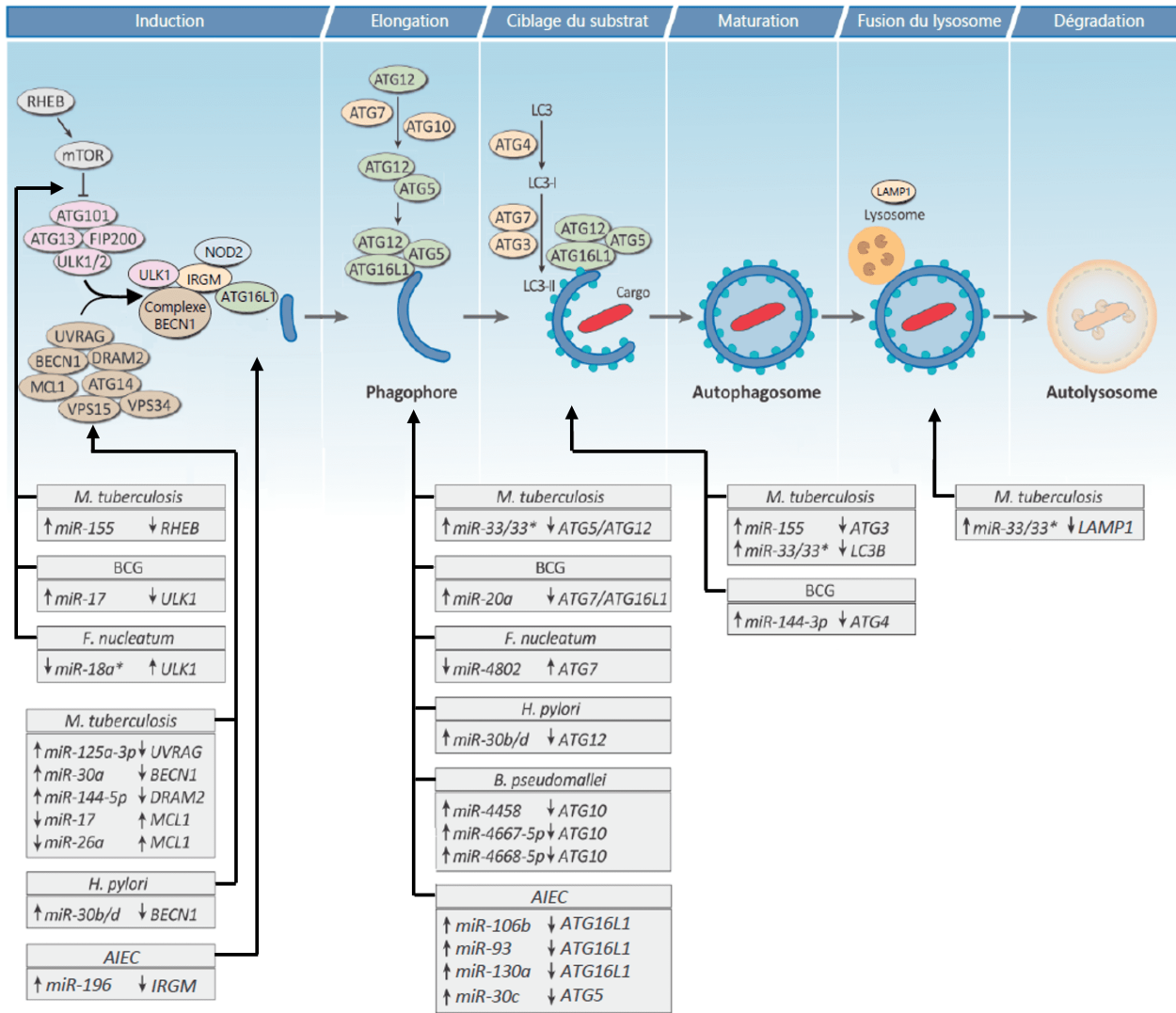
## III.4 Autophagie et AIEC

### III.4.1 Activation de l'autophagie dans les cellules hôtes infectées par les AIEC

L'autophagie est un mécanisme clé dans le contrôle de la réplication intracellulaire des AIEC. Il a été montré par notre équipe que l'infection par les AIEC entraîne l'activation de la voie de réponse au stress métabolique EIF2AK4-EIF2A-ATF4, induisant ainsi la transcription de plusieurs gènes de l'autophagie *via* le facteur de transcription ATF4 (*activating transcription factor 4*). Ceci résulte en une autophagie fonctionnelle nécessaire à la clairance bactérienne et au contrôle de la réponse immunitaire (Bretin et al., 2016). De plus, *in vivo*, les souris *eif2ak4<sup>-/-</sup>* infectées par les AIEC présentent un défaut de l'autophagie dans les CEI, entraînant ainsi une augmentation de la colonisation intestinale par les AIEC et une inflammation accrue, comparativement aux souris sauvages. Enfin, l'activation de la voie EIF2AK4-EIF2A-ATF4 est observée dans les biopsies iléales non enflammées de patients atteints de la MC, mais pas dans la zone enflammée. Cela suggère qu'un défaut d'activation de cette voie, qui est associé à un défaut du contrôle des AIEC par l'autophagie, pourrait être l'un des mécanismes contribuant au développement de la MC (Bretin et al., 2016, 2018).

Plus récemment, notre laboratoire a rapporté que la souche AIEC LF82 possède un îlot de pathogénicité similaire à celui de *Yersinia spp.*, qui code pour le sidérophore yersiniabactine nécessaire à l'absorption du fer et à la croissance de la bactérie dans un environnement pauvre en fer. Il a été constaté que la perte de yersiniabactine diminue la croissance de la souche AIEC LF82 dans un environnement compétitif, réduisant ainsi la capacité de la souche à adhérer et à envahir les CEI humaines et à coloniser le tractus intestinal des sou-





**FIGURE 48 : Modulation des miARN de l'hôte contrôlant la machinerie autophagique par les bactéries.** L'infection par différentes bactéries pathogènes mène à l'altération de l'expression de miARN régulant différentes étapes de l'autophagie. La modulation des miARN par les bactéries conduit principalement à l'inhibition de l'autophagie et donc l'amélioration de la survie du pathogène. Adaptée de (Lu et al., 2014a; Nguyen et al., 2014; Chauhan et al., 2015a; Aguilar et al., 2019).

ris CEABAC10. Toutefois, lors d'une infection par la souche AIEC LF82, une yersiniabactine fonctionnelle est nécessaire pour l'induction de l'expression de HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$* ), qui est impliquée dans l'activation de l'autophagie dans les cellules infectées. Ainsi, la yersiniabactine, qui constitue un avantage pour la croissance de la souche AIEC LF82 dans un environnement compétitif, pourrait être un inconvénient pour la bactérie car elle est nécessaire pour l'activation de l'autophagie, conduisant à son élimination (Dalmaso et al., 2021).

### III.4.2 Inhibition de l'autophagie dans les cellules hôtes infectées par les AIEC

Notre équipe a démontré *in vitro* et *in vivo* que l'infection par les AIEC diminue l'expression d'*ATG5* et d'*ATG16L1* en CEI *via* l'augmentation respective des niveaux des miR-30c et miR-130a. Cela inhibe l'autophagie, conduisant à une répllication intracellulaire anormale des AIEC ainsi qu'à une augmentation de l'inflammation. De plus, une corrélation inverse entre les niveaux des miR-30c et miR-130a et ceux des ARNm *ATG5* et *ATG16L1* a été observée dans la muqueuse iléale des patients atteints de la MC (Nguyen et al., 2014). Cette étude a également démontré que l'inhibition de ces deux miARN par des anti-miARN dans des CEI et dans les anses iléales de souris CEABAC10, permet de restaurer l'autophagie, inhibant ainsi la colonisation anormale des AIEC et l'inflammation intestinale (Nguyen et al., 2014). Plus récemment, nous avons montré que lors d'une infection par les AIEC, les miARN-30c et -130a peuvent être sécrétés et transférés d'une cellule donneuse à une cellule receveuse *via* des exosomes, qui sont de petites vésicules extracellulaires de 30 à 150 nm de diamètre. Ce transfert résulte en une inhibition de l'autophagie dans les cellules receveuses, favorisant ainsi la répllication intracellulaire des bactéries AIEC dans les cellules voisines (Larabi et al., 2020b).

Par ailleurs, il a été révélé que les bactéries AIEC peuvent également inhiber l'autophagie en altérant la SUMOylation de l'hôte, une modification post-traductionnelle eucaryote réversible, dans laquelle SUMO, un polypeptide de type ubiquitine, est lié de manière covalente à des protéines cibles. En effet, dans les CEI, la désSUMOylation induite par les AIEC est en partie due à l'augmentation du niveau du miR-18, qui inhibe l'expression de *PIAS3* (*protein inhibitor of activated STAT3*) impliquée dans la SUMOylation. De plus, la surexpression des polypeptides SUMO ou l'inhibition du miR-18 dans les CEI active l'autophagie, induisant une diminution de la répllication intracellulaire des AIEC (Dalmaso et al., 2019). Ensemble, ces résultats montrent que bien que l'autophagie soit induite dans les cellules hôtes pour éliminer les AIEC, ces bactéries peuvent détourner l'autophagie par différents mécanismes afin de se répliquer dans les cellules hôtes.

### III.5 Autophagie et maladie de Crohn

Au niveau génétique, l'implication de l'autophagie dans la pathogénèse de la MC a initialement été révélée par des GWAS (Rioux et al., 2007). Ces études pionnières ont montré une association entre l'augmentation de la susceptibilité à développer la MC et la présence de SNP dans les gènes de l'autophagie comme *ATG16L1*

**TABLEAU 6 : SNP des gènes impliqués dans l'autophagie retrouvés dans la maladie de Crohn.**

<b>Fonction</b>	<b>Gène</b>	<b>Identifiant du SNP</b>
<b>Initiation</b> (complexe ULK1/2)	ULK1	rs12303764; rs10902469; rs7488085
<b>Initiation</b> (complexe Beclin-1 et orthologues d'ATG9)	ATG2A	rs17146441
<b>Élongation</b> (système de conjugaison ATG12 et ATG8)	ATG16L1	rs2241880
	ATG4A	rs5973822
	ATG4D	rs7248036; rs2304165
	ATG5	rs510432; rs9373839
	IRGM	rs10065172; rs1000113; rs10065172; rs11747270; rs11749391; rs180802994; rs4958843; rs4958847; rs72553867; rs7714584, rs9637876
<b>Récepteurs de l'autophagie</b>	NDP52	rs2303015
<b>Régulateur du processus autophagique</b>	LRRK2	rs11175593; rs33995883; rs7308720; rs11564258; rs37618963; rs376186; rs3764147

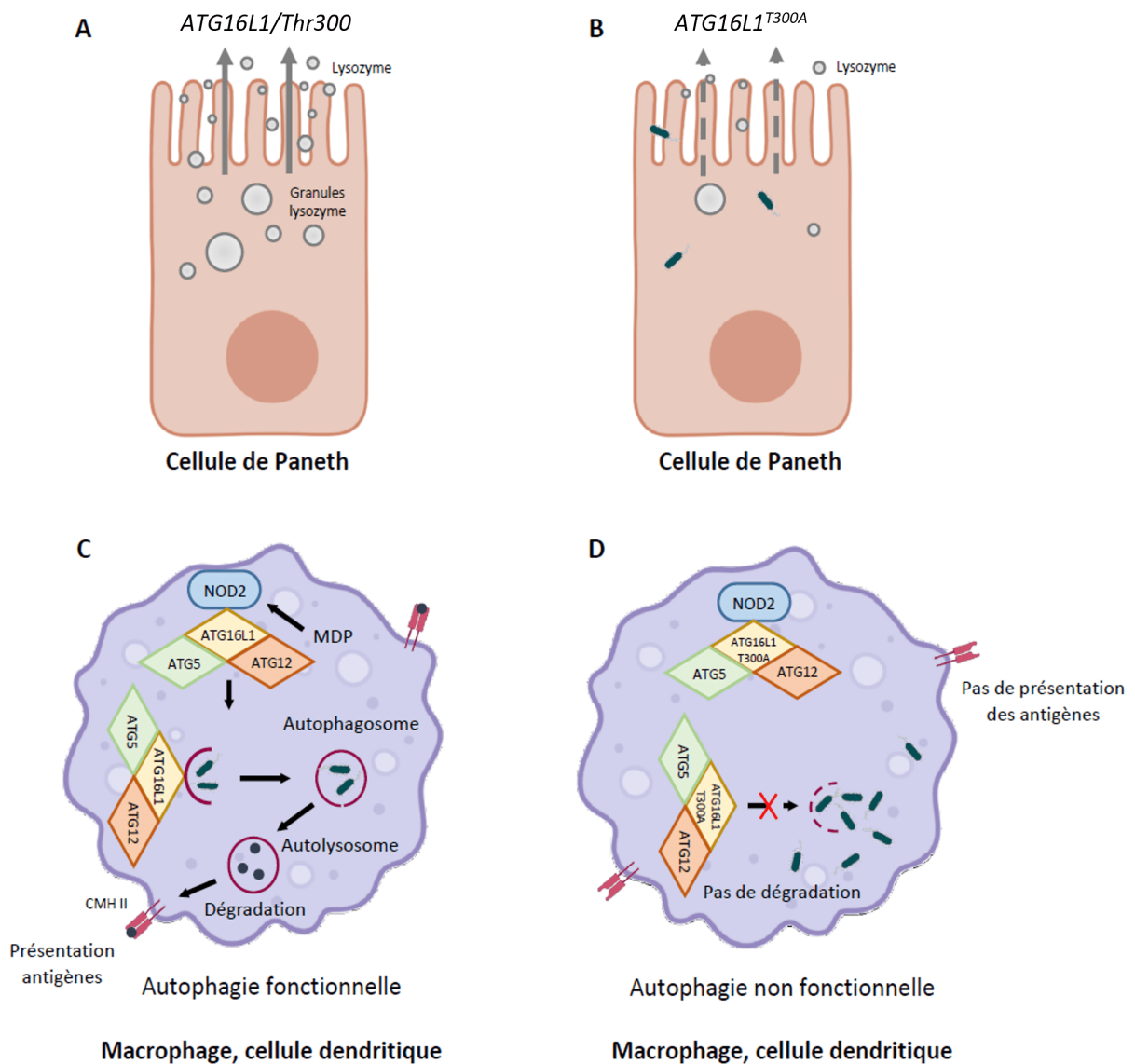
(Hampe et al., 2007) et *IRGM* (Parkes et al., 2007; McCarroll et al., 2008; Prescott et al., 2010) (**Tableau 6**). Ensuite, d'autres études GWAS ont mis en évidence d'autres gènes de susceptibilité à développer la MC qui codent pour des protéines impliquées dans l'initiation de l'autophagie comme ULK1 (Henckaerts et al., 2011), dans la reconnaissance bactérienne par l'autophagie telles que TLR4 (Oostenbrug et al., 2005) ou NDP52 (Ellinghaus et al., 2013), ou dans la régulation de l'activation de l'autophagie comme LRRK2 (Barrett et al., 2008), PTPN2 (Glas et al., 2012), et PTPN22 (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) (Diaz-Gallo et al., 2011). De plus, lors d'une xénophagie fonctionnelle, la découverte de l'interaction entre ATG16L1 et NOD2, le premier gène découvert de susceptibilité à développer la MC (Hugot et al., 2001), renforce le lien entre l'autophagie et la MC. Enfin, plusieurs études fonctionnelles ont ensuite élucidé les mécanismes moléculaires par lesquels un défaut de l'autophagie entraînerait une dysbiose intestinale, une perturbation de l'homéostasie intestinale, une anomalie de la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth, un stress du RE et une réponse immunitaire aberrante, qui sont des caractéristiques de la pathogenèse de la MC.

### III.5.1 SNP dans les gènes impliqués dans l'autophagie

#### III.5.1.1 *ATG16L1*

*ATG16L1* est une protéine cruciale du processus autophagique qui participe à l'élongation de la membrane de l'autophagosome avant la fusion de ce dernier avec un lysosome. Bien que neuf variants génétiques d'*ATG16L1* soient associés à la MC, le variant à risque rs2241880, identifié en 2007, est celui dont l'association à la MC est la plus forte (Hampe et al., 2007). Ce polymorphisme mène au remplacement d'une thréonine par une alanine (T300A) et son association avec la MC a été confirmée par de nombreuses études menées dans des populations européennes (Hampe et al., 2007; Prescott et al., 2007; Rioux et al., 2007; Lacher et al., 2009; Brest et al., 2010; Salem et al., 2015). Cette association a récemment été retrouvée dans les populations grecques, algériennes ou iraniennes, même si elle ne l'a pas été dans des populations brésiliennes, japonaises ou chinoises (Aida et al., 2018; Teimoori-Toolabi et al., 2018; Tsianos et al., 2020). Ces études ont également démontré qu'*ATG16L1* est plus particulièrement associé à la forme iléale de la MC, forme la plus courante de la MC pour laquelle il est observé une présence anormale d'*E. coli* associés à la muqueuse (Hoffmann et al., 2021).

Dans des cellules humaines exprimant le variant *ATG16L1*<sup>T300A</sup>, il a été constaté un défaut d'élimination par l'autophagie de bactéries telles que *S. Typhimurium* ou certaines souches d'*E. coli* associées à la MC (Kuballa et al., 2008; Lapaquette et al., 2010; Sadaghian Sadabad et al., 2015). En effet, il a été révélé qu'en réponse à un stress, le variant *ATG16L1*<sup>T300A</sup> est plus sensible à la dégradation dépendante de la caspase 3, comparativement à la forme sauvage d'*ATG16L1*, favorisant la progression de la maladie (Lassen et al., 2014; Murthy et al., 2014). Ce variant affecte également la capacité d'*ATG16L1* à interagir avec la protéine TMEM59 (*transmembrane protein 59*), qui permet d'activer *ATG16L1* et l'autophagie en réponse à l'infection (Boada-Romero et al., 2016). Par ailleurs, dans les cellules myéloïdes issues d'un modèle de souris exprimant ce va-



**FIGURE 49 : Impact du variant *ATG16L1*<sup>T300A</sup> sur l'autophagie et la présentation antigénique dans les cellules de Paneth, les cellules dendritiques et les macrophages.**

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

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

riant, il a également été rapporté une altération de la morphologie des cellules caliciformes ainsi qu'une augmentation de la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  et de la charge bactérienne (Lassen et al., 2014; Liu et al., 2021a). D'autres travaux ont révélé des altérations de la structure des cellules de Paneth issues de patients homozygotes pour le variant *ATG16L1*<sup>T300A</sup> ou de souris exprimant le variant à risque (**Figure 49 A-B**) (Cadwell et al., 2008; Lassen et al., 2014). Une persistance accrue des *E. coli* associés à la MC a aussi été décrite chez les patients porteurs du polymorphisme et présentant des altérations des cellules de Paneth (Deuring et al., 2014). Par ailleurs, les souris exprimant le variant *ATG16L1*<sup>T300A</sup> présentent un microbiote altéré dans l'iléon terminal et le côlon, avec une augmentation significative de l'abondance de *Tyzzarella*, *Mucispirillum*, *Ruminococcaceae* et *Cyanobacteria*, connues pour être associées aux MICI, par rapport aux souris sauvages cohabitant avec elles. Ces résultats indiquent que l'altération du microbiote chez les porteurs du variant *ATG16L1*<sup>T300A</sup> pourrait être un facteur important contribuant au développement de la MC (Liu et al., 2021a).

Enfin, il existe un lien entre *ATG16L1* et *NOD2*. En effet, *NOD2* permet le recrutement d'*ATG16L1* au niveau du site d'entrée des bactéries, ce qui induit l'activation de l'autophagie et l'élimination des bactéries intracellulaires. En revanche, ces effets sont perdus lorsque *ATG16L1* et/ou *NOD2* sont mutés (**Figure 49 C-D**) (Homer et al., 2010; Travassos et al., 2010). Dans des cellules dendritiques exprimant le variant *NOD2*<sup>L1007fsinsC</sup> ou *ATG16L1*<sup>T300A</sup>, une étude a montré un défaut de l'activation de l'autophagie, n'assurant plus l'élimination des bactéries ainsi que la présentation des antigènes par le CMH-II (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) (Cooney et al., 2010).

### III.5.1.2 IRGM

*IRGM* joue un rôle essentiel dans la formation et l'activation du complexe d'initiation de l'autophagie en réponse à des pathogènes intracellulaires. En effet, *IRGM* interagit physiquement avec *NOD2* et *ATG16L1* pour permettre la modulation du processus autophagique (Brest et al., 2011; Chauhan et al., 2015a,b). Après sa poly-ubiquitination favorisée par *NOD2*, *IRGM* contrôle l'initiation de l'autophagie en formant un complexe avec *ULK1* et *BECLIN 1* (Chauhan et al., 2015b), ce qui est crucial pour les propriétés anti-microbiennes et anti-inflammatoires de l'autophagie (Chauhan et al., 2015a).

*IRGM* est le deuxième gène impliqué dans l'autophagie à avoir été associé à la MC (Burton et al., 2007; Parkes et al., 2007). De la même manière qu'*ATG16L1*, les polymorphismes dans le gène *IRGM* semblent plus spécifiquement associés à la MC iléale et ont été retrouvés dans des cohortes indépendantes de Nouvelle-Zélande, d'Amérique du Nord, de Corée et d'Europe (Parkes et al., 2007; Roberts et al., 2008; Palomino-Morales et al., 2009; Brest et al., 2010; Moon et al., 2013). Une étude clinique incluant 263 patients atteints de la MC et 245 sujets sains a mis en évidence que le SNP rs13361189 est associé à un risque accru d'avoir une MC avec une atteinte iléale ou périanales, d'avoir un phénotype sténosant ou de subir une intervention chirurgi-



cale (Rufini et al., 2015). Récemment, il a été rapporté que les patients porteurs de ce polymorphisme présentent une expression réduite d'*IRGM* dans le sang et dans l'iléon terminal, et que cette diminution d'expression est associée à une altération de l'expression de gènes liés à l'autophagie ou à la colite (Ajayi et al., 2019). Enfin, deux autres polymorphismes d'*IRGM* sont fortement associés à un risque élevé de développer la MC : l'un est un SNP synonyme dans la région codante (c.313T) (rs10065172) et l'autre correspond à une délétion de 20 paires de bases dans le promoteur du gène *IRGM*, qui affecterait le niveau d'expression d'*IRGM* (Parkes et al., 2007; McCarroll et al., 2008; Prescott et al., 2010; Lu et al., 2014b).

En outre, le rôle anti-inflammatoire d'*IRGM* a été démontré dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. En effet, *IRGM* réduit l'activation de l'inflammasome NLRP3 (*NOD-like receptor family pyrin domain containing 3*) en le ciblant pour sa dégradation par l'autophagie, protégeant ainsi de la mort cellulaire induite par l'inflammation et de la colite induite au DSS (Mehto et al., 2019a). D'autres travaux utilisant des modèles de souris déficientes pour *Irgm* ont montré que *IRGM* est impliqué dans l'élimination de bactéries intracellulaires telles que *L. monocytogenes*, *Salmonella* ou *M. tuberculosis* (Kim et al., 2019). De plus, le laboratoire a montré un rôle crucial d'*IRGM* dans l'élimination des bactéries AIEC dans des CEI (Lapaquette et al., 2010; Brest et al., 2011) et macrophages (Lapaquette et al., 2012).

### III.5.1.3 *ULK1*

*ULK1* est une protéine kinase sérine/thréonine qui intervient de façon précoce dans le processus autophagique, en contrôlant l'initiation et la formation du phagophore et de l'autophagosome. *ULK1* forme un complexe avec *ATG13*, *ATG101* et *FIP200* qui, après induction de l'autophagie, va transloquer au niveau des sites d'initiation et réguler le recrutement du complexe protéique suivant, le *VPS34* (Zachari and Ganley, 2017). Sur des modèles de cellules en culture, il a été montré que *ULK1* phosphoryle *ATG16L1*, ce qui est nécessaire pour l'induction de la xénophagie et l'élimination de *Salmonella* (Alsaadi et al., 2019).

Dans ce contexte, un SNP du gène *ULK1* (rs12303764) est associé à la MC en population caucasienne. Toutefois, cette étude n'a pas constaté d'association significative entre le génotype et le phénotype de la maladie (Henckaerts et al., 2011). Deux autres SNP du gène *ULK1* (rs10902469 et rs7488085) ont révélé une association significative avec le risque de développer la MC dans une population néo-zélandaise. Les analyses phénotypiques ont démontré un lien entre l'âge au diagnostic et le phénotype inflammatoire de la MC (Morgan et al., 2012). Contrairement à ces données, une étude coréenne n'a pas mis en évidence d'association entre les trois SNP testés du gène *ULK1* et le risque de développer la MC dans une cohorte pédiatrique (Na et al., 2015). À ce jour, la conséquence des SNP *ULK1* sur la fonction de la protéine ainsi que dans l'étiologie de la MC n'est pas encore connue et nécessite de plus amples recherches.



### III.5.1.4 *LRRK2*

Identifiée en 2004, *LRRK2* est une protéine sérine/thréonine possédant quatre domaines d'interaction protéine-protéine et deux domaines distincts d'activité enzymatique. Bien qu'elle soit impliquée dans diverses pathologies telles que la maladie de Parkinson, la MC, la maladie de Hansen et certains cancers, sa fonction reste très peu décrite (Berwick et al., 2019). *LRRK2* semble intervenir dans différents processus biologiques cellulaires incluant l'autophagie, l'inflammation, la régulation de la réponse immunitaire, l'endocytose, la synthèse des protéines ou encore l'homéostasie du cytosquelette (Wallings et al., 2015; Hui et al., 2018).

Plusieurs polymorphismes du gène *LRRK2* ont été associés à un risque élevé de développer la MC (Umeno et al., 2011; Hoefkens et al., 2013; Hui et al., 2018). Une étude a montré une association entre un variant du gène *LRRK2* (N2081D), l'âge au diagnostic et la localisation de la maladie. Certains variants ont également été associés au risque de développer la maladie de Parkinson, suggérant une voie commune de signalisation dépendant de *LRRK2* affectée entre les deux pathologies (Hui et al., 2018). Par ailleurs, des travaux récents ont démontré une augmentation de l'expression de *LRRK2* conduisant à une réponse inflammatoire excessive dans un modèle murin de colite induite au DSS et dans des cellules dendritiques de patients atteints de la MC porteurs du variant rs11564258. Les auteurs ont également constaté une inhibition de l'autophagie par *LRRK2* via son interaction avec *BECN1* (Takagawa et al., 2018). Enfin, plus récemment une étude a suggéré qu'un polymorphisme de *LRRK2* (M2397T) altère la réponse immunitaire innée des monocytes CD14<sup>+</sup> dans la MC en entraînant l'expression des gènes pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-12 après une stimulation par de l'IFN- $\gamma$  (Ikezu et al., 2020).

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

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

L'autophagie contrôle la fonction barrière de l'épithélium en induisant la dégradation de la protéine Claudine 2, diminuant ainsi la perméabilité intestinale (Nighot et al., 2015). L'inhibition de la dégradation de Claudine 2 par l'autophagie entraîne des défauts de jonctions serrées et une augmentation de niveau de Claudine 2 dans la monocouche de CEI Caco-2 traitée avec du TNF- $\alpha$  (Zhang et al., 2017a). Par ailleurs, en présence du polymorphisme *ATG16LI*<sup>T300A</sup>, la morphologie des cellules caliciformes est altérée, induisant un défaut de sécrétion de mucus. Cela indique que l'autophagie module le développement des cellules caliciformes qui participent à la fonction barrière de l'épithélium via la sécrétion de mucines (Lassen et al., 2014).

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

La mort cellulaire induite à la suite d'un stress prolongé au niveau de l'épithélium intestinal peut être régulée par l'autophagie. En effet, cela entraîne la phosphorylation constitutive d'eIF2 $\alpha$ , ce qui induit la voie eIF2 $\alpha$ /ATF4 ainsi qu'une surexpression d'*IRGM* régulant l'autophagie, induisant une mort cellulaire par né-

crose (Roy et al., 2018) et conduisant au développement d'une iléite semblable à la MC dans un modèle murin. L'augmentation de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , de l'expression d'*IRGM* et de la mort cellulaire par nécrose, est également observée chez les patients atteints de la MC (Roy et al., 2018).

De plus, l'autophagie peut également moduler la mort cellulaire programmée induite par les cytokines pour limiter l'inflammation au niveau de l'épithélium intestinal (Matsuzawa-Ishimoto et al., 2017; Pott et al., 2018). Dans un modèle de souris déficientes pour *Atg16l1* spécifiquement au niveau des cellules épithéliales intestinales (*Atg16l1* <sup>$\Delta$ CEI</sup>) et présentant une colite chronique expérimentale, il a été montré que l'autophagie maintient l'intégrité de la barrière intestinale en protégeant les CEI de l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  (Matsuzawa-Ishimoto et al., 2017; Pott et al., 2018). En réponse au TNF- $\alpha$ , la viabilité des organoïdes intestinaux murins exprimant le variant à risque *ATG16L1*<sup>T300A</sup> est diminuée, comparativement à ceux exprimant l'allèle *ATG16L1* sauvage (Matsuzawa-Ishimoto et al., 2017). Par conséquent, dans le cadre des MICI, ces résultats suggèrent qu'une autophagie fonctionnelle est nécessaire pour une réponse optimale au traitement par les anti-TNF- $\alpha$ .

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

L'autophagie joue un rôle primordial dans le développement, la maintenance et le fonctionnement des cellules de Paneth, qui produisent principalement des peptides anti-microbiens. D'une part, chez des souris déficientes pour *Atg5* (Cadwell et al., 2008) ou *Atg7* (Wittkopf et al., 2012) spécifiquement dans les CEI ou totalement déficientes pour *Atg4b* (Cabrera et al., 2013) ou *Irgm* (Liu et al., 2013), des défauts de morphologie et du nombre de cellules de Paneth ainsi que de la structure des granules contenant les peptides anti-microbiens ont été observés. De même, chez des souris hypomorphes pour *Atg16l1* (*Atg16l1*<sup>HM</sup>), c'est-à-dire présentant un défaut d'expression d'*Atg16l1*, élevées de manière conventionnelle ainsi que chez des souris *Atg16l1*<sup>HM</sup> exemptes de pathogènes spécifiques et infectées par un norovirus entérique, une structure irrégulière des granules et une diminution de la sécrétion de peptides anti-microbiens ont été constatés. Ces effets sont similaires à ce qui est observé chez les patients atteints de la MC et homozygotes pour le variant *ATG16L1*<sup>T300A</sup> (Cadwell et al., 2008, 2010).

D'autre part, lors de l'infection par des pathogènes intracellulaires, l'autophagie joue un rôle dans le maintien de la sécrétion du lysozyme par les cellules de Paneth à travers des vésicules de sécrétion (Bel et al., 2017). En effet, l'activation de NOD2 par le MDP (Zhang et al., 2015) entraîne le recrutement de NOD2, LRRK2, RIPK2 (*receptor-interacting protein kinase 2*) et RAB2A (*Ras-related protein Rab-2A*), qui sont nécessaires pour séquestrer le lysozyme à l'intérieur des vésicules de sécrétion (Zhang et al., 2015; Wang et al., 2017). Les polymorphismes de *NOD2* ou *LRRK2* associés à la MC engendrent un dysfonctionnement de ces protéines et la dégradation de lysozyme par le lysosome (Zhang et al., 2015; Wang et al., 2017). De même, le variant *NOD2*<sup>L1007fsinsC</sup> associé à la MC est incapable de détecter le MDP bactérien, résultant en un défaut de la sécrétion de peptides anti-microbiens (Cadwell et al., 2008; Iida et al., 2018). De plus, les cellules de Paneth

sont capables de contourner la voie de sécrétion RE-Golgi et rediriger le lysozyme vers une voie de sécrétion alternative basée sur l'autophagie, pour contrer les dommages à l'appareil de Golgi engendrés par une infection à *S. Typhimurium* (Bel et al., 2017). En réponse à l'infection par des bactéries intracellulaires, le variant à risque *ATG16L1<sup>T300A</sup>* entraîne une perturbation de la voie de sécrétion RE-Golgi ainsi que de l'autophagie sécrétoire dans les cellules de Paneth (Bel et al., 2017). L'utilisation de souris *Atg16l1<sup>ΔCEI</sup>* et d'un modèle murin de MICI induites par un virus a démontré que l'autophagie est essentielle pour prévenir la perte des cellules de Paneth, contribuant ainsi au maintien de la barrière intestinale (Matsuzawa-Ishimoto et al., 2017).

Enfin, la protéine IRGM (IRGM1 chez la souris) joue un rôle essentiel dans la fonction et la morphologie des cellules de Paneth. En effet, chez les souris *irgm<sup>-/-</sup>* conventionnelles, des altérations importantes des cellules de Paneth ont été constatées telles qu'un développement anormal des granules de sécrétion, une diminution de l'expression de certains peptides anti-microbiens et une augmentation de la susceptibilité à la colite induite au DSS (Liu et al., 2013). Toutes ces altérations ont été très peu retrouvées chez des souris *irgm<sup>-/-</sup>* exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (Rogala et al., 2018). Par conséquent, ces études montrent que la susceptibilité génétique des cellules de Paneth peut être fortement impactée par l'environnement, en particulier par une infection bactérienne.

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

Un défaut de l'autophagie a été associé à une dysbiose intestinale, indiquant que l'autophagie est impliquée dans le contrôle de la composition du microbiote intestinal. En effet, une altération de la composition du microbiote fécal associée à une augmentation du nombre de bactéries totales et un enrichissement en *Clostridioides leptum* et *Bacteroides fragilis* ont été observés chez des souris délétées pour *Atg7* spécifiquement dans les cellules épithéliales du côlon par rapport aux souris contrôles sauvages (Tsuboi et al., 2015). De même, comparativement aux souris contrôles sauvages, la composition du microbiote intestinal des souris *Atg5<sup>ΔCEI</sup>* est altérée de façon similaire à ce qui est rapporté chez les patients atteints de la MC. Les souris *Atg5<sup>ΔCEI</sup>* présentent une diminution de la diversité microbienne, une diminution du nombre de bactéries impliquées dans le contrôle des réponses inflammatoires, telles que celles des familles *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae*, ainsi qu'une augmentation des bactéries pro-inflammatoires telles que celles de la famille *Pasteurellaceae*, comme observé chez les patients atteints de la MC (Yang et al., 2018). Les souris *Atg5<sup>ΔCEI</sup>* présentent également un appauvrissement d'*Akkermansia muciniphila*, comme constaté dans les MICI, et une augmentation de *Candidatus Athromitus*, une bactérie capable d'induire la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves en Th17 et Th1 (Yang et al., 2018). De façon similaire, à l'état basal, un changement de la composition du microbiote fécal a été constaté chez les souris knock-in exprimant le variant à risque *ATG16L1<sup>T300A</sup>* avec une augmentation des *Bacteroidales*, comparativement aux souris sauvages (Lavoie et al., 2019). Lors d'une colite induite au DSS, une réduction du phylum Firmicutes et un enrichissement des phyla Proteobacteria, Cyanobacteria et Bacteroidetes

ont été observés chez les souris exprimant *ATG16L1*<sup>T300A</sup> (Lavoie et al., 2019). De façon intéressante, les souris exprimant *ATG16L1*<sup>T300A</sup> gnotobiotiques qui ont reçues des selles de patients atteints de la MC active, présentent une composition du microbiote différente des souris contrôles, avec une augmentation de l'abondance des *Bacteroides*, ce qui n'est pas constaté chez les souris ayant reçu des selles de patients atteints de RCH (Lavoie et al., 2019). Enfin, comparativement aux patients homozygotes pour l'allèle *ATG16L1* sauvage, les patients atteints de la MC homozygotes pour le variant à risque *ATG16L1*<sup>T300A</sup> présentent une abondance plus forte des groupes bactériens pathosymbiotiques tels que les *Enterobacteriaceae* (principalement *E. coli*), *Bacteroidaceae* (principalement *Bacteroides fragilis*) et *Fusobacteriaceae* au niveau de l'iléon inflammé (Sadaghian Sadabad et al., 2015). De façon plus surprenante, les variants touchant les gènes *NOD2*, *ATG16L1* et *IRGM* associés aux MICI peuvent également affecter la composition du microbiote fécal des individus sains, caractérisée par une diminution de *Roseburia spp.*, une bactérie productrice de butyrate, un AGCC aux propriétés anti-inflammatoires (Imhann et al., 2018). En conclusion, le dérèglement des réponses immunitaires avant l'apparition des symptômes de la MC et la dysbiose du microbiote intestinal sont impactés par l'absence ou le dysfonctionnement de gènes impliqués dans l'autophagie. Cependant, le mécanisme par lequel certains SNP dans les gènes de l'autophagie influence la composition ou la fonction du microbiote intestinal n'est pas encore bien déterminé et nécessite des recherches plus approfondies.

### III.5.4 Autophagie et stress du réticulum endoplasmique

L'autophagie peut être activée par un stress prolongé du RE. En effet, libérés par le RE en réponse à un stress prolongé, les ions calciques activent l'AMPK bloquant mTOR pour induire l'autophagie (Høyer-Hansen et al., 2007). De plus, en condition de stress du RE, l'activation de la voie IRE1 $\alpha$  (*inositol requiring enzyme 1* $\alpha$ )-XBP1 (*X-box binding protein 1*) entraîne la conversion de la forme LC3-I en LC3-II et la formation de l'autophagosome (Ogata et al., 2006). Dans un modèle murin de colite induite au DSS, l'inhibition pharmacologique ou génétique de TREM1 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 1*), connu pour amplifier l'inflammation dans de nombreuses pathologies, active l'autophagie *via* la dérégulation de mTOR, favorisant la réponse aux protéines mal repliées pour réduire le stress du RE et diminuer l'inflammation du côlon et la sévérité de la colite (Kökten et al., 2018). Ainsi, lorsque l'autophagie est dysfonctionnelle dans les CEI murines, une augmentation du stress du RE est délétère (Tschurtschenthaler et al., 2017). Par ailleurs, une étude a rapporté une corrélation entre la présence du variant *ATG16L1*<sup>T300A</sup>, le stress du RE dans les cellules de Paneth et l'augmentation de la colonisation par les AIEC chez les patients atteints de la MC (Deuring et al., 2014). En effet, lors d'un stress du RE dans les cellules de Paneth, l'élimination des agrégats IRE1 $\alpha$  est défectueuse chez les souris *Atg16l1* <sup>$\Delta$ CEI</sup> qui développent spontanément une iléite transmurale similaire à la MC. Dans les cryptes intestinales de sujets sains et de patients atteints de la MC homozygotes pour le variant *ATG16L1*<sup>T300A</sup>, l'accumulation d'IRE1 $\alpha$  a également été observée (Tschurtschenthaler et al., 2017). Ces résultats ont été confirmés sur un modèle murin. Des souris déficientes pour *Atg16l1* ou *Xbp1* spécifiquement dans les CEI (*Atg16l1* <sup>$\Delta$ CEI</sup>

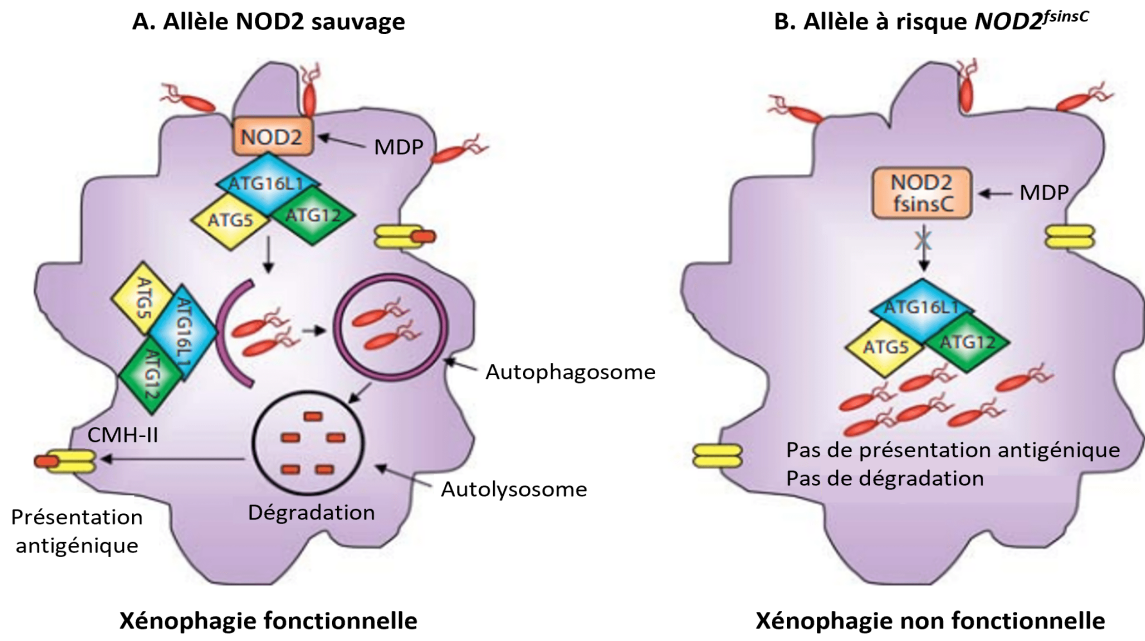
ou *Xbp1<sup>ACE1</sup>*) ou déficientes pour les deux gènes présentent une forte accumulation et hyperactivation d'IRE1 $\alpha$  (Adolph et al., 2013), qui peut s'expliquer par un défaut de sa dégradation par l'autophagie (Tschurtschenthaler et al., 2017).

### III.5.5 Autophagie et immunité innée

L'autophagie joue un rôle essentiel dans la modulation de l'activation de l'inflammasome en diminuant la sécrétion des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18 (Saitoh et al., 2008). En effet, un défaut de dégradation des inflammasomes assemblés ou des composants de la voie de l'inflammasome, tels que NLRP3 par l'autophagie, est à l'origine d'une activation anormale de l'inflammasome (Shi et al., 2012), conduisant à une augmentation de la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 (Takahama et al., 2018). Ces résultats ont été confirmés dans un modèle de souris déficientes pour *Atg1611* spécifiquement dans les cellules de la lignée myéloïde après stimulation par une endotoxine bactérienne. Ces souris présentent également une plus grande susceptibilité au développement d'une colite induite au DSS (Saitoh et al., 2008). Les souris exprimant le variant *ATG16LI<sup>T300A</sup>* et les souris délétées pour *Atg5* spécifiquement dans les macrophages présentent aussi une augmentation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  médiée par l'activation de l'inflammasome, par rapport à leurs contrôles respectifs, conduisant à une sévérité accrue de l'uvéite induite par une endotoxine, une pathologie oculaire fréquemment développée par les patients atteints de la MC (Santeford et al., 2016).

De plus, les gènes de susceptibilité à développer la MC *PTPN2* et *PTPN22* ont été impliqués dans la régulation de l'autophagie et de l'activité de l'inflammasome (Spalinger et al., 2017, 2018). *PTPN22* déphosphoryle l'inflammasome NLRP3 afin de limiter la séquestration de NLRP3 dans les autophagosomes et leur dégradation par les autolysosomes (Spalinger et al., 2017). Dans les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris et les macrophages humains, la perte de *PTPN22* induit une augmentation de la phosphorylation et de la dégradation de NLRP3, diminuant ainsi la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Spalinger et al., 2017). Ensuite, il a été montré que *PTPN2* est impliqué dans la régulation de l'autophagie, l'activation de l'inflammasome et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  en limitant la phosphorylation d'ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), qui est nécessaire à l'assemblage de l'inflammasome. Un variant associé à une perte de fonction de *PTPN2* a été rapporté comme un facteur de risque de la MC, alors qu'un variant associé à un gain de fonction de *PTPN2* a été rapporté comme un facteur protecteur contre la MC (Pike and Tremblay, 2018). En modèle murin, la perte de *Ptpn2* dans les cellules myéloïdes accroît légèrement la susceptibilité à la colite induite au DSS en raison d'une augmentation de l'assemblage de l'inflammasome et de la production d'IL-1 $\beta$  (Spalinger et al., 2018).

Enfin, IRGM/IRGM1 est directement impliqué dans la suppression de l'inflammation *via* l'inhibition de l'activation de l'inflammasome NLRP3. D'une part, IRGM/IRGM1 prévient l'assemblage de NLRP3 et d'autre part, favorise la dégradation des composants de NLRP3 par l'autophagie sélective médiée par p62, limitant ainsi la mort cellulaire induite par l'inflammation et supprimant la colite induite au DSS (Mehto et al., 2019a,b).



**FIGURE 50 : Impact du variant à risque *NOD2<sup>L1007fsinsC</sup>* dans la clairance des bactéries intracellulaires médiée par la xénophagie et dans la présentation antigénique.**

(A) Dans le cas d'une xénophagie fonctionnelle dans les macrophages porteurs de l'allèle *NOD2* sauvage, NOD2 est activé par le MDP (*muramyl dipeptide*) en réponse à une invasion bactérienne. Une fois activé, NOD2 recrute et interagit avec ATG16L1 sur les sites d'entrées des bactéries dans la membrane plasmique, activant la xénophagie et induisant ainsi l'élimination des bactéries intracellulaires et la présentation d'antigènes par le CMH de classe II (complexe majeur d'histocompatibilité). (B) Dans le cas d'une xénophagie non fonctionnelle dans les macrophages porteurs du variant à risque *NOD2<sup>L1007fsinsC</sup>*, NOD ne parvient pas à recruter ATG16L1 ou à induire la xénophagie en réponse à une invasion bactérienne. Par conséquent, la dégradation intracellulaire des bactéries et la présentation d'antigènes par le CMH de classe II sont défectueuses. Adaptée de (Nguyen et al., 2013).



## III.5.6 Autophagie et immunité adaptative

### III.5.6.1 Autophagie et présentation antigénique

Comme démontré dans un modèle de souris déficientes pour *Atg5* spécifiquement dans les cellules dendritiques, un défaut de l'autophagie interfère avec la présentation des antigènes aux lymphocytes *via* le CMH-II par les cellules dendritiques (Lee et al., 2010). En effet, l'autophagie médiée par NOD2 dans les cellules dendritiques est nécessaire à l'élimination des AIEC intracellulaires et à la mise en place de la réponse des cellules T CD4+ spécifiques des antigènes présentés par le CMH-II (Cooney et al., 2010). La présentation antigénique *via* le CMH-II par les cellules dendritiques est défectueuse chez les patients atteints de la MC porteurs d'un allèle à risque *NOD2*<sup>L1007fsinsC</sup> ou *ATG16LI*<sup>T300A</sup> (**Figure 50**) (Cooney et al., 2010). De plus, l'autophagie déstabilise le site de contact entre les cellules T et les cellules dendritiques, ce qui module négativement les réponses immunitaires adaptatives. Chez les patients atteints de la MC porteurs de l'allèle *ATG16LI*<sup>T300A</sup> et les souris déficientes pour *Atg16l1* ou *Irgm1* spécifiquement dans les cellules dendritiques, une interaction hyperstable entre les cellules T et les cellules dendritiques ainsi qu'une augmentation de l'activation des cellules T et d'une réponse Th17 ont été constatées (Wildenberg et al., 2012). Par conséquent, les polymorphismes dans les gènes de l'autophagie associés à la MC peuvent favoriser le développement de la maladie en entraînant une dérégulation de la présentation antigénique par les cellules dendritiques *via* le CMH-II.

### III.5.6.2 Autophagie et activation des cellules T

L'autophagie joue un rôle crucial dans l'homéostasie des cellules T, en contribuant à la survie des cellules T CD8+ et à la mise en place des cellules T mémoire (Xu et al., 2014). En effet, l'inhibition de l'autophagie spécifiquement dans les cellules T de souris engendre une diminution du nombre de cellules T CD4+ et CD8+ ainsi qu'une altération de la prolifération des cellules T (Kabat et al., 2016). De plus, l'autophagie est essentielle au maintien de l'homéostasie des cellules T, en favorisant la survie des lymphocytes Treg et en limitant l'expansion des lymphocytes Th2 pro-inflammatoires. L'inhibition de l'autophagie spécifiquement dans les cellules T de souris modifie la balance entre les différents types de lymphocytes Th dans l'intestin (Kabat et al., 2016). Les cellules Th jouent un rôle critique dans les réponses immunitaires intestinales et leur nombre et leur comportement varient au cours de l'évolution des MICI (Geremia et al., 2014). Les souris déficientes pour *Atg16l1* spécifiquement dans les cellules T CD4+ développent de façon spontanée une inflammation intestinale caractérisée par une réponse Th2 contre les antigènes alimentaires et microbiens, ainsi que par une perte des Treg (Kabat et al., 2016). De façon intéressante, les souris gnotobiotiques exprimant le variant *ATG16LI*<sup>T300A</sup> qui ont reçu des selles de patients atteints de la MC active, présentent une augmentation des réponses Th1 et Th17 au niveau de l'intestin, ce qui n'est pas constaté chez les souris ayant reçu des selles de patients atteints de RCH (Lavoie et al., 2019). Enfin, l'autophagie est également nécessaire dans la reconnaissance des signaux protecteurs dérivés du microbiote intestinal pour initier une réponse immunitaire efficace et inhiber l'inflamma-



tion intestinale (Chu et al., 2016). En effet, le polysaccharide A (PSA), sécrété par la bactérie commensale *B. fragilis* dans ses OMV, est une molécule immunomodulatrice reconnue par les cellules dendritiques *via* le TLR2. Cette interaction provoque la conversion des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves en cellules Treg FOXP3<sup>+</sup> produisant de l'IL-10, et protège les souris d'une colite induite expérimentalement (Shen et al., 2012). Ainsi, il a été démontré que l'administration orale d'OMV protège les souris sauvages de l'induction d'une colite expérimentale. En revanche, les souris déficientes pour *Atg16l1* spécifiquement dans les cellules dendritiques CD11<sup>+</sup> présentent une diminution de la production d'IL-10 par les cellules Treg CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup>, une perte de poids ainsi qu'une mortalité élevée de manière similaire à ce qui est observé chez les souris n'ayant pas reçu les OMV (Chu et al., 2016). Enfin, les cellules dendritiques dérivées des monocytes de patients atteints de la MC ou de sujets sains homozygotes pour le variant *ATG16L1*<sup>T300A</sup> stimulées avec les OMV de *B. fragilis* et co-cultivées avec les cellules T CD4<sup>+</sup> ne sont pas capables d'induire la production d'IL-10 par les cellules Treg FOXP3<sup>+</sup>, contrairement aux cellules de patients portant l'allèle sauvage (Chu et al., 2016).

### III.5.7 Xénophagie et maladie de Crohn

La plupart des études fonctionnelles se sont intéressées à trois facteurs de risques majeurs associés à la MC : *NOD2*, *ATG16L1* et *IRGM*. Globalement, ces études ont rapporté une diminution de l'autophagie dans différents types cellulaires de patients atteints de la MC.

Tout d'abord, les macrophages dérivés de monocytes de patients atteints de la MC et génotypés pour les mutations *NOD2*, *ATG16L1* et *IRGM* sont incapables de contrôler la répllication intracellulaire des AIEC (Lapaquette et al., 2012; Vazeille et al., 2015). La mutation d'*IRGM* par perte de fonction affecte la clairance des AIEC par les macrophages dans des modèles murins de MICI (Parkes, 2012). En effet, la perte de contrôle de l'expression d'*IRGM* par le miR-196 entraînée par le variant à risque *IRGM*<sup>C313T</sup> induit une xénophagie déficiente et, en conséquence, une répllication intracellulaire excessive des bactéries AIEC (Brest et al., 2011). Par ailleurs, les cellules dendritiques et les CEI porteuses des variants *NOD2*<sup>L1007fsinsC</sup> ou *ATG16L1*<sup>T300A</sup> présentent une diminution de l'activation de l'autophagie par le MDP, induisant un défaut d'élimination des pathogènes intracellulaires comme *S. Typhimurium*, *S. flexneri* et les AIEC (Cooney et al., 2010). Ce défaut pourrait être dû à l'incapacité du variant *NOD2*<sup>L1007fsinsC</sup> à recruter ATG16L1 au site d'entrée de la bactérie (**Figure 50**). Les macrophages murins primaires déficients pour *Atg16l1* et les macrophages primaires humains porteurs du variant *ATG16L1*<sup>T300A</sup> présentent une diminution de la fusion des vésicules contenant *S. Typhimurium* avec les lysosomes, conduisant à un défaut de la clairance bactérienne (Zhang et al., 2017b). Récemment, il a été démontré que lors d'une infection par *S. Typhimurium*, ULK1 phosphoryle ATG16L1 pour l'activer, permettant le transfert d'ATG16L1 au niveau du site d'entrée de la bactérie. Or, la phosphorylation du variant à risque *ATG16L1*<sup>T300A</sup> par ULK1 provoque sa déstabilisation et sa dégradation, diminuant ainsi l'élimination de *S. Typhimurium* (Alsaadi et al., 2019). Enfin, *IRGM* interagit, d'une part, avec le complexe Beclin 1 et ULK pour

favoriser leur assemblage, et d'autre part, avec ATG16L1 et NOD2 afin de former un complexe et moduler l'autophagie en réponse à divers composants microbiens. NOD2 contribue à la poly-ubiquitination d'IRGM, une étape nécessaire pour l'interaction d'IRGM avec les facteurs autophagiques et l'élimination des bactéries (Chauhan et al., 2015a).

Par ailleurs, il a précédemment été montré que les récepteurs de la xénophagie jouent un rôle essentiel dans l'élimination des pathogènes intracellulaires. En particulier, certaines études se sont intéressées au rôle de p62 et de l'OPTN dans la pathogénèse de la MC. Au cours de l'inflammation intestinale, une diminution du recyclage de p62 associée à un défaut de l'autophagie a été observée (Cosin-Roger et al., 2017). Il a été rapporté que l'expression de p62 est plus élevée dans les cellules épithéliales de la muqueuse endommagée, comparativement à la muqueuse saine de patients atteints de MICI (Ortiz-Masiá et al., 2014). La survie des AIEC LF82 est supérieure dans les CEI transfectées avec un vecteur inhibant l'expression de p62 par rapport aux cellules transfectées avec un vecteur vide (Mimouna et al., 2014). De plus, le gène codant pour l'*OPTN* est sous exprimé dans les macrophages chez environ 10 % des patients atteints de la MC, et ceci est associé à une diminution du taux de protéine OPTN et de la sécrétion de cytokines par les macrophages lors d'une infection bactérienne (Smith et al., 2015). Enfin, comparativement aux souris sauvages, les souris déficientes pour l'*Optn* présentent une colite induite par *C. rodentium* plus sévère, une diminution du niveau de TNF- $\alpha$  dans le sérum et un défaut de recrutement des neutrophiles au site de l'infection (Chew et al., 2015).

Pour finir, après avoir été reconnus par les récepteurs de la xénophagie, les pathogènes intracellulaires sont éliminés par fusion de l'autophagosome avec le lysosome, qui nécessite les protéines inhibitrices de l'apoptose comme cIAP2 (*cellular inhibitor of apoptosis 2*) et XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) (Gradzka et al., 2018). La perte de fonction ou l'inhibition de ces protéines engendre une altération du flux autophagique responsable d'une xénophagie défectueuse ainsi que d'une augmentation de la sécrétion de TNF et d'IL-1 $\beta$ , pouvant contribuer au développement de la MC (Gradzka et al., 2018). De plus, l'acidité du lysosome, contrôlée par le récepteur GPR65 (*G protein-coupled receptor 65*), est nécessaire à son fonctionnement et à l'élimination des pathogènes intracellulaires. En effet, une acidification lysosomale aberrante entraînant un dysfonctionnement lysosomal et une altération de la clairance bactérienne intracellulaire par l'autophagie, est observée dans les cellules épithéliales ou les lymphoblastes de patients atteints de MICI porteurs du variant à risque *GPR65<sup>I231L</sup>* (Lassen et al., 2016). La délétion de *Gpr65* en modèle murin augmente la susceptibilité des souris au développement d'une inflammation intestinale induite par *C. rodentium* (Lassen et al., 2016). Or, ces résultats nécessitent des recherches plus approfondies car d'autres études ont révélé qu'un défaut de l'autophagie augmente la résistance à l'infection par *C. rodentium*. En effet, les souris *Atg16l1<sup>HM</sup>* présentent une réponse accrue de l'IFN-I au microbiote intestinal, augmentant leur résistance à l'infection par *C. rodentium*, comparativement aux souris sauvages (Marchiando et al., 2013). À l'inverse, les souris déficientes pour *Atg16l1*

**TABLEAU 7 : Principales molécules ou cibles thérapeutiques utilisées pour activer l'autophagie dans le traitement des MICI.**

Abréviations :  $\alpha 7nAChR$  : *alpha7 nicotinic acetylcholine receptor*, C2BR : *cannabinoid receptor 2*.

Molécule ou cible thérapeutique	Mode d'action	
Récepteurs impliqués dans l'induction de l'autophagie activés par différents agonistes	Optineurine	Maintien la clairance des agents pathogènes et régule la production de cytokines
	CB2R	Active la voie de signalisation AMPK-mTOR et inhibe l'activation de l'inflammasome NLRP3
	$\alpha 7nAChR$	Active la voie de signalisation AMPK-mTOR
Immunosuppresseurs	Sirolimus	Active de façon globale l'autophagie
	Évérolimus	Active de façon globale l'autophagie
Composés alimentaires et acides aminés	Vitamine D	Recrute Beclin-1 et favorise la libération de la protéine de jonction serrée Claudine-2
	Curcumine	Inhibe l'activation de l'inflammasome NLRP3
	Glutamine	Régule les voies de signalisation mTOR et MAPK-p38
	Spermidine	Active l'autophagie dans les macrophages
	Acide kynurénique	Dégrade l'inflammasome NLRP3
Principes actifs issus de végétaux	Célastrol	Inhibe la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR
	Palmatine	Favorise la mitophagie et inhibe l'inflammasome NLRP3
	Andrographolide	Favorise la mitophagie et inhibe l'inflammasome NLRP3
	Évodiamine	Empêche l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 et régule la voie de signalisation NF- $\kappa$ B
	GL-V9	Active la voie de signalisation AMPK et inhibe l'inflammasome NLRP3
	Andrographolide	Diminue l'activation de la voie de signalisation AKT-mTOR
	Anthocyanes	Régule la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR
	Resvératrol	Active la xénophagie dans les macrophages et cellules épithéliales intestinales
	Ginsenoside	Inactive l'inflammasome NLRP3 et induit la mitophagie médiée par p62

spécifiquement dans les cellules myéloïdes sont sensibles à cette infection, suggérant que les cellules myéloïdes sont nécessaires à la protection contre *C. rodentium* médiée par l'autophagie (Martin et al., 2018).

### III.6 Autophagie : vers de potentielles thérapies pour la maladie de Crohn

Dans les maladies inflammatoires, il a été prouvé que l'autophagie basale correctement induite atténue efficacement l'apparition et le développement des maladies par la suppression des réactions inflammatoires et immunitaires excessives. Ainsi, la modulation de l'autophagie dans ce type de pathologies semble être une solution thérapeutique intéressante.

#### III.6.1 Activation de l'autophagie par la rapamycine et ses analogues

Le sirolimus et l'évérolimus sont deux analogues de la rapamycine qui ont été utilisés sur des modèles murins et en clinique pour activer l'autophagie. En effet, chez des souris déficientes pour l'*Il-10*, l'iléite est améliorée par un traitement à l'évérolimus (Matsuda et al., 2007). Au niveau clinique, les effets de l'évérolimus restent à éclaircir, puisqu'une équipe a rapporté une amélioration des symptômes chez les patients atteints de la MC (Dumortier et al., 2008), tandis qu'une étude multicentrique randomisée n'a démontré aucun effet supérieur au placebo utilisé (Reinisch et al., 2008). Par ailleurs, un autre analogue de la rapamycine, le sirolimus, a également fait l'objet d'une étude rétrospective chez des enfants atteints de MICI sévère et réfractaire. Cette étude a rapporté une rémission clinique et une guérison de la muqueuse chez 100 % des enfants atteints de la MC, après un traitement au sirolimus (**Tableau 7**) (Mutalib et al., 2014). Cependant, les effets bénéfiques des analogues de la rapamycine peuvent être dus à des effets immunosuppresseurs indépendants de l'autophagie. Par conséquent, l'utilisation de modulateurs de l'autophagie en tant que thérapie demeure problématique en raison de leur faible spécificité pour leurs cibles, l'absence de spécificité pour un type cellulaire particulier et leurs effets indépendants de l'autophagie. Ainsi, afin d'établir une thérapie efficace pour le traitement des MICI, des stratégies modulant spécifiquement l'autophagie sans effet toxique restent à développer.

#### III.6.2 Activation spécifique de l'autophagie par des composés alimentaires ou végétaux

Parmi les nombreux activateurs ou inhibiteurs actuels, peu d'entre eux sélectionne strictement une voie autophagique et une cible. C'est pourquoi une partie de la recherche s'est orientée vers l'identification de petites molécules et de peptides modulant précisément l'autophagie dans les processus pathologiques.

De façon intéressante, certains acides aminés ou composés dérivés de produits alimentaires sont capables d'activer l'autophagie, comme la vitamine D, la curcumine, la glutamine, la spermidine, les anthocyanes et le résvératrol. En effet, la carence en vitamine D a été reconnue comme une base pathologique importante des MICI (Blaney et al., 2009). Une étude a démontré qu'un traitement par la vitamine D3 des CEI induit l'activa-

tion de l'autophagie (Wu et al., 2015), suggérant qu'une complémentation en vitamine D chez les patients atteints de la MC augmenterait le niveau de l'autophagie. Le récepteur de la vitamine D renforce l'autophagie par l'intermédiaire de Beclin 1 (Lu et al., 2019) et favorise la libération de la protéine de jonction serrée Claudine 2 pour ralentir l'inflammation intestinale (Zhang et al., 2019). En modèle animal de MICI (Yue et al., 2019) et lors d'études cliniques (Yanai et al., 2016), le traitement par la curcumine inhibe l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Gong et al., 2018), permettant d'améliorer la pathologie intestinale. De la même manière, en conditions basales et de stress, la glutamine active l'autophagie dans les CEI en régulant les voies mTOR et MAPK-p38, limitant l'apoptose induite par le stress (Sakiyama et al., 2009). Par ailleurs, dans un modèle murin de colite induite au DSS, la spermidine, une polyamine naturelle, améliore la perte de poids et les lésions coliques (Morón et al., 2013). L'étude de Liu et co-auteurs suggère que l'amélioration des MICI par la spermidine est en partie due à son activation de l'autophagie dans les macrophages, ce qui lui permet d'acquérir des propriétés anti-inflammatoires (Liu et al., 2020). De plus, les anthocyanes, appartenant à une sous-classe de flavonoïdes alimentaires (composés polyphénoliques), jouent un rôle important dans la prévention de l'apparition et de la progression de l'inflammation intestinale (Farzaei et al., 2018) et peuvent accélérer l'autophagie en régulant la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR (Zhang et al., 2016). Il a été démontré que les proanthocyanidines peuvent atténuer la colite induite par le DSS en activant l'autophagie (Zhang et al., 2022a). Enfin, *in vitro* et dans un modèle de poisson-zèbre, une étude a montré que le resvératrol induit la xénophagie dans les macrophages et dans les CEI, favorisant ainsi l'élimination de *S. Typhimurium* et des AIEC (**Tableau 7**) (Al Azzaz et al., 2018).

De même, il a été démontré que certains extraits végétaux ou principes actifs améliorent l'inflammation intestinale en induisant l'autophagie. Par exemple, le célastrol, un extrait végétal issu de la racine de *Tripterygium wilfordii* utilisée traditionnellement en médecine chinoise, augmente l'autophagie dans le côlon de souris *il10<sup>-/-</sup>* en inhibant la voie PI3K-AKT-mTOR et limitant ainsi l'inflammation (Zhao et al., 2015). Deux autres extraits végétaux, la palmatine (Mai et al., 2019) et l'andrographolide (Guo et al., 2014), améliorent la colite induite au DSS en favorisant la mitophagie dans les macrophages et en inhibant l'inflammasome NLRP3 (**Tableau 7**).

### III.6.3 Activation des récepteurs et régulateurs de l'autophagie

Ces dernières années, il a été démontré que plusieurs types de récepteurs et de régulateurs pouvaient avoir un effet bénéfique sur les MICI à travers l'autophagie. Par exemple, l'OPTN est de plus en plus reconnu comme étant un facteur essentiel dans le maintien de la clairance des pathogènes et la régulation de la production de cytokines dans les macrophages (Tschurtschenthaler and Adolph, 2018; Xu et al., 2020). En effet, l'activation de l'OPTN contribue à l'atténuation de la MC, *via* l'induction de l'autophagie et la suppression des réponses inflammatoires médiées par les macrophages intestinaux (Tschurtschenthaler and Adolph, 2018). De plus, le CB2R (*cannabinoid receptor 2*), un récepteur couplé aux protéines G principalement localisé dans le système

immunitaire, y compris les macrophages et d'autres cellules inflammatoires et immunitaires dans les tissus périphériques, a été de plus en plus étudié en tant que modulateur immunitaire et inflammatoire (Carbone et al., 2014; Kong et al., 2014; Ke et al., 2016). Dans un modèle murin de colite induite au DSS, l'administration de HU308, un agoniste de CB2R (Ke et al., 2016), et l'administration de PNU282987, un agoniste du récepteur  $\alpha 7nAChR$  (*alpha7 nicotinic acetylcholine receptor*) (Shao et al., 2019), activent la voie AMPK-mTOR, induisant ainsi l'autophagie dans les macrophages intestinaux et atténuant considérablement la sévérité de la colite (**Tableau 7**).

### III.6.4 Activation de l'autophagie pour moduler l'inflammasome

D'après des études récentes, plusieurs molécules se sont révélées efficaces pour soulager les MICI en induisant la suppression de l'inflammasome par l'autophagie. Par exemple, un agoniste du CB2R augmente l'autophagie, en inhibant l'activation de l'inflammasome NLRP3 et en atténuant la colite induite au DSS dans un modèle murin (Shao et al., 2014). De plus, l'administration d'une molécule anti-inflammatoire, le Ginsenoside, inactive l'inflammasome NLRP3 et induit la mitophagie médiée par p62, améliorant ainsi la colite induite au DSS en modèle murin (**Tableau 7**) (Liu et al., 2018a). Par ailleurs, le GL-V9, une molécule activatrice de l'AMPK, induit l'autophagie et protège contre la colite grâce à l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 (Zhao et al., 2017). En outre, l'acide kynurénique, un régulateur endogène de la colite exacerbée par le stress, induit la dégradation de NLRP3 par l'autophagie dans les macrophages (Zheng et al., 2019). Enfin, il a été démontré que l'évodiamine, un composant chimique extrait d'*Evodiae fructus*, supprime l'initiation et l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 *via* la régulation de la voie NF- $\kappa$ B par l'autophagie dans les macrophages, atténuant ainsi la colite induite par le DSS (**Tableau 7**) (Ding et al., 2020).

Plus récemment, chez les patients atteints de MICI, l'application de cannabis, un agoniste du CB2R, permet d'atténuer la sévérité des MICI grâce à l'induction de l'autophagie et à la suppression de l'inflammation par les macrophages (Tartakover Matalon et al., 2020). Une autre étude menée sur des patients a révélé que le ciblage d'*ATG2B* par le miARN-143 inhibant l'autophagie augmente la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, jouant ainsi un effet néfaste sur la MC (Lin et al., 2018). En outre, dans les CEI humaines, les lipoprotéines HDL (*high-density lipoprotein*) et l'apolipoprotéine A-I (apoA-I) suppriment l'inflammation intestinale *via* l'autophagie (Gerster et al., 2015). Dans un modèle murin de colite induite au DSS, il a été démontré que la sous-unité V-ATPase ATP6V0D2 spécifique des macrophages atténuait considérablement la sévérité de la colite en limitant l'activation de l'inflammasome dans les macrophages et l'infection bactérienne par *S. Typhimurium*. Ces effets sont médiés par l'augmentation de la fusion autophagosome-lysosome et du niveau du flux d'autophagie (Xia et al., 2019). L'induction de l'autophagie par PINK1/Parkin protège contre la colite induite au DSS en inhibant l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages (Mai et al., 2019). Enfin, dans un autre modèle murin de colite induite au TNBS (*trinitro-benzene-sulfonic acid*), l'IL-33

améliorerait la colite en induisant l'autophagie dans les macrophages intestinaux *via* la régulation de la voie de signalisation TLR4 (Wang et al., 2019).

### III.6.5 Approche thérapeutique par une thérapie personnalisée

Le développement d'une approche personnalisée pour le traitement de la MC semble essentiel étant donné que l'étiologie de cette pathologie est multifactorielle et que les facteurs de risques sont spécifiques à chaque patient. Une approche intéressante serait d'induire l'autophagie chez les patients atteints de la MC qui présentent des défauts génétiques associés à l'autophagie. Cela permettrait de restaurer la sécrétion de peptides anti-microbiens par les cellules de Paneth et d'activer efficacement les réponses immunitaires (Nys et al., 2013).

Par ailleurs, une autre stratégie thérapeutique envisageable est la thérapie génique, qui permettrait de soulager et traiter la MC. Il a été montré que plusieurs miARN inhibent l'expression de gènes associés à l'autophagie, supprimant ainsi ce processus (El-Khider and McDonald, 2016). Enfin, les pathologies humaines associées à un défaut de l'autophagie pourraient être traitées par un inducteur de l'autophagie, un peptide appelé « Tat- BECN1 », qui est internalisé et induit l'autophagie dans différents types cellulaires humains (Shoji-Kawata et al., 2013). Cependant, des progrès restent à faire sur l'utilisation de thérapies basées sur les miARN ou de peptides inducteurs de l'autophagie puisque cela nécessite le développement de systèmes de délivrance spécifique de l'intestin ainsi que la vérification de leur efficacité et de leur innocuité.

Par conséquent, en raison de ses nombreux rôles fondamentaux dans le maintien de l'homéostasie intestinale et des divers polymorphismes présents chez les patients atteints de la MC, l'autophagie semble être une cible thérapeutique pertinente. Bien que des progrès aient été réalisés dans l'étude des médicaments induisant l'autophagie, le traitement des MICI par la modulation de l'autophagie n'en est encore qu'à ses débuts. Il s'agit d'un défi en raison de la faible spécificité pharmacologique de ses cibles, du manque de spécificité pour des classes cellulaires spécifiques et des effets indépendants de l'autophagie.





# **Travail expérimental**



# Travail expérimental

## IV.1 Contexte scientifique

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin dont l'étiologie est multifactorielle. Elle résulte de l'interaction complexe entre des prédispositions génétiques, des facteurs environnementaux et des altérations de la composition du microbiote intestinal, induisant une dérégulation du système immunitaire intestinal. Chez les patients atteints de la MC, une augmentation de la prévalence des bactéries AIEC (adherent-invasive *E. coli*) a été rapportée (Darfeuille-Michaud et al., 1998, 2004; Palmela et al., 2018). Les AIEC sont des pathobiontes capables d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales, de survivre et se répliquer en macrophages, de coloniser le tube digestif et d'induire une inflammation intestinale chez des souris génétiquement prédisposées (Palmela et al., 2018).

De plus, le laboratoire a montré que l'autophagie est un processus clé de la défense de l'hôte pour contrôler la réplication intracellulaire des AIEC ainsi que l'inflammation intestinale induite par ces bactéries (Brest et al., 2011; Lapaquette et al., 2012; Nguyen et al., 2014; Bretin et al., 2016, 2018; Dalmaso et al., 2019). En effet, lors d'une infection par les AIEC, l'autophagie est induite dans les cellules hôtes et cela est nécessaire pour limiter la réplication intracellulaire des AIEC (Lapaquette et al., 2010, 2012; Nguyen et al., 2014; Bretin et al., 2016; Dalmaso et al., 2021). Bien que l'autophagie soit induite dans les cellules infectées, il a également été démontré que les AIEC peuvent contourner l'autophagie en dérégulant les niveaux des microARN 130a et 30c (Nguyen et al., 2014) ou la SUMOylation (Dalmaso et al., 2019) des cellules hôtes. Cela conduit à une réplication intracellulaire anormale des AIEC et à une inflammation accrue induite par ces bactéries (Nguyen et al., 2014; Dalmaso et al., 2019). En outre, les cellules hôtes infectées par les AIEC sécrètent des exosomes (Carrière et al., 2016), des vésicules extracellulaires de 30 à 150 nm, qui peuvent transférer le miR-30c et le miR-130a d'une cellule à une autre pour inhiber l'autophagie, ce qui favorise la réplication intracellulaire des AIEC (Larabi et al., 2020b). Enfin, de précédentes études menées par le laboratoire ont révélé que plusieurs polymorphismes dans les gènes impliqués dans l'autophagie (*ATG16L1*, *IRGM*, *ULK1*, et *NOD2*) associés à la MC entraînent un défaut de l'autophagie, induisant une réplication intracellulaire anormale des AIEC et une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires (Lapaquette et al., 2010; Brest et al., 2011; Lapaquette et al., 2012; Buisson et al., 2019). Toutefois, les mécanismes par lesquels les bactéries AIEC sont reconnues par l'autophagie ainsi que l'impact des SNP dans les gènes de l'autophagie sur ce processus restent mal connus.

Certains pathogènes intracellulaires, tels que *L. monocytogenes* ou *S. flexneri*, développent diverses stratégies, en particulier des facteurs de virulence, pour contourner le processus autophagique et échapper ainsi à leur dégradation. Bien que certaines bactéries AIEC soient éliminées par l'autophagie, d'autres ne le sont pas. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que les AIEC sont également capables d'échapper à l'autophagie afin de se répliquer au sein des cellules hôtes.

Dans ce contexte, les travaux menés au cours de ma thèse ont eu pour **objectif principal de mieux comprendre l'interaction entre les bactéries AIEC et l'autophagie**. Pour répondre à cet objectif, mon travail de recherche s'est articulé autour de 2 axes : **(i) identifier le ou le(s) récepteur(s) autophagique(s) implique(s) dans la reconnaissance des AIEC par l'autophagie**, et **(ii) identifier les facteurs de virulence nécessaires aux bactéries AIEC pour échapper à l'autophagie**.

## IV.2 Identification du ou des récepteur(s) autophagique(s) impliqué(s) dans la reconnaissance des bactéries AIEC associées à la MC par l'autophagie

Lors d'une infection par les AIEC, notre groupe a montré que l'autophagie est induite dans les cellules hôtes afin de limiter la réplication intracellulaire de ces bactéries (Lapaquette et al., 2010, 2012; Bretin et al., 2016). Par ailleurs, il a également été rapporté que les bactéries intracellulaires ubiquitinées sont reconnues par plusieurs récepteurs autophagiques se liant à l'ubiquitine, tels que l'OPTN (Wild et al., 2011), NBR1 (Kirkin et al., 2009; Waters et al., 2009), TAX1BP1 (Tumbarello et al., 2015), p62 (Zheng et al., 2009) et NDP52 (Thurston et al., 2009). Ainsi, dans cette étude, les objectifs étaient d'**identifier le(s) récepteur(s) autophagique(s) impliqué(s) dans la reconnaissance et l'adressage de la souche AIEC LF82 vers les autophagosomes** ainsi que d'**étudier l'impact du variant à risque *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* associé à la MC sur la réponse de l'hôte lors d'une infection par les AIEC.**

Parmi les récepteurs autophagiques testés (p62, NDP52, NBR1, TAX1BP1 et OPTN), nos résultats ont montré une augmentation significative de la réplication intracellulaire de la souche de référence AIEC LF82 dans les cellules épithéliales intestinales T84 transfectées avec un siARN dirigé contre *p62* ou *NDP52*, comparativement aux conditions contrôles. En présence des siARN dirigés contre l'*OPTN*, *NBR1* ou *TAX1BP1*, aucune différence significative n'a été observée par rapport aux conditions contrôles. Ainsi, ces résultats indiquent que les récepteurs p62 et NDP52 semblent être impliqués dans la reconnaissance de la souche AIEC LF82, contrairement aux récepteurs OPTN, NBR1 et TAX1BP1. En effet, une augmentation significative de la réplication intracellulaire de la souche AIEC LF82 a été constatée dans des cellules HeLa déficientes pour p62 ou NDP52, comparativement aux cellules contrôles. Par ailleurs, cette augmentation est associée à une production plus élevée des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 induite par la souche AIEC LF82. En outre, l'analyse par microscopie confocale a révélé la colocalisation entre p62 ou NDP52 avec la souche AIEC LF82 et LC3, un marqueur de l'autophagie. Par conséquent, bien que d'autres études soient nécessaires pour démontrer le rôle exact de p62 et NDP52, nos résultats suggèrent que ces protéines pourraient agir comme récepteurs autophagiques pour contrôler la réplication intracellulaire des AIEC.

Par ailleurs, l'étude de l'impact du variant à risque *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* sur la réponse de l'hôte lors d'une infection par les AIEC, n'a montré aucune différence significative dans le nombre de bactéries AIEC LF82 intracellulaires entre les cellules HeLa exprimant ce variant et celles exprimant la protéine NDP52 sauvage, que ce soit par le test de protection à la gentamicine, par cytométrie en flux ou par microscopie confocale. Ainsi, ces données suggèrent que le variant à risque *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* pourrait être impliqué dans la reconnaissance de la souche AIEC LF82 dans d'autres lignées cellulaires comme les macrophages, ou qu'il joue un autre rôle, probablement dans le contrôle de l'inflammation.

Ces travaux sont présentés ici sous la forme d'un article scientifique, qui est actuellement en révision dans le journal « **Frontiers in cellular and infection microbiology** ».

**Identification of autophagy receptors for the Crohn's disease-associated adherent-  
invasive *Escherichia coli***

Alison Da Silva<sup>1</sup>, Guillaume Dalmaso<sup>1</sup>, Anaïs Larabi<sup>1</sup>, My Hanh Thi Hoang<sup>1</sup>, Elisabeth Billard<sup>1</sup>, Nicolas Barnich<sup>1,#,\*</sup>, Hang Thi Thu Nguyen<sup>1,#,\*</sup>

<sup>1</sup>M2iSH, UMR 1071 Inserm, Université Clermont Auvergne, INRAe USC 1382, CNRH, 63001 Clermont-Ferrand, France.

#These authors contributed equally to this work

\*Correspondences: [hang.nguyen@uca.fr](mailto:hang.nguyen@uca.fr) or [nicolas.barnich@uca.fr](mailto:nicolas.barnich@uca.fr)

Tel.: (+33)473178345; Fax: (+33)473178371.

## Abstract

Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory bowel disease, of which the etiology involves genetic, environmental and microbial factors. Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) and polymorphisms in autophagy-related genes have been implicated in CD etiology. Autophagy is a key process for the maintenance of cellular homeostasis, which allows the degradation of damaged cytoplasmic components and pathogens *via* lysosome. We have shown that a functional autophagy is necessary for AIEC clearance. Here, we aimed at identifying the autophagy receptor(s) responsible to target AIEC to autophagy for degradation. We showed that, among the tested autophagy receptors (p62, NDP52, NBR1, TAX1BP1 and Optineurin), diminished expression of p62 or NDP52 increased the number of the clinical AIEC LF82 strain inside intestinal epithelial cells. This was associated with increased pro-inflammatory cytokine production. Moreover, p62 or NDP52 directly colocalized with AIEC LF82 and LC3, an autophagy marker. As the *NDP52*<sup>Val248Ala</sup> polymorphism has been associated with increased CD susceptibility, we investigated its impact on AIEC control. However, in HeLa cell and under our experimental condition, no effect of this polymorphism neither on AIEC LF82 intracellular number nor on pro-inflammatory cytokine production was observed. Together, our results suggest that p62 and NDP52 act as autophagy receptors for AIEC recognition, controlling AIEC intracellular replication and inflammation.

Keywords: Adherent-invasive *E. coli* (AIEC); autophagy; Crohn's disease; p62; NDP52.



## Introduction

Crohn's disease (CD) is an inflammatory bowel disease (IBD) characterized by chronic inflammation of any part of the gastrointestinal tract (Torres et al., 2017). Evidence has shown that CD resulted from a complex interplay between environmental factors and genetic susceptibility, leading to dysregulated immune responses against the intestinal microbiota (Carrière et al., 2014). To date, no curative treatment is available for CD patients, and only symptomatic treatments are proposed to limit the intensity and the frequency of the inflammatory flare (Torres et al., 2017). This indicates a need to fully elucidate the underlying causes of the disease.

Intestinal dysbiosis with altered composition and diversity of the microbiota has been consistently described in patients with IBD (Carrière et al., 2014). It has been shown that the intestinal mucosa of CD patients is abnormally colonized by adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) pathobionts (Darfeuille-Michaud et al., 1998, 2004). AIEC bacteria are characterized by their abilities to adhere to and to invade intestinal epithelial cells, to survive and replicate within macrophages without inducing cell death, and to induce the release of pro-inflammatory cytokines (Larabi et al., 2020a). Furthermore, our group has shown that the replication ability of AIEC is increased in macrophages from CD patients compared to healthy individuals (Vazeille et al., 2015), and that the defect in AIEC clearance of CD patients-derived macrophages is linked to the polymorphisms in autophagy-related genes, including *IRGM* (Immunity-related GTPase family M protein) and *ULK-1* (Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1) (Buisson et al., 2019). Our recent study showed that AIEC are involved in the early stages of ileal lesions in CD and the presence of AIEC within surgical specimen is predictive of endoscopic post-operative recurrence at 6 months (Buisson et al., 2023). This study strongly demonstrates the clinical relevance of AIEC implication in the etiopathogenesis of CD.

Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is a tightly regulated and conserved catabolic process by which the cell degrades cytoplasmic components, such as misfolded proteins, damaged organelles or invasive pathogens, *via* lysosome (Klionsky et al., 2021). Briefly, autophagy is initiated by the formation of the isolated double-membrane phagophore that elongates and matures to form an autophagosome. Autophagosome then fuses with lysosome for the subsequent degradation of its content (Klionsky et al., 2021). Our group has shown that upon AIEC infection, autophagy is induced in host cells, and a functional autophagy is necessary to limit the intracellular replication of AIEC (Lapaquette et al., 2010, 2012; Bretin et al., 2016, 2018; Dalmaso et al., 2021). We also showed that while host cells

induce a functional autophagy to eliminate AIEC, AIEC can subvert autophagy by up-regulating the levels of microRNAs 130a and 30c of host cells (Nguyen et al., 2014) or by impairing host SUMOylation, a eukaryotic reversible post-translational modification, in which SUMO, a ubiquitin-like polypeptide, is covalently linked to target proteins (Dalmasso et al., 2019). This consequently leads to abnormal AIEC intracellular replication and enhanced AIEC-induced inflammation (Nguyen et al., 2014; Dalmasso et al., 2019). Furthermore, upon AIEC infection, host cells secrete exosomes (Carrière et al., 2016), extracellular vesicles of 30-100 nm, that can transfer miR-30c and miR-130a from cell-to-cell to inhibit autophagy, favoring AIEC intracellular replication (Larabi et al., 2020b). Importantly, we and others have shown that the CD-associated SNPs in autophagy-related genes, including *ATG16L1*, *IRGM* and *NOD2*, lead to impaired autophagy, resulting in abnormal AIEC intracellular replication and increased secretion of pro-inflammatory cytokines (Nguyen et al., 2013; Larabi et al., 2020a).

Autophagy can be non-selective, where bulky portions of the cytoplasm are degraded upon stress, or highly selective, by which pre-selected and specific cellular components are degraded. In selective autophagy, the first step involves the ubiquitination of the cargo, following which it gets recognized by autophagic receptors for subsequent targeting into an autophagosome, which matures into a degradative vesicle after fusion with lysosome (Lamark and Johansen, 2021). Selective autophagy is classified according to the targeted cargo: mitophagy for mitochondria, pexophagy for peroxisomes, ribophagy for ribosomes, lipophagy for lipid droplets, aggrephagy for aggregated proteins and xenophagy for invading pathogens (Lamark and Johansen, 2021). Ubiquitinated intracellular bacteria could be recognized by multiple ubiquitin-binding cargo receptors, such as Optineurin (Wild et al., 2011), NBR1 (Kirkin et al., 2009; Waters et al., 2009), TAX1BP1 (Tumbarello et al., 2015), p62 (Bjørkøy et al., 2005; Pankiv et al., 2007) and NDP52 (Thurston et al., 2009).

p62 (also known as SQSTM1 (sequestosome 1)) is the first selective autophagy receptor to be identified and described (Bjørkøy et al., 2005; Pankiv et al., 2007). It is involved in cellular stress response, clearance of protein aggregates, defective organelles as well as invading pathogens (Sharma et al., 2018; Vainshtein and Grumati, 2020). Indeed, the importance of p62 in xenophagy was primarily explored in the control of the invading bacteria *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Zheng et al., 2009). Other bacterial species, such as *Shigella flexneri* (Mostowy et al., 2011), *Listeria monocytogenes* (Mostowy et al., 2011) and *Mycobacterium tuberculosis* (Franco et al., 2017) have been also reported to be selectively targeted by p62 for recruitment and delivery into nascent LC3-positive autophagosomes. p62 acts with other receptors such as NDP52 (nuclear dot protein 52 kDa, also known as CALCOCO2) to target *S.*

Typhimurium (Cemma et al., 2011), *Listeria monocytogenes* (Mostowy et al., 2011) and *Shigella flexneri* (Mostowy et al., 2011) to autophagosomes.

NDP52 is an important selective autophagy receptor which is involved in the maintenance of cellular homeostasis by degrading damaged mitochondria *via* mitophagy (Heo et al., 2015). It also plays an essential role in xenophagy. Indeed, NDP52 targets various infectious pathogens such as *Streptococcus pyogenes* (Von Muhlinen et al., 2010), *S. Typhimurium* (Von Muhlinen et al., 2010) and *Shigella flexneri* (Mostowy et al., 2011) for their selective degradation by xenophagy. NDP52 uses its C-terminal ubiquitin-binding zinc finger domain (UBZ) to recognize ubiquitin on the bacterial surface and the LC3-interacting region (LIR) for the binding with LC3 molecules on autophagosome, facilitating the recruitment of autophagic machinery surrounding the pathogens (Ivanov and Roy, 2009; Thurston et al., 2009). Moreover, NDP52 also takes part in reducing inflammation via down-regulating the NF- $\kappa$ B signaling (Inomata et al., 2012; Ellinghaus et al., 2013). In 2013, a whole exome sequencing study identified an association between CD susceptibility and a common missense variant, Val248Ala (SNP rs2303015), which leads to the replacement of valine by alanine at position 248 (Ellinghaus et al., 2013). Ellinghaus and colleagues reported that while the wild-type *NDP52* was able to decrease NF- $\kappa$ B activation in response to poly(I:C), a TLR (Toll-like receptor) agonist, in HeLa cells, the CD-associated *NDP52*<sup>Val248Ala</sup> variant failed to do so (Ellinghaus et al., 2013). Thus, the negative feedback on TLR signaling exerted by NDP52 was impaired by the *NDP52*<sup>Val248Ala</sup> variant, and this could be one of the mechanisms underlying the implication of this variant in CD pathogenesis (Ellinghaus et al., 2013). Nevertheless, the impact of this risk variant on autophagy targeting bacteria or xenophagy has not been investigated.

So far, the autophagic receptors responsible for the recognition of AIEC and targeting the bacteria to autophagosome have not yet been identified. In this study, we aimed to identify the autophagic receptor(s) specific for AIEC targeting and to investigate the impact of the CD-associated *NDP52*<sup>Val248Ala</sup> variant on host response to AIEC infection.

## **Materials and methods**

### **Bacterial strains**

The AIEC reference strain LF82 was isolated from a chronic ileal lesion of a CD patient (Darfeuille-Michaud et al., 1998). The clinical AIEC strains CEA501S and CEA614S were isolated from the ileal lesions of CD patients from the CEALIVE cohort (Buisson et al., 2021). The LF82-GFP bacteria was used to visualize the bacteria by fluorescent microscopy as previously described (Nguyen et al., 2014; Bretin et al., 2016). The mCherry-labeled AIEC LF82 strain was obtained by bacterial conjugation in solid medium. Briefly, the mCherry donor strain, the AIEC LF82 recipient strain and the strain carrying the transposase were grown overnight in Luria-Broth (LB) with corresponding antibiotics at 37°C. These 3 strains were mixed together, centrifuged for 2 min at 1,900 g, re-suspended in 1.5 mL of LB to eliminate antibiotics and centrifuged again. Then, the pellet was re-suspended in 50 µL of LB, and this solution was filtered through a 0.45 µm filter membrane on LB agar plate. The plate was incubated for 2 to 6 hours at 37°C, and then, the filter membrane was transferred in a 50 mL tube to resuspend the bacteria in 1 mL of LB. It was spread on LB agar plates and incubated overnight at 37°C. The laboratory *E. coli* K12 C600 strain was used as a non-invasive strain. All bacterial strains were grown overnight in LB at 37°C without agitation.

### **Cell lines and culture conditions**

The NDP52 knock-out (KO) and p62 KO HeLa cells, as well as their corresponding control HeLa cells, which express NDP52 or p62, respectively, were kindly provided by Prof. Richard J. Youle (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) (Lazarou et al., 2015). HeLa cells expressing LC3-GFP were kindly given by Drs. Aurore Rozières and Christophe Viret (CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France). HeLa cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with L-glutamine (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Dutscher) and 1% antibiotic/antimycotic solution (Penicillin G/Streptomycin/Amphotericin B) (Cytiva). The intestinal epithelial cell line T84 (ATCC, CCL-248) was cultured in DMEM/F-12 Nutrient Mixture (Ham) (Gibco) supplemented with 10% FBS, 1% Glutamine (Gibco), 1% antibiotic/antimycotic solution (Penicillin G/Streptomycin/Amphotericin B) and 1% Hepes (Dutscher). All cells were maintained in an atmosphere with saturated humidity and containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

## Plasmid construction

The constructs expressing wild-type NDP52, or mutated NDP52<sup>Val248Ala</sup>, or NDP52-GFP or NDP52<sup>Val248Ala</sup>-GFP were generated. NDP52 cDNA was cloned from T84 cells into the pEGFP-C2 vector (Clontech) using the SuperFi II DNA polymerase (Invitrogen) and the following primers:

NDP52<sub>Forward-EcoRI</sub>: 5'-GGGCGAATTCTATGGAGGAGACCATCAAAG-3';

NDP52<sub>Reverse-BamHI</sub>: 5'-GTTGGATCCTCAGAGAGAGTGGCAGAACACG-3'.

The valine at position 248 was replaced by an alanine by changing a C for a T at the position 743 of NDP52 cDNA using the Site-Directed Mutagenesis Kit QuickChange II (Agilent) and the following primers:

Forward: 5'-GAGAAAGAAATGGAGAAGCTTGCTCAGGGAGATCAAGATAAGAC-3';

Reverse: 5'-GTCTTATCTTGATCTCCCTGAGCAAGCTTCTCCATTTCTTTCTC-3'.

GFP was removed from the pEGFP-C2-NDP52 construct using the In-Fusion HD Cloning Kit (Takara) and the following primers:

Forward: 5'-TCGCCACCATAACTGATCATAATCAGCCATACC-3';

Reverse: 5'-CAGTTATGGTGGCGACCGGTAGCGC-3'.

All the sequences were verified by DNA sequencing (Eurofins Genomics).

## Transfection

All transfections were performed using Lipofectamine 3000 RNAimax (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Briefly, T84 cells or NDP52 KO HeLa cells were seeded in 24-well tissue culture plates. The following day, lipofectamine 3000 reagent was diluted in Opti-MEM medium (Gibco), and nucleotide mix was prepared by mixing siRNAs (Dharmacon ON-TARGETplus SMARTPool; final concentration: 50 nM) against NDP52 (#L-010637-00-0005), Optineurin (#L-016269-00-0005), p62 (#L-010230-00-0005), NBR1 (#L-010522-00-0005) or TAX1BP1 (#L-016892-00-0005) or 500 ng of plasmid in Opti-MEM medium. Then, the lipofectamine 3000 reagent was added to the nucleotide mix and incubated for 5 min at room temperature. The mixed solution was added to the cells and incubated at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. After 6 h, the transfection medium was removed, cells were washed once with PBS and incubated with antibiotic-free culture medium.

## Invasion assay

Bacterial strains were cultured overnight in LB at 37°C without agitation. Bacterial concentrations were estimated by measuring the optical density at 600 nm. Bacteria were re-

suspended in a proper volume of fresh antibiotic-free culture medium to allow infection of host cells at a MOI (multiplicity of infection) of 100. The number of intracellular bacteria was determined using the gentamicin protection assay as we described previously (Nguyen et al., 2014; Bretin et al., 2016). Briefly, cell monolayers were incubated with bacteria for 3 h, washed for three times with PBS 1X and then incubated with antibiotic-free culture medium containing 100 µg/mL of gentamicin for the indicated time. To determine the number of intracellular bacteria, cell monolayers were washed once with PBS and lysed with 1% Triton X-100 (Euromedex) in deionized water. Samples were serially diluted and plated onto LB agar plates to determine the number of CFU (colony-forming unit) of the bacteria.

### **Immunofluorescence analysis**

LC3-GFP-expressing HeLa cells were seeded on coverslips in 24-well tissue culture plates 2 days before infection. Cells were infected with AIEC LF82-mCherry at a MOI of 10 and centrifugated at 160 g for 10 min to promote the contact between the bacteria and the cells. The cells were then incubated with the bacteria for 3 h at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cells were then washed three times with PBS 1X and incubated with antibiotic-free culture media containing 100 µg/mL of gentamicin for the indicated time. Then, cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde (PFA) (Sigma) in PBS 1X at room temperature for 10 min, and then permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS 1X at room temperature for 10 min. Cells were incubated with the saturation buffer (PBS 1X containing 5% FBS, 3% Bovine Serum Albumin (BSA) and 0.025% Triton X-100) at room temperature for 1 h. Cells were then incubated overnight at 4°C with a primary antibody diluted in the saturation buffer (rabbit anti-NDP52 antibody, #ab68588, Abcam, dilution: 1/100) in a humid box. The following day, after 6 washes with PBS 1X, cells were incubated with the corresponding secondary antibody diluted in the saturation buffer (anti-rabbit Cy5, #A10523, Invitrogen, dilution: 1/400) in a humid box for 45 min. Nuclei were stained with Hoescht. Coverslips were mounted with a Mowiol solution (Interchim). Images were taken using Zeiss LSM 800 with Airyscan confocal microscope.

### **Flow cytometry**

NDP52 KO HeLa cells were seeded in 6-well tissue culture plates. The following day, cells were transfected with wild-type NDP52-GFP or NDP52<sup>Val248Ala</sup>-GFP constructs, or the empty plasmid. Then, cells were infected with AIEC LF82-mCherry at a MOI of 10 for 3 h. Cells were then washed three times with PBS 1X and incubated with antibiotic-free culture media containing 100 µg/mL of gentamicin for 1 h. Cells were trypsinized, resuspended in fresh

antibiotic-free culture media and centrifugated for 5 min at 130 g. The cells were finally resuspended in PBS 1X containing 1% BSA and 2 mM EDTA. The flow cytometry analysis was performed on Attune flow cytometer (Life Technologies) using the Attune NXT software.

### **Enzyme-linked immunosorbent assay**

Cell culture supernatants were collected at different time points during invasion assay (before infection and at 4 h, 10 h and 24 h post-infection). The amount of secreted IL-8 and IL-6 levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (Duoset, R&D systems).

### **Immunoblotting analysis**

Cells were washed with PBS 1X and lysed with RIPA buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, pH 7.4) containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche) and 20 mM Na-orthovanadate. Lysates were recovered in an eppendorf tube and disrupted for 6 min at 4°C. Then, lysates were centrifuged at 14,000 g for 15 min at 4°C, and the supernatants were used for immunoblotting. Protein concentrations were measured using the DC protein assay kit (Bio-Rad). The samples were diluted with 4X Laemmli sample buffer (277.8 mM Tris-HCl, pH 6.8, 44.4 % (v/v) glycerol, 4.4 % SDS, 0.02 % bromophenol blue; Bio-Rad) containing  $\beta$ -mercaptoethanol, followed by heating for 5 min at 95°C. Whole-cell lysates were separated by acrylamide gel electrophoresis (10  $\mu$ g of proteins per well), and transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham<sup>TM</sup> Protran<sup>TM</sup> supported 0.45  $\mu$ m). The membrane was then incubated with the blocking buffer (PBS 1X containing 0.1% Tween 20 and 5% BSA) for 1 h at room temperature. Then, the membrane was incubated with primary antibodies (rabbit anti-NDP52 antibody, #ab68588, Abcam, dilution: 1/1000; anti-phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$ , #2859, Cell Signaling Technology, dilution: 1/1000; anti- $\beta$ -actin rabbit antibody, #4970, Cell Signaling Technology, dilution: 1/1000) diluted with the blocking buffer overnight at 4°C. After washes, membranes were incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Cell Signaling Technology) in blocking buffer for 1 h at room temperature. After washes, blots were detected using the Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) and revealed using the ChemiDOc<sup>TM</sup> XRS System (Bio-Rad).

### **Statistical analysis**

Results are presented as means  $\pm$  SEM. Statistical analysis between 2 or several groups were performed using the Student t test (Mann-Whitney if not parametric) or analysis of



variance (ANOVA) followed by a post-test Bonferroni correction (Kruskal-Wallis if not parametric), respectively, with GraphPad Prism version 9.4.0 software. A  $P$  value less than 0.05 was considered statistically significant.  $*P < 0.05$ ;  $**P \leq 0.01$ ;  $***P \leq 0.001$ ;  $****P \leq 0.0001$ .

## Results

### **p62 and NDP52 are autophagic receptors involved in the control of AIEC LF82 intracellular replication.**

Some autophagic receptors, such as Optineurin, NBR1, TAX1BP1, p62 and NDP52, have been shown to participate in the elimination of invading bacteria (Lamark and Johansen, 2021). To investigate which autophagic receptor(s) are involved in the control of intracellular AIEC LF82 by autophagy, the intestinal epithelial T84 cell line was transfected with siRNAs against Optineurin, NBR1, TAX1BP1, p62 or NDP52. Among them, a significant increase in the number of intracellular AIEC LF82 was observed in cells transfected with siRNAs against p62 or NDP52, compared to cells transfected with vehicle or a siRNA control at 4, 10 and 24 h post-infection (**Figure 1A**). In the cells transfected with siRNAs against TAX1BP1, Optineurin or NBR1, no significant difference in the AIEC LF82 intracellular number was detected compared to vehicle and siRNA control conditions (**Figures 1A and 1B**). Therefore, these results suggest that p62 and NDP52 are involved in the control of the AIEC LF82 strain by autophagy.

To confirm the involvement of p62 in autophagy-mediated control of AIEC intracellular number, p62 KO and the control HeLa cells were infected with the AIEC LF82 strain. A significant increase in the number of intracellular AIEC LF82 was observed in p62 KO HeLa cells compared to control cells at 4, 10 et 24 h post-infection (**Figure 2A**). The same experiment was performed using NDP52 KO HeLa cells and their corresponding control cells, and the same results were obtained (**Figure 2B**). Indeed, the intracellular number of AIEC LF82 was significantly higher in NDP52 KO HeLa cells compared to control cells (**Figure 2B**). Thus, these results confirm the involvement of p62 and NDP52 in the control of AIEC LF82 intracellular number by autophagy.

Next, to further investigate the role of these two receptors in the recognition of other clinical AIEC strains, p62 KO HeLa cells, NDP52 KO HeLa cells and their respective control cells were infected with two other clinical AIEC strains (CEA501S and CEA614S) isolated from the ileal mucosa of CD patients (CEALIVE cohort (Buisson et al., 2021)). The non-pathogenic and non-invasive *E. coli* K12 C600 strain and the AIEC LF82 strain were also used. In p62 KO HeLa cells, the intracellular number of the AIEC CEA501S and CEA614S strains was significantly higher compared to that in control cells at 4h post-infection (**Figure 2C**). This was also observed for the AIEC LF82 strain but not the K12 C600 strain (**Figure 2C**). Similarly, the intracellular number of the CEA501S and CEA614S strains was significantly higher in NDP52 KO HeLa cells compared to control cells at 4h post-infection (**Figure 2D**). This

increase was also observed for the AIEC LF82 strain, but not the K12 C600 strain (**Figure 2D**). Taken together, these results strongly demonstrate the role of p62 and NDP52 in controlling the intracellular replication of clinical AIEC strains.

### **Direct colocalization between p62 or NDP52 with the AIEC LF82 strain and the autophagic protein LC3.**

It has been shown that autophagy receptors can bind the autophagic protein LC3 *via* their LC3-binding domain and can also bind ubiquitin on the bacterial surface *via* their ubiquitin-binding domain (Lamark and Johansen, 2021). To demonstrate that p62 and NDP52 act as autophagy receptors for AIEC, we performed the immunofluorescent staining to observe a colocalization between NDP52 or p62 with AIEC LF82 bacteria and the autophagic protein LC3. **Figure 3A** shows a direct colocalization between LF82-GFP bacteria, p62 (blue) and LC3 (red). We also observed a colocalization between LF82-mCherry, NDP52 (magenta) and LC3-GFP (**Figure 3B**). Together, these results demonstrate that p62 and NDP52 are autophagy receptors responsible for the recognition and targeting AIEC LF82 bacteria to LC3-positive autophagosome.

### **NDP52 and p62 are required to control AIEC LF82-induced inflammation.**

It has been shown that AIEC LF82 bacteria are able to induce the production of pro-inflammatory cytokines by host cells (Nguyen et al., 2014; Bretin et al., 2016). Thus, we sought to analyze the role of NDP52 and p62 in the control of AIEC-induced pro-inflammatory cytokine production. In p62 KO HeLa cells, a significant increase in the amount of secreted IL-6 and IL-8 was detected at 4h, 10h and 24h post-LF82 infection compared to control cells (**Figures 4A and 4B**). Similarly, the amount of secreted IL-6 and IL-8 was increased in NDP52 KO HeLa cells compared to control cells after 4h, 8h and 24h of LF82 infection (**Figures 4C and 4D**). Together, these results showed that p62 and NDP52 are also required to limit AIEC LF82-induced pro-inflammatory cytokine production.

### **The CD-associated *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* variant does not impact AIEC LF82 intracellular replication in HeLa cells.**

As the *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* polymorphism has been associated with an increased susceptibility to develop CD (Ellinghaus et al., 2013), we investigated its potential impact on host response to AIEC infection. For this, NDP52 KO HeLa cells were transfected with a construct that expresses the wild-type NDP52 or the mutated NDP52<sup>Val248Ala</sup> protein. Western

blot analysis showed that the level of NDP52 protein in these cells were similar (**Figure 5A**). A flow cytometry experiment was performed to investigate the impact of the mutated NDP52<sup>Val248Ala</sup> protein on the control of host cells to AIEC LF82 infection. For this, NDP52 KO HeLa cells were transfected with the GFP plasmid expressing wild-type NDP52 or the mutated NDP52<sup>Val248Ala</sup> protein, and infected with the AIEC LF82-mCherry bacteria. Then, the percentage of mCherry-positive cells (LF82-infected cells) among GFP-positive cells (transfected cells) was determined by flow cytometry. This allowed to select only the transfected cells, and to count the transfected cells that are infected with LF82-mCherry. Our results showed that 67.3% of the cells expressing wild-type NDP52-GFP were infected, and 63% of the cells expressing NDP52<sup>Val248Ala</sup>-GFP were infected (**Figure 5B**). This result suggested that expression of the mutated NDP52<sup>Val248Ala</sup> protein did not seem to impact the percentage of LF82-infected cells. Furthermore, fluorescent microscopy analysis showed that the mutated NDP52<sup>Val248Ala</sup>-GFP protein was able to bind to the LF82-mCherry bacteria and the autophagic protein LC3 (magenta) as the wild-type NDP52 did (**Figure 5C**). Finally, we investigated the impact of the *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* variant on AIEC LF82 intracellular replication by gentamicin protection assay. No significant difference in the AIEC LF82 intracellular number at 4, 10 and 24 h post-infection was observed between HeLa cells expressing the wild-type NDP52 and the mutated NDP52<sup>Val248Ala</sup> protein (**Figure 5D**). Together, these results suggested that in HeLa cells, the CD-associated *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* polymorphism has no impact on AIEC recognition and targeting to autophagy, thus does not influence the control of AIEC intracellular replication.

### **The CD-associated *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* variant does not impact AIEC-induced NF- $\kappa$ B activation and pro-inflammatory production in HeLa cells.**

To further examine the impact of the CD-associated *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* polymorphism on the control of AIEC LF82-induced inflammation, NDP52 KO HeLa cells were transfected with the construct expressing the wild-type NDP52 or the mutated NDP52<sup>Val248Ala</sup> protein, and infected with the AIEC LF82 strain. No significant difference was observed in the amount of IL-6 and IL-8 cytokines secreted by HeLa cells expressing the wild-type NDP52 and those expressing the NDP52<sup>Val248Ala</sup> protein (**Figures 6A and 6B**). Furthermore, Western blot analysis showed a similar level of phospho-I $\kappa$ B in cells expressing the mutated NDP52<sup>Val248Ala</sup> protein compared to those expressing the wild-type NDP52 under both uninfected and LF82-

infected conditions (**Figure 6C**). These results suggested that the CD-associated *NDP52*<sup>Val248Ala</sup> polymorphism has no impact on AIEC-induced inflammation in HeLa cells.

## Discussion & Conclusion

Xenophagy is an important mechanism of selective autophagy allowing the degradation of intracellular pathogens. This specific elimination is ensured by autophagic receptors which act as a bridge between the cargo to be degraded and the LC3 molecules on autophagosome (Lamark and Johansen, 2021). Our group has shown that xenophagy is a key mechanism of host cells to eliminate intracellular AIEC bacteria, which have been emerged as an important player in the etiopathogenesis of CD (Larabi et al., 2020a). However, the receptor(s) that recognize AIEC and targeting the bacteria to autophagy have not been elucidated.

In this study, we demonstrated that NDP52 and p62 act as autophagy receptors for AIEC in intestinal epithelial cells, therefore limiting AIEC intracellular replication. Indeed, we showed that NDP52 and p62 receptors directly colocalized with intracellular AIEC LF82 bacteria and with LC3, a key protein for autophagosome formation (Klionsky et al., 2021). Furthermore, the depletion of NDP52 or p62 in intestinal epithelial cells led to an increase in the intracellular number of AIEC LF82 as well as other clinical AIEC strains. In line with our results, it has been shown that these two autophagic receptors are involved in the recognition of other intracellular bacteria, such as *Listeria monocytogenes* (Mostowy et al., 2011), *Shigella flexneri* (Mostowy et al., 2011) and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Thurston et al., 2009; Zheng et al., 2009). It has been highlighted that the same autophagy receptor can target different bacteria into different autophagosomes (Sharma et al., 2018). For example, Mostowy and co-workers showed that NDP52 and p62 target *Shigella flexneri* to autophagosomes in an actin-septin dependent manner, whereas they target *Listeria monocytogenes* to autophagosome via an autophagy pathway independently of septin or actin (Mostowy et al., 2011). Additionally, it has been shown that NDP52 and p62 can bind to distinct micro-domains of bacteria (Cemma et al., 2011). These studies reinforce the fact that different pathogens can induce different pathways of selective autophagy (Sharma et al., 2018), and thus the elucidation of autophagy receptors for each pathogen is of importance and needs to be further investigated.

As we have previously shown that AIEC can induce the production of pro-inflammatory cytokines by host intestinal epithelial cells (Nguyen et al., 2014; Bretin et al., 2016), we further investigated the role of NDP52 and p62 in controlling AIEC-induced inflammation. Our results highlighted that the depletion of NDP52 or p62 resulted in enhanced IL-6 and IL-8 secretion by intestinal epithelial cells upon AIEC infection. This indicates that NDP52 and p62 are required to control AIEC-induced inflammation.

Interestingly, a whole exome sequencing study identified an association between increased susceptibility to develop CD susceptibility and a common missense variant,

Val248Ala (SNP rs2303015), which leads to the replacement of valine by alanine at the position 248 (Ellinghaus et al., 2013). However, the exact implication of the *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* risk variant in CD etiopathogenesis remained a mystery. We hypothesized that this risk variant could lead to a defect in the control of AIEC intracellular replication, leading to AIEC abnormal replication and enhanced AIEC-induced inflammation, and this could be a potential mechanism by which the *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* variant may contribute to CD etiopathogenesis. Our results showed that the *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* risk variant does not appear to impact the control of AIEC LF82 by autophagy as the mutated *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* protein still colocalized with LF82 bacteria and LC3 as did the wild-type *NDP52* protein. Furthermore, in HeLa cells, under our experimental conditions, expression of the mutated *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* protein did not influence neither the replication of LF82 bacteria nor the LF82-induced NF- $\kappa$ B activation and pro-inflammatory cytokine production. These results suggest that the *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* variant may be implicated in CD etiopathogenesis *via* another mechanism, such as regulation of inflammation, rather than *via* impacting the autophagy-mediated control of AIEC colonization.

Indeed, the protein *NDP52* has been shown to be able to reduce inflammation via down-regulating the NF- $\kappa$ B signaling (Inomata et al., 2012; Ellinghaus et al., 2013). Ellinghaus and colleagues reported that while the wild-type *NDP52* was able to decrease NF- $\kappa$ B activation in response to the TLR agonist poly(I:C) in HeLa cells, the CD-associated *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* protein failed to do this (Ellinghaus et al., 2013). The authors thus proposed that under physiological state, wild-type *NDP52* could selectively degrade TLR adaptors or other PAMP (Pathogen-associated molecular pattern) receptors, inhibiting activation of the pro-inflammatory NF- $\kappa$ B signaling pathway. However, in pathological state, such as in CD, the *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* risk variant may fail to recognize polyubiquitinated TLR adaptors, inducing adaptor stabilization and consequently high NF- $\kappa$ B activity, thereby causing aggravated inflammation as observed in CD patients (Ellinghaus et al., 2013). The discrepancy between this work and our results could be explained by the fact that, contrary to Ellinghaus and co-authors who used poly(I:C) to induce the NF- $\kappa$ B pathway, we used an AIEC infection model. In our AIEC-infected HeLa cell model, the impact of wild-type *NDP52* and mutated *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* protein on inflammation are similar. But we could imagine that in specific pathological condition, the charge of AIEC could be different compared to our experimental condition, and under these conditions, NF- $\kappa$ B activation might be much increased, and cannot be down-regulated by the mutated *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* protein. The implication of the *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* risk variant in CD etiopathogenesis thus need to be further investigated using different models of experimentation.

In conclusion, our results demonstrated that NDP52 and p62 are autophagy receptors responsible for the targeting of AIEC to autophagy pathway, thus controlling AIEC intracellular replication and AIEC-induced inflammation.



**Acknowledgements:** We would like to thank Professor Richard J. Youle (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland USA) for kindly providing us NDP52 KO and SQSTM1 KO cells. We thank the platforms CLIC (Clermont-Ferrand Imagerie Confocale) and SC3 (Single cell & Cell culture facilities) of University of Clermont Auvergne for assistance with confocal microscopy and flow cytometry analyses, respectively. We thank Drs. Aurore Rozières and Christophe Viret and professor Mathias Faure for their kind help with cell lines and valuable discussions. We thank Margot Fargeas and Caroline Chevarin for their help with bacterial strains.

**Funding:** This work was supported by the “Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation” (MESRI), Inserm (Institut national de la santé et de la recherche médicale; UMR1071), INRAe (Institut national de recherche en agriculture, alimentation et environnement; USC 1382), the Agence Nationale de la Recherche of the French government through the program “Investissements d’Avenir” I-SITE CAP 20-25 (Projects HAPPYCROHN, RUNNINGUT and EXOCROHN to Hang Nguyen) and the ANR (French National Research Agency; project AAPG2021\_RESTOGUT to Hang Nguyen and project AAPG2022\_TOPIC to Nicolas Barnich and Hang Nguyen).

**Author contributions:** Alison Da Silva performed the experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript. Guillaume Dalmasso performed the experiments and critically revised the manuscript for important intellectual content. Anaïs Larabi, My Hanh Thi Hoang and Elisabeth Billard performed the experiments. Nicolas Barnich developed experimental concepts and designs, and critically revised the manuscript. Hang Nguyen developed experimental concepts and designs, performed the experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript.

**Contribution to the field statement:**

Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory disease of the gastrointestinal tract. To date, there is no medical cure for CD, and the current therapies are limited to symptomatic treatments and recurrence prevention. It has been shown that the ileal mucosa of CD patients is abnormally colonized with adherent-invasive *E. coli* (AIEC), which play an important role in the etiopathogenesis of CD. We previously showed that autophagy, a cellular degradative process, is necessary to eliminate invasive AIEC. In the current study, we identified the autophagy receptor(s) responsible to recognize AIEC and target them to autophagy for degradation. Our

results advance our knowledge on the molecular mechanism underlying the interaction between AIEC and host cells. In the future, this could contribute to the development of strategies targeting AIEC, thus limiting AIEC-induced intestinal inflammation.

## References

- Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Øvervatn, A., et al. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *Journal of Cell Biology* 171, 603–614. doi: 10.1083/jcb.200507002.
- Bretin, A., Carrière, J., Dalmaso, G., Bergougnoux, A., B'chir, W., Maurin, A.-C., et al. (2016). Activation of the EIF2AK4-EIF2A/eIF2 $\alpha$ -ATF4 pathway triggers autophagy response to Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* infection. *Autophagy* 12, 770–783. doi: 10.1080/15548627.2016.1156823.
- Bretin, A., Lucas, C., Larabi, A., Dalmaso, G., Billard, E., Barnich, N., et al. (2018). AIEC infection triggers modification of gut microbiota composition in genetically predisposed mice, contributing to intestinal inflammation. *Sci Rep* 8, 12301. doi: 10.1038/s41598-018-30055-y.
- Buisson, A., Douadi, C., Ouchchane, L., Goutte, M., Hugot, J.-P., Dubois, A., et al. (2019). Macrophages Inability to Mediate Adherent-Invasive *E. coli* Replication is Linked to Autophagy in Crohn's Disease Patients. *Cells* 8, 1394. doi: 10.3390/cells8111394.
- Buisson, A., Sokol, H., Hammoudi, N., Nancey, S., Treton, X., Nachury, M., et al. (2023). Role of adherent and invasive *Escherichia coli* in Crohn's disease: lessons from the postoperative recurrence model. *Gut* 72, 39–48. doi: 10.1136/gutjnl-2021-325971.
- Buisson, A., Vazeille, E., Fumery, M., Pariente, B., Nancey, S., Seksik, P., et al. (2021). Faster and less invasive tools to identify patients with ileal colonization by adherent-invasive *E. coli* in Crohn's disease. *United European Gastroenterol. j.* 9, 1007–1018. doi: 10.1002/ueg2.12161.
- Carrière, J., Bretin, A., Darfeuille-Michaud, A., Barnich, N., and Nguyen, H. T. T. (2016). Exosomes Released from Cells Infected with Crohn's Disease-associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Activate Host Innate Immune Responses and Enhance Bacterial Intracellular Replication. *Inflamm Bowel Dis* 22, 516–528. doi: 10.1097/MIB.0000000000000635.
- Carrière, J., Darfeuille-Michaud, A., and Nguyen, H. T. T. (2014). Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 20, 12102–12117. doi: 10.3748/wjg.v20.i34.12102.
- Cemma, M., Kim, P. K., and Brumell, J. H. (2011). The ubiquitin-binding adaptor proteins p62/SQSTM1 and NDP52 are recruited independently to bacteria-associated microdomains to target Salmonella to the autophagy pathway. *Autophagy* 7, 341–345. doi: 10.4161/auto.7.3.14046.
- Dalmaso, G., Nguyen, H. T. T., Faïs, T., Massier, S., Barnich, N., Delmas, J., et al. (2019). Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Manipulate Host Autophagy by Impairing SUMOylation. *Cells* 8, 35. doi: 10.3390/cells8010035.
- Dalmaso, G., Nguyen, H. T. T., Faïs, T., Massier, S., Chevarin, C., Vazeille, E., et al. (2021). Yersiniabactin Siderophore of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Is Involved in Autophagy Activation in Host Cells. *Int J Mol Sci* 22, 3512. doi: 10.3390/ijms22073512.

- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., et al. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127, 412–421. doi: 10.1053/j.gastro.2004.04.061.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., et al. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115, 1405–1413. doi: 10.1016/S0016-5085(98)70019-8.
- Ellinghaus, D., Zhang, H., Zeissig, S., Lipinski, S., Till, A., Jiang, T., et al. (2013). Association Between Variants of PRDM1 and NDP52 and Crohn's Disease, Based on Exome Sequencing and Functional Studies. *Gastroenterology* 145, 339–347. doi: 10.1053/j.gastro.2013.04.040.
- Franco, L. H., Nair, V. R., Scharn, C. R., Xavier, R. J., Torrealba, J. R., Shiloh, M. U., et al. (2017). The Ubiquitin Ligase Smurf1 Functions in Selective Autophagy of *Mycobacterium tuberculosis* and Anti-tuberculous Host Defense. *Cell Host & Microbe* 21, 59–72. doi: 10.1016/j.chom.2016.11.002.
- Heo, J.-M., Ordureau, A., Paulo, J. A., Rinehart, J., and Harper, J. W. (2015). The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy. *Molecular Cell* 60, 7–20. doi: 10.1016/j.molcel.2015.08.016.
- Inomata, M., Niida, S., Shibata, K., and Into, T. (2012). Regulation of Toll-like receptor signaling by NDP52-mediated selective autophagy is normally inactivated by A20. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 963–979. doi: 10.1007/s00018-011-0819-y.
- Ivanov, S., and Roy, C. R. (2009). NDP52: the missing link between ubiquitinated bacteria and autophagy. *Nat Immunol* 10, 1137–1139. doi: 10.1038/ni1109-1137.
- Kirkin, V., Lamark, T., Sou, Y.-S., Bjørkøy, G., Nunn, J. L., Bruun, J.-A., et al. (2009). A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates. *Molecular Cell* 33, 505–516. doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.020.
- Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., et al. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. *Autophagy* 17, 1–382. doi: 10.1080/15548627.2020.1797280.
- Lamark, T., and Johansen, T. (2021). Mechanisms of Selective Autophagy. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 37, 143–169. doi: 10.1146/annurev-cellbio-120219-035530.
- Lapaquette, P., Bringer, M.-A., and Darfeuille-Michaud, A. (2012). Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell Microbiol* 14, 791–807. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01768.x.
- Lapaquette, P., Glasser, A.-L., Huett, A., Xavier, R. J., and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol* 12, 99–113. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01381.x.

- Larabi, A., Barnich, N., and Nguyen, H. T. T. (2020a). New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD. *Autophagy* 16, 38–51. doi: 10.1080/15548627.2019.1635384.
- Larabi, A., Dalmasso, G., Delmas, J., Barnich, N., and Nguyen, H. T. T. (2020b). Exosomes transfer miRNAs from cell-to-cell to inhibit autophagy during infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli*. *Gut Microbes* 11, 1677–1694. doi: 10.1080/19490976.2020.1771985.
- Lazarou, M., Sliter, D. A., Kane, L. A., Sarraf, S. A., Wang, C., Burman, J. L., et al. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 524, 309–314. doi: 10.1038/nature14893.
- Mostowy, S., Sancho-Shimizu, V., Hamon, M. A., Simeone, R., Brosch, R., Johansen, T., et al. (2011). p62 and NDP52 Proteins Target Intracytosolic *Shigella* and *Listeria* to Different Autophagy Pathways. *Journal of Biological Chemistry* 286, 26987–26995. doi: 10.1074/jbc.M111.223610.
- Nguyen, H. T. T., Dalmasso, G., Müller, S., Carrière, J., Seibold, F., and Darfeuille-Michaud, A. (2014). Crohn's disease-associated adherent invasive *Escherichia coli* modulate levels of microRNAs in intestinal epithelial cells to reduce autophagy. *Gastroenterology* 146, 508–519. doi: 10.1053/j.gastro.2013.10.021.
- Nguyen, H. T. T., Lapaquette, P., Bringer, M.-A., and Darfeuille-Michaud, A. (2013). Autophagy and Crohn's disease. *J Innate Immun* 5, 434–443. doi: 10.1159/000345129.
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., et al. (2007). p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 282, 24131–24145. doi: 10.1074/jbc.M702824200.
- Sharma, V., Verma, S., Seranova, E., Sarkar, S., and Kumar, D. (2018). Selective Autophagy and Xenophagy in Infection and Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 147. doi: 10.3389/fcell.2018.00147.
- Thurston, T. L. M., Ryzhakov, G., Bloor, S., Von Muhlinen, N., and Randow, F. (2009). The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat Immunol* 10, 1215–1221. doi: 10.1038/ni.1800.
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F., and Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *The Lancet* 389, 1741–1755. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31711-1.
- Tumbarello, D. A., Manna, P. T., Allen, M., Bycroft, M., Arden, S. D., Kendrick-Jones, J., et al. (2015). The Autophagy Receptor TAX1BP1 and the Molecular Motor Myosin VI Are Required for Clearance of *Salmonella* Typhimurium by Autophagy. *PLoS Pathog* 11, e1005174. doi: 10.1371/journal.ppat.1005174.
- Vainshtein, A., and Grumati, P. (2020). Selective Autophagy by Close Encounters of the Ubiquitin Kind. *Cells* 9, 2349. doi: 10.3390/cells9112349.
- Vazeille, E., Buisson, A., Bringer, M.-A., Goutte, M., Ouchchane, L., Hugot, J.-P., et al. (2015). Monocyte-derived macrophages from Crohn's disease patients are impaired in the ability to

control intracellular adherent-invasive *Escherichia coli* and exhibit disordered cytokine secretion profile. *J Crohns Colitis* 9, 410–420. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv053.

Von Muhlinen, N., Thurston, T., Ryzhako, G., Bloor, S., and Randow, F. (2010). NDP52, a novel autophagy receptor for ubiquitin-decorated cytosolic bacteria. *Autophagy* 6, 288–289. doi: 10.4161/auto.6.2.11118.

Waters, S., Marchbank, K., Solomon, E., Whitehouse, C., and Gautel, M. (2009). Interactions with LC3 and polyubiquitin chains link nbr1 to autophagic protein turnover. *FEBS Letters* 583, 1846–1852. doi: 10.1016/j.febslet.2009.04.049.

Wild, P., Farhan, H., McEwan, D. G., Wagner, S., Rogov, V. V., Brady, N. R., et al. (2011). Phosphorylation of the Autophagy Receptor Optineurin Restricts *Salmonella* Growth. *Science* 333, 228–233. doi: 10.1126/science.1205405.

Zheng, Y. T., Shahnazari, S., Brech, A., Lamark, T., Johansen, T., and Brumell, J. H. (2009). The Adaptor Protein p62/SQSTM1 Targets Invading Bacteria to the Autophagy Pathway. *The Journal of Immunology* 183, 5909–5916. doi: 10.4049/jimmunol.0900441.

## Figures legends

### **Figure 1: NDP52 and p62 are implicated in the control of AIEC LF82 intracellular replication in T84 cells.**

T84 cells were transfected with 50 nM of control siRNA or siRNA against NDP52, p62 or Optineurin (A) or TAX1BP1, NBR1, or Optineurin (B). 48 h after transfection, the cells were infected with AIEC LF82 strain at a MOI of 10 for 3 h. The cells were then wash and incubated with the infection media containing 100 µg/ml gentamicin for 1, 7 or 21 h, which corresponded to 4, 10 or 24 h post-infection on the graph respectively. The cells were washed, lysed and plated on LB agar plate to determine the colony-forming units of LF82. Results are presented as means ± SEM from at least 4 independent experiments. Statistical analyses were performed using one-way Anova test followed by a post-test Bonferroni correction. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ .

### **Figure 2: Depletion of NDP52 and p62 leads to enhanced intracellular number of clinical AIEC strains in T84 cells.**

P62 KO HeLa (A, C) or NDP52 KO HeLa (B, D) cells and their corresponding control cells were infected with the AIEC LF82 strain (A, B) or the K12 C600 strain or different clinical AIEC strains LF82, CEA501S, CEA614S (C, D) at a MOI of 10 for 3 h. The cells were then wash and incubated with the infection media containing 100 µg/ml gentamicin for 1, 7 or 21 h (A, B) or 1 h (C, D). The cells were washed, lysed and plated on LB agar plate to determine the bacterial colony-forming units. Results are presented as means ± SEM from 3 independent experiments. Statistical analyses were performed using one-way Anova test followed by a post-test Bonferroni correction. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ .

### **Figure 3: NDP52 and p62 directly colocalize with AIEC LF82 bacteria and the autophagic LC3 protein in HeLa cells.**

(A) HeLa cells were infected with AIEC LF82-GFP at a MOI of 100 for 3 h, washed and incubated with 100 µg/ml gentamicin for 3 h. Immunofluorescent labeling to detect p62 (blue) and LC3 (red) was performed. (B) HeLa-LC3-GFP cells were infected with AIEC LF82-mCherry at a MOI of 100 for 3 h, washed and incubated with 100 µg/ml gentamicin for 3 h. Immunofluorescent labeling to detect NDP52 (magenta) was performed. Observation was performed on a Zeiss LSM 800 Airyscan confocal microscope. Bars: 2 µm.

**Figure 4: Depletion of NDP52 and p62 leads to increased AIEC LF82-induced pro-inflammatory cytokine production in HeLa cells.**

p62 KO (A, B) or NDP52 KO (C, D) HeLa cells and their corresponding control cells were infected with AIEC LF82 strain at a MOI of 10 for 3 h. The cells were then washed and incubated with the infection media containing 100 µg/ml gentamicin for 1, 7 or 21 h, which corresponded to 4, 10 or 24 h post-infection on the graphs respectively. Cell culture supernatants were collected at 4, 10 and 24 h post-infection, and the amount of secreted IL-6 (A, C) and IL-8 (B, D) were analyzed by ELISA. Results are presented as means ± SEM from 3 independent experiments. Statistical analyses were performed using one-way Anova test followed by a post-test Bonferroni correction. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ .

**Figure 5: The CD-associated NDP52<sup>Val248Ala</sup> variant does not impact AIEC LF82 intracellular replication in HeLa cells.**

(A) Western blot analysis for NDP52 expression in NDP52 KO HeLa cells transfected with different quantities (250, 500, 750 or 1000 ng/well) of a construct that expresses wild-type NDP52 or the mutated NDP52<sup>Val248Ala</sup> or the empty plasmid or with different volumes of vehicle (corresponding to the volumes of plasmid added). HeLa cells from ATCC and the corresponding control cells of NDP52 KO cells were used in parallel. (B, C) NDP52 KO HeLa cells expressing NDP52-GFP or NDP52<sup>Val248Ala</sup>-GFP were infected with AIEC LF82-mCherry at a MOI of 100 for 3 h. The cells were then washed and incubated with the infection media containing 100 µg/ml gentamicin for 3 h. (B) The percentage of mCherry-positive cells (LF82-infected cells) among GFP-positive cells (transfected cells) was determined by flow cytometry. (C) Immunofluorescent labeling to detect LC3 (magenta) was performed. Observation was performed on a Zeiss LSM 800 Airyscan confocal microscope. Bars: 2 µm. (D) NDP52 KO HeLa cells transfected with the construct expressing wild-type NDP52 or NDP52<sup>Val248Ala</sup> protein were infected with AIEC LF82 at a MOI of 100 for 3 h. The cells were then washed and incubated with the infection media containing 100 µg/ml gentamicin for 1, 7 or 21 h, which corresponded to 4, 10 or 24 h post-infection on the graphs, respectively. The cells were washed, lysed and plated on LB agar plates to determine the bacterial colony-forming units (CFUs). Results are presented as medians of values from 3 independent experiments.



**Figure 6: The CD-associated *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* variant does not impact AIEC LF82-induced NF- $\kappa$ B activation and pro-inflammatory production in HeLa cells.**

NDP52 KO HeLa cells were transfected with a construct that expresses wild-type NDP52 or the mutated NDP52<sup>Val248Ala</sup> (A-C) or the empty plasmid (C), and were infected with AIEC LF82 at a MOI of 100 for 3 h. The cells were then washed and incubated with the infection media containing 100  $\mu$ g/ml gentamicin for 1, 7 or 21 h (which corresponded to 4, 10 or 24 h post-infection on the graphs respectively) (A, B) or 3 h (C). (A, B) Cell culture supernatants were collected at 4, 10 and 24 h post-infection, and the amounts of secreted IL-6 and IL-8 were analyzed by ELISA. Results are presented as means  $\pm$  SEM from 3 independent experiments. (C) Western blot analysis for phospho-I $\kappa$ B levels.

Figure 1

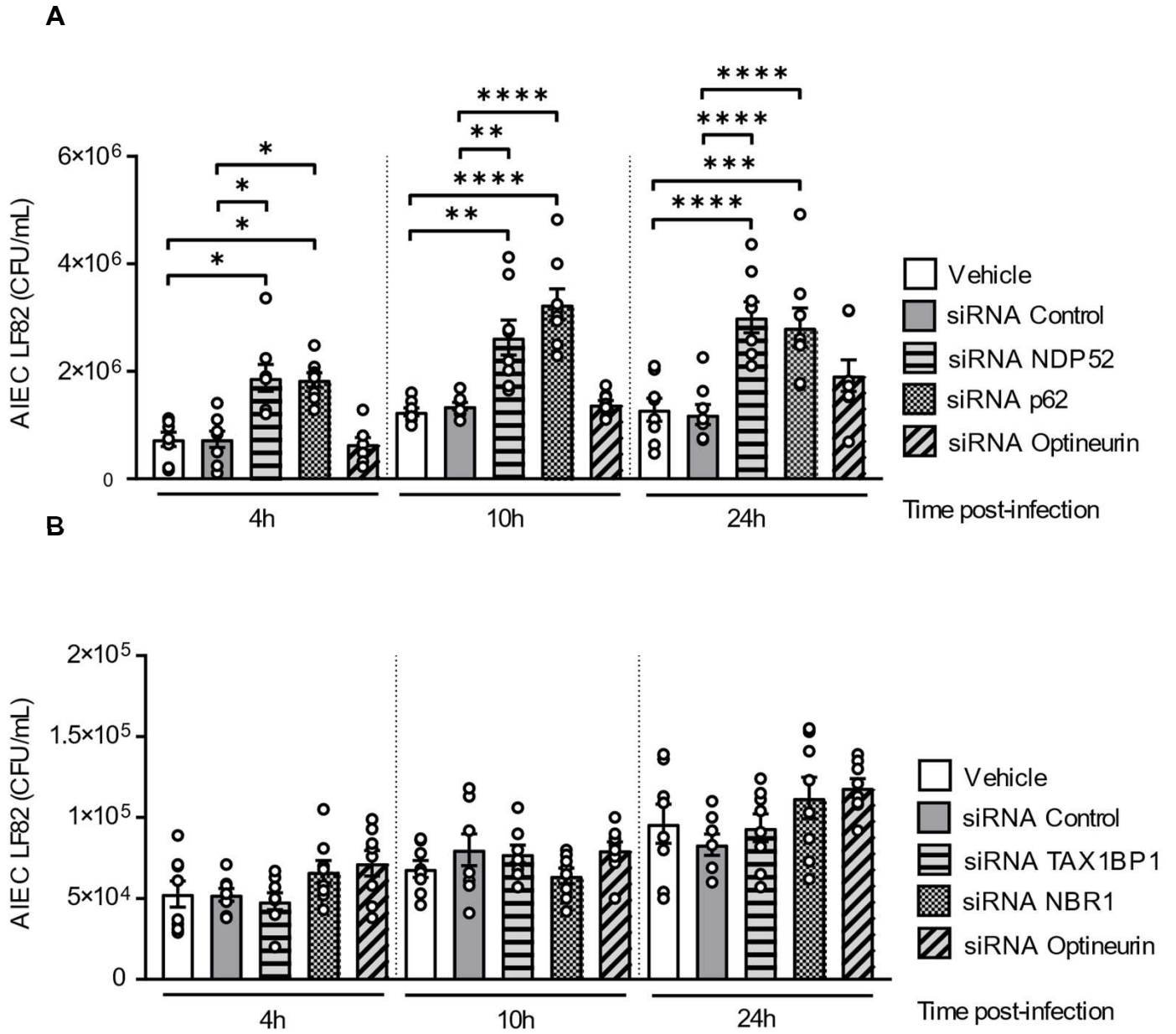


Figure 2

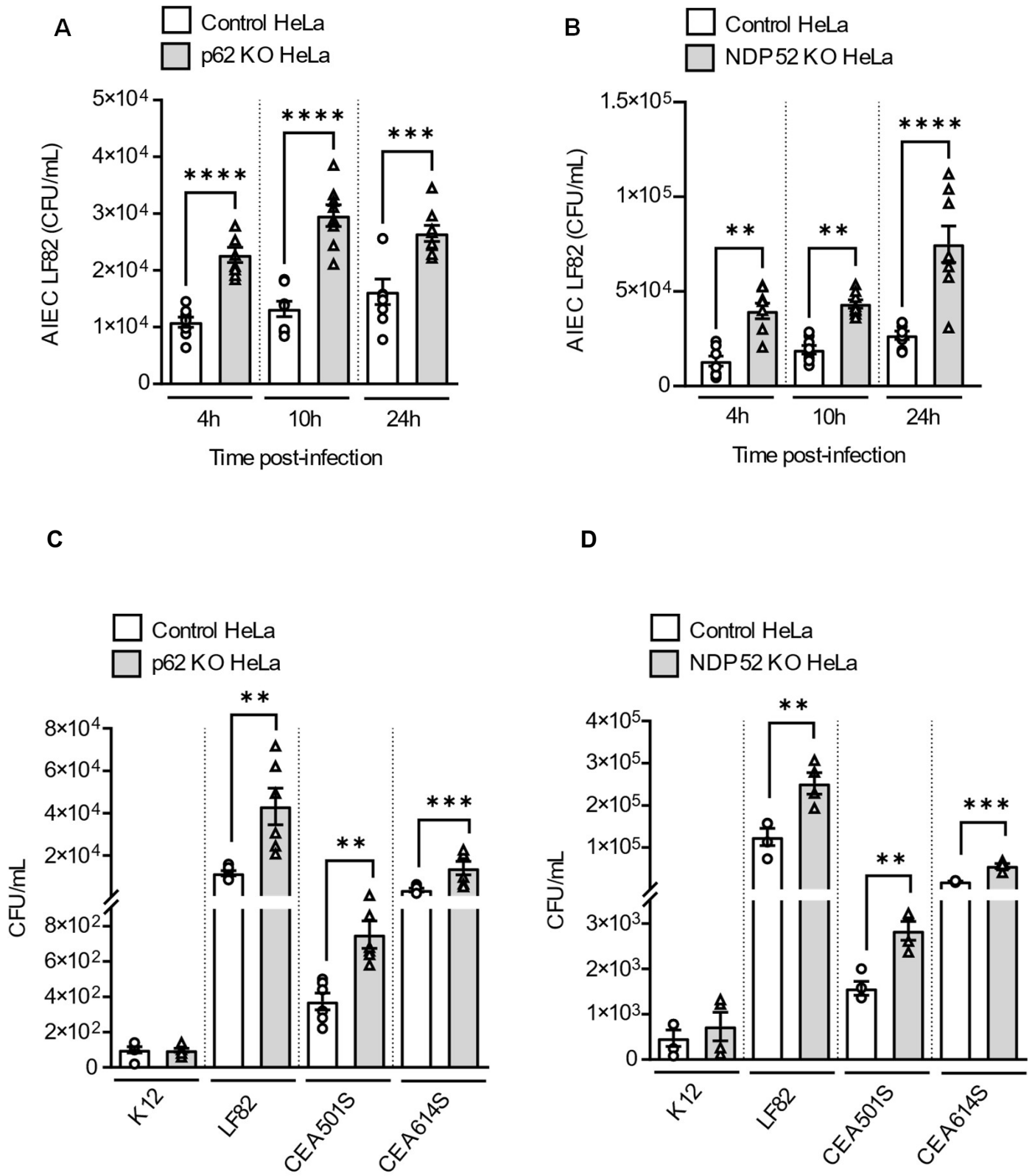


Figure 3

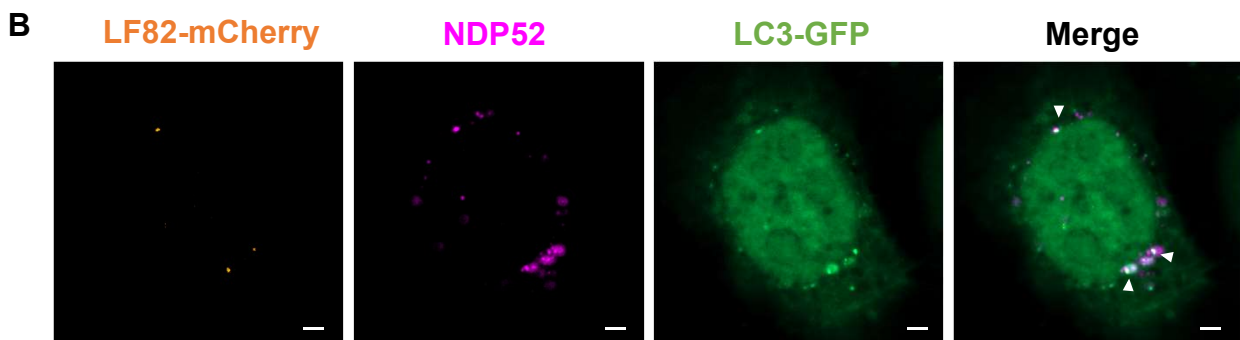
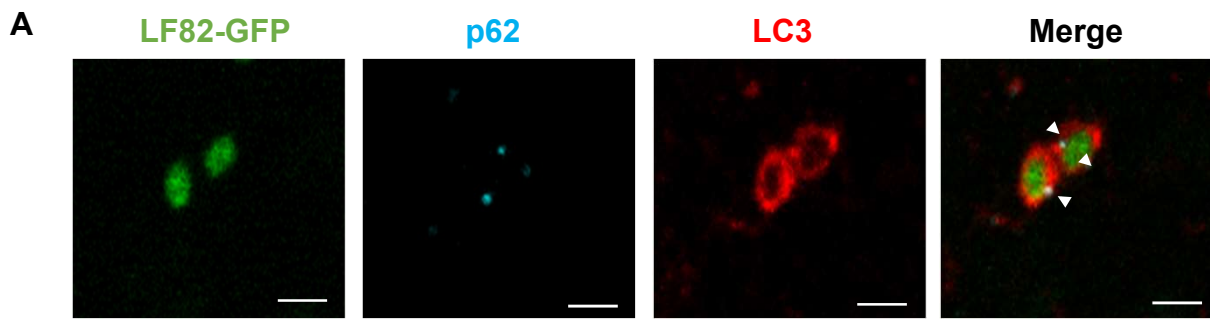
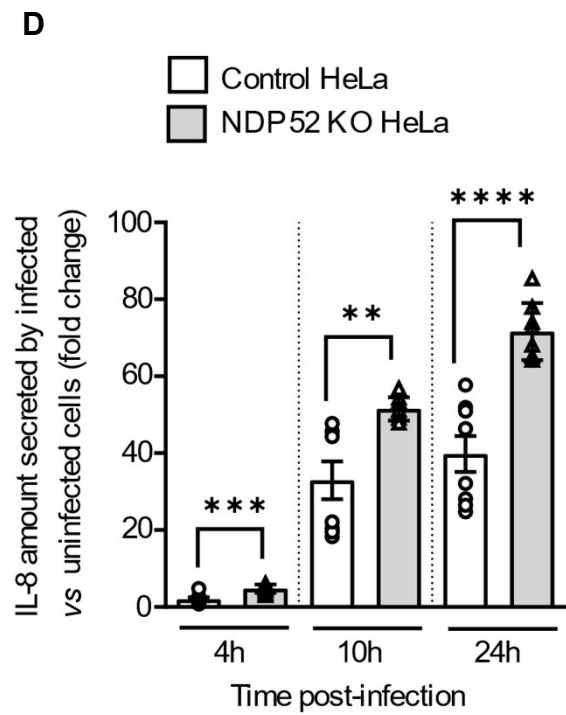
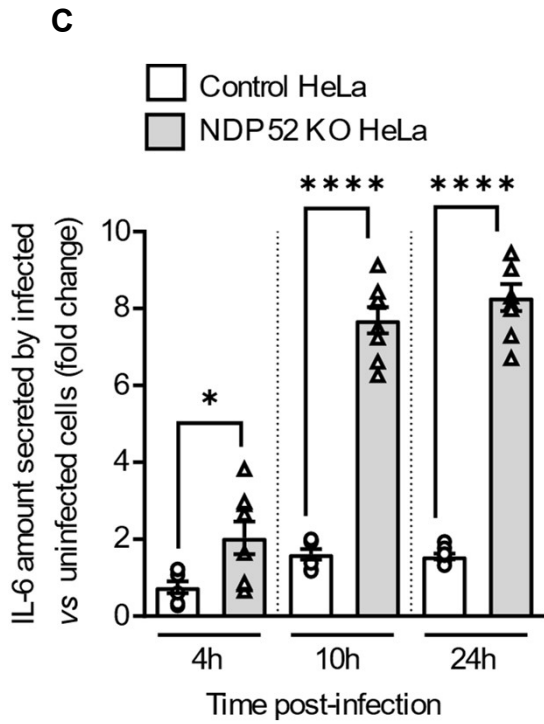
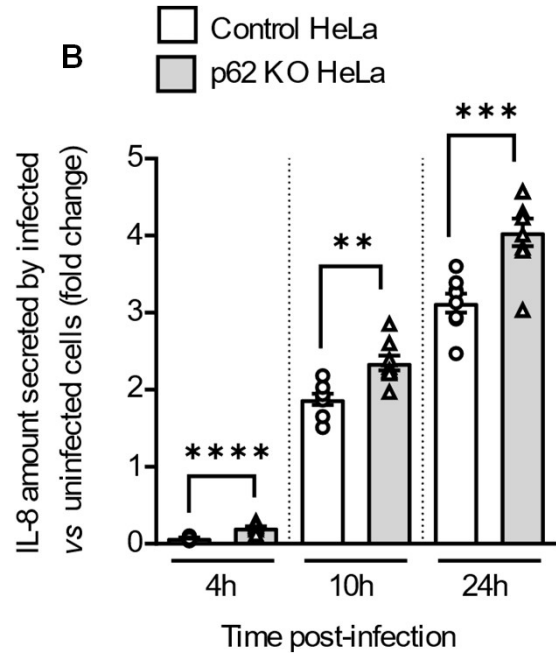
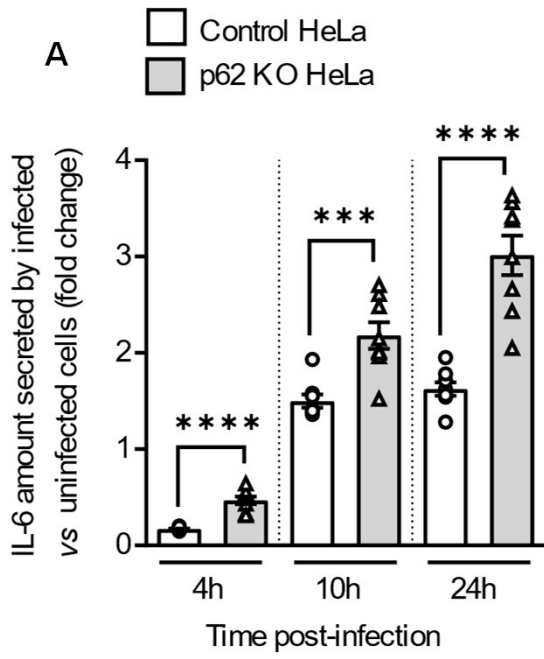
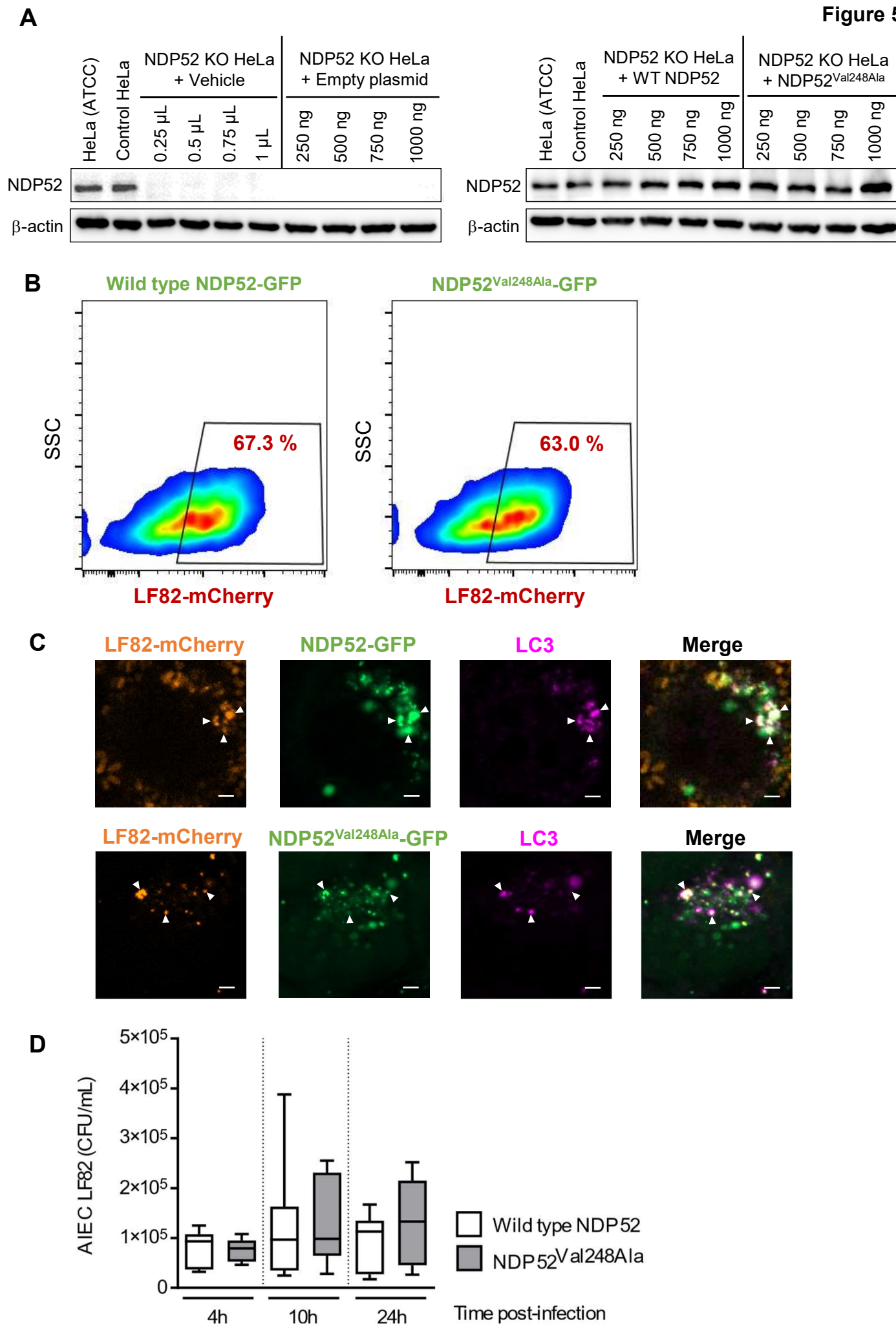


Figure 4



**Figure 5**





### IV.3 Identification des facteurs de virulence nécessaires aux bactéries AIEC pour échapper à l'autophagie

Bien que la plupart des bactéries intracellulaires soient éliminées par l'autophagie, certaines d'entre elles développent diverses stratégies pour contourner le processus autophagique. Concernant les AIEC, il a été montré que ces bactéries sont capables de réguler les niveaux des miARN-130a et -30c des cellules hôtes (Nguyen et al., 2014), ou d'altérer la SUMOylation de l'hôte (Dalmaso et al., 2019) afin d'inhiber l'autophagie. Toutefois, jusqu'à présent, les facteurs de virulence des AIEC impliqués dans l'échappement à l'autophagie n'ont pas encore été mis en évidence. Ainsi, l'objectif de cette étude était d'**identifier les gènes nécessaires aux bactéries AIEC pour échapper à l'autophagie, en utilisant une approche sans à priori de Tn-Seq** (transposon sequencing).

Pour cela, une banque de mutants d'insertion de la souche AIEC LF82 a été créée de manière « saturée », c'est-à-dire que chacun des gènes du génome bactérien a été interrompu par au moins un transposon, conduisant à son invalidation (Yamaichi and Dörr, 2017). Cette banque de mutants, appelée « input », a été utilisée pour infecter des cellules HeLa contrôles et des cellules déficientes pour l'autophagie. À 24h post-infection, l'ADN des mutants a été extrait et les sites d'insertion du transposon ont été déterminés par séquençage.

Les données de séquençage ont permis d'identifier 3 735 gènes présents dans la souche AIEC LF82. Deux clusters ont été définis selon le nombre de « reads » obtenus pour chaque gène inséré par un transposon. Dans le cluster 1 (2 935 gènes), la plupart des gènes sont sur-représentés ou légèrement sur-représentés dans les cellules HeLa contrôles, comparé à « l'input ». Au contraire, dans le cluster 2 (800 gènes), les gènes sont sous-représentés dans les cellules HeLa contrôles par rapport à « l'input », suggérant que ces mutants présentent un défaut d'adhésion et/ou d'invasion des cellules HeLa et donc, que ces gènes seraient potentiellement impliqués dans ces deux processus. Nous avons réalisé une analyse « STRING » qui permet de mettre en évidence des relations connues entre les protéines et de réaliser des analyses « gene ontology » pour identifier des voies enrichies. L'analyse « STRING » réalisée sur les 800 gènes du cluster 2, a révélé que certains d'entre eux ont déjà été identifiés pour être impliqués dans les processus d'adhésion et/ou d'invasion, comme les gènes impliqués dans la mise en place du système flagellaire, ou les gènes de l'opéron Fim impliqués dans la synthèse des pili de type I. Ces résultats démontrent la robustesse de la technique, et l'analyse plus fine des autres mutants invalidés dans des gènes d'intérêt nous permettra, à l'avenir, d'identifier de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans l'adhésion et/ou l'invasion de la souche AIEC LF82 dans les cellules épithéliales.

Ensuite, une augmentation significative du nombre de mutants intracellulaires a été observée dans les cellules HeLa déficientes pour l'autophagie à 6, 12 et 24h post-infection, comparativement aux cellules HeLa contrôles, montrant le rôle primordial de l'autophagie dans l'élimination des bactéries. Parmi les 3 735 gènes de la souche AIEC LF82, les mutants invalidés dans 68 d'entre eux sont significativement sous-représentés (clus-



ter 1 avec 29 gènes) ou sur-représentés (cluster 2 avec 39 gènes) dans les cellules déficientes pour l'autophagie par rapport aux cellules contrôles. Ainsi, les gènes du cluster 2 sont les gènes potentiellement nécessaires aux AIEC pour échapper à l'autophagie. D'après la littérature, bien que la fonction de certains de ces 68 gènes ne soit pas clairement identifiée, aucun d'eux n'a une fonction connue dans l'autophagie, suggérant un nouveau rôle pour certains de ces gènes dans l'autophagie.

Enfin, nous avons analysé plus en détail ces 68 gènes afin de déterminer s'ils appartiennent au core génome des *E. coli*. Cette analyse a permis d'identifier 22 gènes absents dans le core génome et présents dans le génome de la souche AIEC LF82. Il sera désormais nécessaire de déterminer si ces 22 gènes sont également présents dans le génome des autres souches AIEC disponibles au laboratoire, afin de définir si certains d'entre eux pourraient être utilisés comme un marqueur moléculaire caractéristique des AIEC. L'identification plus précise de ces gènes pourrait être un premier axe de recherche pour cibler spécifiquement les gènes présents dans la souche AIEC LF82 pour échapper à l'autophagie.

Par conséquent, la suite de ce projet consistera à créer des mutants isogéniques invalidés pour les gènes identifiés et d'étudier leur interaction avec l'autophagie dans les cellules hôtes. Ce travail a permis de développer la technique Tn-Seq dans une souche AIEC et de confirmer que cette technique peut être utilisée pour identifier les gènes impliqués dans l'adhésion et/ou l'invasion ou dans l'échappement à l'autophagie. Ainsi, cette étude permettrait, à l'avenir, d'identifier de nouvelles cibles pour limiter la virulence des AIEC.

Ces travaux sont présentés ici sous forme d'un article scientifique, qui sera soumis après une caractérisation phénotypique des gènes identifiés par la technique Tn-Seq.

**Identification of virulence factors for the Crohn's disease-associated adherent-invasive  
*Escherichia coli* to escape from autophagy**

Alison Da Silva<sup>1</sup>, Jérémy Denizot<sup>1</sup>, Adrien Camus<sup>2</sup>, Michaël Rodrigues<sup>1</sup>, Aurélien Birer<sup>1</sup>,  
Olivier Espéli<sup>2</sup>, Nicolas Barnich<sup>1,#,\*</sup>, Hang Nguyen<sup>1,#,\*</sup>

<sup>1</sup>M2iSH, UMR 1071 Inserm, Université Clermont Auvergne, INRAe USC 1382, CNRH, 63001  
Clermont-Ferrand, France.

<sup>2</sup>CIRB, Collège de France, Paris, France.

#These authors contributed equally to this work

\*Correspondences: [hang.nguyen@uca.fr](mailto:hang.nguyen@uca.fr) or [nicolas.barnich@uca.fr](mailto:nicolas.barnich@uca.fr)

Tel.: (+33)473178345; Fax: (+33)473178371.

## Abstract

Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory bowel disease, of which the etiology involves genetic, environmental and microbial factors. Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) and polymorphisms in autophagy-related genes (*ATG16L1*, *IRGM*, *ULK1*, etc.) have been identified as risk factor for CD. Autophagy is a key process for the maintenance of cellular homeostasis, which allows the degradation of damaged cytoplasmic components and pathogens *via* lysosome. Some intracellular pathogens develop various strategies to escape autophagy degradation, or even to hijack this mechanism for their own replication. Although upon AIEC infection, autophagy is induced in host cells to eliminate the bacteria, some AIEC are still able to replicate intracellularly. Here, we investigated the virulence factors necessary for AIEC to escape from autophagy control using the Transposon Sequencing (Tn-Seq) technique. For that, a mutant library of the AIEC LF82 strain was created so that each gene of the LF82 genome was inserted by at least one transposon, leading to gene inactivation. This mutant library was used to infect control and autophagy-deficient HeLa cells. At 24 hours post-infection, the intracellular bacterial DNA was extracted and sequenced, allowing the identification of 68 genes differentially represented between the two conditions. We propose that the mutants found with increased amount in autophagy-deficient cells *versus* control cells are degraded by a functional autophagy in control HeLa cells. In other words, the mutants found with increased amount in autophagy-deficient cells are inactivated in the genes which are required for them to escape from autophagy. Thus, the mutated genes over-represented in autophagy-deficient HeLa cells compared to control cells are the potential genes necessary for AIEC to escape from autophagy. Further investigations are necessary to confirm the physiological role of the identified genes. In conclusion, this study allowed the identification of potential genes necessary for AIEC to escape from autophagy control of host cells, thus advancing our knowledge on AIEC-host interaction.

Keywords: Crohn's disease, adherent-invasive *E. coli* (AIEC), autophagy, Tn-Seq.

## Introduction

Crohn's disease (CD) is an inflammatory bowel disease (IBD) characterized by chronic inflammation of any part of the gastrointestinal tract (Roda et al., 2020). Evidence has shown that CD resulted from a complex interplay between environmental factors and genetic susceptibility, leading to dysregulated immune responses against the intestinal microbiota (Carrière et al., 2014). To date, no curative treatment is available for CD patients, and only symptomatic treatments are proposed to limit the intensity and the frequency of the inflammatory flare (Roda et al., 2020; Torres et al., 2017). This indicates a need to fully elucidate the underlying causes of the disease.

Intestinal dysbiosis with altered composition and diversity of the microbiota has been consistently described in patients with IBD (Caparrós et al., 2021). It has been shown that the intestinal mucosa of CD patients is abnormally colonized by adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) pathobionts (Baumgart et al., 2007; Darfeuille-Michaud et al., 1998, 2004; Martinez-Medina et al., 2009; O'Brien et al., 2017; Raso et al., 2011). AIEC bacteria are characterized by their abilities to adhere to and to invade intestinal epithelial cells, to survive and replicate within macrophages without inducing cell death, and to induce the release of pro-inflammatory cytokines (Boudeau et al., 1999; Darfeuille-Michaud et al., 1998, 2004; Glasser et al., 2001). Furthermore, our group has shown that the replication ability of AIEC is increased in macrophages from CD patients compared to healthy individuals (Vazeille et al., 2015), and that the defect in AIEC clearance of CD patients-derived macrophages is linked to the polymorphisms in autophagy-related genes, including *IRGM* (immunity-related GTPase family M) and *ULK-1* (unc-51 like autophagy activating kinase 1) (Buisson et al., 2019). Our recent study showed that AIEC presence within the neoterminal ileum at 6 months after surgery was associated with higher rate of early ileal lesions, suggesting that AIEC could be involved in the early stages of CD development (Buisson et al., 2023). Furthermore, the presence of AIEC within the surgical specimen is predictive of endoscopic post-operative recurrence at 6 months (Buisson et al., 2023). This study strongly demonstrates the clinical relevance of AIEC implication in the etiopathogenesis of CD.

Autophagy is a tightly regulated and conserved catabolic process by which the cell degrades cytoplasmic components, such as misfolded proteins, damaged organelles or invasive pathogens, *via* lysosome (Klionsky et al., 2021). Autophagy is initiated by the formation of the isolated double-membrane phagophore, which elongates and matures to form an autophagosome. Autophagosome then fuses with lysosome, leading to the degradation of its content (Klionsky et al., 2021). Our group has shown that upon AIEC infection, autophagy is

induced in host cells, and a functional autophagy is necessary to limit the intracellular replication of AIEC (Bretin et al., 2016; Dalmaso et al., 2021; Lapaquette et al., 2010, 2012; Nguyen et al., 2014). We also showed that while host cells induce a functional autophagy to eliminate AIEC, AIEC can subvert autophagy by upregulating the levels of microRNAs 130a and 30c of host cells (Nguyen et al., 2014) or by impairing host SUMOylation, a eukaryotic reversible post-translational modification, in which SUMO, a ubiquitin-like polypeptide, is covalently linked to target proteins (Dalmaso et al., 2019). This consequently leads to abnormal AIEC intracellular replication and enhanced AIEC-induced inflammation (Dalmaso et al., 2019; Nguyen et al., 2014). Furthermore, upon AIEC infection, host cells secrete exosomes (Carrière et al., 2016), extracellular vesicles of 30-150 nm, that can transfer miR-30c and miR-130a from cell-to-cell to inhibit autophagy, favoring AIEC intracellular replication (Larabi et al., 2020). Importantly, we and others have shown that the CD-associated SNPs in autophagy-related genes, including *ATG16L1* (autophagy-related gene 16 like 1), *IRGM* and *NOD2* (nucleotide oligomerization domain 2), lead to impaired autophagy, resulting in abnormal AIEC intracellular replication and increased secretion of pro-inflammatory cytokines (Brest et al., 2011; Lapaquette et al., 2010, 2012).

Although the intracellular bacteria free in the cytosol of the infected cell or present within a vacuole with damaged membrane are targeted for elimination by autophagy, some of them have developed various strategies to subvert autophagy for their advantage by secreting virulence factors (Hu et al., 2020). We hypothesized that AIEC possess the virulence factors that allow them to escape from autophagy control of host cells. To identify the genes coding these potential virulence factors, we used the Tn-Seq (transposon sequencing) technique, also known as TIS (transposon insertion sequencing), which is a sequencing technique enabling the identification of essential genes in given growth conditions, after inserting a transposon into each gene of the micro-organism studied (Yamaichi & Dörr, 2017). Conducting a Tn-Seq experiment involves the following steps: (i) mutant library generation, (ii) genomic DNA extraction and preparation, (iii) adapter ligation and PCR to enrich transposon-containing fragments, (iv) sequencing, and (v) data analysis. To ensure sufficient statistical power for data analysis, the mutant library (step i) should be saturated, *i.e.*, each potential insertion site should be inserted at least once with a transposon (Yamaichi & Dörr, 2017).

## **Materials & Methods**

### **Cell lines and culture conditions**

The *ATG16L1* knock-out (KO) HeLa cells (*ATG16L1* expression was depleted using CRISPR/Cas9 system) and their corresponding control HeLa cells (*ATG16L1* KO HeLa cells expressing wild type *ATG16L1*) (Begun et al., 2015) were kindly provided by Professor Xavier Ramnik (Harvard Medical School, Boston, MA, USA). The cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with L-glutamine (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Dutscher) and 1% antibiotic/antimycotic solution (Penicillin G/Streptomycin/Amphotericin B) (Cytiva). Cells were maintained in an atmosphere with saturated humidity and containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

### **Transposon Sequencing (Tn-Seq) technique**

#### **1. Materials & strains**

The *E. coli* MFD*pir* (Mu-free donor strain) harboring pSC189 Himar 1 Mariner transposon vector was used to deliver Transposon (Tn) by conjugation (Yamaichi & Dörr, 2017). The recipient strain was the AIEC reference strain LF82 isolated from a chronic ileal lesion of a CD patient (Darfeuille-Michaud et al., 1998).

#### **2. Library construction**

The Tn-Seq mutant library was generated as previously described (Yamaichi & Dörr, 2017) except for some modifications. The Himar 1 mariner transposon was employed to insert into the TA dinucleotide sites (Chiang & Rubin, 2002). The mutant library was generated in the AIEC LF82 genome which contains approximately 300,000 TA sites. This was achieved by screening 1,000,000 colonies after the mutagenesis, which allowed 2-3 times greater genome coverage at transposon insertion sites to ensure the saturation. Briefly, the MFD*pir* donor strain (in LB broth containing 100 µg/mL of ampicillin, 50 µg/mL of kanamycin and 0.3 mM of DAP (diaminopimelic acid)) and the AIEC LF82 recipient strain (in LB broth containing 100 µg/mL of ampicillin and 50 µg/mL of erythromycin) were grown for 48 hours and overnight respectively, at 37°C without agitation. LB agar plates containing DAP but without antibiotics were prepared, and a 0.45 µm cellulose hydrophile filter membrane was placed on top of the plate. For each reaction, 500 µL of the donor and recipient strain culture were centrifuged for 5 min at 4,000 *rpm*. The supernatants were removed, the pellets were resuspended in 500 µL of LB broth, and then, both strains were mixed together and centrifuged. The pellet was resuspended in 30 µL of LB broth, and the cell suspension was placed onto the filter membrane

prepared above. Then, the plate was incubated for 2 hours at 37°C. After incubation, the filter was moved to a 50 mL tube by forceps, and the cells were resuspended from the filter in 4 mL of LB broth by pipetting up and down and vortexing. Thereafter, the cell suspension was diluted with LB broth, and 100 µL of this solution was spread onto LB agar plates containing kanamycin. All plates were incubated overnight at 37°C. The following day, colonies were enumerated to obtain more than 200,000 colonies. 5 mL of LB broth were added to each plate, and the colonies were scraped with a spreader, and collected into a 50 mL tube. Finally, the collected library was vortexed to disperse clumps and evenly mix the mutants. Each library was stored in cryotubes with 20% glycerol at -20°C. Whenever needed, the content of each cryotube was put in 200 mL of LB broth containing kanamycin in an Erlenmeyer flask and incubated overnight at 37°C without agitation.

### **3. Infection of cells with the mutant library**

Bacterial concentration of the library was estimated by measuring the optical density at 600 nm. Bacteria were resuspended in a proper volume of antibiotic-free culture medium to allow infection of host cells at a MOI (multiplicity of infection) of 100. *ATG16L1* KO and control HeLa cells were incubated with the bacteria for 3 hours, washed three times with PBS 1X and then incubated with culture medium containing 100 µg/mL of gentamicin for 21 hours. The following day, the cells were washed once with PBS and lysed with 1% Triton X-100 (Euromedex) in deionized water. Samples were collected, diluted, and plated onto LB agar plates to determine the number of mutants which survived inside the cells. For optimal sequencing, 10<sup>6</sup> mutants were required. The samples were centrifuged for 5 min at 6,000 g, and the pellet was store at -20°C for DNA extraction.

### **4. Genomic DNA extraction**

Genomic DNA (gDNA) was extracted using the PureLink Genomic DNA mini kit (K18202, ThermoFisher), eluted in milliQ water, and gDNA concentration was determined with the Nanodrop. For the sequencing, 1 µg of sample at a minimal concentration of 50 ng/µL was used.

### **5. Sequencing**

All steps for sequencing were performed by Helixio, Clermont-Ferrand, France. Briefly, samples gDNA concentration was determined with the Qubit 2.0 fluorometer using the dsDNA BR assay kit (ThermoFisher Scientific). 3 samples of *ATG16L1* KO HeLa cells, 3 samples of control cells and one sample of the input (mutant library used for cell infection) were used. The libraries were prepared using the NEBNext® Ultra™ II FS DNA Library Prep Kit for Illumina®

from 200 ng of gDNA. Different molecular biology steps were performed: gDNA shearing, end repair, A-tailing, adapter ligation, amplification of Tn-associated gDNA, second PCR to add barcodes and Illumina attachment and size selection. Sequencing was performed with the « NextSeq 500 » system (Illumina) and « two-channel SBS » technology. Sequenced reads were aligned against the genome of AIEC LF82 strain using the bwa software (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). Read counts, representing the transposon insertion sites, were quantified over genes using the SeqMonk RNA-seq quantitation pipeline (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/seqmonk/>). Statistical analysis was performed using the DeSeq2.

### **Invasion assay**

The Tn-Seq mutant library was cultured overnight in 200 mL of LB broth containing 50 µg/mL of kanamycin at 37°C without agitation. Bacterial concentration was estimated by measuring the optical density at 600 nm. Bacteria were resuspended in a proper volume of antibiotic-free culture medium and used to infect host cells at a MOI (multiplicity of infection) of 100. The number of intracellular mutants was determined using the gentamicin protection assay as we described previously (Nguyen et al., 2014; Bretin et al., 2016). Briefly, cell monolayers were incubated with bacteria for 3 hours, washed three times with PBS 1X and then incubated with antibiotic-free culture medium containing 100 µg/mL of gentamicin for 3, 9 or 21 hours. To determine the number of intracellular mutants, cell monolayers were washed once with PBS and lysed with 1% Triton X-100 (Euromedex) in deionized water. Samples were serially diluted and plated onto LB agar plates containing Km to determine the number of CFU (colony-forming unit) of the mutants.



## Results

In this study, we performed an unbiased Tn-Seq experiment to identify the genes necessary for AIEC LF82 bacteria to escape from autophagy-mediated degradation. This technique requires the creation of a representative mutant library in the AIEC LF82 reference strain, called « input », and used to infect *ATG16L1* KO and control HeLa cells.

### Identification of AIEC LF82 genes involved in adhesion and invasion processes.

Tn-seq data are represented as a heatmap of the 3,735 genes of the AIEC LF82 strain with transposon insertion (**Figure 1A**). The heatmap shows the relative quantity of each insertion mutants in the input (n = 1) and in infected control HeLa cells (n = 3). Each line represents one gene of the AIEC LF82 strain and the color indicates the relative number of insertion mutants quantified in each condition. Two clusters can be defined according to the read number obtained for each gene. In the cluster 1 (2,935 genes), most of the inserted genes are over-represented or slightly over-represented in control HeLa cells compared to the input. In the cluster 2 (800 genes), inserted genes are under-represented in control HeLa cells compared to input, suggesting that these mutants were impaired in their ability to adhere to and to invade HeLa cells.

Furthermore, we performed a “STRING” analysis which allows to reveal known relationships between proteins and to perform gene ontology analysis to identify enriched pathways. “STRING” analysis performed on the 800 genes of the cluster 2 revealed that some of them were already identified, such as the genes involved in flagellar assembly and adhesion process, particularly genes belonging to fim operon (**Figure 1B**) (Barnich et al., 2003; Boudeau et al., 2001; Elhenawy et al., 2019; Sevrin et al., 2020). Indeed, our group has shown that fim operon/fimH (type 1 fimbrial adhesion) are the genes of AIEC involved in adhesion and invasion of intestinal epithelial cells (Barnich et al., 2003, 2007; Barnich & Darfeuille-Michaud, 2010). Consistent with these findings, a recent study observed that the genes belonging to the fim operon (fimC precursor, fimD precursor, fimF, and fimH) were over-expressed in AIEC compared to non-AIEC strains in the supernatant of infected I-407 intestinal epithelial cells (Bonet-Rossinyol et al., 2023). All these observations allowed to technically validate our Tn-Seq experiment. Therefore, the identification of this cluster would enable us, in the future, to identify new genes potentially involved in the adhesion and invasion processes of the AIEC LF82 strain in epithelial cells.

### Identification of AIEC LF82 genes involved in autophagy escape.

First, to validate the effect of autophagy deficiency on the number of mutants in *ATG16L1* KO cells, these cells and the control HeLa cells were infected with the mutant library, and the gentamycin protection assay was performed. A significant increase in the number of intracellular mutants was observed in *ATG16L1* KO cells compared to control cells at 6, 12 and 24 hours post-infection (**Figure 2A**). Therefore, these results showed the essential role of autophagy in the control of mutants' intracellular replication.

Among the 3,735 genes of the AIEC LF82 bacteria, 68 of them were significantly over- or under-represented between *ATG16L1* KO and control HeLa cells. Tn-seq data are represented as a heatmap (**Figure 2B**) and MA-plot (**Figure 2C**) of the 68 genes with transposon insertion showing statistically significant difference between control (n = 3) and *ATG16L1* KO (n = 3) HeLa cells ( $P < 0.05$  using the DeSeq2 statistical analysis). On the MA-plot, each dot represents a bacterial gene of which the invalidation with the transposon insertion changed the ability of the bacteria to survive within autophagy deficient-cells compared to control cells. Tn-Seq data analysis defined two clusters according to the read number obtained for each gene (**Figure 2B**).

In control HeLa cells, some mutants are degraded by functional autophagy, and some mutants survived intracellularly (**Figure 2D**). In *ATG16L1* KO HeLa cells, autophagy is dysfunctional, and none of the mutants is degraded by autophagy. We reasoned that the mutants over-represented in *ATG16L1* KO *versus* control cells (illustrated in purple, **Figure 2D**) are the one that were degraded by autophagy in control cells. This interpretation means that the mutants increased in *ATG16L1* KO *versus* control cells are invalidated in the genes necessary for AIEC bacteria to escape from autophagy-mediated control. Thus, we focused on cluster 2 (**Figure 2B**), which includes 39 genes over-represented in *ATG16L1* KO *versus* control cells.

Tn-Seq data analysis is complex and allows to answer different questions concerning AIEC LF82 bacteria fitness. For instance, in our case, this technique allowed us to identify the genes necessary for AIEC bacteria to escape from autophagy control. However, by analyzing the cluster 1 (29 genes), we could also identify the genes that are potentially involved in the recognition of AIEC bacteria by autophagy (**Figure 2A**). Indeed, we could reason that the mutants that were over-represented in control HeLa cells, in which autophagy is functional, compared to *ATG16L1* KO cells, are invalidated in the genes coding for bacterial surface proteins that are recognized by the autophagy machinery.

Finally, we further investigated among the 68 genes, which ones are present in the core genome of *E. coli*. This analysis allowed the identification of 22 genes that are only present in the AIEC LF82 strain's genome and absent in the core genome of *E. coli* (**Table 1**).

## Discussion & Conclusion

Tn-Seq is an approach that enables the study of the functions of genes in a whole genome scale through construction of complex random transposon insertion libraries and quantification of each mutant's abundance using next-generation sequencing (DeJesus et al., 2017). As an example, in the model organism *Vibrio cholerae*, Tn-Seq has been previously used to identify essential housekeeping genes (Chao et al., 2013) as well as those crucial for host colonization (Y. Fu et al., 2013; Kamp et al., 2013), growth in different environments (Kamp et al., 2013; Möll et al., 2015), and survival in response to antibiotic stress (Dörr et al., 2016). Concerning the AIEC LF82 strain, to our knowledge, the Tn-Seq technique was only used by Prudent and co-authors to identify the genes of LF82 involved in bacterial survival in macrophages (Prudent et al., 2021). Thus, we aimed at identifying the potential genes that enable the AIEC LF82 bacteria to escape from autophagy control of host cells.

Although bacteria free inside the cytosol of the infected cell or present within a vacuole damaged membrane are targeted for elimination by autophagy, some of them have developed various strategies to subvert autophagy for their own advantage by secreting virulence factors (Hu et al., 2020). These effectors could enable the bacteria to avoid being recognised by the autophagic machinery, to limit the induction of autophagy, or even to hijack this process to ensure their own replication. For example, *Listeria monocytogenes* secretes ActA and InlK effectors, which prevent its recognition by autophagy (Dortet et al., 2011; Mitchell et al., 2015; Yoshikawa et al., 2009). In addition, *L. monocytogenes* phospholipases C, PlcA and PlcB prevent the formation of PI3P (phosphatidylinositol-3-phosphate), blocking LC3 (light chain 3) lipidation and thus autophagy (Mitchell et al., 2015). Similarly, *Shigella flexneri* can secrete IcsB effector, which binds to the bacterial outer membrane protein VirG, thus masking the binding site for ATG5. This allows the bacterium to avoid the control by autophagy (Ogawa et al., 2005). It was also shown that IcsB blocks the recruitment of LC3 to the vacuole and facilitates the escape of *S. flexneri* from the nascent LC3-positive vacuoles (Campbell-Valois et al., 2015). In addition, IcsB prevents the recruitment of ubiquitin proteins and autophagic receptors p62 and NDP52 (Baxt & Goldberg, 2014; Mostowy et al., 2011). A recent study showed that pathogenic *E. coli* strains harboring a plasmid coding for the virulence factor HlyF overproduce OMVs (outer membrane vesicles) that prevent autophagosome-lysosome fusion and acidification in macrophages, thus inhibiting their clearance from host cytosol (David et al., 2022; Murase et al., 2016). In line with this idea, the fact that the AIEC NRG 857Cc strain harbors the *HlyF* gene suggests that the OMVs produced by this strain might participate in its

virulence by favoring the bacterial survival and replication in eukaryotic cells (McPhee et al., 2014).

In our study, we identified 68 genes of the AIEC LF82 strain, divided into two clusters, significantly over- or under-represented between *ATG16L1* KO and control HeLa cells. The cluster 1 includes 29 genes under-represented in *ATG16L1* KO vs control cells, and the cluster 2 includes 39 genes over-represented in *ATG16L1* KO vs control cells. According to the literature, these 68 genes don't have known functions related to autophagy, and the functions of some of them are not yet very well known.

Among 29 genes of the cluster 1, the genes that have the abundance mostly different between the two conditions are *yegR*, *mrdB*, *flgL*, *dnaJ* and *lpxL*. The *mrdB* gene codes for a shape protein required for the maintenance of rod shape in *E. coli* (Bendezú & de Boer, 2008; Shiomi et al., 2013). The *flgL* gene codes for a hook-associated protein involved in the flagellum structure (Fraser et al., 1999) and the *dnaJ* gene codes for a heat shock protein in response to temperature upshift from 30 to 42°C (Arsène et al., 2000; Grudniak et al., 2015). Then, the *lpxL* gene codes for an acyltransferase involved in the lipid A biosynthesis pathway in *E. coli* (Schilling et al., 2014; Six et al., 2008, 2012). Interestingly, a recent study revealed that the acyltransferase CAG (cholesteryl 6'-*O*-acyl- $\alpha$ -d-glucoside) is mainly distributed in autophago-lysosomal compartments and assist *Helicobacter pylori* to escape host-cell autophagy, suggesting a similar role for the acyltransferase *lpxL* (Muthusamy et al., 2021). Among these 29 genes, few of them are still unknown in the literature, such as *yegR*, *mgo* and *ydcO*, which could be interesting to investigate.

For the cluster 2, most of the 39 genes have an already known function, mainly in metabolic pathways. The genes showing the abundance mostly different between *ATG16L1* KO and control cells are *secG*, *ribC*, *fabD* and *yajC*. For example, the *secG* and *yajC* genes are involved in a channel that allows protein translocation across the *E. coli* cytoplasmic membrane (Belin et al., 2015; Miyazaki et al., 2022). The *ribC* and *ribA* genes are involved in the riboflavin biosynthesis pathway in *E. coli* (Bereswill et al., 1999; B. Fu et al., 2023), and the *fabD* gene is involved in the free fatty acid biosynthesis pathway (Marcella & Barb, 2017; Zhang et al., 2012). A few genes are still unknown in the literature, such as *yadW*, *ydeS*, and *aec32*, and could be of interest to further investigate. Finally, the precise functions of certain genes are still unknown, but a few recent articles suggest their role, such as the *slyX* gene responsible for secretion of inulin-degrading enzyme (Glebov et al., 2011; Mokhonov et al., 2018) and the *yhcB* gene involved in cell morphology.

The following step of this project will be to perform a gene ontology analysis to predict the pathways in which the 68 genes are potentially involved. Furthermore, to confirm the physiological role of the identified genes, it will be necessary to create the isogenic mutants and study their interaction with autophagy in host cells. In conclusion, this work allowed to develop the Tn-Seq technique in an AIEC strain and to confirm that this technique can be used to identify the genes involved in epithelial cell entry and/or escape from autophagy degradation by the bacteria. In the future, the outcomes from this work could help to identify new targets to limit the virulence of AIEC.

## References

- Arsène, F., Tomoyasu, T., & Bukau, B. (2000). The heat shock response of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, *55*(1), 3–9. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00206-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00206-3)
- Barnich, N., Boudeau, J., Claret, L., & Darfeuille-Michaud, A. (2003). Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Molecular Microbiology*, *48*(3), 781–794. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03468.x>
- Barnich, N., Carvalho, F. A., Glasser, A.-L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., Peeters, H., Bommelaer, G., Desreumaux, P., Colombel, J.-F., & Darfeuille-Michaud, A. (2007). CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *117*(6), 1566–1574. <https://doi.org/10.1172/JCI30504>
- Barnich, N., & Darfeuille-Michaud, A. (2010). Abnormal CEACAM6 expression in Crohn disease patients favors gut colonization and inflammation by adherent-invasive *E. coli*. *Virulence*, *1*(4), 281–282. <https://doi.org/10.4161/viru.1.4.11510>
- Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, R. H., Wiedmann, M., McDonough, P., Kim, S. G., Berg, D., Schukken, Y., Scherl, E., & Simpson, K. W. (2007). Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *The ISME Journal*, *1*(5), 403–418. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.52>
- Baxt, L. A., & Goldberg, M. B. (2014). Host and bacterial proteins that repress recruitment of LC3 to *Shigella* early during infection. *PloS One*, *9*(4), e94653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094653>
- Begun, J., Lassen, K. G., Jijon, H. B., Baxt, L. A., Goel, G., Heath, R. J., Ng, A., Tam, J. M., Kuo, S.-Y., Villablanca, E. J., Fagbami, L., Oosting, M., Kumar, V., Schenone, M., Carr, S. A., Joosten, L. A. B., Vyas, J. M., Daly, M. J., Netea, M. G., ... Xavier, R. J. (2015). Integrated Genomics of Crohn's Disease Risk Variant Identifies a Role for CLEC12A in Antibacterial Autophagy. *Cell Reports*, *11*(12), 1905–1918. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.045>
- Belin, D., Plaia, G., Boulfekhar, Y., & Silva, F. (2015). *Escherichia coli* SecG Is Required for Residual Export Mediated by Mutant Signal Sequences and for SecY-SecE Complex Stability. *Journal of Bacteriology*, *197*(3), 542–552. <https://doi.org/10.1128/JB.02136-14>
- Bendezú, F. O., & de Boer, P. A. J. (2008). Conditional Lethality, Division Defects, Membrane Involution, and Endocytosis in *mre* and *mrd* Shape Mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *190*(5), 1792–1811. <https://doi.org/10.1128/JB.01322-07>

Bereswill, S., Hinkelmann, S., Kist, M., & Sander, A. (1999). Molecular Analysis of Riboflavin Synthesis Genes in *Bartonella henselae* and Use of the ribC Gene for Differentiation of *Bartonella* Species by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10), 3159–3166.

Bonet-Rossinyol, Q., Camprubí-Font, C., López-Siles, M., & Martínez-Medina, M. (2023). Identification of differences in gene expression implicated in the Adherent-Invasive *Escherichia coli* phenotype during in vitro infection of intestinal epithelial cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1228159. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1228159>

Boudeau, J., Barnich, N., & Darfeuille-Michaud, A. (2001). Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1272–1284. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2001.02315.x>

Boudeau, J., Glasser, A. L., Masseret, E., Joly, B., & Darfeuille-Michaud, A. (1999). Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infection and Immunity*, 67(9), 4499–4509. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.9.4499-4509.1999>

Brest, P., Lapaquette, P., Souidi, M., Lebrigand, K., Cesaro, A., Vouret-Craviari, V., Mari, B., Barbry, P., Mosnier, J.-F., Hébuterne, X., Harel-Bellan, A., Mograbi, B., Darfeuille-Michaud, A., & Hofman, P. (2011). A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nature Genetics*, 43(3), 242–245. <https://doi.org/10.1038/ng.762>

Bretin, A., Carrière, J., Dalmaso, G., Bergougnoux, A., B'chir, W., Maurin, A.-C., Müller, S., Seibold, F., Barnich, N., Bruhat, A., Darfeuille-Michaud, A., & Nguyen, H. T. T. (2016). Activation of the EIF2AK4-EIF2A/eIF2 $\alpha$ -ATF4 pathway triggers autophagy response to Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* infection. *Autophagy*, 12(5), 770–783. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1156823>

Buisson, A., Douadi, C., Ouchchane, L., Goutte, M., Hugot, J.-P., Dubois, A., Minet-Quinard, R., Bouvier, D., Bommelaer, G., Vazeille, E., & Barnich, N. (2019). Macrophages Inability to Mediate Adherent-Invasive *E. coli* Replication is Linked to Autophagy in Crohn's Disease Patients. *Cells*, 8(11), E1394. <https://doi.org/10.3390/cells8111394>

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>

Campbell-Valois, F.-X., Sachse, M., Sansonetti, P. J., & Parsot, C. (2015). Escape of Actively Secreting *Shigella flexneri* from ATG8/LC3-Positive Vacuoles Formed during Cell-To-Cell Spread Is Facilitated by IcsB and VirA. *mBio*, 6(3), e02567-02514. <https://doi.org/10.1128/mBio.02567-14>



- Caparrós, E., Wiest, R., Scharl, M., Rogler, G., Gutiérrez Casbas, A., Yilmaz, B., Wawrzyniak, M., & Francés, R. (2021). Dysbiotic microbiota interactions in Crohn's disease. *Gut Microbes*, *13*(1), 1949096. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1949096>
- Carrière, J., Bretin, A., Darfeuille-Michaud, A., Barnich, N., & Nguyen, H. T. T. (2016). Exosomes Released from Cells Infected with Crohn's Disease-associated Adherent-Invasive Escherichia coli Activate Host Innate Immune Responses and Enhance Bacterial Intracellular Replication. *Inflammatory Bowel Diseases*, *22*(3), 516–528. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000635>
- Carrière, J., Darfeuille-Michaud, A., & Nguyen, H. T. T. (2014). Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(34), 12102–12117. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i34.12102>
- Chao, M. C., Pritchard, J. R., Zhang, Y. J., Rubin, E. J., Livny, J., Davis, B. M., & Waldor, M. K. (2013). High-resolution definition of the Vibrio cholerae essential gene set with hidden Markov model-based analyses of transposon-insertion sequencing data. *Nucleic Acids Research*, *41*(19), 9033–9048. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt654>
- Crohn, B. B., Ginzburg, L., & Oppenheimer, G. D. (1952). Regional ileitis: A pathologic and clinical entity. *The American Journal of Medicine*, *13*(5), 583–590. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(52\)90025-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(52)90025-9)
- 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>
- Dalmaso, G., Nguyen, H. T. T., Faïs, T., Massier, S., Chevarin, C., Vazeille, E., Barnich, N., Delmas, J., & Bonnet, R. (2021). Yersiniabactin Siderophore of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli Is Involved in Autophagy Activation in Host Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(7), 3512. <https://doi.org/10.3390/ijms22073512>
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., & Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, *127*(2), 412–421. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.061>
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., & Colombel, J. F. (1998). Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, *115*(6), 1405–1413. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70019-8](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70019-8)
- David, L., Taieb, F., Pénary, M., Bordignon, P.-J., Planès, R., Bagayoko, S., Duplan-Eche, V., Meunier, E., & Oswald, E. (2022). Outer membrane vesicles produced by pathogenic strains of

- Escherichia coli block autophagic flux and exacerbate inflammasome activation. *Autophagy*, 18(12), 2913–2925. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2054040>
- DeJesus, M. A., Nambi, S., Smith, C. M., Baker, R. E., Sasseti, C. M., & Ioerger, T. R. (2017). Statistical analysis of genetic interactions in Tn-Seq data. *Nucleic Acids Research*, 45(11), e93. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx128>
- Dörr, T., Alvarez, L., Delgado, F., Davis, B. M., Cava, F., & Waldor, M. K. (2016). A cell wall damage response mediated by a sensor kinase/response regulator pair enables beta-lactam tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(2), 404–409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520333113>
- Dortet, L., Mostowy, S., Samba-Louaka, A., Gouin, E., Nahori, M.-A., Wiemer, E. A. C., Dussurget, O., & Cossart, P. (2011). Recruitment of the major vault protein by InlK: A *Listeria monocytogenes* strategy to avoid autophagy. *PLoS Pathogens*, 7(8), e1002168. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002168>
- Elhenawy, W., Tsai, C. N., & Coombes, B. K. (2019). Host-Specific Adaptive Diversification of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Cell Host & Microbe*, 25(2), 301-312.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.010>
- Fraser, G. M., Bennett, J. C. Q., & Hughes, C. (1999). Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FliT, putative chaperones for flagellum assembly. *Molecular Microbiology*, 32(3), 569–580. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01372.x>
- Fu, B., Ying, J., Chen, Q., Zhang, Q., Lu, J., Zhu, Z., & Yu, P. (2023). Enhancing the biosynthesis of riboflavin in the recombinant *Escherichia coli* BL21 strain by metabolic engineering. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1111790. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1111790>
- Fu, Y., Waldor, M. K., & Mekalanos, J. J. (2013). Tn-Seq analysis of *Vibrio cholerae* intestinal colonization reveals a role for T6SS-mediated antibacterial activity in the host. *Cell Host & Microbe*, 14(6), 652–663. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.11.001>
- 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>
- Glebov, K., Schütze, S., & Walter, J. (2011). Functional Relevance of a Novel SlyX Motif in Non-conventional Secretion of Insulin-degrading Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(26), 22711–22715. <https://doi.org/10.1074/jbc.C110.217893>
- Grudniak, A. M., Włodkowska, J., & Wolska, K. I. (2015). Chaperone DnaJ Influences the Formation of Biofilm by *Escherichia coli*. *Polish Journal of Microbiology*, 64(3), 279–283.

- Hu, W., Chan, H., Lu, L., Wong, K. T., Wong, S. H., Li, M. X., Xiao, Z. G., Cho, C. H., Gin, T., Chan, M. T. V., Wu, W. K. K., & Zhang, L. (2020). Autophagy in intracellular bacterial infection. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *101*, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.07.014>
- Kamp, H. D., Patimalla-Dipali, B., Lazinski, D. W., Wallace-Gadsden, F., & Camilli, A. (2013). Gene fitness landscapes of *Vibrio cholerae* at important stages of its life cycle. *PLoS Pathogens*, *9*(12), e1003800. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003800>
- Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M. H., Abudu, Y. P., Acevedo-Arozena, A., Adamopoulos, I. E., Adeli, K., Adolph, T. E., Adornetto, A., Aflaki, E., Agam, G., Agarwal, A., Aggarwal, B. B., Agnello, M., ... Tong, C.-K. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. *Autophagy*, *17*(1), 1–382. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>
- Lapaquette, P., Bringer, M.-A., & Darfeuille-Michaud, A. (2012). Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cellular Microbiology*, *14*(6), 791–807. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01768.x>
- Lapaquette, P., Glasser, A.-L., Huett, A., Xavier, R. J., & Darfeuille-Michaud, A. (2010). Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cellular Microbiology*, *12*(1), 99–113. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01381.x>
- Larabi, A., Dalmaso, G., Delmas, J., Barnich, N., & Nguyen, H. T. T. (2020). Exosomes transfer miRNAs from cell-to-cell to inhibit autophagy during infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli*. *Gut Microbes*, *11*(6), 1677–1694. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1771985>
- Marcella, A. M., & Barb, A. W. (2017). The R117A variant of the *Escherichia coli* transacylase FabD synthesizes novel acyl-(acyl carrier proteins). *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(23), 8431–8441. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8586-9>
- 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. (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>
- McPhee, J. B., Small, C. L., Reid-Yu, S. A., Brannon, J. R., Le Moual, H., & Coombes, B. K. (2014). Host defense peptide resistance contributes to colonization and maximal intestinal pathology by Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, *82*(8), 3383–3393. <https://doi.org/10.1128/IAI.01888-14>

- Mitchell, G., Ge, L., Huang, Q., Chen, C., Kianian, S., Roberts, M. F., Schekman, R., & Portnoy, D. A. (2015). Avoidance of autophagy mediated by PlcA or ActA is required for *Listeria monocytogenes* growth in macrophages. *Infection and Immunity*, *83*(5), 2175–2184. <https://doi.org/10.1128/IAI.00110-15>
- Miyazaki, R., Ai, M., Tanaka, N., Suzuki, T., Dhomae, N., Tsukazaki, T., Akiyama, Y., & Mori, H. (2022). Inner membrane YfgM–PpiD heterodimer acts as a functional unit that associates with the SecY/E/G translocon and promotes protein translocation. *The Journal of Biological Chemistry*, *298*(11), 102572. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102572>
- Mokhonov, V. V., Vasilenko, E. A., Gorshkova, E. N., Astrakhantseva, I. V., Novikov, D. V., & Novikov, V. V. (2018). SlyD-deficient *Escherichia coli* strains: A highway to contaminant-free protein extraction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *499*(4), 967–972. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.029>
- Möll, A., Dörr, T., Alvarez, L., Davis, B. M., Cava, F., & Waldor, M. K. (2015). A D, D-carboxypeptidase is required for *Vibrio cholerae* halotolerance. *Environmental Microbiology*, *17*(2), 527–540. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12779>
- Mostowy, S., Sancho-Shimizu, V., Hamon, M. A., Simeone, R., Brosch, R., Johansen, T., & Cossart, P. (2011). P62 and NDP52 proteins target intracytosolic *Shigella* and *Listeria* to different autophagy pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(30), 26987–26995. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.223610>
- Murase, K., Martin, P., Porcheron, G., Houle, S., Helloin, E., Pénary, M., Nougayrède, J.-P., Dozois, C. M., Hayashi, T., & Oswald, E. (2016). HlyF Produced by Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Is a Virulence Factor That Regulates Outer Membrane Vesicle Biogenesis. *The Journal of Infectious Diseases*, *213*(5), 856–865. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv506>
- Muthusamy, S., Jan, H.-M., Hsieh, M.-Y., Mondal, S., Liu, W.-C., Ko, Y.-A., Yang, W.-Y., Mong, K.-K. T., Chen, G.-C., & Lin, C.-H. (2021). Enhanced enzymatic production of cholesteryl 6'-acylglucoside impairs lysosomal degradation for the intracellular survival of *Helicobacter pylori*. *Journal of Biomedical Science*, *28*, 72. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00768-w>
- Nguyen, H. T. T., Dalmasso, 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>
- 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>

- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., & Sasakawa, C. (2005). Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science (New York, N.Y.)*, *307*(5710), 727–731. <https://doi.org/10.1126/science.1106036>
- Prudent, V., Demarre, G., Vazeille, E., Wery, M., Quenech'Du, N., Ravet, A., Dauverd-Girault, J., van Dijk, E., Bringer, M.-A., Descrimes, 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), 627. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02161-7>
- Raso, T., Crivellaro, S., Chirillo, M. G., Pais, P., Gaia, E., & Savoia, D. (2011). Analysis of *Escherichia coli* isolated from patients affected by Crohn's disease. *Current Microbiology*, *63*(2), 131–137. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9947-8>
- Roda, G., Chien Ng, S., Kotze, P. G., Argollo, M., Panaccione, R., Spinelli, A., Kaser, A., Peyrin-Biroulet, L., & Danese, S. (2020). Crohn's disease. *Nature Reviews. Disease Primers*, *6*(1), 22. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0156-2>
- Schilling, B., Hunt, J., Gibson, B. W., & Apicella, M. A. (2014). Site-specific acylation changes in the lipid A of *Escherichia coli* lpxL mutants grown at high temperatures. *Innate Immunity*, *20*(3), 269–282. <https://doi.org/10.1177/1753425913490534>
- Sevrin, G., Massier, S., Chassaing, B., Agus, A., Delmas, J., Denizot, J., Billard, E., & Barnich, N. (2020). Adaptation of adherent-invasive *E. coli* to gut environment: Impact on flagellum expression and bacterial colonization ability. *Gut Microbes*, *11*(3), 364–380. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1421886>
- Shiomi, D., Toyoda, A., Aizu, T., Ejima, F., Fujiyama, A., Shini, T., Kohara, Y., & Niki, H. (2013). Mutations in cell elongation genes *mreB*, *mrdA* and *mrdB* suppress the shape defect of RodZ-deficient cells. *Molecular Microbiology*, *87*(5), 1029–1044. <https://doi.org/10.1111/mmi.12148>
- Six, D. A., Carty, S. M., Guan, Z., & Raetz, C. R. H. (2008). Purification and Mutagenesis of LpxL, the Lauroyltransferase of *Escherichia coli* Lipid A Biosynthesis. *Biochemistry*, *47*(33), 8623–8637. <https://doi.org/10.1021/bi800873n>
- Six, D. A., Lambert, B., Raetz, C. R. H., & Doerrler, W. T. (2012). Density gradient enrichment of *Escherichia coli* lpxL mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1821*(7), 989–993. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.04.003>
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F., & Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *Lancet (London, England)*, *389*(10080), 1741–1755. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31711-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31711-1)
- Vazeille, E., Buisson, A., Bringer, M.-A., Goutte, M., Ouchchane, L., Hugot, J.-P., de Vallée, A., Barnich, N., Bommelaer, G., & Darfeuille-Michaud, A. (2015). Monocyte-derived macrophages from Crohn's disease patients are impaired in the ability to control intracellular

adherent-invasive Escherichia coli and exhibit disordered cytokine secretion profile. *Journal of Crohn's & Colitis*, 9(5), 410–420. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv053>

Yamaichi, Y., & Dörr, T. (2017). Transposon Insertion Site Sequencing for Synthetic Lethal Screening. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1624, 39–49. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7098-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7098-8_4)

Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Yoshida, M., Fukumatsu, M., Kim, M., Mimuro, H., Nakagawa, I., Yanagawa, T., Ishii, T., Kakizuka, A., Sztul, E., Chakraborty, T., & Sasakawa, C. (2009). *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nature Cell Biology*, 11(10), 1233–1240. <https://doi.org/10.1038/ncb1967>

Zhang, X., Agrawal, A., & San, K.-Y. (2012). Improving fatty acid production in Escherichia coli through the overexpression of malonyl coA-acyl carrier protein transacylase. *Biotechnology Progress*, 28(1), 60–65. <https://doi.org/10.1002/btpr.716>

## Figures legends

### **Figure 1: Analysis of insertion LF82 mutants in input and control infected HeLa cells by Tn-seq.**

(A) Tn-seq data represented as a heatmap of the 3,735 genes of the AIEC LF82 strain with transposon insertion. The heatmap shows the relative enrichment of each insertion mutants in the input control (n=1) and in control HeLa cells (n=3) infected with the bank of mutants. Each line represents one gene of the AIEC LF82 strain and the color indicates the relative number of insertion mutants quantified in each condition. Two clusters can be observed according to the read number obtained for each gene. (B) Predicted functional interactions of the 800 genes differentially represented between the input and control HeLa cells within the cluster 2. The count in network represents the number of genes found in each network. For flagellar assembly, the network is composed of 37 genes and among the 800 genes tested, 24 of them are involved in this pathway, indicating that this pathway is enriched. The strength represents the value of enrichment. The closer to 1, the more genes in this pathway are enriched in the list. The false discovery rate corresponds to the percentage of estimated false positives. It must not exceed 0.05 (5%). Graph created using the « STRING » tool. Genes involved in flagellar assembly are the first genes identified, which are symbolized by red circles.

### **Figure 2: Identification of the genes necessary for AIEC LF82 to escape from autophagy by Tn-Seq technique.**

(A) *ATG16L1* KO and control HeLa cells were infected with the mutant library at a MOI of 100 for 3 hours. The cells were then washed and incubated with the infection media containing 100 µg/mL of gentamicin for 3, 9 or 21 hours. The cells were washed, lysed and plated on LB agar plate to determine the colony-forming units (CFU) of mutants. Results are presented as means ± SEM from 4 independent experiments. Statistical analyses were performed using one-way Anova test followed by a post-test Bonferroni correction. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ . (B-C) Tn-seq data represented as a (B) heatmap and (C) MA-plot of the 68 genes of the AIEC LF82 strain with transposon insertion showing statistically significant difference between control HeLa cells (n=3) and *ATG16L1* KO HeLa cells (n=3) conditions (DeSeq2  $p < 0.05$ ). (B) Each line represents one gene of the AIEC LF82 strain and the color indicates the relative number of insertion mutants quantified in each condition. Two clusters can be observed according to the read number obtained for each gene. (C) Each dot represents a bacterial gene for which the transposon insertion changes the ability of the bacteria to survive within autophagy deficient-cells compared to control cells. On the x-axis, this is the average

number of mutants carrying the insertion in the gene, and on the y-axis, this is the fold change.

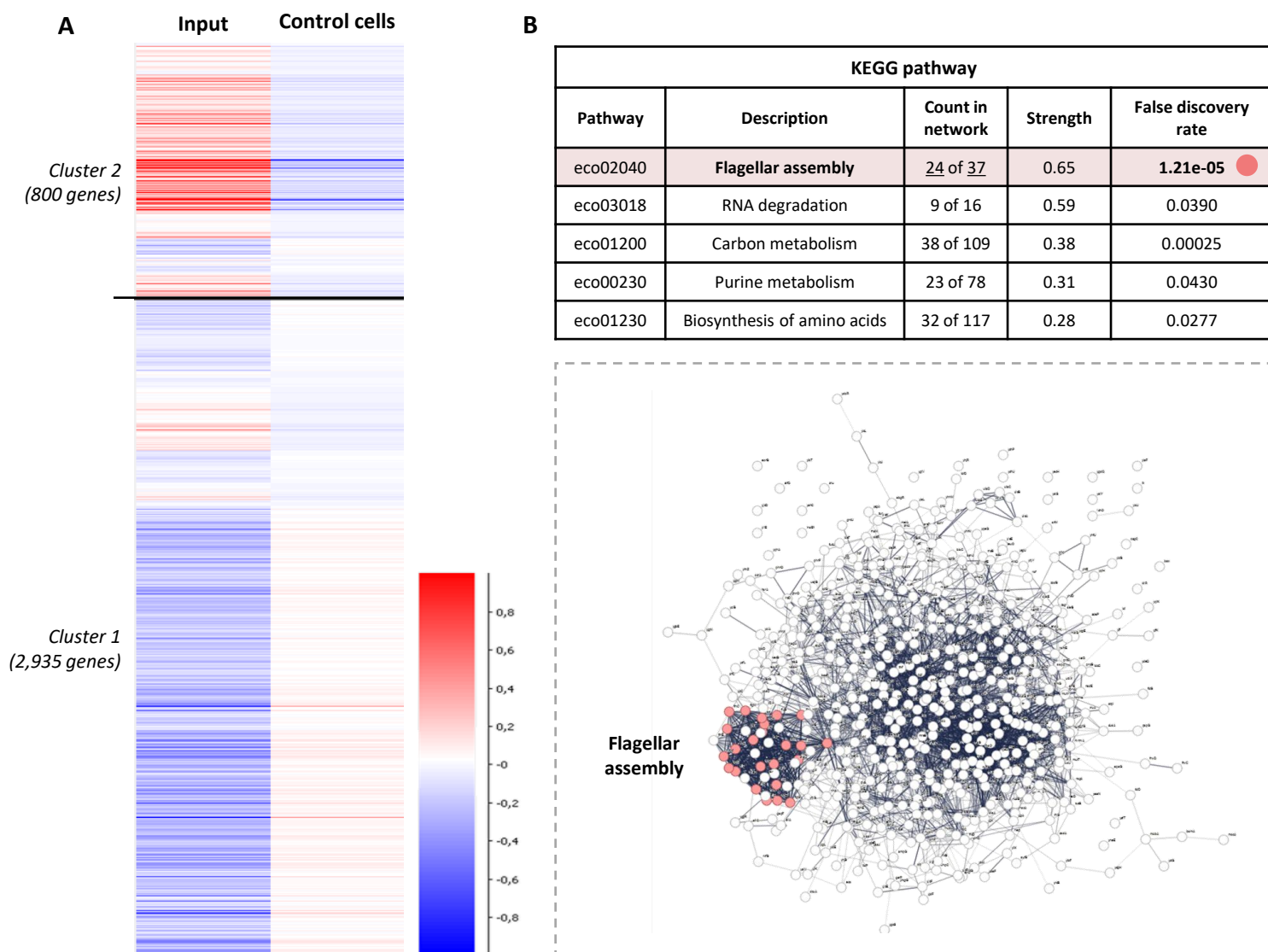
(D) Simplified diagram of the Tn-Seq biological interpretation.

**Table 1: List of the 68 bacterial genes involved in escape of AIEC LF82 from autophagy.**

Tn-seq data represented as a table of the 68 genes of the AIEC LF82 strain with transposon insertion showing statistically significant difference between control HeLa cells (n=3) and *ATG16L1* KO HeLa cells (n=3) conditions (DeSeq2  $p < 0.05$ ). Among the 68 genes, 22 are highlighted in pink. These genes are present in the AIEC LF82 strain genome but not in the core genome of *E. coli*. The black line separates the genes over-represented in *ATG16L1* KO HeLa cells (at the top) and the genes over-represented in control HeLa cells (at the bottom).



**Figure 1**



**Figure 2**

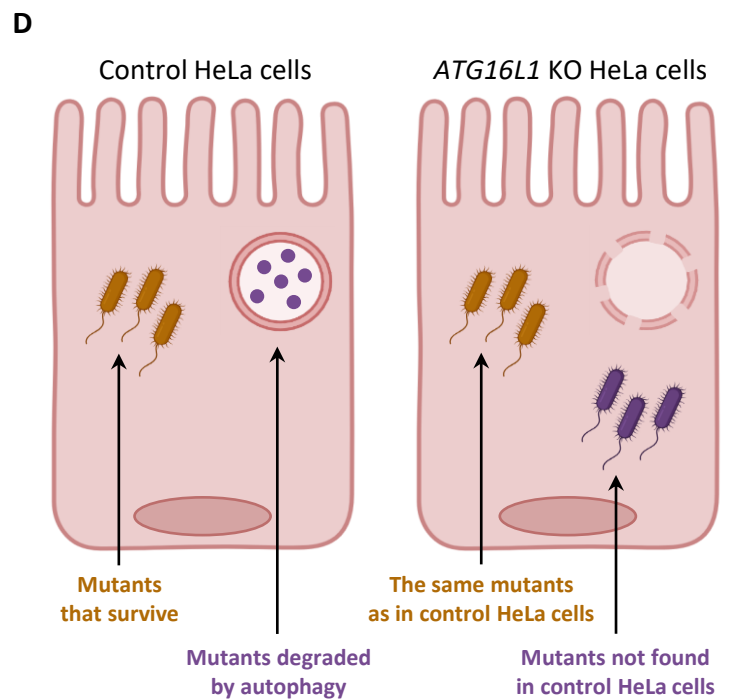
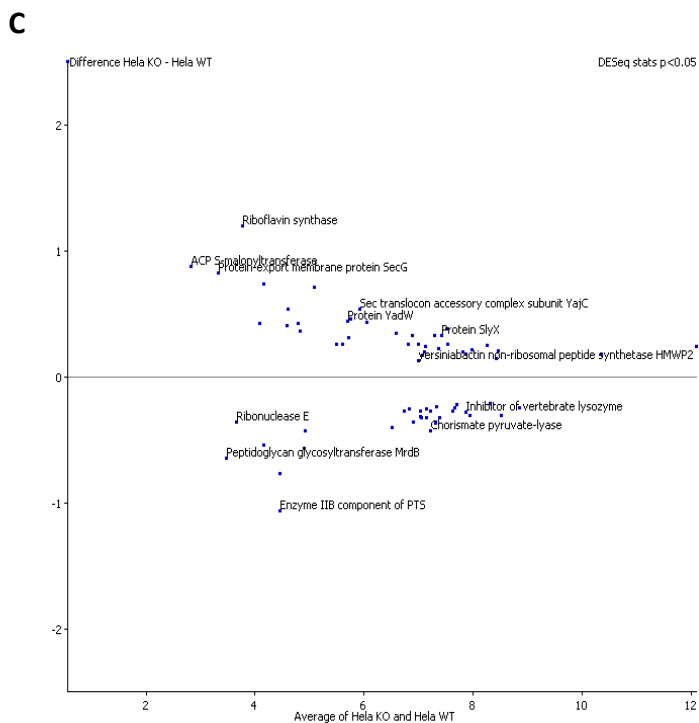
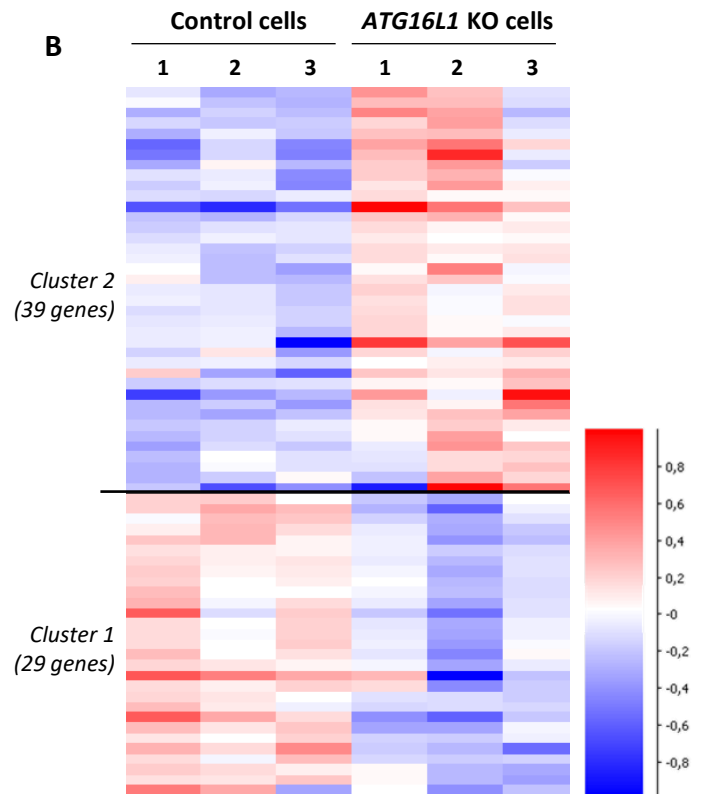
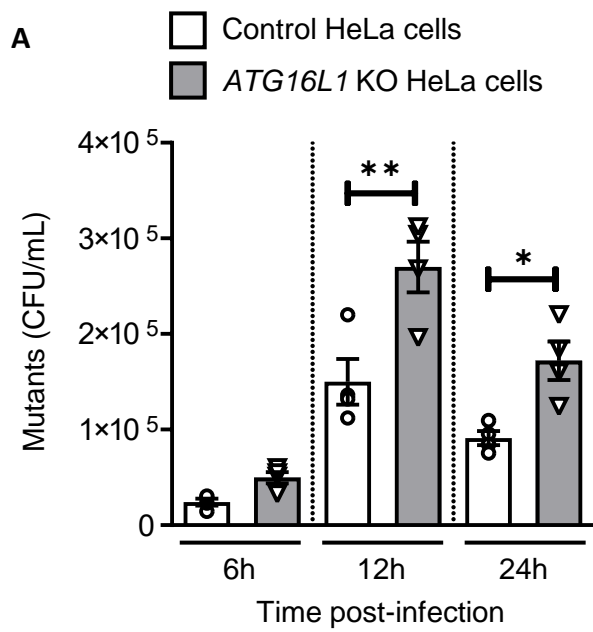


Table 1

Probe	Gene	Start	End	ID	Input	Control cells	ATG16L1 KO cells	Log2 Fold Change (KO vs control) DESeq stats p<0.05)
30S ribosomal protein S6	rpsF	4564530	4564925	LF82_22825	2,44	0,00	3,62	-4,849
Protein-export membrane protein SecG	secG	3365991	3366323	LF82_16735	8,13	7,60	16,08	-1,182
Riboflavin synthase alpha chain	ribC	1715627	1716268	LF82_08595	9,34	10,25	21,00	-1,044
ACP S-malonyltransferase	fabD	1126384	1127313	LF82_05565	2,50	5,25	10,00	-0,937
DNA-binding protein H-NS	hns	1308436	1308849	LF82_06585	21,49	26,77	45,12	-0,803
Ribulose-phosphate 3-epimerase		2071934	2072578	LF82_10410	12,90	13,88	23,11	-0,771
YdaT_toxin domain-containing protein	ydaT	1181166	1181705	LF82_05865	17,91	20,08	29,27	-0,579
Sec translocon accessory complex subunit YajC	yajC	430851	431183	LF82_02030	55,19	50,40	73,87	-0,574
Protein YadW	yadW	181334	181736	LF82_00850	33,60	44,67	62,43	-0,511
Phosphoglucosyltransferase	pgm	686090	687730	LF82_03320	44,80	23,89	32,29	-0,477
GTP cyclohydrolase-2	ribA	1353434	1354024	LF82_06815	69,07	57,26	77,29	-0,473
1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	dxr	197293	198489	LF82_00935	16,81	14,65	19,77	-0,469
Uncharacterized fimbrial-like protein YdeS	ydeS	1540402	1540932	LF82_07665	41,53	47,24	63,43	-0,456
TPR_REGION domain-containing protein		3122271	3123428	LF82_15545	19,88	20,82	27,97	-0,455
Lactamase		2850536	2851579	LF82_14280	25,20	25,16	32,72	-0,431
hypothetical protein		3751013	3751240	LF82_18675	207,87	161,20	209,34	-0,412
Protein SlyX	slyX	3520758	3520976	LF82_17610	183,73	151,93	193,64	-0,392
Inner membrane protein YhcB	yhcB	3415160	3415558	LF82_16995	96,48	85,21	108,94	-0,384
Membrane protein		3600244	3600849	LF82_17970	174,94	139,78	176,70	-0,376
Aec32	aec32	242397	242876	LF82_01175	114,46	106,75	135,14	-0,375
Tyrosine recombinase XerD	xerD	3039852	3040748	LF82_15105	53,05	47,49	59,27	-0,355
Guanylate kinase	gmk	3863735	3864358	LF82_19230	477,43	281,64	339,09	-0,304
glycine betaine ABC transporter permease YehW	yehW	2234846	2235577	LF82_11225	91,18	103,05	123,20	-0,295
Trehalose-6-phosphate hydrolase	treC	4611470	4613125	LF82_23055	51,40	44,76	53,54	-0,292
Cysteine--tRNA ligase	cysS	553758	555143	LF82_02655	36,99	41,10	49,29	-0,292
Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP(+)] GabD	gabD	2772324	2773772	LF82_13850	195,59	169,36	202,78	-0,285
Anhydromuropeptide permease	ampG	455371	456846	LF82_02160	5417,28	4008,08	4743,29	-0,270
HTH-type transcriptional activator AII5	ydhB	1711892	1712824	LF82_08575	124,82	118,08	140,22	-0,269
Cell division protein ZapD	zapD	112944	114307	LF82_00545	130,91	128,31	151,33	-0,264
Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase	hemF	2545675	2546574	LF82_12705	130,69	153,63	179,49	-0,249
L-alanine exporter AlaE	alaE	2780212	2780661	LF82_13895	219,24	233,14	271,27	-0,243
DUF805 domain-containing protein		29418	29783	LF82_00150	343,56	325,63	377,66	-0,236
Band 7 protein		3077544	3078452	LF82_15335	205,58	208,26	240,00	-0,227
alanine transaminase AlaA	alaA	2416171	2417388	LF82_12060	131,19	129,25	148,57	-0,226
Cell division protein FtsN	ftsN	4186981	4187835	LF82_20900	1677,48	1232,78	1403,65	-0,215
NADPH-dependent aldehyde reductase Ahr	yjgB	4645467	4646486	LF82_23210	217,35	220,11	249,33	-0,205
Periplasmic pH-dependent serine endoprotease DegQ	degQ	3415712	3417079	LF82_17000	138,30	126,28	142,26	-0,197
Probable 3-phenylpropionic acid transporter	hcaT	2649535	2650674	LF82_13140	321,91	326,36	361,12	-0,175
yersiniabactin non-ribosomal peptide synthetase HMWP2		2016879	2022986	LF82_10220	124,82	122,28	134,19	-0,159
4-deoxy-L-threo-5-hexosulose-uronate ketol-isomerase	kdul	2996066	2996902	LF82_14935	296,53	341,87	296,66	0,179
HAAAP family serine/threonine permease SdaC	sdaC	2906434	2907723	LF82_14550	186,40	223,22	192,69	0,190
Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase B	ghrB	3768036	3769010	LF82_18760	163,69	174,31	147,99	0,212
Starvation-sensing protein RspB	rspB	1630426	1631445	LF82_08170	188,71	219,88	185,64	0,215
long-chain acyl-CoA thioesterase FadM	fadM	467715	468113	LF82_02215	406,78	502,77	424,99	0,215
BenE family transporter YdcO	ydcO	1467704	1468876	LF82_07350	115,44	155,50	130,03	0,226
Probable malate:quinone oxidoreductase	mqo	2319446	2321092	LF82_11660	93,38	123,99	104,22	0,231
Minor tail protein U		1600558	1601546	LF82_07960	100,34	116,74	97,16	0,243
N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase	murQ	2539594	2540490	LF82_12670	119,91	144,31	120,26	0,243
STAS domain-containing protein	yrbB	3380642	3381570	LF82_16815	178,67	216,47	180,10	0,245
2-deoxy-D-gluconate 3-dehydrogenase		4574904	4575695	LF82_22880	163,65	163,59	136,13	0,245
Inhibitor of vertebrate lysozyme		277157	277603	LF82_01330	191,72	257,58	213,22	0,255
Type II secretion system core protein G	gspG	3504132	3504569	LF82_17510	232,76	273,54	225,14	0,272
CP4-like integrase		299737	300075	LF82_01460	301,87	408,57	330,04	0,280
Phage tail protein		2750155	2751031	LF82_13700	113,82	145,87	117,71	0,286
cell division protein ZapC	zapC	957900	958442	LF82_04585	127,54	186,39	150,15	0,295
Histidine transport ATP-binding protein HisP	hisP	2432346	2433119	LF82_12140	121,47	149,07	119,80	0,295
Metal-binding protein ZinT	zinT	2005272	2005922	LF82_10170	114,11	159,18	127,41	0,299
Uncharacterized protein YbgS	ybgS	737423	737803	LF82_03595	111,20	135,83	106,68	0,329
Ribonuclease E	rne	1117839	1121024	LF82_05525	11,90	14,38	11,18	0,343
quercetin 2,3-dioxygenase	yhhW	3624849	3625544	LF82_18075	160,38	179,74	139,51	0,347
Chorismate pyruvate-lyase	ubiC	4329452	4329949	LF82_21570	156,94	172,22	128,49	0,394
kdo(2)-lipid IV(A) lauroyltransferase	lpxL	1092318	1093238	LF82_05375	25,84	35,05	26,08	0,412
mRNA interferase		2056573	2056905	LF82_10350	107,47	109,15	80,51	0,422
Chaperone protein DnaJ	dnaJ	13894	15024	LF82_00075	18,47	22,16	15,03	0,538
Flagellar hook protein FlgL	flgL	1116691	1117644	LF82_05520	51,30	36,29	24,74	0,541
Peptidoglycan glycosyltransferase MrdB	mrdB	635992	637104	LF82_03045	9,04	13,93	8,97	0,605
Protein	yegR	2187989	2188306	LF82_11020	21,29	28,82	16,90	0,745
Enzyme IIB component of PTS		2073875	2074168	LF82_10420	20,40	31,79	17,67	0,895



## **Discussion & Conclusion**



# Discussion & Perspectives

## V.1 Identification du ou des récepteur(s) autophagique(s) impliqué(s) dans la reconnaissance des bactéries AIEC associées à la maladie de Crohn

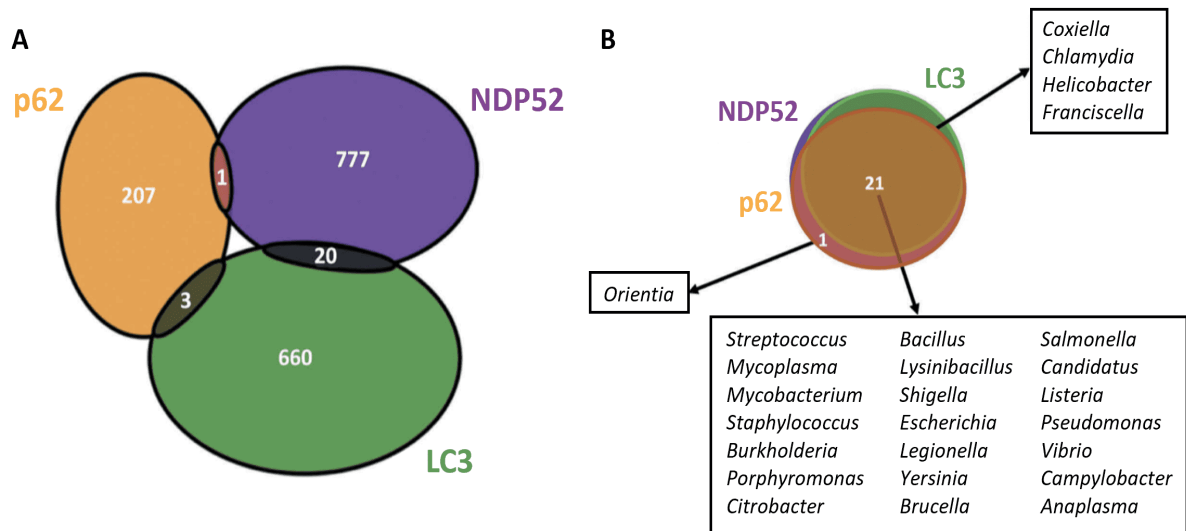
La xénophagie, un processus essentiel de l'autophagie sélective, permet la dégradation des pathogènes intracellulaires par des récepteurs autophagiques qui ciblent spécifiquement les micro-organismes ubiquitinés et qui agissent comme un pont entre le pathogène et les protéines LC3 présentes sur l'autophagosome (Lamark and Johansen, 2021). À ce jour, plusieurs récepteurs de l'autophagie impliqués dans la reconnaissance des micro-organismes ont été identifiés, notamment NBR1 (Kirkin et al., 2009; Waters et al., 2009; Franco et al., 2017), TAX1BP1 (Tumbarello et al., 2015), NDP52 (Thurston et al., 2009), p62 (Zheng et al., 2009), et Optineurine (OPTN) (Wild et al., 2011). Nous avons montré que la xénophagie est un mécanisme clé des cellules hôtes pour éliminer les bactéries AIEC intracellulaires (Larabi et al., 2020a). Toutefois, le(s) récepteur(s) impliqués dans l'adressage des AIEC vers les autophagosomes n'ont pas encore été identifiés.

### V.1.1 Étude du mécanisme d'adressage des bactéries AIEC vers les autophagosomes par les récepteurs autophagiques NDP52 et p62

#### V.1.1.1 Coopération entre les récepteurs autophagiques NDP52 et p62 dans la xénophagie

Parmi les récepteurs autophagiques testés (p62, NDP52, NRB1, TAX1BP1 et OPTN), nos résultats ont révélé une augmentation de la réplication intracellulaire de la souche de référence AIEC LF82 dans les cellules HeLa déficientes pour p62 ou NDP52, comparativement aux cellules HeLa contrôles. De plus, l'analyse par microscopie confocale a montré la colocalisation de p62 ou NDP52 avec la souche AIEC LF82 et LC3, un marqueur de l'autophagie. Ainsi, nos données suggèrent que ces deux récepteurs autophagiques sont impliqués dans la reconnaissance et l'adressage des AIEC vers les autophagosomes pour leur dégradation.

En accord avec nos résultats, il a été rapporté que ces deux récepteurs autophagiques sont impliqués dans la reconnaissance d'autres bactéries intracellulaires, telles que *L. monocytogenes* (Mostowy et al., 2011), *S. flexneri* (Mostowy et al., 2011) et *S. Typhimurium* (Thurston et al., 2009; Zheng et al., 2009). En effet, de façon intéressante, il a été révélé qu'un même récepteur est capable de cibler diverses bactéries vers les autophago-



**FIGURE 51 : Genres et protéines spécifiques des récepteurs autophagiques p62 et NDP52 et de la protéine LC3 de l'autophagie.**

(A) Comparaison des protéines bactériennes ciblées par p62, NDP52 et LC3, indiquant que le ciblage des protéines bactériennes par l'autophagie est principalement complémentaire. (B) Comparaison des genres bactériens ciblés par p62, NDP52 et LC3, montrant un chevauchement important, favorisant ainsi une surveillance efficace des pathogènes. Adaptée de (Sudhakar et al., 2019).

somes (Sharma et al., 2018) et inversement, plusieurs récepteurs peuvent être recrutés sur le même pathogène intracellulaire. Par exemple, Mostowy et co-auteurs ont montré que NDP52 et p62 sont recrutés, de manière dépendante, dans les cages de septines contenant *S. flexneri*, tandis qu'ils sont recrutés de façon indépendante lors de l'infection par *L. monocytogenes*. Les septines, un type de protéines conservées se liant au GTP, forment des cages autour des *Shigella* intracytosoliques mais pas des *Listeria* pour limiter la prolifération bactérienne (Mostowy et al., 2011). De la même manière, une autre étude a suggéré que, bien que partageant une cinétique de recrutement similaire pour *Salmonella*, p62 et NDP52 sont recrutés indépendamment l'un de l'autre pour cibler des micro-domaines distincts sur les bactéries afin de faciliter la xénophagie, soulignant leur potentielle complémentarité dans l'élimination des pathogènes intracellulaires (Cemma et al., 2011).

En effet, une étude très intéressante a démontré la complémentarité existante entre les récepteurs autophagiques p62 et NDP52. Cette étude a prédit les interactions potentielles entre les protéines humaines de l'autophagie et les protéines effectrices de plusieurs bactéries pathogènes, en identifiant les protéines bactériennes possédant potentiellement des motifs de reconnaissance pour les récepteurs p62 et NDP52 (Sudhakar et al., 2019). L'analyse a révélé que les cibles de p62 et NDP52 sont presque totalement spécifiques à chacun des récepteurs (seule une protéine est ciblée à la fois par p62 et NDP52), renforçant l'hypothèse qu'ils agissent indépendamment l'un de l'autre (**Figure 51 A**). De plus, 21 des 26 genres bactériens testés sont communément ciblés par p62, NDP52 et LC3, tandis qu'ils ciblent des protéines bactériennes avec peu de chevauchement (**Figure 51 B**) (Sudhakar et al., 2019). Compte tenu de l'absence de chevauchement entre les cibles de p62, NP52 et LC3, et du chevauchement important en termes de genres bactériens, cette observation suggère que l'autophagie cible différentes protéines bactériennes d'un même pathogène. La redondance dans le ciblage d'un même genre est bénéfique pour une reconnaissance robuste des agents pathogènes, tandis que la complémentarité des protéines bactériennes spécifiques est avantageuse pour augmenter la couverture de surveillance de l'autophagie. Toutefois, la complémentarité des récepteurs autophagiques pourrait rendre l'hôte plus vulnérable aux infections si le gène codant pour l'un des récepteurs est muté (Sudhakar et al., 2019), comme dans la MC avec la présence d'un polymorphisme du gène *NDP52* associé à une susceptibilité augmentée de développer la maladie (Ellinghaus et al., 2013).

Par conséquent, toutes ces études renforcent le fait que différents pathogènes peuvent être reconnus et contrôlés d'une manière spécifique par l'autophagie, montrant ainsi l'importance d'identifier le mode d'action des récepteurs autophagiques impliqués dans la reconnaissance des bactéries AIEC. Enfin, ces travaux renforcent également les résultats que nous avons obtenus, à savoir que p62 et NDP52 peuvent être recrutés au niveau de la bactérie AIEC LF82.

Dans ce contexte, des travaux supplémentaires seraient nécessaires pour identifier les mécanismes moléculaires précis régissant les reconnaissances spécifiques des pathogènes intracellulaires ubiquitinés par les récepteurs p62 et NDP52. Pour cela, plusieurs expériences pourraient être envisagées. Dans un premier temps,

des tests de protection à la gentamicine pourraient être réalisés dans des cellules T84 transfectées avec les deux siARN dirigés contre p62 et NDP52, ou dans des cellules HeLa déficientes pour les deux récepteurs (Lazarou et al., 2015), afin de déterminer si ces récepteurs agissent en coopération ou non dans l'élimination des AIEC. Par ailleurs, nos observations de la colocalisation entre p62 ou NDP52 avec la souche AIEC LF82 par microscopie confocale pourraient être confirmées par l'interaction physique entre les AIEC et les récepteurs autophagiques NDP52 et p62 qui pourrait être analysée par co-immunoprécipitation.

De plus, il a précédemment été montré par le laboratoire que l'autophagie joue également un rôle primordial dans la défense contre les AIEC dans les macrophages, un élément clé de la réponse immunitaire. En effet, Lapaquette et co-auteurs ont notamment démontré qu'une diminution de l'expression d'*ATG16L1*, induite par un siARN, entraînant une altération de l'autophagie, permet une meilleure survie de la souche AIEC LF82 dans les macrophages humains THP-1 (Lapaquette et al., 2012). En outre, une étude plus récente a rapporté que les macrophages isolés de patients atteints de la MC et porteurs de SNP dans les gènes de l'autophagie (*ULK1* et *IRGM*) présentent un défaut de l'élimination de la souche AIEC LF82 (Buisson et al., 2019). Ainsi, il serait pertinent d'identifier le ou les récepteur(s) autophagique(s) impliqués dans la reconnaissance des AIEC dans les macrophages, puisque les récepteurs pourraient être différents dans cette lignée par rapport aux cellules HeLa. Pour cela, des macrophages transfectés avec des siARN dirigés contre chacun des récepteurs ou des macrophages déficients pour l'un de ces récepteurs générés par la technique CRISPR/Cas9, pourraient être utilisés afin de réaliser des tests de protection à la gentamicine.

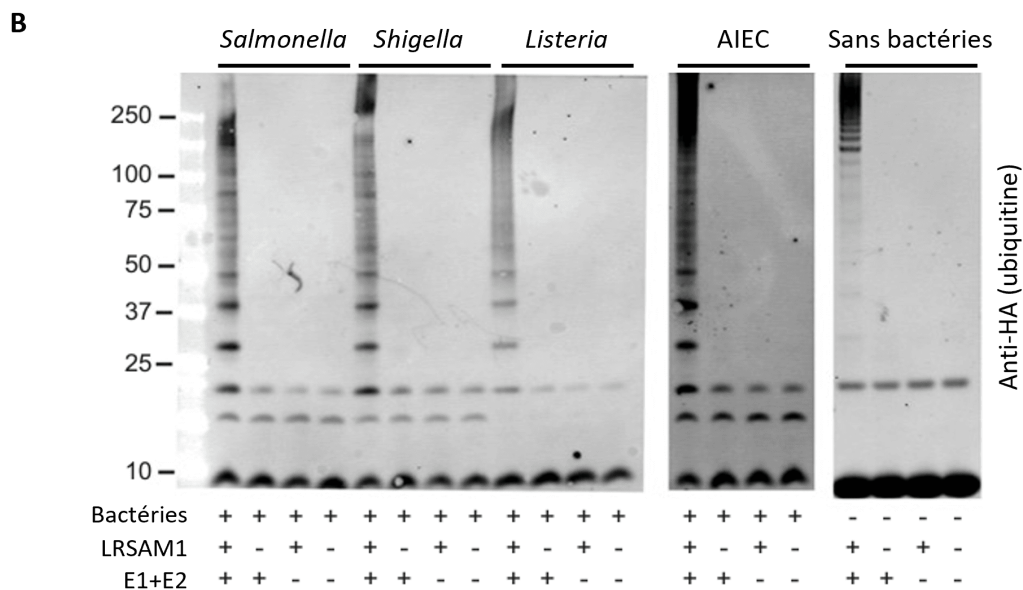
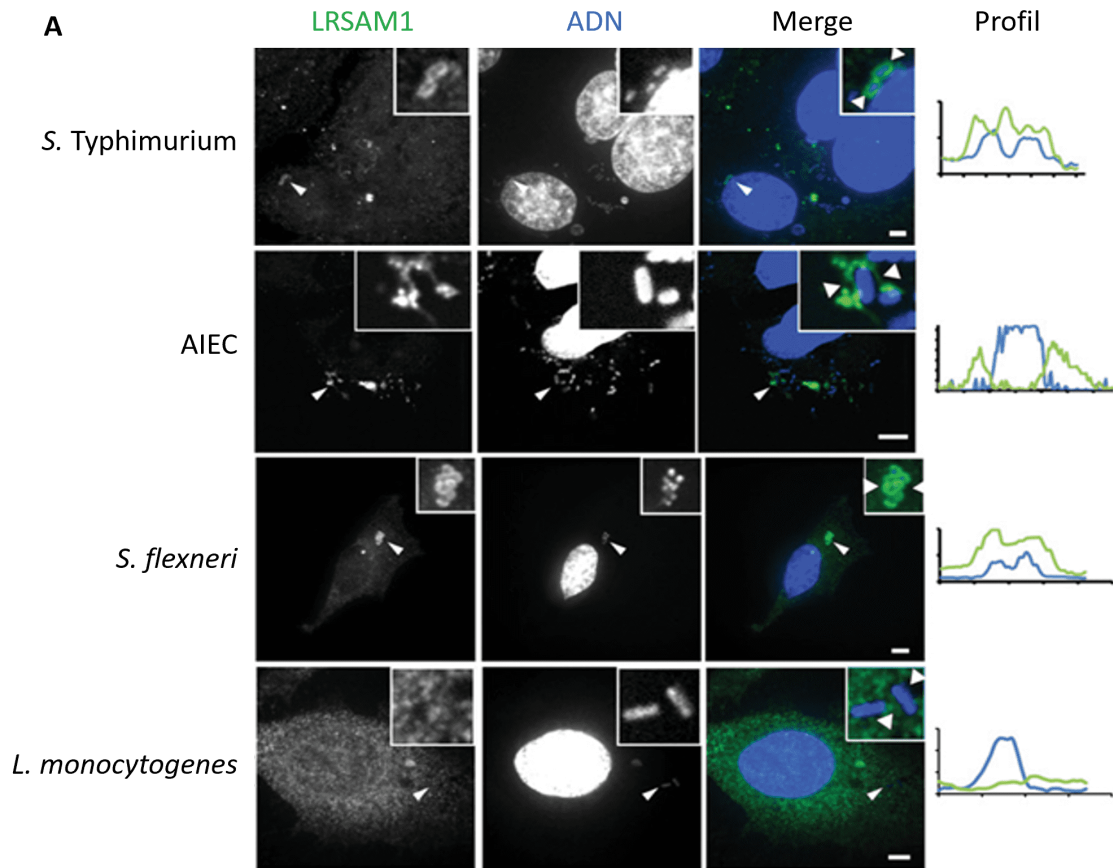
Une fois la validation *in vitro* réalisée, la plupart des études utilise ensuite des modèles *in vivo*, en particulier des modèles murins. Toutefois, dans le cas du récepteur NDP52, l'étude sur souris semble difficile. En effet, la protéine murine NDP52 est une forme tronquée dépourvue du domaine en doigt de zinc C-terminal, qui contient ZF1 et ZF2, nécessaire à la reconnaissance de l'ubiquitine à la surface des substrats et à l'interaction avec Rab35 (Tumbarello et al., 2015; Wu et al., 2021). Cela suggère que l'analyse de NDP52 et Rab35 chez la souris pourrait ne pas être informative quant à la fonction de NDP52 et Rab35 chez l'Homme. Cependant, il est intéressant de noter que NDP52 peut se lier à la protéine tau phosphorylée *via* son domaine SKICH et facilite la dégradation de cette protéine par l'autophagie chez la souris (Jo et al., 2014), ce qui suggère que NDP52 reconnaît différentes cibles par le biais de différents domaines et implique une fonction supplémentaire ou distincte de NDP52 humain par rapport à son homologue murin.

### V.1.1.2 Implication des ligases E3 et des ubiquitines dans la xénophagie

#### V.1.1.2.1 Ligases E3

L'ubiquitination est la liaison covalente de molécules d'ubiquitine sur les substrats, permettant l'induction de la dégradation sélective de protéines, d'organites, de bactéries, etc. L'ubiquitination nécessite l'action orches-





**FIGURE 52 : Implication de LRSAM1 dans l'ubiquitination des bactéries AIEC.**

(A) La colocalisation entre LRSAM1 endogène (en vert) et les bactéries (en bleu) est observée dans les cellules HeLa à 40 min post-infection. Les colocalisations sont marquées par des points de flèches dans l'encadrement en haut à droite. Les profils d'histogramme à droite ont été générés le long d'une ligne reliant les triangles représentés dans les encadrements - échelle : 5 µm. (B) Ubiquitination *in vitro* des bactéries de façon dépendante de LRSAM1. L'ubiquitination *in vitro* dépendante de LRSAM1 est capable de cibler *S. Typhimurium*, *S. flexneri*, *L. monocytogenes* et les bactéries AIEC. Adaptée de (Huett et al., 2012).

trée d'au moins trois enzymes travaillant en relais, une enzyme activatrice E1 (*ubiquitin-activating enzyme*), une enzyme de conjugaison E2 (*ubiquitin-conjugating enzyme*), et une ligase E3 (*ubiquitin E3 ligase*) (Herzhko et al., 2000; Buetow and Huang, 2016). Les substrats peuvent être modifiés par des molécules ubiquitine simples sur une ou plusieurs lysines (mono- ou multi-ubiquitination) et/ou des chaînes de poly-ubiquitine (poly-ubiquitination) peuvent être formées en reliant les molécules ubiquitine *via* l'un de leurs sept résidus lysine (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) ou de la méthionine N-terminale (M1) (Tripathi-Giesgen et al., 2021).

Au cours de ces deux dernières décennies, de nombreuses ligases E3 telles que LRSAM1 (*leucine rich repeat and sterile  $\alpha$  motif containing 1*), Parkin, Smurf1 (*SMAD ubiquitin regulator factor 1*), LUBAC (*linear ubiquitin chain assembly complex*), ARIH1 (*ariadne ring-between-ring homolog 1*) et RNF213 (*ring finger protein 213*), ont été identifiées pour ubiquitiner plus d'un type de bactéries et, dans certains cas, les bactéries sont ciblées simultanément par plusieurs ligases E3 (Huett et al., 2012; Heath et al., 2016; Franco et al., 2017; Tripathi-Giesgen et al., 2021). Par exemple, ARIH1, LRSAM1, RNF213 et LUBAC sont connus pour se colocaliser avec les vacuoles SCV (*Salmonella-containing vacuole*) endommagées et promouvoir la formation d'un manteau d'ubiquitine autour de *S. Typhimurium* cytosolique. Il existe également un groupe de ligases E3 comme RNF166 (Heath et al., 2016), MARCH8 (Jin et al., 2017), TRIM21 (Hos et al., 2020), TRIM22 (Lou et al., 2018) et TRIM16 (Chauhan et al., 2016) qui ne reconnaissent pas le pathogène lui-même, mais reconnaissent d'autres molécules liées à l'infection comme les glycanes exposés (Chauhan et al., 2016). En 2011, la première ligase E3 LRSAM1 a été fonctionnellement liée à la synthèse de l'enveloppe d'ubiquitine et à la xénophagie. En effet, les cellules déficientes pour *LRSAM1* sont incapables d'activer la xénophagie pour éliminer *S. Typhimurium* (Ng et al., 2011). De façon très intéressante, il a été montré que LRSAM1, non seulement colocalise avec toutes les bactéries susceptibles d'être éliminées par la xénophagie, mais induit leur ubiquitination (**Figure 52 A**) (Huett et al., 2012). En effet, dans les cellules HeLa, le taux de colocalisation de LRSAM1 endogène est de 10 % avec *S. Typhimurium*, 18 % avec les AIEC, 25 % avec *L. monocytogenes* et 29 % avec *S. flexneri* (**Figure 52 B**) (Huett et al., 2012). Par ailleurs, de façon tout aussi intrigante, il a été révélé que la perte de l'ubiquitination médiée par RNF213 réduit également le recrutement des récepteurs autophagiques p62 et de NDP52 vers *Salmonella*, suggérant que RNF213 est un moteur majeur de la xénophagie au cours de l'infection (Otten et al., 2021).

Toutefois, la façon dont les récepteurs autophagiques NPD52 et p62 sont recrutés par les bactéries ubiquitinées pour déclencher l'autophagie n'est pas encore claire. Dans ce contexte, il est important de déterminer la ou les ligase(s) E3 impliquée(s) dans l'ubiquitination des bactéries AIEC ainsi que de déterminer si elles agissent de manière coordonnée ou de manière indépendante et aléatoire. Jusqu'à présent, les études n'ont examiné que les duos et les trios de ligases E3 en réponse à l'infection par *M. tuberculosis* et *S. Typhimurium*, respectivement (Sharma et al., 2018). Ainsi, une meilleure compréhension du recrutement spécifique des ligases E3, de leur activation et du recrutement en aval des adaptateurs après l'activation par des pathogènes intracellulaires

représente à l'avenir, un sujet intéressant pour la recherche. Plus précisément, dans le cas des AIEC, plusieurs questions peuvent être posées : Est-ce que la souche AIEC LF82 colocalise avec les ubiquitines ? Quelle(s) ligase(s) E3 sont impliquées dans l'ubiquitination des bactéries AIEC ? Quels résidus des AIEC sont ubiquitinés ? Quelles sont les marques ubiquitine reconnues par p62 et NDP52 sur les AIEC ? Quelles protéines bactériennes de la membrane externe sont ubiquitinées par quelle ligase E3 ? Comment les micro-domaines des récepteurs autophagiques sont-ils établis sur les surfaces bactériennes et quels sont leurs rôles dans l'orchestration des voies de réponse immunitaire innée et xénophagique ?

Pour répondre à ces différentes questions, il pourrait être envisagé dans un premier temps, de réaliser une expérience d'immunofluorescence au cours de laquelle la souche AIEC LF82 et les molécules ubiquitine (par exemple, K48 ou K63) seraient marquées par un anticorps afin d'observer une éventuelle colocalisation. Cela nous permettrait de savoir si les bactéries AIEC sont ubiquitinées. Par la suite, une seconde expérience d'immunofluorescence pourrait être réalisée au cours de laquelle la souche AIEC LF82, les molécules ubiquitine et les récepteurs autophagiques p62 et NDP52 seraient marqués afin d'observer une colocalisation. Cela nous permettrait de déterminer si les récepteurs reconnaissent directement la souche AIEC LF82 ubiquitinée.

Ensuite, l'implication des différentes ligases E3 dans l'ubiquitination des AIEC pourra être étudiée par transfection des CEI avec des siARN dirigés contre les ARNm correspondants aux ligases E3, pour (i) observer une colocalisation entre la souche AIEC LF82, l'ubiquitine et LC3, et (ii) déterminer le nombre de bactéries AIEC LF82 intracellulaires par un test de protection à la gentamicine. D'après les données bibliographiques, il serait pertinent de s'intéresser dans un premier temps aux ligases E3 RNF213 et LRSAM1, puisqu'elles ont déjà été identifiées comme jouant un rôle dans l'ubiquitination des *E. coli* et dans le recrutement des récepteurs autophagiques p62 et NDP52. En effet, pour mieux comprendre le rôle de LRSAM1 dans l'élimination des AIEC par la xénophagie, les protéines LRSAM1 endogène et LC3 pourraient être marquées au cours de l'infection par la souche AIEC LF82 dans des CEI ou des macrophages afin d'observer une colocalisation entre les AIEC, LRSAM1 et LC3. De plus, étant donné que l'inactivation de *LRSAM1* par un siARN entraîne une augmentation du nombre de *Salmonella* intracellulaires, cela pourrait être testé en présence des bactéries AIEC. En effet, des CEI ou des macrophages pourraient être transfectés avec un siARN contre *LRSAM1* ou *ATG16L1* afin de déterminer le nombre de bactéries AIEC LF82 intracellulaires par un test de protection à la gentamicine. Par ailleurs, il a également été observé une interaction entre LRSAM1 et NDP52, mais pas p62, grâce à une technique de co-immunoprécipitation (Huett et al., 2012). En utilisant cette même technique, nous pourrions tester si d'autres ligases E3, comme RNF213, interagissent avec NDP52 ou p62. Enfin, une expérience pourrait être envisagée afin d'identifier les différentes ligases E3 impliquées dans l'ubiquitination de la souche AIEC LF82. Une expérience d'immunofluorescence pourrait être réalisée au cours de laquelle la souche AIEC LF82 et les ligases E3 sont marquées pour observer une colocalisation. Ensuite, un test d'ubiquitination *in vitro* avec des composants purifiés (mélange de la protéine LRSAM1 purifiée ou une autre ligase E3, des enzymes E1 et

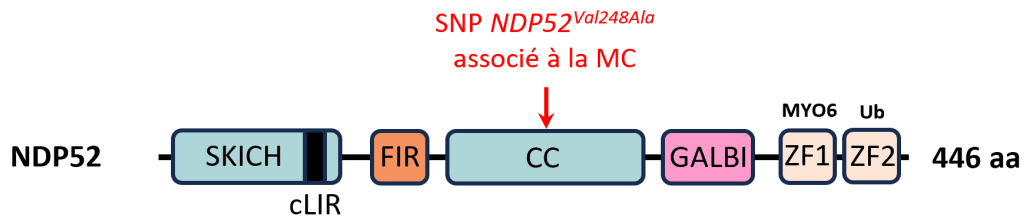
E2, de l'ubiquitine marquée par un tag HA, du tampon d'ubiquitination et la souche AIEC LF82) pour garantir que toute l'ubiquitination se produise *in vitro*, pourrait être réalisé afin d'observer une éventuelle ubiquitination des AIEC. Ainsi, les ubiquitines marquées par un tag HA seraient ensuite identifiées par western blot pour déterminer si les bactéries AIEC sont ubiquitinées.

### V.1.1.2.2 Ubiquitines

Bien qu'il existe de multiples types de liaisons ubiquitine possibles, les chaînes liées à K48 et K63 sont parmi les plus abondantes. La poly-ubiquitination liée à K48 cible plus largement les protéines pour la dégradation protéasomale, tandis que les poly-ubiquitination liées à K63 et K27 semblent être plus fortement associées à la dégradation par l'autophagie (Vainshtein and Grumati, 2020).

Dans ce contexte, une étude a révélé que l'extrémité C-terminale de NDP52 contient un domaine de liaison à l'ubiquitine composé de deux doigts de zinc (ZF) : un ZF non canonique (ZF1) et un ZF canonique de type C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (ZF2). Le domaine ZF2 se lie spécifiquement à la mono-ubiquitine (Cemma et al., 2011; Xie et al., 2015) ou à différents types de chaînes d'ubiquitine, y compris les chaînes d'ubiquitine K48, K63 et M1, pour cibler les pathogènes en vue de leur dégradation autophagique (Ciani et al., 2003; Xie et al., 2015; Thurston et al., 2016). Toutefois, deux études plus récentes ont montré que NDP52 se lie également aux chaînes d'ubiquitine liées à K27 (Wu et al., 2021) ainsi qu'aux chaînes de tétra-ubiquitine avec un ordre d'affinité K63>M1>K48 et aux chaînes de poly-ubiquitine K27 et K29 (Miyashita et al., 2021). Ainsi, les types d'ubiquitine reconnues par NDP52 ainsi que le ou les substrats bactériens ubiquitinés durant l'infection sont encore mal connus. Il est alors possible d'envisager que plusieurs types de chaînes d'ubiquitine soient construits à la surface des bactéries sur différents substrats. Ceci créerait des micro-domaines à la surface de la bactérie offrant une variété de ligands pour les récepteurs autophagiques. De plus, les domaines de reconnaissance de l'ubiquitine diffèrent sensiblement entre NDP52 et p62. En effet, p62 possède un domaine organisé en hélice- $\alpha$  qui reconnaît préférentiellement les poly-ubiquitine liées à K63, bien qu'il soit également capable de se lier aux chaînes K48 et à la mono-ubiquitine (Zheng et al., 2009; Cemma et al., 2011). Il est donc envisageable que NDP52 et p62 ne reconnaissent pas les mêmes chaînes d'ubiquitine et donc ne s'associent pas aux mêmes micro-domaines bactériens, renforçant ainsi l'idée que ces deux récepteurs peuvent travailler ensemble ou indépendamment. Ainsi, la multiplication des chaînes d'ubiquitine et des récepteurs les reconnaissant pourrait offrir un répertoire varié de signaux d'adressage vers l'autophagie. Cette variété serait cruciale pour lutter contre des pathogènes comme *Salmonella*, capables de modifier les voies d'ubiquitination cellulaire (Fiskin et al., 2016).

En outre, il a été rapporté que plusieurs types de chaînes sont associés au manteau d'ubiquitine de *S. Typhimurium*, notamment les chaînes M1 (également connues sous le nom de chaînes d'ubiquitine linéaires), et les chaînes de poly-ubiquitine K48 et K63, suggérant une structure et une plateforme de signalisation complexe du manteau d'ubiquitine (Manzanillo et al., 2013; van Wijk et al., 2017). Avec les avantages de la microscopie



**FIGURE 53 : Position du SNP  $NDP52^{Val248Ala}$  associé à la MC sur le récepteur autophagique NDP52.**

NDP52 (446 aa), comprend 7 domaines : un domaine SKICH qui est impliqué dans les interactions protéines-protéines et assure son oligomérisation, une région LIR non canonique (cLIR) qui se lie préférentiellement à LC3C (**en noir**), une région FIR pour se lier à FIP200 et induire l'autophagie (**en orange**), un domaine CC pour son oligomérisation (**en bleu**), une région GALBI qui assure sa liaison à la Galectine-8 (**en rose**) ainsi qu'un domaine de liaison à l'ubiquitine composé de deux doigts de zinc pour se lier à l'ubiquitine et à la myosine 6 (**en beige**). La position du SNP  $NDP52^{Val248Ala}$  se situe au niveau de l'acide aminé 248, dans le domaine CC de NDP52, où la valine est remplacée par une alanine (**en rouge**).

Abréviations : CC : *coiled-coil domain*, cLIR : *non-canonical LC3-interacting region*, FIR : *FIP200-interacting region*, GALBI : *galectine-8-binding region*, LIR : *LC3-interacting region*, MYO6 : *myosine VI*, SKICH : *skeletal muscle and kidney enriched inositol phosphatase carboxyl homology domain*, Ub : *ubiquitine*, ZF : *zinc finger domain*.

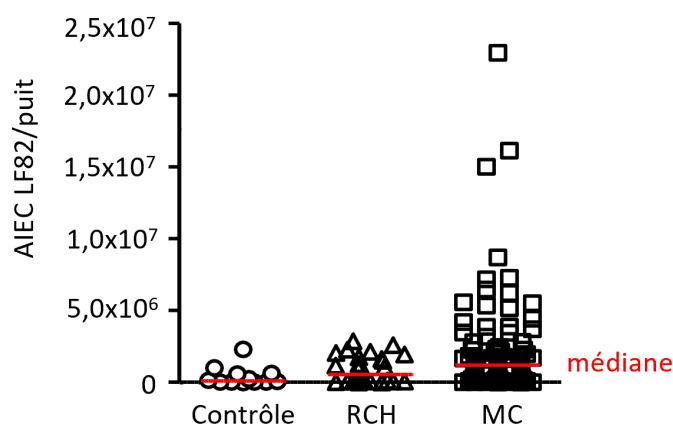
à super-résolution au cours des dernières années, il est devenu de plus en plus clair que l'enveloppe d'ubiquitine est un assemblage hétérogène composé au moins des types de chaînes K48, K63 et M1 (Noad et al., 2017; van Wijk et al., 2017), qui servent de sites de liaison directe spécifiques sur les bactéries cytosoliques pour des récepteurs autophagiques distincts. Par conséquent, ces travaux supposent donc que l'identification des types de chaînes d'ubiquitine présents sur les AIEC pourra être complexe.

Ainsi, il serait intéressant d'identifier les chaînes d'ubiquitine reconnues par p62 et NDP52 à la surface des AIEC. Pour cela, un test de « pull down » avec des lysats cellulaires pourrait être envisagé, au cours duquel des CEI seront transfectées avec des plasmides codant pour l'ubiquitine marquée par un tag HA ou des mutants à une seule lysine (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63), puis lysées. Les lysats seront ensuite incubés avec la protéine NDP52 ou p62 fusionnée à la GST afin de faire migrer ce lysat et utiliser un anticorps anti-HA pour identifier les ubiquitines qui se lient aux récepteurs autophagiques p62 et NDP52. De plus, nous pourrions marquer la souche AIEC LF82 avec un tag HA ou la fusionner avec la GFP, et infecter des CEI avec cette souche. À différents temps post-infection, les protéines pourraient être récupérées, et une co-immunoprécipitation sera réalisée avec un anticorps anti-GFP puis un anticorps anti-ubiquitine afin d'identifier le type d'ubiquitine présent à la surface de la souche AIEC LF82.

## V.2 Étude de l'impact du variant à risque *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* sur la réponse de l'hôte lors d'une infection par les AIEC

### V.2.1 Impact du variant à risque *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* sur le contrôle de la réplication intracellulaire des AIEC

En 2013, une étude de séquençage de l'exome entier de 42 patients atteints de la MC et de patients sains a identifié une association entre une augmentation du risque de développer la MC et une mutation faux-sens commune, appelée Val248Ala (SNP rs2303015). Cette mutation entraîne le remplacement de la valine par l'alanine en position 248 dans le domaine central « coiled-coil » de NDP52 (**Figure 53**) (Ellinghaus et al., 2013). Toutefois, l'implication exacte de ce variant à risque *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* dans la pathogénèse de la MC n'a pas encore été décrite. Ainsi, l'hypothèse proposée serait que ce variant entraînerait un défaut dans le contrôle de la réplication intracellulaire des AIEC par l'autophagie, conduisant à une réplication anormale des AIEC et à une inflammation accrue induite par ces bactéries. Cette hypothèse est soutenue par la présence de ce même variant *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* chez des patients atteints de cirrhose alcoolique du foie (Lutz et al., 2016). En effet, dans deux cohortes indépendantes de patients atteints de cirrhose alcoolique du foie, la présence du variant *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* est associée à un risque accru de développer une péritonite bactérienne spontanée, qui est l'infection la plus fréquente chez ces patients. Par ailleurs, la survie à 6 mois des patients porteurs de ce variant est diminuée par rapport aux patients porteurs de l'allèle *NDP52* sauvage (Lutz et al., 2016).



	NDP52		p-value	NDP52 <sup>Val248Ala</sup>		p-value
	≤ médiane	> médiane		≤ médiane	> médiane	
<b>Contrôle</b>	50,00 % (6)	50,00 % (6)	ns	50,00 % (1)	50,00 % (1)	ns
<b>RCH</b>	50,00 % (14)	50,00 % (14)	ns	50,00 % (1)	50,00 % (1)	ns
<b>MC</b>	53,49 % (46)	46,51 % (40)	ns	22,22 % (2)	77,70 % (7)	* p = 0,0371

**FIGURE 54 : La présence du SNP *NDP52*<sup>Val248Ala</sup> augmente la proportion de patients atteints de la MC présentant un nombre de bactéries AIEC intra-macrophagiques plus élevé.**

La présence du polymorphisme *NDP52*<sup>Val248Ala</sup> a été déterminée chez les patients atteints de la MC, de la RCH ou chez des sujets contrôles dans le cadre de l'étude MACRO2, une étude monocentrique dont les patients ont été inclus à Clermont-Ferrand et menée par le Dr. Anthony Buisson. Les macrophages dérivés des monocytes du sang périphérique des individus ont été infectés par la souche AIEC LF82 et la capacité de survie des bactéries à 10 heures post-infection a été analysée par un test de protection à la gentamicine. Pour chaque groupe (MC, RCH ou contrôle), la valeur médiane du nombre de bactéries AIEC LF82 intracellulaires à 10 heures post-infection de tous les individus a été déterminée. La proportion d'individus dans chaque groupe présentant un nombre de bactéries AIEC LF82 intra-macrophagiques à 10 heures post-infection ≤ ou > la médiane a été calculée. La différence statistique entre ces deux proportions a été analysée en utilisant un test Chi-square.

Néanmoins, obtenus par un test de protection à la gentamicine, nos résultats n'ont montré aucune différence significative dans le nombre de bactéries AIEC LF82 intracellulaires entre les cellules HeLa exprimant la protéine NDP52 sauvage et celles exprimant la protéine mutée NDP52<sup>Val248Ala</sup>. Ces résultats ont été confirmés par une expérience de cytométrie en flux, qui nous a permis de déterminer le pourcentage de cellules infectées parmi les cellules HeLa exprimant la protéine NDP52 sauvage ou la protéine mutée. Par conséquent, ces résultats suggèrent que dans les cellules HeLa avec nos conditions expérimentales, le variant à risque NDP52<sup>Val248Ala</sup> n'a pas d'impact sur le contrôle de la réplication des AIEC.

Une étude a montré que ce variant est toujours recruté au niveau des mitochondries pour exercer la mitophagie, ce qui n'est pas le cas pour un mutant dépourvu du domaine de liaison à l'ubiquitine, indiquant que cette mutation n'empêche pas son recrutement vers les cibles (Thurston et al., 2009; Lazarou et al., 2015). En effet, la mutation Val248Ala se trouve en position 248 de la protéine NDP52, dans le domaine CC et non pas dans le domaine de liaison à l'ubiquitine, ce qui expliquerait qu'aucune différence ne soit observée dans le nombre de bactéries intracellulaires entre les cellules HeLa exprimant la protéine NDP52 sauvage et celles exprimant la protéine mutée NDP52<sup>Val248Ala</sup> (**Figure 53**).

Toutefois, ce variant pourrait jouer un rôle dans d'autres lignées cellulaires, comme les macrophages. En effet, étant donné que les cellules épithéliales et les cellules immunitaires peuvent réagir différemment à l'infection par les AIEC, il semble important de remettre en question ces résultats dans les cellules immunitaires. Une étude clinique translationnelle sur des macrophages dérivés de monocytes de sang périphérique de patients, appelée « MACRO2 » (étude du comportement des MACrophages vis-à-vis des bactéries AIEC isolées de patients atteints de maladie de CROhn en fonction des facteurs de susceptibilité de l'hôte) a été menée au laboratoire sur 95 patients atteints de la MC, 30 patients atteints de la RCH et 15 sujets sains. Cette étude a mis en avant une corrélation entre la présence du variant à risque NDP52<sup>Val248Ala</sup> et un nombre plus élevé de bactéries AIEC dans les macrophages dérivés de monocytes chez les patients atteints de la MC. Cette corrélation n'a pas été observée chez les sujets sains ou chez les patients atteints de la RCH (**Figure 54**).

Par la suite, il serait pertinent d'étudier le rôle du variant à risque NDP52<sup>Val248Ala</sup> sur le contrôle de la réplication intracellulaire des AIEC dans les macrophages. Pour cela, nous pouvons infecter avec la souche AIEC LF82 des macrophages humains exprimant la protéine NDP52 sauvage ou la protéine mutée NDP52<sup>Val248Ala</sup>, et déterminer le nombre de bactéries intracellulaires. Nous pouvons également profiter d'un projet en cours au laboratoire, financé par l'ANR TOPIC (PRC), pour l'utilisation des cellules dérivées du sang (macrophages et cellules dendritiques) de patients atteints de la MC porteurs ou non du variant à risque NDP52<sup>Val248Ala</sup>. Notre hypothèse est que la mutation NDP52<sup>Val248Ala</sup> pourrait influencer la réponse inflammatoire en altérant la production de TNF- $\alpha$  et avoir ainsi un impact indirect sur la réplication intracellulaire des AIEC. En effet, il a été démontré par le laboratoire que les macrophages infectés par la souche AIEC LF82 secrètent de plus grande

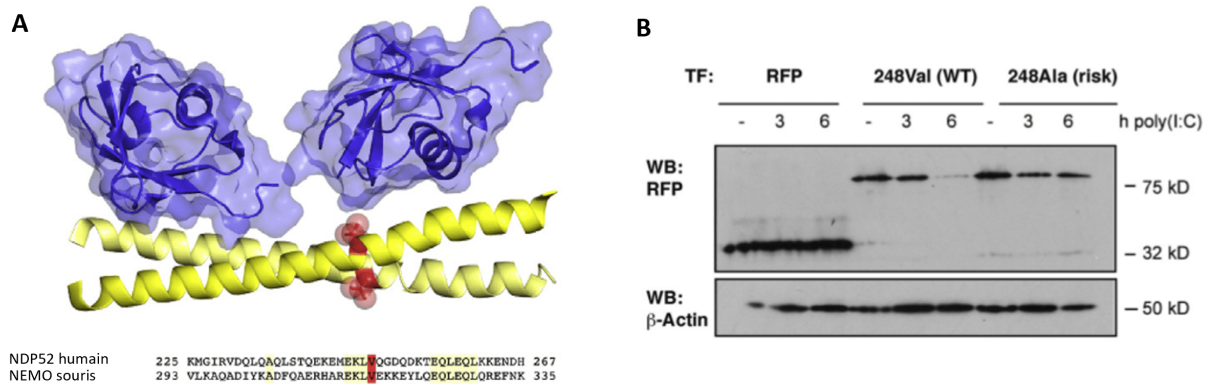


quantité de TNF- $\alpha$ , favorisant la réplication intracellulaire des AIEC (Bringer et al., 2012), et que cette réplication est limitée par des anticorps anti-TNF- $\alpha$  dans les macrophages issus de patients atteints de la MC (Douadi et al., 2022).

## V.2.2 Impact du variant de risque *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* sur le contrôle de la réponse inflammatoire induite par les AIEC

À l'heure actuelle, environ 270 protéines ont été identifiées comme interagissant avec NDP52, y compris les facteurs de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B tels que IKK $\beta$ , NEMO, A20, TRAF6 et IKK $\alpha$ , ce qui suggère que NDP52 pourrait réguler cette voie (Miyashita et al., 2021). En effet, plusieurs études ont démontré que la protéine NDP52 est capable de réduire l'inflammation en régulant la voie NF- $\kappa$ B (Inomata et al., 2012; Ellinghaus et al., 2013; Miyashita et al., 2021). Inomata et co-auteurs ont rapporté que la transfection des cellules HEK293T avec un plasmide exprimant la protéine NDP52 entraîne une diminution de l'activation de NF- $\kappa$ B, de façon dose-dépendante, à la suite d'une stimulation avec du LPS isolé d'*E. coli*, un agoniste du TLR4 (Inomata et al., 2012). Les mêmes résultats ont été observés par Ellinghaus et co-auteurs dans des cellules HeLa exprimant la protéine NDP52 stimulées avec du poly(I :C), un agoniste du TLR3 (Ellinghaus et al., 2013). Enfin, une étude plus récente a également démontré que la sur-expression de la protéine NDP52, dans des cellules HEK293T, empêche l'activation de NF- $\kappa$ B de manière dose-dépendante à la suite d'une stimulation avec 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  (Miyashita et al., 2021). Toutefois, bien que le rôle de la protéine NDP52 sauvage sur le contrôle de la voie NF- $\kappa$ B semble bien établi, l'impact du variant à risque *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* reste quant à lui, encore controversé.

Il a été rapporté que le rétro-contrôle négatif exercé par NDP52 sur la voie NF- $\kappa$ B est altéré lorsque les cellules HeLa sont transfectées avec un plasmide exprimant le variant à risque *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* et stimulées avec du poly(I :C) (Ellinghaus et al., 2013). Les auteurs ont proposé qu'à l'état physiologique, la protéine NDP52 sauvage est nécessaire pour dégrader sélectivement les TLR ou d'autres récepteurs des PAMP, inhibant ainsi l'activation de la voie de signalisation pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B (Ellinghaus et al., 2013). En revanche, une étude récente de Miyashita et co-auteurs a montré des résultats inverses. En effet, ils ont rapporté que l'activation canonique de NF- $\kappa$ B induite par la protéine NEMO est inhibée par la protéine NDP52 sauvage et *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* mutée dans les cellules HEK293T. L'activation non canonique de NF- $\kappa$ B induite par la kinase NIK (*NF- $\kappa$ B-inducing kinase*) n'est pas inhibée par ces deux formes de la protéine NDP52. De plus, la sur-expression de la protéine NDP52 sauvage ou *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* mutée n'a aucun effet sur l'activité basale de NF- $\kappa$ B dans les cellules HEK293T (Miyashita et al., 2021). Cette étude indique donc que le variant *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* a les mêmes effets que la protéine NDP52 sauvage sur l'activité de la voie NF- $\kappa$ B, suggérant qu'il pourrait affecter d'autres fonctions cellulaires impliquées dans l'étiologie de la MC (Miyashita et al., 2021). Ainsi, d'autres études sont nécessaires afin d'élucider clairement le rôle de ce variant à risque sur l'inflammation.



**FIGURE 55 : Rôle du variant à risque *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* sur la stabilité des protéines.**

(A) Alignement basé sur la structure et le modèle du domaine « coiled-coil » de NDP52 (acides aminés 225-267) ainsi que sur la structure des acides aminés 293-335 du motif UBAN de NEMO en complexe avec la di-ubiquitine liée à la lysine 63. Les hélices en spirale sont en jaune. La position du variant Val248 est visualisée par des sphères rouges dans le modèle tridimensionnel et marquée en rouge dans la séquence. L'ubiquitine est représentée en bleu avec une représentation de la surface. (B) Analyse par Western blot de la stabilité de la protéine NDP52. Les cellules HeLa ont été transfectées avec des plasmides exprimant la protéine NDP52 sauvage (WT) et le variant à risque (risk) et stimulées avec 50 mg/mL de poly(I:C) (agoniste synthétique du TLR, acide polyinosinique-polycytidylique) pendant 0, 3 ou 6 heures. Tandis que la protéine NDP52 sauvage est dégradée après 6 heures, le variant à risque présente une stabilité accrue. Adaptée de (Ellinghaus et al., 2013).

De plus, Ellinghaus et co-auteurs ont généré un modèle de la structure de la protéine NDP52 en complexe avec la di-ubiquitine liée à la lysine K63 afin de visualiser la position de l'acide aminé 248 dans le domaine CC. Bien que cet acide aminé ne se situe pas dans le domaine UBA de NDP52, d'après les auteurs, cette analyse de prédiction de structure indique un rôle possible de cet acide aminé dans la liaison aux chaînes d'ubiquitine (**Figure 55 A**). Par ailleurs, étant donné que NDP52 lui-même est censé être modifié post-traductionnellement et sujet à une dégradation sélective au cours de l'activation du TLR, ils ont ensuite caractérisé la stabilité de NDP52 à la suite de l'activation du TLR par le poly(I :C). L'activation du TLR entraîne une dégradation de la protéine NDP52 sauvage (248Val) en fonction du temps. Cependant, cet effet est altéré pour le variant à risque (248Ala), comme en témoigne la stabilité accrue de la protéine mutée NDP52 (248Ala) en fonction de la dose et du temps (**Figure 55 B**) (Ellinghaus et al., 2013). Ainsi, bien qu'Ellinghaus et co-auteurs aient mis en évidence l'impact de cette mutation sur la stabilité de la protéine, d'autres études restent nécessaires pour démontrer si cette mutation entraîne une modification de la liaison à l'ubiquitine.

Les résultats que nous avons obtenus ne montrent aucune différence significative dans la production de cytokines IL-6 et IL-8 induite à la suite d'une infection par la souche AIEC LF82, entre les cellules HeLa exprimant la protéine NDP52 sauvage et celles exprimant la protéine mutée NDP52<sup>Val248Ala</sup>. La divergence entre l'étude d'Ellinghaus et co-auteurs et la nôtre pourrait s'expliquer par le fait que, contrairement à Ellinghaus et co-auteurs qui ont utilisé le poly(I :C) pour activer la voie NF- $\kappa$ B, nous avons utilisé un modèle d'infection avec la souche AIEC LF82 qui induirait peut-être de façon plus faible l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Nous pourrions supposer que dans des conditions pathologiques spécifiques, la charge des AIEC pourrait être beaucoup plus importante, avec par conséquent une activation accrue de NF- $\kappa$ B. Dans cette condition, il est possible que NDP52<sup>Val248Ala</sup> ne pourrait pas diminuer l'activation de NF- $\kappa$ B. Ainsi, l'implication du variant à risque NDP52<sup>Val248Ala</sup> dans l'étiologie de la MC doit être étudiée de manière plus approfondie en utilisant différents modèles d'expérimentation. Par la suite, il serait pertinent de tester d'autres temps post-infection et d'autres MOI (Multiplicity of infection) d'infection par les AIEC dans des différentes lignées cellulaires.

### V.3 Identification des facteurs de virulence nécessaires aux AIEC pour échapper à l'autophagie par la technique Tn-Seq

Bien que les bactéries intracellulaires soient ciblées par la xénophagie pour être éliminées, certaines d'entre elles développent diverses stratégies pour détourner l'autophagie à leur avantage en sécrétant des facteurs de virulence (Hu et al., 2020). Ces effecteurs leur permettent d'éviter d'être reconnues par la machinerie autophagique, de limiter l'induction de ce processus, voire même de le détourner pour assurer leur propre réplication (Riebisch et al., 2021). Toutefois, jusqu'à présent, les facteurs de virulence des AIEC impliqués dans l'échappement à l'autophagie n'ont pas encore été identifiés. Ainsi, l'objectif de cette étude était donc d'identifier les gènes codant pour ces facteurs de virulence par la technique Tn-Seq (transposon sequencing).

**TABLEAU 8 : Facteurs de virulence décrits chez les AIEC impliqués dans la survie en macrophages.**

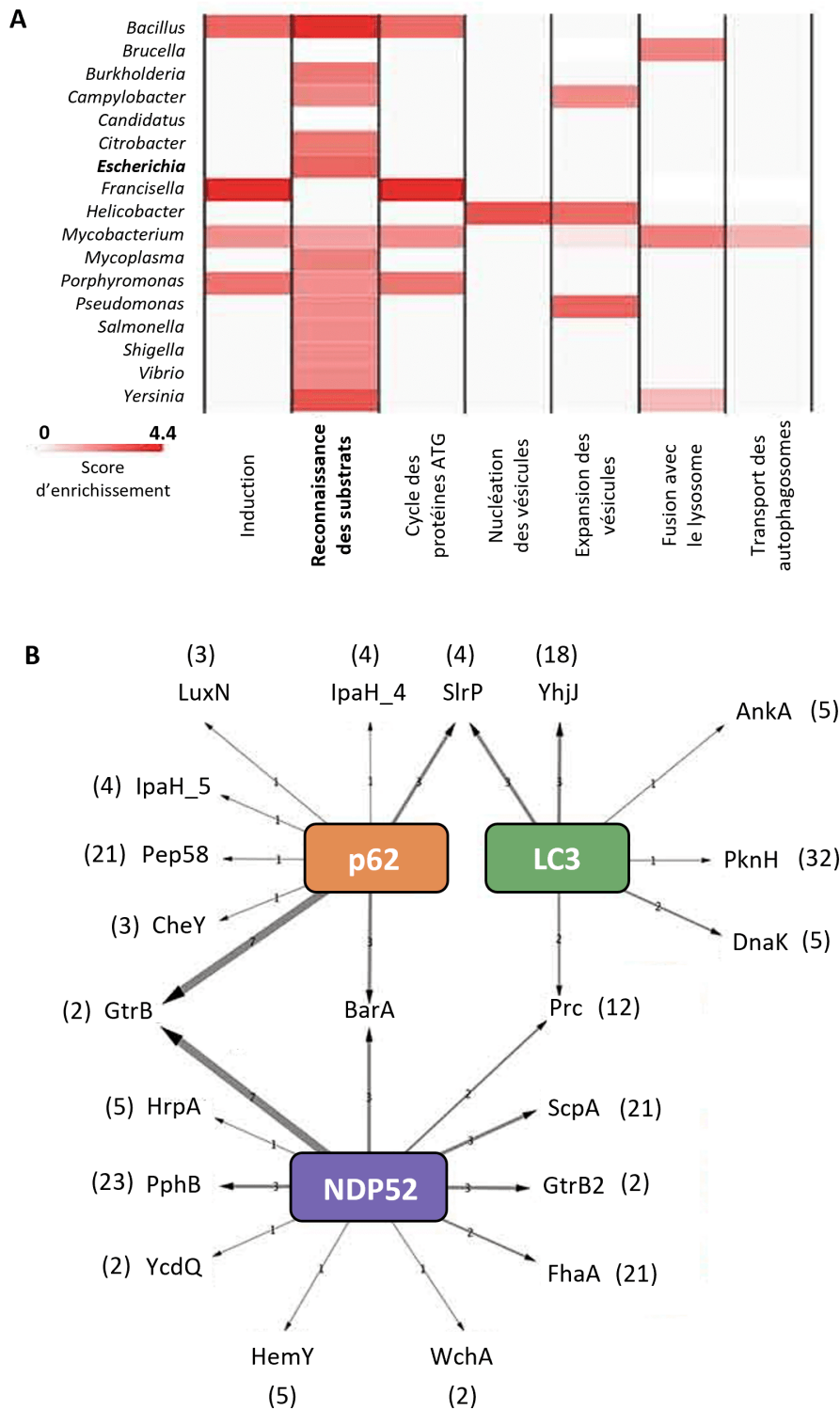
Gène	Description	Type de réponse induite	Référence
<i>htrA</i> ( <i>degP</i> )	Periplasmic serine endoprotease, high-temperature requirement A stress protein	Dommages de la paroi bactérienne	(Bringer et al., 2005)
<i>dsbA</i>	Disulfide interchange protein, periplasmic oxidoreductase	Stress oxydant	(Bringer et al., 2007)
<i>gipA</i>	Peyer's patch-specific virulence factor, transposase-like	Acidité Stress oxydant	(Vazeille et al., 2016)
<i>hfq</i>	RNA-binding protein	Multiples stress	(Simonsen et al., 2011)
<i>ibeA</i>	Invasion of brain endothelium protein A	Stress oxydant	(Cieza et al., 2015)
<i>ydeO</i>	HTH-type transcriptional regulator	Acidité	(Demarre et al., 2019)
<i>phoP</i>	Transcriptional regulatory protein	Acidité	(Demarre et al., 2019)
<i>rpoS</i>	RNA polymerase sigma factor	Multiples stress	(Demarre et al., 2019)
<i>pspA</i>	Phage shock protein A	Dommages de la paroi bactérienne	(Demarre et al., 2019)
<i>dksA</i>	RNA polymerase-binding transcription factor	Multiples stress	(Demarre et al., 2019)
<i>recA</i>	DNA-binding recombinase protein	Dommages à l'ADN	(Demarre et al., 2019)
<i>sulA</i>	Cell division inhibitor	Inhibition de la division cellulaire Dommages à l'ADN	(Demarre et al., 2019)
<i>lexA</i>	DNA-binding repressor	Dommages à l'ADN	(Demarre et al., 2019)
<i>soxS</i>	DNA-binding regulatory protein	Stress oxydant	(Demarre et al., 2019)

Le Tn-Seq est une approche qui permet d'étudier les fonctions des gènes à l'échelle du génome entier *via* l'insertion aléatoire d'un transposon dans chaque gène du micro-organisme étudié (DeJesus et al., 2017). Par exemple, chez l'organisme modèle *Vibrio cholerae*, le Tn-Seq a déjà été utilisé pour identifier les « house-keeping genes » (Chao et al., 2013) ainsi que ceux nécessaires pour la colonisation de l'hôte (Fu et al., 2013; Kamp et al., 2013), la croissance dans différents environnements (Kamp et al., 2013; Möll et al., 2015) et la survie au stress antibiotique (Dörr et al., 2016). Cette technique a été utilisée très récemment par Prudent et co-auteurs pour identifier les gènes de la souche AIEC LF82 impliqués dans la survie des bactéries au sein des macrophages (**Tableau 8**) (Prudent et al., 2021).

Dans un premier temps, parmi les 3 735 gènes de la souche AIEC LF82, nos résultats ont permis de définir deux clusters de gènes différentiellement représentés entre « l'input » et les cellules HeLa contrôles. Dans le cluster 1 (2 935 gènes), la majorité des gènes sont sur-représentés dans les cellules HeLa contrôles et sous-représentés dans le cluster 2 (800 gènes), comparativement à « l'input ». De plus, l'analyse « STRING » réalisée sur ces 800 gènes a révélé que certains d'entre eux ont déjà été identifiés, comme les gènes impliqués dans la mise en place du système flagellaire. Dans un second temps, parmi les 3 735 gènes de la souche AIEC LF82, 68 d'entre eux sont significativement sous-représentés (cluster 1 avec 29 gènes) ou sur-représentés (cluster 2 avec 39 gènes) dans les cellules déficientes pour l'autophagie (cellules déficientes pour *ATG16L1*) par rapport aux cellules contrôles. Ainsi, les gènes du cluster 2 sont les gènes potentiellement nécessaires aux AIEC pour échapper à l'autophagie. D'après la littérature, bien que la fonction de certains de ces 68 gènes ne soit pas clairement identifiée, aucun d'eux n'a une fonction connue dans l'autophagie, suggérant un nouveau rôle pour certains de ces gènes dans l'autophagie.

En effet, les gènes du cluster 1 (29 gènes) qui présentent une différence significative la plus élevée entre les cellules contrôles et les cellules déficientes pour l'autophagie sont les gènes *yegR*, *mrdB*, *flgL*, *dnaJ* et *lpxL*. Le gène *mrdB* code pour une protéine nécessaire au maintien de la forme en bâtonnet chez *E. coli* (Bendezú and de Boer, 2008; Shiomi et al., 2013). Le gène *flgL* code pour une protéine associée au crochet impliquée dans la structure du flagelle (Fraser et al., 1999) et le gène *dnaJ* code pour une protéine « heat shock » en réponse à une augmentation de la température de 30 à 42°C (Arsène et al., 2000; Grudniak et al., 2015). Ensuite, le gène *lpxL* code pour une acyltransférase impliquée dans la voie de biosynthèse des lipides A chez les *E. coli* (Schilling et al., 2014; Six et al., 2008, 2012). Parmi ces 29 gènes, certains sont encore inconnus dans la littérature, comme *yegR*, *mgo* et *ycdO*, et pourraient être intéressants à étudier.

Ensuite, parmi les 39 gènes du cluster 2, la plupart d'entre eux ont déjà une fonction connue, principalement dans les voies métaboliques. Les gènes qui présentent une différence significative la plus élevée entre les cellules contrôles et les cellules déficientes pour l'autophagie sont les gènes *secG*, *ribC*, *fabD* et *yajC*. Par exemple, les gènes *secG* et *yajC* sont impliqués dans un canal qui permet la translocation des protéines à travers la membrane cytoplasmique d'*E. coli* (Belin et al., 2015; Miyazaki et al., 2022). Les gènes *ribC* et *ribA* sont



**FIGURE 56 : Interactions entre l'autophagie et les pathogènes**

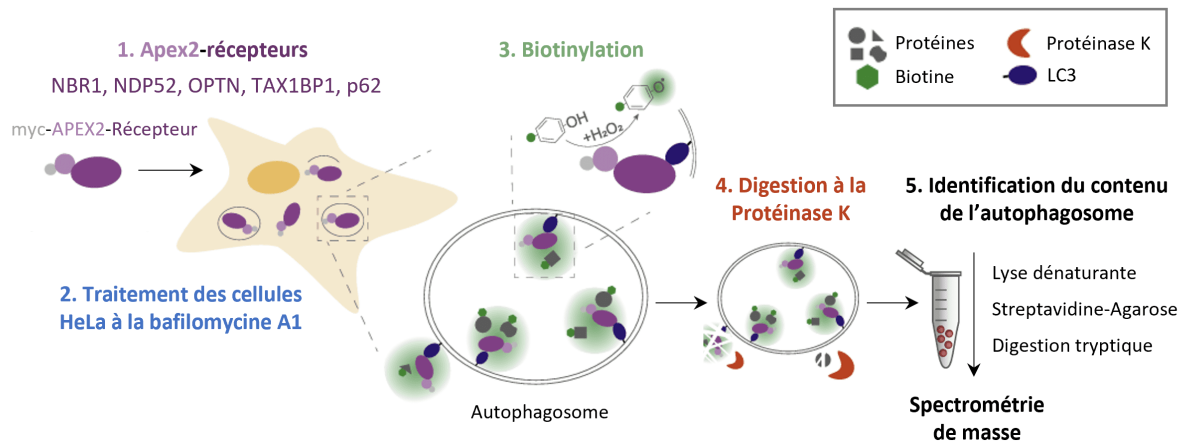
(A) Heatmap montrant la régulation des différentes phases de l'autophagie par divers genres bactériens. (B) Interaction entre les récepteurs de l'autophagie et leurs effecteurs bactériens cibles, qui régulent les différentes phases de l'autophagie. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre total de protéines de l'autophagie de l'hôte ciblées par l'effecteur bactérien indiqué. L'épaisseur des flèches de p62, NDP52 et LC3 indique le nombre d'orthologues de l'effecteur bactérien ciblé.

impliqués dans la voie de biosynthèse de la riboflavine chez *E. coli* (Bereswill et al., 1999; Fu et al., 2023), et le gène *fabD* est impliqué dans la voie de biosynthèse des acides gras libres (Zhang et al., 2012; Marcella and Barb, 2017). Peu de gènes sont encore inconnus dans la littérature, comme *yadW*, *ydeS*, *aec32* et la protéine band 7, qui pourraient être intéressants à étudier. Enfin, les fonctions précises de certains gènes sont encore inconnues, mais quelques articles récents suggèrent leur rôle, comme le gène *slyX* responsable de la sécrétion de l'enzyme dégradant l'inuline (Glebov et al., 2011; Mokhonov et al., 2018) et le gène *yhcB* impliqué dans la morphologie cellulaire.

En lien avec nos travaux, une étude très intéressante a révélé que certaines phases de l'autophagie, comme l'induction, la formation des autophagosomes et la fusion entre l'autophagosome et le lysosome, sont potentiellement régulées par un groupe de pathogènes donné. Il a été observé que les *Escherichia spp.* ont tendance à moduler la phase de l'autophagie qui consiste à reconnaître et adresser les substrats, plutôt que les phases plus en aval (**Figure 56 A**) (Sudhakar et al., 2019). Cette observation suggère donc que les AIEC pourraient contourner l'autophagie majoritairement en régulant cette phase précoce de l'autophagie. En outre, les auteurs ont également recherché le chevauchement entre les protéines bactériennes prédites ciblées par l'autophagie et les protéines de l'autophagie potentiellement modulées par cette même protéine bactérienne. 67 protéines bactériennes de ce type ont été identifiées, parmi les 2 119 protéines bactériennes prédites pour moduler l'autophagie (**Figure 56 B**) (Sudhakar et al., 2019). À l'appui de cette hypothèse, il a été constaté que les 67 protéines provenaient de 18 genres bactériens (sur les 26 testés), témoignant d'une stratégie assez répandue et conservée parmi les genres bactériens. En effet, certaines des protéines bactériennes identifiées ont des fonctions spécifiquement liées à la protéolyse (YhjJ, ScpA (*C5a peptidase*)), à la phosphorylation (PknH (*Serine/threonine-protein kinase PknH*), PphB (*Serine/threonine-protein phosphatase 2*)), et des effets post-traductionnels tels que le transfert d'ubiquitine (SlrP (*E3 ubiquitin-protein ligase*)), signifiant que ces bactéries sont capables de contourner l'autophagie de l'hôte (**Figure 56 B**) (Sudhakar et al., 2019).

Par ailleurs, une étude récente a démontré que les souches pathogènes d'*E. coli* hébergeant un plasmide codant pour le facteur de virulence *hlyF* surproduisent des OMV (*outer membrane vesicle*) qui empêchent la fusion autophagosome-lysosome et l'acidification dans les macrophages, inhibant ainsi leur élimination par la cellule hôte (Murase et al., 2016; David et al., 2022). Conformément à cette idée, le fait que la souche AIEC NRG 857Cc héberge le gène *hlyF* suggère que les OMV participent activement à la virulence de ces bactéries pathogènes en favorisant leur survie et leur réplication dans les cellules eucaryotes (McPhee et al., 2014). Ainsi, les bactéries pathogènes pourraient exploiter la propriété du facteur *hlyF* pour empêcher leur élimination par l'autophagie dans les cellules épithéliales et les macrophages.

Ensuite, afin de valider l'implication de certains gènes de la souche AIEC LF82 identifiés grâce au Tn-Seq dans l'échappement à l'autophagie, il sera nécessaire de générer des mutants isogéniques invalidés pour les gènes identifiés et d'étudier leur interaction avec l'autophagie dans les cellules hôtes. Par ailleurs, à l'avenir, la



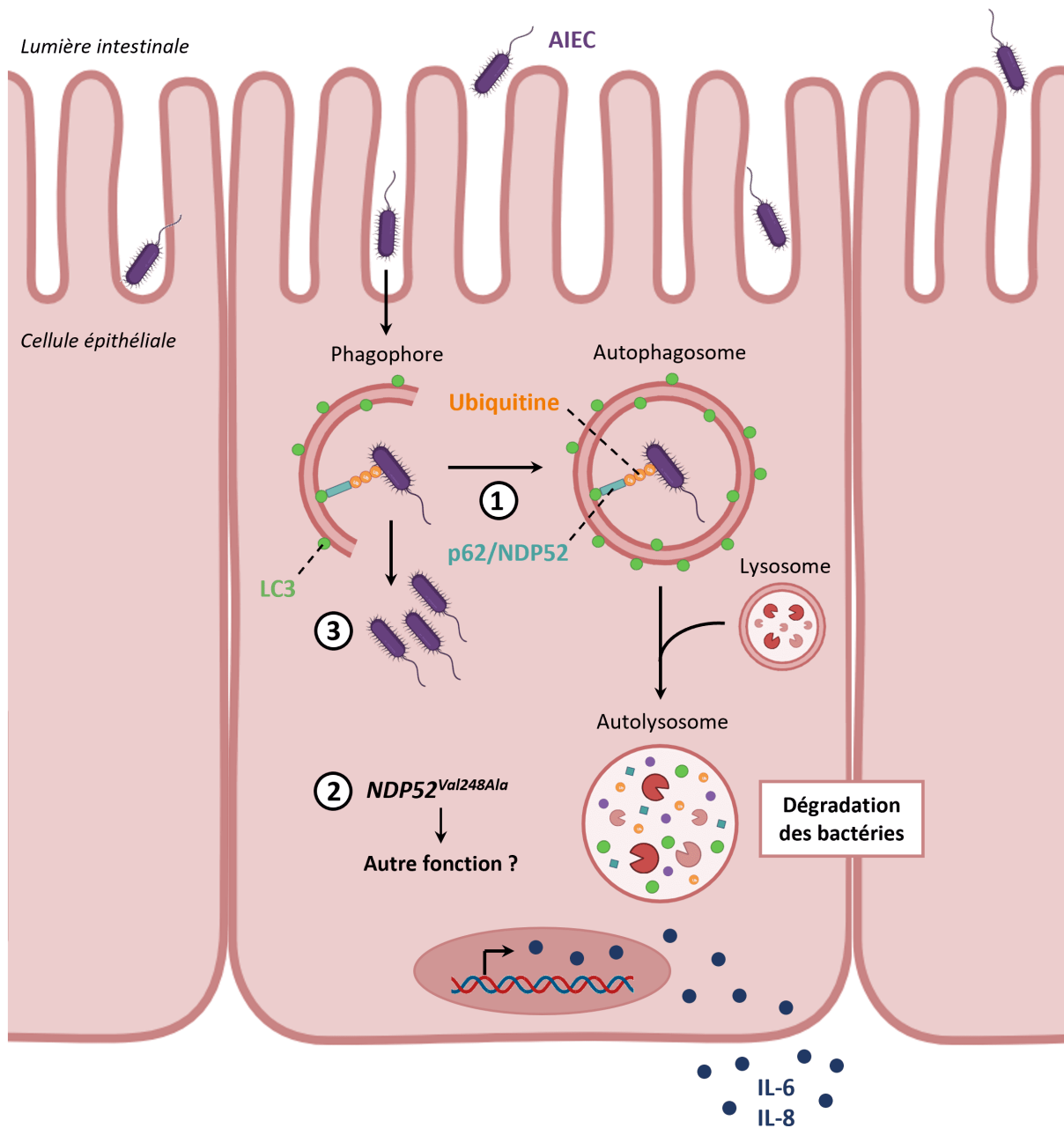
**FIGURE 57 : Purification des autophagosomes par la technique APEX2.**

Cette technique consiste à (1) générer des cellules HeLa exprimant les récepteurs autophagiques NBR1, NDP52, p62, OPTN ou TAX1BP1 fusionnés à la peroxydase Apex2. (2) Les cellules sont traitées avec de la bafilomycine A1, un inhibiteur de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome, afin d'enrichir les autophagosomes. (3) Ensuite, les cellules sont traitées avec de la biotine-phénol et de l' $H_2O_2$ , permettant ainsi la biotinylation des substrats à proximité du système Apex2. (4) Les cellules sont ensuite homogénéisées, puis traitées avec de la protéinase K, qui digère toutes les protéines qui ne sont pas protégées par une double-membrane, c'est-à-dire hors d'un autophagosome. Cette étape de digestion permet d'enrichir spécifiquement les protéines biotinylées par le système Apex2. (5) Les autophagosomes sont ensuite lysés avec du Triton X-100 et incubés avec de la Streptavidine-Agarose pour récupérer les protéines biotinylées. Les échantillons sont soumis à une digestion tryptique en solution et à une analyse par spectrométrie de masse afin d'identifier le contenu des autophagosomes. Adaptée de (Zellner et al., 2021).



technique Tn-Seq pourra permettre de répondre à différentes questions scientifiques selon les gènes observés, tels que s'intéresser aux gènes impliqués dans la survie intracellulaire, ou encore identifier de nouveaux gènes impliqués dans l'adhésion et/ou l'invasion de la souche AIEC LF82.

Enfin, il serait intéressant d'identifier les facteurs de virulence des AIEC potentiellement ciblés par les récepteurs autophagiques en s'appuyant sur une technique développée par Zellner et co-auteurs (Zellner et al., 2021). Brièvement, cette technique consiste à générer des cellules HeLa exprimant les récepteurs autophagiques NBR1, NDP52, p62, OPTN ou TAX1BP1 fusionnés à la peroxydase Apex2. Dans un premier temps, les cellules seront traitées avec de la bafilomycine A1, un inhibiteur de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome, afin d'enrichir les autophagosomes. Ensuite, les cellules seront traitées avec de la biotine-phénol et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, permettant ainsi la biotinylation des substrats à proximité du système Apex2. Les cellules seront ensuite homogénéisées, puis traitées avec de la protéinase K, qui digère toutes les protéines qui ne sont pas protégées par une double-membrane, c'est-à-dire hors d'un autophagosome. Cette étape de digestion permet d'enrichir spécifiquement les protéines biotinylées par le système Apex2. Les autophagosomes seront ensuite lysés avec du Triton X-100 et incubés avec de la Streptavidine-Agarose pour récupérer les protéines biotinylées. Les échantillons seront soumis à une digestion tryptique en solution et à une analyse par spectrométrie de masse afin d'identifier le contenu des autophagosomes (**Figure 57**) (Zellner et al., 2021). Ainsi, cette technique nous permettrait d'identifier les protéines bactériennes ciblées par les récepteurs autophagiques lors d'une infection par les AIEC.



**FIGURE 58 : Schéma bilan de mon travail de thèse.**

(1) L'autophagie est un mécanisme de défense de l'hôte, induit dans les cellules infectées par des bactéries AIEC, qui permet la dégradation des bactéries intracellulaires. p62 et NDP52 sont des récepteurs autophagiques impliqués dans le contrôle de la répllication intracellulaire de la souche AIEC LF82 et de l'inflammation induite par ces bactéries. (2) Concernant le rôle du variant à risque *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* associé à une susceptibilité augmentée de développer la MC, nos résultats suggèrent que ce variant n'impacte pas l'élimination de la souche AIEC LF82. (3) Enfin, certains pathogènes intracellulaires, dont les AIEC, développent diverses stratégies pour échapper à l'autophagie. Nos résultats ont révélé que 68 gènes sont différemment représentés entre les cellules HeLa contrôles et les cellules HeLa déficientes pour l'autophagie, suggérant ainsi que certains de ces gènes sont nécessaires aux AIEC pour échapper à l'autophagie.

## Conclusion générale

Des études menées par le laboratoire ont révélé que l'autophagie, un mécanisme de défense crucial de l'hôte contre les pathogènes intracellulaires, est induite lors d'une infection par les bactéries AIEC. Toutefois, les AIEC sont capables de contourner le processus autophagique *via* différents mécanismes et, ainsi, de se répliquer dans les cellules hôtes. Dans ce contexte, l'objectif de mes travaux de thèse était d'identifier les récepteurs autophagiques responsables de la reconnaissance des AIEC, ainsi que les gènes nécessaires aux AIEC pour échapper à l'autophagie.

Le 1<sup>er</sup> axe de mon travail de thèse a montré que la déficience de p62 ou NDP52 dans les cellules HeLa entraîne une augmentation de la réplication intracellulaire de la souche de référence AIEC LF82 et de la production de cytokines pro-inflammatoires. L'analyse par microscopie confocale a révélé la colocalisation de p62 ou NDP52 avec la bactérie AIEC LF82 et la protéine LC3, un marqueur de l'autophagie. Ainsi, nos résultats suggèrent que p62 et NDP52 agiraient comme des récepteurs autophagiques pour contrôler la réplication intracellulaire des AIEC. De plus, nous avons étudié l'impact d'un polymorphisme du gène *NDP52* associé à une susceptibilité augmentée de développer la MC, appelé *NDP52<sup>Val248Ala</sup>*, sur le contrôle des AIEC. Aucune différence n'a été observée dans le nombre de bactéries AIEC LF82 intracellulaires entre les cellules HeLa exprimant le variant à risque *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* et celles exprimant l'allèle sauvage, suggérant un autre rôle de ce variant, probablement dans le contrôle de l'inflammation (**Figure 58**). Par la suite, il serait également intéressant d'étudier le rôle de ce variant sur le contrôle de la réplication intracellulaire des AIEC et de la réponse inflammatoire dans les macrophages.

Le 2<sup>ème</sup> axe de mon travail de thèse visait à identifier les gènes nécessaires aux AIEC pour échapper à l'autophagie par la technique Tn-Seq. Les résultats obtenus ont permis d'identifier 68 gènes différentiellement représentés entre les cellules HeLa contrôles et les cellules HeLa déficientes pour l'autophagie. Les gènes sur-représentés dans les cellules HeLa déficientes pour l'autophagie par rapport aux cellules contrôles, sont les gènes potentiellement nécessaires aux AIEC pour échapper à l'autophagie (**Figure 58**). Ainsi, la suite de cette étude consistera à générer des mutants isogéniques invalidés pour des gènes identifiés et d'étudier leur interaction avec l'autophagie dans les cellules hôtes.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux contribuent à la compréhension des divers aspects de l'interaction entre les cellules hôte et les bactéries AIEC associées à la MC et permettront, à l'avenir, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour limiter la virulence des AIEC.

# Ma Thèse en 180 secondes

Je souhaite conclure mon manuscrit de thèse avec la planche qui a été réalisée par Anne Bernardi (illustratrice scientifique) lors de la finale clermontoise du concours « Ma Thèse en 180 secondes », à laquelle j'ai participé en mars 2023. Cette planche permet d'illustrer et de vulgariser mon sujet de thèse, ainsi que de garder un souvenir scientifique de mon passage sur scène, qui a été filmé et que vous pouvez retrouver sur Youtube !



MT 180 FRANCE

En direct sur la chaîne YouTube de l'UCA

ma thèse en 180 secondes finale locale à la Comédie de Clermont-Ferrand

10<sup>ème</sup> édition

17h30 lundi 6 mars 2023

Entrée gratuite  
Inscription obligatoire sur [bit.ly/MT180-UCA-23](https://bit.ly/MT180-UCA-23)

Logos: CNRS, Université Clermont Auvergne, MAIF, mgen, casden



# **Bibliographie**



# Bibliographie

- Abubakar, I., Myhill, D., Aliyu, S. H., and Hunter, P. R. (2008). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques : a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*, 14(3) :401–410.
- Adams, A. T., Kennedy, N. A., Hansen, R., Ventham, N. T., O'Leary, K. R., Drummond, H. E., Noble, C. L., El-Omar, E., Russell, R. K., Wilson, D. C., Nimmo, E. R., Hold, G. L., and Satsangi, J. (2014). Two-stage genome-wide methylation profiling in childhood-onset Crohn's Disease implicates epigenetic alterations at the VMP1/MIR21 and HLA loci. *Inflamm Bowel Dis*, 20(10) :1784–1793.
- Adegbola, S. O., Sahnun, K., Warusavitarne, J., Hart, A., and Tozer, P. (2018). Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease. *Int J Mol Sci*, 19(8) :2244.
- Adler, J., Rangwalla, S. C., Dwamena, B. A., and Higgins, P. D. R. (2011). The prognostic power of the NOD2 genotype for complicated Crohn's disease : a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 106(4) :699–712.
- Adolph, T. E., Tomczak, M. F., Niederreiter, L., Ko, H.-J., Böck, J., Martinez-Naves, et al. (2013). Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature*, 503(7475) :272–276.
- Aggeletopoulou, I., Konstantakis, C., Assimakopoulos, S. F., and Triantos, C. (2019). The role of the gut microbiota in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Microb Pathog*, 137 :103774.
- Aguilar, C., Mano, M., and Eulalio, A. (2019). MicroRNAs at the Host-Bacteria Interface : Host Defense or Bacterial Offense. *Trends Microbiol*, 27(3) :206–218.
- Agus, A., Denizot, J., Thévenot, J., Martinez-Medina, M., Massier, S., Sauvanet, P., Bernalier-Donadille, A., Denis, S., Hofman, P., Bonnet, R., Billard, E., and Barnich, N. (2016). Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Sci Rep*, 6 :19032.
- Ahluwalia, B., Moraes, L., Magnusson, M. K., and Öhman, L. (2018). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 53(4) :379–389. Publisher : Taylor & Francis \_eprint : <https://doi.org/10.1080/00365521.2018.1447597>.
- Aida, I., Meddour, Y., Kadiri, H., Smara, M., Bousseloub, A., Kecili, L., Gamar, L., Belhocine, K., Boussafsaf, M.-A., Debzi, N., Aouichat-Bouguerra, S., and Chaib, S. (2018). T300A variant of AT16L1 gene in a cohort of Algerian Crohn disease patients. *Curr Res Transl Med*, 66(1) :9–14.
- Ajayi, T. A., Innes, C. L., Grimm, S. A., Rai, P., Finethy, R., Coers, J., Wang, X., Bell, D. A., McGrath, J. A., Schurman, S. H., and Fessler, M. B. (2019). Crohn's disease IRGM risk alleles are associated with altered gene expression in human tissues. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 316(1) :G95–G105.
- Al Azzaz, J., Rieu, A., Aires, V., Delmas, D., Chluba, J., Winckler, P., Bringer, M.-A., Lamarche, J., Vervandier-Fasseur, D., Dalle, F., Lapaquette, P., and Guzzo, J. (2018). Resveratrol-Induced Xenophagy Promotes Intracellular Bacteria Clearance in Intestinal Epithelial Cells and Macrophages. *Front Immunol*, 9 :3149.

- Al Nabhani, Z., Dietrich, G., Hugot, J.-P., and Barreau, F. (2017). Nod2 : The intestinal gate keeper. *PLoS Pathog*, 13(3) :e1006177.
- Al Nabhani, Z., Lepage, P., Mauny, P., Montcuquet, N., Roy, M., Le Roux, K., Dussailant, M., Berrebi, D., Hugot, J.-P., and Barreau, F. (2016). Nod2 Deficiency Leads to a Specific and Transmissible Mucosa-associated Microbial Dysbiosis Which Is Independent of the Mucosal Barrier Defect. *J Crohns Colitis*, 10(12) :1428–1436.
- Al-Sadi, R., Boivin, M., and Ma, T. (2009). Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14(7) :2765–2778.
- Alam, M. T., Amos, G. C. A., Murphy, A. R. J., Murch, S., Wellington, E. M. H., and Arasaradnam, R. P. (2020). Microbial imbalance in inflammatory bowel disease patients at different taxonomic levels. *Gut Pathog*, 12 :1.
- Alcedo, K. P., Thanigachalam, S., and Naser, S. A. (2016). RHB-104 triple antibiotics combination in culture is bactericidal and should be effective for treatment of Crohn’s disease associated with Mycobacterium paratuberculosis. *Gut Pathog*, 8 :32.
- Aleksandrova, K., Romero-Mosquera, B., and Hernandez, V. (2017). Diet, Gut Microbiome and Epigenetics : Emerging Links with Inflammatory Bowel Diseases and Prospects for Management and Prevention. *Nutrients*, 9(9) :962.
- Allaire, J. M., Crowley, S. M., Law, H. T., Chang, S.-Y., Ko, H.-J., and Vallance, B. A. (2018). The Intestinal Epithelium : Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol*, 39(9) :677–696.
- Aloi, M., Nuti, F., Stronati, L., and Cucchiara, S. (2014). Advances in the medical management of paediatric IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 11(2) :99–108.
- Alsaadi, R. M., Losier, T. T., Tian, W., Jackson, A., Guo, Z., Rubinsztein, D. C., and Russell, R. C. (2019). ULK1-mediated phosphorylation of ATG16L1 promotes xenophagy, but destabilizes the ATG16L1 Crohn’s mutant. *EMBO Rep*, 20(7) :e46885.
- Ananthakrishnan, A. N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12(4) :205–217.
- Ananthakrishnan, A. N., Khalili, H., Higuchi, L. M., Bao, Y., Korzenik, J. R., Giovannucci, E. L., Richter, J. M., Fuchs, C. S., and Chan, A. T. (2012). Higher predicted vitamin D status is associated with reduced risk of Crohn’s disease. *Gastroenterology*, 142(3) :482–489.
- Ananthakrishnan, A. N., Khalili, H., Konijeti, G. G., Higuchi, L. M., de Silva, P., Korzenik, J. R., Fuchs, C. S., Willett, W. C., Richter, J. M., and Chan, A. T. (2013). A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 145(5) :970–977.
- Anderson, J. L., Edney, R. J., and Whelan, K. (2012). Systematic review : faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 36(6) :503–516.
- Aomatsu, T., Imaeda, H., Matsumoto, K., Kimura, E., Yoden, A., Tamai, H., Fujiyama, Y., Mizoguchi, E., and Andoh, A. (2011). Faecal chitinase 3-like-1 : a novel biomarker of disease activity in paediatric inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 34(8) :941–948.
- Arnott, I. D., Kingstone, K., and Ghosh, S. (2000). Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. *Scand J Gastroenterol*, 35(11) :1163–1169.
- Arsène, F., Tomoyasu, T., and Bukau, B. (2000). The heat shock response of Escherichia coli. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1) :3–9.

- Aschard, H., Laville, V., Tchetchen, E. T., Knights, D., Imhann, F., Seksik, P., Zaitlen, N., Silverberg, M. S., Cosnes, J., Weersma, R. K., Xavier, R., Beaugerie, L., Skurnik, D., and Sokol, H. (2019). Genetic effects on the commensal microbiota in inflammatory bowel disease patients. *PLoS Genet*, 15(3) :e1008018.
- Ashida, H., Kim, M., Schmidt-Supprian, M., Ma, A., Ogawa, M., and Sasakawa, C. (2010). A bacterial E3 ubiquitin ligase IpaH9.8 targets NEMO/IKKgamma to dampen the host NF-kappaB-mediated inflammatory response. *Nat Cell Biol*, 12(1) :66–73; sup pp 1–9.
- Assa, A., Vong, L., Pinnell, L. J., Rautava, J., Avitzur, N., Johnson-Henry, K. C., and Sherman, P. M. (2015). Vitamin D deficiency predisposes to adherent-invasive Escherichia coli-induced barrier dysfunction and experimental colonic injury. *Inflamm Bowel Dis*, 21(2) :297–306.
- Autschbach, F., Eisold, S., Hinz, U., Zinser, S., Linnebacher, M., Giese, T., Löffler, T., Büchler, M. W., and Schmidt, J. (2005). High prevalence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut*, 54(7) :944–949.
- Azimi, T., Nasiri, M. J., Chirani, A. S., Pouriran, R., and Dabiri, H. (2018). The role of bacteria in the inflammatory bowel disease development : a narrative review. *APMIS*, 126(4) :275–283.
- Bach, H., Papavinasundaram, K. G., Wong, D., Hmama, Z., and Av-Gay, Y. (2008). Mycobacterium tuberculosis virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B. *Cell Host Microbe*, 3(5) :316–322.
- Bank, S., Andersen, P. S., Burisch, J., Pedersen, N., Roug, S., Galsgaard, J., Ydegaard Turino, S., Brodersen, J. B., Rashid, S., Kaiser Rasmussen, B., Avlund, S., Bastholm Olesen, T., Hoffmann, H. J., Andersen Nexø, B., Sode, J., Vogel, U., and Andersen, V. (2015). Polymorphisms in the Toll-Like Receptor and the IL-23/IL-17 Pathways Were Associated with Susceptibility to Inflammatory Bowel Disease in a Danish Cohort. *PLoS One*, 10(12) :e0145302.
- Bansal, M., Moharir, S. C., and Swarup, G. (2018). Autophagy receptor optineurin promotes autophagosome formation by potentiating LC3-II production and phagophore maturation. *Commun Integr Biol*, 11(2) :1–4.
- Barbara, G., Barbaro, M. R., Fuschi, D., Palombo, M., Falangone, F., Cremon, C., Marasco, G., and Stanghellini, V. (2021). Inflammatory and Microbiota-Related Regulation of the Intestinal Epithelial Barrier. *Front Nutr*, 8 :718356.
- Barnett, T. C., Liebl, D., Seymour, L. M., Gillen, C. M., Lim, J. Y., Larock, C. N., Davies, M. R., Schulz, B. L., Nizet, V., Teasdale, R. D., and Walker, M. J. (2013). The globally disseminated MIT1 clone of group A Streptococcus evades autophagy for intracellular replication. *Cell Host Microbe*, 14(6) :675–682.
- Barnich, N., Boudeau, J., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2003). Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol Microbiol*, 48(3) :781–794.
- Barnich, N., Carvalho, F. A., Glasser, A.-L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., Peeters, H., Bommelaer, G., Desreumaux, P., Colombel, J.-F., and Darfeuille-Michaud, A. (2007). CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest*, 117(6) :1566–1574.
- Barnich, N. and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Abnormal CEACAM6 expression in Crohn disease patients favors gut colonization and inflammation by adherent-invasive E. coli. *Virulence*, 1(4) :281–282.
- Barreau, F., Meinzer, U., Chareyre, F., Berrebi, D., Niwa-Kawakita, M., Dussillant, M., Foligne, B., Ollendorff, V., Heyman, M., Bonacorsi, S., Lesuffleur, T., Sterkers, G., Giovannini, M., and Hugot, J.-P. (2007). CARD15/NOD2 Is Required for Peyer's Patches Homeostasis in Mice. *PLOS ONE*, 2(6) :e523. Publisher : Public Library of Science.



- Barrett, J. C., Hansoul, S., Nicolae, D. L., Cho, J. H., Duerr, et al. (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*, 40(8) :955–962.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs : target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2) :215–233.
- Basic, M., Keubler, L. M., Buettner, M., Achard, M., Breves, G., Schröder, B., Smoczek, A., Jörns, A., Wedekind, D., Zschemisch, N. H., Günther, C., Neumann, D., Lienenklaus, S., Weiss, S., Hornef, M. W., Mähler, M., and Bleich, A. (2014). Norovirus triggered microbiota-driven mucosal inflammation in interleukin 10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis*, 20(3) :431–443.
- Baumgart, D. C. and Sandborn, W. J. (2012). Crohn's disease. *Lancet*, 380(9853) :1590–1605.
- Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, R. H., Wiedmann, M., McDonough, P., Kim, S. G., Berg, D., Schukken, Y., Scherl, E., and Simpson, K. W. (2007). Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J*, 1(5) :403–418.
- Baxt, L. A. and Goldberg, M. B. (2014). Host and bacterial proteins that repress recruitment of LC3 to *Shigella* early during infection. *PLoS One*, 9(4) :e94653.
- Bel, S., Pendse, M., Wang, Y., Li, Y., Ruhn, K. A., Hassell, B., Leal, T., Winter, S. E., Xavier, R. J., and Hooper, L. V. (2017). Paneth cells secrete lysozyme via secretory autophagy during bacterial infection of the intestine. *Science*, 357(6355) :1047–1052.
- Belin, D., Plaia, G., Boulfekhar, Y., and Silva, F. (2015). *Escherichia coli* SecG Is Required for Residual Export Mediated by Mutant Signal Sequences and for SecY-SecE Complex Stability. *J Bacteriol*, 197(3) :542–552.
- Bell, S. L., Lopez, K. L., Cox, J. S., Patrick, K. L., and Watson, R. O. (2021). Galectin-8 Senses Phagosomal Damage and Recruits Selective Autophagy Adapter TAX1BP1 To Control *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Macrophages. *mBio*, 12(4) :e0187120.
- Bendezú, F. O. and de Boer, P. A. J. (2008). Conditional Lethality, Division Defects, Membrane Involution, and Endocytosis in *mre* and *mrd* Shape Mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 190(5) :1792–1811.
- Benjamin, J., Makharia, G. K., Ahuja, V., Kalaivani, M., and Joshi, Y. K. (2008). Intestinal permeability and its association with the patient and disease characteristics in Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 14(9) :1399–1405.
- Benjamin, J. L., Hedin, C. R. H., Koutsoumpas, A., Ng, S. C., McCarthy, N. E., Hart, A. L., Kamm, M. A., Sanderson, J. D., Knight, S. C., Forbes, A., Stagg, A. J., Whelan, K., and Lindsay, J. O. (2011). Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of fructo-oligosaccharides in active Crohn's disease. *Gut*, 60(7) :923–929.
- Benjamin, J. L., Hedin, C. R. H., Koutsoumpas, A., Ng, S. C., McCarthy, N. E., Prescott, N. J., Pessoa-Lopes, P., Mathew, C. G., Sanderson, J., Hart, A. L., Kamm, M. A., Knight, S. C., Forbes, A., Stagg, A. J., Lindsay, J. O., and Whelan, K. (2012). Smokers with active Crohn's disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis*, 18(6) :1092–1100.
- Bereswill, S., Hinkelmann, S., Kist, M., and Sander, A. (1999). Molecular Analysis of Riboflavin Synthesis Genes in *Bartonella henselae* and Use of the *ribC* Gene for Differentiation of *Bartonella* Species by PCR. *J Clin Microbiol*, 37(10) :3159–3166.
- Bergeron, V., Grondin, V., Rajca, S., Maubert, M.-A., Pigneur, B., Thomas, G., Trugnan, G., Beaugerie, L., Cosnes, J., Masliah, J., Sokol, H., Seksik, P., and Bachelet, M. (2012). Current smoking differentially affects blood mononuclear cells from patients with Crohn's disease and ulcerative colitis : relevance to its adverse role in the disease. *Inflamm Bowel Dis*, 18(6) :1101–1111.

- Bernstein, C. N., Rawsthorne, P., Cheang, M., and Blanchard, J. F. (2006). A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am J Gastroenterol*, 101(5) :993–1002.
- Berton, S., Chen, L., Liang, Y. C., Xu, Z., Afriyie-Asante, A., Rajabalee, N., Yang, W., and Sun, J. (2022). A selective PPM1A inhibitor activates autophagy to restrict the survival of Mycobacterium tuberculosis. *Cell Chem Biol*, pages S2451–9456(22)00094–0.
- Berwick, D. C., Heaton, G. R., Azeggagh, S., and Harvey, K. (2019). LRRK2 Biology from structure to dysfunction : research progresses, but the themes remain the same. *Molecular Neurodegeneration*, 14(1) :49.
- Beveridge, T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol*, 181(16) :4725–4733.
- Bevins, C. L., Stange, E. F., and Wehkamp, J. (2009). Decreased Paneth cell defensin expression in ileal Crohn’s disease is independent of inflammation, but linked to the NOD2 1007fs genotype. *Gut*, 58(6) :882–883 ; discussion 883–884.
- Bilski, J., Brzozowski, B., Mazur-Bialy, A., Sliwowski, Z., and Brzozowski, T. (2014). The role of physical exercise in inflammatory bowel disease. *Biomed Res Int*, 2014 :429031.
- Bilski, J., Mazur-Bialy, A. I., Brzozowski, B., Magierowski, M., Jasnos, K., Krzysiek-Maczka, G., Urbanczyk, K., Ptak-Belowska, A., Zwolinska-Wcislo, M., Mach, T., and Brzozowski, T. (2015). Moderate exercise training attenuates the severity of experimental rodent colitis : the importance of crosstalk between adipose tissue and skeletal muscles. *Mediators Inflamm*, 2015 :605071.
- Bisanz, J. E., Upadhyay, V., Turnbaugh, J. A., Ly, K., and Turnbaugh, P. J. (2019). Meta-Analysis Reveals Reproducible Gut Microbiome Alterations in Response to a High-Fat Diet. *Cell Host Microbe*, 26(2) :265–272.e4.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., and Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 171(4) :603–614.
- Blaney, G. P., Albert, P. J., and Proal, A. D. (2009). Vitamin D metabolites as clinical markers in autoimmune and chronic disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1173 :384–390.
- Boada-Romero, E., Serramito-Gómez, I., Sacristán, M. P., Boone, D. L., Xavier, R. J., and Pimentel-Muiños, F. X. (2016). The T300A Crohn’s disease risk polymorphism impairs function of the WD40 domain of ATG16L1. *Nat Commun*, 7 :11821.
- Bonfiglio, G., Neroni, B., Radocchia, G., Pompilio, A., Mura, F., Trancassini, M., Di Bonaventura, G., Pantanella, F., and Schippa, S. (2019). Growth Control of Adherent-Invasive Escherichia coli (AIEC) by the Predator Bacteria Bdellovibrio bacteriovorus : A New Therapeutic Approach for Crohn’s Disease Patients. *Microorganisms*, 8(1) :17.
- Bonilla, D. L., Bhattacharya, A., Sha, Y., Xu, Y., Xiang, Q., Kan, A., Jagannath, C., Komatsu, M., and Eissa, N. T. (2013). Autophagy regulates phagocytosis by modulating the expression of scavenger receptors. *Immunity*, 39(3) :537–547.
- Borgo, G. M., Burke, T. P., Tran, C. J., Lo, N. T. N., Engström, P., and Welch, M. D. (2022). A patatin-like phospholipase mediates Rickettsia parkeri escape from host membranes. *Nat Commun*, 13(1) :3656.
- Borody, T. J., Bilkey, S., Wettstein, A. R., Leis, S., Pang, G., and Tye, S. (2007). Anti-mycobacterial therapy in Crohn’s disease heals mucosa with longitudinal scars. *Dig Liver Dis*, 39(5) :438–444.
- Borody, T. J., Leis, S., Warren, E. F., and Surace, R. (2002). Treatment of severe Crohn’s disease using antimycobacterial triple therapy—approaching a cure ? *Dig Liver Dis*, 34(1) :29–38.

- Bosca-Watts, M. M., Tosca, J., Anton, R., Mora, M., Minguez, M., and Mora, F. (2015). Pathogenesis of Crohn's disease : Bug or no bug. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 6(1) :1–12.
- Boschetti, G., Garnero, P., Moussata, D., Cuerq, C., Préaudat, C., Duclaux-Loras, R., Mialon, A., Draï, J., Flourié, B., and Nancey, S. (2015a). Accuracies of serum and fecal S100 proteins (calprotectin and calgranulin C) to predict the response to TNF antagonists in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 21(2) :331–336.
- Boschetti, G., Laidet, M., Moussata, D., Stefanescu, C., Roblin, X., Phelip, G., Cotte, E., Passot, G., Francois, Y., Draï, J., Del Tedesco, E., Bouhnik, Y., Flourie, B., and Nancey, S. (2015b). Levels of Fecal Calprotectin Are Associated With the Severity of Postoperative Endoscopic Recurrence in Asymptomatic Patients With Crohn's Disease. *Am J Gastroenterol*, 110(6) :865–872.
- Boudeau, J., Barnich, N., and Darfeuille-Michaud, A. (2001). Type 1 pili-mediated adherence of Escherichia coli strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol Microbiol*, 39(5) :1272–1284.
- Boudeau, J., Glasser, A.-L., Julien, S., Colombel, J.-F., and Darfeuille-Michaud, A. (2003). Inhibitory effect of probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive E. coli strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 18(1) :45–56.
- Boudeau, J., Glasser, A. L., Masseret, E., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. (1999). Invasive ability of an Escherichia coli strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun*, 67(9) :4499–4509.
- Boyle, K. B. and Randow, F. (2013). The role of 'eat-me' signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. *Curr Opin Microbiol*, 16(3) :339–348.
- Brant, S. R. (2011). Update on the heritability of inflammatory bowel disease : the importance of twin studies. *Inflamm Bowel Dis*, 17(1) :1–5.
- Bressler, B., Panaccione, R., Fedorak, R. N., and Seidman, E. G. (2015). Clinicians' guide to the use of fecal calprotectin to identify and monitor disease activity in inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 29(7) :369–372.
- Brest, P., Corcelle, E. A., Cesaro, A., Chargui, A., Belaïd, A., Klionsky, D. J., Vouret-Craviari, V., Hebuterne, X., Hofman, P., and Mograbi, B. (2010). Autophagy and Crohn's disease : at the crossroads of infection, inflammation, immunity, and cancer. *Curr Mol Med*, 10(5) :486–502.
- Brest, P., Lapaquette, P., Souidi, M., Lebrigand, K., Cesaro, A., Vouret-Craviari, V., Mari, B., Barbry, P., Mosnier, J.-F., Hébuterne, X., Harel-Bellan, A., Mograbi, B., Darfeuille-Michaud, A., and Hofman, P. (2011). A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet*, 43(3) :242–245.
- Bretin, A., Carrière, J., Dalmasso, G., Bergougnoux, A., B'chir, W., Maurin, A.-C., Müller, S., Seibold, F., Barnich, N., Bruhat, A., Darfeuille-Michaud, A., and Nguyen, H. T. T. (2016). Activation of the EIF2AK4-EIF2A/eIF2 $\alpha$ -ATF4 pathway triggers autophagy response to Crohn disease-associated adherent-invasive Escherichia coli infection. *Autophagy*, 12(5) :770–783.
- Bretin, A., Lucas, C., Larabi, A., Dalmasso, G., Billard, E., Barnich, N., Bonnet, R., and Nguyen, H. T. T. (2018). AIEC infection triggers modification of gut microbiota composition in genetically predisposed mice, contributing to intestinal inflammation. *Sci Rep*, 8(1) :12301.
- Bringer, M.-A., Barnich, N., Glasser, A.-L., Bardot, O., and Darfeuille-Michaud, A. (2005). HtrA Stress Protein Is Involved in Intramacrophagic Replication of Adherent and Invasive Escherichia coli Strain LF82 Isolated from a Patient with Crohn's Disease. *Infect Immun*, 73(2) :712–721.

- Bringer, M.-A., Billard, E., Glasser, A.-L., Colombel, J.-F., and Darfeuille-Michaud, A. (2012). Replication of Crohn's disease-associated AIEC within macrophages is dependent on TNF- $\alpha$  secretion. *Lab Invest*, 92(3) :411–419.
- Bringer, M.-A., Glasser, A.-L., Tung, C.-H., Méresse, S., and Darfeuille-Michaud, A. (2006). The Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. *Cell Microbiol*, 8(3) :471–484.
- Bringer, M.-A., Rolhion, N., Glasser, A.-L., and Darfeuille-Michaud, A. (2007). The Oxidoreductase DsbA Plays a Key Role in the Ability of the Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli Strain LF82 To Resist Macrophage Killing. *J Bacteriol*, 189(13) :4860–4871.
- Britton, G. J., Contijoch, E. J., Mogno, I., Vennaro, O. H., Llewellyn, S. R., Ng, R., Li, Z., Mortha, A., Merad, M., Das, A., Gevers, D., McGovern, D. P. B., Singh, N., Braun, J., Jacobs, J. P., Clemente, J. C., Grinspan, A., Sands, B. E., Colombel, J.-F., Dubinsky, M. C., and Faith, J. J. (2019). Microbiotas from Humans with Inflammatory Bowel Disease Alter the Balance of Gut Th17 and ROR $\gamma$ t+ Regulatory T Cells and Exacerbate Colitis in Mice. *Immunity*, 50(1) :212–224.e4.
- Brument, S., Sivignon, A., Dumych, T. I., Moreau, N., Roos, G., Guérardel, Y., Chalopin, T., Deniaud, D., Bilyy, R. O., Darfeuille-Michaud, A., Bouckaert, J., and Gouin, S. G. (2013). Thiazolylaminomannosides as potent antiadhesives of type 1 piliated Escherichia coli isolated from Crohn's disease patients. *J Med Chem*, 56(13) :5395–5406.
- Budzik, J. M., Swaney, D. L., Jimenez-Morales, D., Johnson, J. R., Garelis, N. E., Repasy, T., Roberts, A. W., Popov, L. M., Parry, T. J., Pratt, D., Ideker, T., Krogan, N. J., and Cox, J. S. (2020). Dynamic post-translational modification profiling of Mycobacterium tuberculosis-infected primary macrophages. *Elife*, 9 :e51461.
- Buetow, L. and Huang, D. T. (2016). Structural insights into the catalysis and regulation of E3 ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(10) :626–642.
- Buhner, S., Buning, C., Genschel, J., Kling, K., Herrmann, D., Dignass, A., Kuechler, I., Krueger, S., Schmidt, H. H.-J., and Lochs, H. (2006). Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease : role of CARD15 3020insC mutation? *Gut*, 55(3) :342–347.
- Buisine, M. P., Desreumaux, P., Leteurtre, E., Copin, M. C., Colombel, J. F., Porchet, N., and Aubert, J. P. (2001). Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. *Gut*, 49(4) :544–551.
- Buisson, A., Chevaux, J.-B., Allen, P. B., Bommelaer, G., and Peyrin-Biroulet, L. (2012). Review article : the natural history of postoperative Crohn's disease recurrence. *Aliment Pharmacol Ther*, 35(6) :625–633.
- Buisson, A., Douadi, C., Ouchchane, L., Goutte, M., Hugot, J.-P., Dubois, A., Minet-Quinard, R., Bouvier, D., Bommelaer, G., Vazeille, E., and Barnich, N. (2019). Macrophages Inability to Mediate Adherent-Invasive E. coli Replication is Linked to Autophagy in Crohn's Disease Patients. *Cells*, 8(11) :E1394.
- 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., Barnich, N., and 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.
- Buisson, A., Vazeille, E., Fumery, M., Pariente, B., Nancey, S., Seksik, P., Peyrin-Biroulet, L., Allez, M., Ballet, N., Filippi, J., Yzet, C., Nachury, M., Boschetti, G., Billard, E., Dubois, A., Rodriguez, S., Chevarin, C., Goutte, M., Bommelaer, G., Pereira, B., Hebuterne, X., Barnich, N., and CEALIVE & REMIND study group (2021). Faster and less invasive tools to identify patients with ileal colonization by adherent-invasive E. coli in Crohn's disease. *United European Gastroenterol J*, 9(9) :1007–1018.

- Buisson, A., Vazeille, E., Minet-Quinard, R., Goutte, M., Bouvier, D., Goutorbe, F., Pereira, B., Barnich, N., and Bommelaer, G. (2016). Faecal chitinase 3-like 1 is a reliable marker as accurate as faecal calprotectin in detecting endoscopic activity in adult patients with inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther*, 43(10) :1069–1079.
- Buisson, A., Vazeille, E., Minet-Quinard, R., Goutte, M., Bouvier, D., Goutorbe, F., Pereira, B., Barnich, N., and Bommelaer, G. (2018). Fecal Matrix Metalloprotease-9 and Lipocalin-2 as Biomarkers in Detecting Endoscopic Activity in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *J Clin Gastroenterol*, 52(7) :e53–e62.
- Burton, P. R., Clayton, D. G., Cardon, L. R., Craddock, N., Deloukas, P., Duncanson, et al. (2007). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 447(7145) :661–678. Number : 7145 Publisher : Nature Publishing Group.
- Buss, F., Spudich, G., and Kendrick-Jones, J. (2004). Myosin VI : cellular functions and motor properties. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20 :649–676.
- Cabrera, S., Fernández, A. F., Mariño, G., Aguirre, A., Suárez, M. F., Español, Y., Vega, J. A., Laurà, R., Fueyo, A., Fernández-García, M. S., Freije, J. M. P., Kroemer, G., and López-Otín, C. (2013). ATG4B/autophagin-1 regulates intestinal homeostasis and protects mice from experimental colitis. *Autophagy*, 9(8) :1188–1200.
- Cadwell, K., Liu, J. Y., Brown, S. L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J. K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J. A., Hunt, S., Stone, C. D., Brunt, E. M., Xavier, R. J., Sleckman, B. P., Li, E., Mizushima, N., Stappenbeck, T. S., and Virgin, H. W. (2008). A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*, 456(7219) :259–263.
- Cadwell, K., Patel, K. K., Maloney, N. S., Liu, T.-C., Ng, A. C. Y., Storer, C. E., Head, R. D., Xavier, R., Stappenbeck, T. S., and Virgin, H. W. (2010). Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn’s disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell*, 141(7) :1135–1145.
- Campbell-Valois, F.-X., Sachse, M., Sansonetti, P. J., and Parsot, C. (2015). Escape of Actively Secreting *Shigella flexneri* from ATG8/LC3-Positive Vacuoles Formed during Cell-To-Cell Spread Is Facilitated by IcsB and VirA. *mBio*, 6(3) :e02567–02514.
- Camprubí-Font, C., Bustamante, P., Vidal, R. M., O’Brien, C. L., Barnich, N., and Martínez-Medina, M. (2020). Study of a classification algorithm for AIEC identification in geographically distinct *E. coli* strains. *Sci Rep*, 10(1) :8094.
- Camprubí-Font, C., Lopez-Siles, M., Ferrer-Guixeras, M., Niubó-Carulla, L., Abellà-Ametller, C., Garcia-Gil, L. J., and Martínez-Medina, M. (2018). Comparative genomics reveals new single-nucleotide polymorphisms that can assist in identification of adherent-invasive *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 8(1) :2695.
- Cani, P. D. (2018). Human gut microbiome : hopes, threats and promises. *Gut*, 67(9) :1716–1725.
- Cantorna, M. T. (2010). Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. *Proc Nutr Soc*, 69(3) :286–289.
- Carbone, F., Mach, F., Vuilleumier, N., and Montecucco, F. (2014). Cannabinoid receptor type 2 activation in atherosclerosis and acute cardiovascular diseases. *Curr Med Chem*, 21(35) :4046–4058.
- Carrière, J., Bretin, A., Darfeuille-Michaud, A., Barnich, N., and Nguyen, H. T. T. (2016). Exosomes Released from Cells Infected with Crohn’s Disease-associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Activate Host Innate Immune Responses and Enhance Bacterial Intracellular Replication. *Inflamm Bowel Dis*, 22(3) :516–528.
- Carvalho, F. A., Barnich, N., Sauvanet, P., Darcha, C., Gelot, A., and Darfeuille-Michaud, A. (2008). Crohn’s disease-associated *Escherichia coli* LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin. *Inflamm Bowel Dis*, 14(8) :1051–1060.

- Carvalho, F. A., Barnich, N., Sivignon, A., Darcha, C., Chan, C. H. F., Stanners, C. P., and Darfeuille-Michaud, A. (2009). Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med*, 206(10) :2179–2189.
- Carvalho, F. A., Koren, O., Goodrich, J. K., Johansson, M. E. V., Nalbantoglu, I., Aitken, J. D., Su, Y., Chassaing, B., Walters, W. A., González, A., Clemente, J. C., Cullender, T. C., Barnich, N., Darfeuille-Michaud, A., Vijay-Kumar, M., Knight, R., Ley, R. E., and Gewirtz, A. T. (2012). Transient inability to manage pro-teobacteria promotes chronic gut inflammation in TLR5-deficient mice. *Cell Host Microbe*, 12(2) :139–152.
- Cemma, M., Kim, P. K., and Brumell, J. H. (2011). The ubiquitin-binding adaptor proteins p62/SQSTM1 and NDP52 are recruited independently to bacteria-associated microdomains to target *Salmonella* to the autophagy pathway. *Autophagy*, 7(3) :341–345.
- Ceregido, M. A., Spínola Amilibia, M., Buts, L., Rivera-Torres, J., Garcia-Pino, A., Bravo, J., and van Nuland, N. A. J. (2014). The structure of TAX1BP1 UBZ1+2 provides insight into target specificity and adaptability. *J Mol Biol*, 426(3) :674–690.
- Cerf-Bensussan, N. and Gaboriau-Routhiau, V. (2010). The immune system and the gut microbiota : friends or foes ? *Nat Rev Immunol*, 10(10) :735–744.
- Chai, Q., Wang, X., Qiang, L., Zhang, Y., Ge, P., Lu, Z., Zhong, Y., Li, B., Wang, J., Zhang, L., Zhou, D., Li, W., Dong, W., Pang, Y., Gao, G. F., and Liu, C. H. (2019). A *Mycobacterium tuberculosis* surface protein recruits ubiquitin to trigger host xenophagy. *Nat Commun*, 10(1) :1973.
- Chalopin, T., Alvarez Dorta, D., Sivignon, A., Caudan, M., Dumych, T. I., Bilyy, R. O., Deniaud, D., Barnich, N., Bouckaert, J., and Gouin, S. G. (2016). Second generation of thiazolylmannosides, FimH antagonists for *E. coli*-induced Crohn's disease. *Org Biomol Chem*, 14(16) :3913–3925.
- Chandra, P., Ghanwat, S., Matta, S. K., Yadav, S. S., Mehta, M., Siddiqui, Z., Singh, A., and Kumar, D. (2015). *Mycobacterium tuberculosis* Inhibits RAB7 Recruitment to Selectively Modulate Autophagy Flux in Macrophages. *Sci Rep*, 5 :16320.
- Chang, C., Shi, X., Jensen, L. E., Yokom, A. L., Fracchiolla, D., Martens, S., and Hurley, J. H. (2021). Reconstitution of cargo-induced LC3 lipidation in mammalian selective autophagy. *Sci Adv*, 7(17) :eabg4922.
- Chang, J. T. (2020). Pathophysiology of Inflammatory Bowel Diseases. *N Engl J Med*, 383(27) :2652–2664. Publisher : Massachusetts Medical Society.
- Chao, M. C., Pritchard, J. R., Zhang, Y. J., Rubin, E. J., Livny, J., Davis, B. M., and Waldor, M. K. (2013). High-resolution definition of the *Vibrio cholerae* essential gene set with hidden Markov model-based analyses of transposon-insertion sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 41(19) :9033–9048.
- Chapman-Kiddell, C. A., Davies, P. S. W., Gillen, L., and Radford-Smith, G. L. (2010). Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 16(1) :137–151.
- Chapuy, L., Bsat, M., Sarkizova, S., Rubio, M., Therrien, A., Wassef, E., Bouin, M., Orlicka, K., Weber, A., Hacohen, N., Villani, A.-C., and Sarfati, M. (2019). Two distinct colonic CD14+ subsets characterized by single-cell RNA profiling in Crohn's disease. *Mucosal Immunol*, 12(3) :703–719.
- Chargui, A., Cesaro, A., Mimouna, S., Fareh, M., Brest, P., Naquet, P., Darfeuille-Michaud, A., Hébuterne, X., Mograbi, B., Vouret-Craviari, V., and Hofman, P. (2012). Subversion of autophagy in adherent invasive *Escherichia coli*-infected neutrophils induces inflammation and cell death. *PLoS One*, 7(12) :e51727.
- Chassaing, B., Compher, C., Bonhomme, B., Liu, Q., Tian, Y., Walters, W., Nessel, L., Delaroque, C., Hao, F., Gershuni, V., Chau, L., Ni, J., Bewtra, M., Albenberg, L., Bretin, A., McKeever, L., Ley, R. E., Patterson, A. D., Wu, G. D., Gewirtz, A. T., and Lewis, J. D. (2022). Randomized Controlled-Feeding Study of Dietary Emulsifier Carboxymethylcellulose Reveals Detrimental Impacts on the Gut Microbiota and Metabolome. *Gastroenterology*, 162(3) :743–756.

- Chassaing, B. and Darfeuille-Michaud, A. (2013). The  $\sigma$ E Pathway Is Involved in Biofilm Formation by Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli. *J Bacteriol*, 195(1) :76–84.
- Chassaing, B., Etienne-Mesmin, L., Bonnet, R., and Darfeuille-Michaud, A. (2013). Bile salts induce long polar fimbriae expression favouring Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli interaction with Peyer's patches. *Environ Microbiol*, 15(2) :355–371.
- Chassaing, B., Garénaux, E., Carriere, J., Rolhion, N., Guérardel, Y., Barnich, N., Bonnet, R., and Darfeuille-Michaud, A. (2015a). Analysis of the  $\sigma$ E regulon in Crohn's disease-associated Escherichia coli revealed involvement of the waaWVL operon in biofilm formation. *J Bacteriol*, 197(8) :1451–1465.
- Chassaing, B. and Gewirtz, A. T. (2018). Mice harboring pathobiont-free microbiota do not develop intestinal inflammation that normally results from an innate immune deficiency. *PLoS One*, 13(4) :e0195310.
- Chassaing, B., Koren, O., Carvalho, F. A., Ley, R. E., and Gewirtz, A. T. (2014). AIEC pathobiont instigates chronic colitis in susceptible hosts by altering microbiota composition. *Gut*, 63(7) :1069–1080.
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J. K., Poole, A. C., Srinivasan, S., Ley, R. E., and Gewirtz, A. T. (2015b). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*, 519(7541) :92–96.
- Chassaing, B., Rolhion, N., de Vallée, A., Salim, S. Y., Prorok-Hamon, M., Neut, C., Campbell, B. J., Söderholm, J. D., Hugot, J.-P., Colombel, J.-F., and Darfeuille-Michaud, A. (2011). Crohn disease-associated adherent-invasive E. coli bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J Clin Invest*, 121(3) :966–975.
- Chassaing, B., Van de Wiele, T., De Bodt, J., Marzorati, M., and Gewirtz, A. T. (2017). Dietary emulsifiers directly alter human microbiota composition and gene expression ex vivo potentiating intestinal inflammation. *Gut*, 66(8) :1414–1427.
- Chauhan, S., Kumar, S., Jain, A., Ponpuak, M., Mudd, M. H., Kimura, T., Choi, S. W., Peters, R., Mandell, M., Bruun, J.-A., Johansen, T., and Deretic, V. (2016). TRIMs and Galectins Globally Cooperate and TRIM16 and Galectin-3 Co-direct Autophagy in Endomembrane Damage Homeostasis. *Dev Cell*, 39(1) :13–27.
- Chauhan, S., Mandell, M. A., and Deretic, V. (2015a). IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense. *Mol Cell*, 58(3) :507–521.
- Chauhan, S., Mandell, M. A., and Deretic, V. (2015b). Mechanism of action of the tuberculosis and Crohn disease risk factor IRGM in autophagy. *Autophagy*, 12(2) :429–431.
- Checroun, C., Wehrly, T. D., Fischer, E. R., Hayes, S. F., and Celli, J. (2006). Autophagy-mediated reentry of Francisella tularensis into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(39) :14578–14583.
- Chehoud, C., Albenberg, L. G., Judge, C., Hoffmann, C., Grunberg, S., Bittinger, K., Baldassano, R. N., Lewis, J. D., Bushman, F. D., and Wu, G. D. (2015). Fungal Signature in the Gut Microbiota of Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*, 21(8) :1948–1956.
- Chen, C.-C., Pekow, J., Llado, V., Kanneganti, M., Lau, C. W., Mizoguchi, A., Mino-Kenudson, M., Bissonnette, M., and Mizoguchi, E. (2011). Chitinase 3-Like-1 Expression in Colonic Epithelial Cells as a Potentially Novel Marker for Colitis-Associated Neoplasia. *Am J Pathol*, 179(3) :1494–1503.
- Chen, J.-S., Hu, F., Kugathasan, S., Jorde, L. B., Nix, D., Rutherford, A., Denson, L., Watkins, W. S., Prahalad, S., Huff, C., and Guthery, S. L. (2018). Targeted Gene Sequencing in Children with Crohn's Disease and Their Parents : Implications for Missing Heritability. *G3 (Bethesda)*, 8(9) :2881–2888.

- Chen, P., Zhou, G., Lin, J., Li, L., Zeng, Z., Chen, M., and Zhang, S. (2020). Serum Biomarkers for Inflammatory Bowel Disease. *Front Med (Lausanne)*, 7 :123.
- Chen, Q.-Q., Yan, L., and Wan, J. (2014). Select a suitable treatment strategy for Crohn's disease : step-up or top-down. *EXCLI J*, 13 :111–122.
- Chen, Y., Wang, Y., and Shen, J. (2019). Role of environmental factors in the pathogenesis of Crohn's disease : a critical review. *Int J Colorectal Dis*, 34(12) :2023–2034.
- Chen, Z., Wang, T., Liu, Z., Zhang, G., Wang, J., Feng, S., and Liang, J. (2015). Inhibition of Autophagy by MiR-30A Induced by Mycobacteria tuberculosis as a Possible Mechanism of Immune Escape in Human Macrophages. *Jpn J Infect Dis*, 68(5) :420–424.
- Chermesh, I., Tamir, A., Reshef, R., Chowers, Y., Suissa, A., Katz, D., Gelber, M., Halpern, Z., Bengmark, S., and Eliakim, R. (2007). Failure of Synbiotic 2000 to prevent postoperative recurrence of Crohn's disease. *Dig Dis Sci*, 52(2) :385–389.
- Chervy, M., Barnich, N., and Denizot, J. (2020). Adherent-Invasive E. coli : Update on the Lifestyle of a Troublemaker in Crohn's Disease. *Int J Mol Sci*, 21(10).
- Chervy, M., Sivignon, A., Dambrine, F., Buisson, A., Sauvanet, P., Godfraind, C., Allez, M., Le Bourhis, L., The Remind Group, n., Barnich, N., and Denizot, J. (2022). Epigenetic master regulators HDAC1 and HDAC5 control pathobiont Enterobacteria colonization in ileal mucosa of Crohn's disease patients. *Gut Microbes*, 14(1) :2127444.
- Chew, T. S., O'Shea, N. R., Sewell, G. W., Oehlers, S. H., Mulvey, C. M., Crosier, P. S., Godovac-Zimmermann, J., Bloom, S. L., Smith, A. M., and Segal, A. W. (2015). Optineurin deficiency in mice contributes to impaired cytokine secretion and neutrophil recruitment in bacteria-driven colitis. *Dis Model Mech*, 8(8) :817–829.
- Chiba, M., Nakane, K., and Komatsu, M. (2019). Westernized Diet is the Most Ubiquitous Environmental Factor in Inflammatory Bowel Disease. *Perm J*, 23 :18–107.
- Choy, A., Dancourt, J., Mugo, B., O'Connor, T. J., Isberg, R. R., Melia, T. J., and Roy, C. R. (2012). The Legionella effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation. *Science*, 338(6110) :1072–1076.
- Christ, A., Lauterbach, M., and Latz, E. (2019). Western Diet and the Immune System : An Inflammatory Connection. *Immunity*, 51(5) :794–811.
- Chu, H., Khosravi, A., Kusumawardhani, I. P., Kwon, A. H. K., Vasconcelos, A. C., Cunha, L. D., Mayer, A. E., Shen, Y., Wu, W.-L., Kambal, A., Targan, S. R., Xavier, R. J., Ernst, P. B., Green, D. R., McGovern, D. P. B., Virgin, H. W., and Mazmanian, S. K. (2016). Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science*, 352(6289) :1116–1120.
- Chua, A. C. G., Klopčič, B. R. S., Ho, D. S., Fu, S. K., Forrest, C. H., Croft, K. D., Olynyk, J. K., Lawrance, I. C., and Trinder, D. (2013). Dietary iron enhances colonic inflammation and IL-6/IL-11-Stat3 signaling promoting colonic tumor development in mice. *PLoS One*, 8(11) :e78850.
- Ciani, B., Layfield, R., Cavey, J. R., Sheppard, P. W., and Searle, M. S. (2003). Structure of the ubiquitin-associated domain of p62 (SQSTM1) and implications for mutations that cause Paget's disease of bone. *J Biol Chem*, 278(39) :37409–37412.
- Cieza, R. J., Hu, J., Ross, B. N., Sbrana, E., and Torres, A. G. (2015). The IbeA invasin of adherent-invasive Escherichia coli mediates interaction with intestinal epithelia and macrophages. *Infect Immun*, 83(5) :1904–1918.



- Clark, K., Nanda, S., and Cohen, P. (2013). Molecular control of the NEMO family of ubiquitin-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(10) :673–685.
- Clooney, A. G., Sutton, T. D. S., Shkorporov, A. N., Holohan, R. K., Daly, K. M., O'Regan, O., Ryan, F. J., Draper, L. A., Plevy, S. E., Ross, R. P., and Hill, C. (2019). Whole-Virome Analysis Sheds Light on Viral Dark Matter in Inflammatory Bowel Disease. *Cell Host Microbe*, 26(6) :764–778.e5.
- Colman, R. J. and Rubin, D. T. (2014). Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel disease : a systematic review and meta-analysis. *J Crohns Colitis*, 8(12) :1569–1581.
- Colombel, J. F., Grandbastien, B., Gower-Rousseau, C., Plegat, S., Evrard, J. P., Dupas, J. L., Gendre, J. P., Modigliani, R., Bélaïche, J., Hostein, J., Hugot, J. P., van Kruiningen, H., and Cortot, A. (1996). Clinical characteristics of Crohn's disease in 72 families. *Gastroenterology*, 111(3) :604–607.
- Contractor, N. V., Bassiri, H., Reya, T., Park, A. Y., Baumgart, D. C., Wasik, M. A., Emerson, S. G., and Carding, S. R. (1998). Lymphoid hyperplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice. *J Immunol*, 160(1) :385–394.
- Cook, A. W., Gough, R. E., and Toseland, C. P. (2020). Nuclear myosins - roles for molecular transporters and anchors. *J Cell Sci*, 133(11) :jcs242420.
- Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P., Ferguson, D. J. P., Campbell, B. J., Jewell, D., and Simmons, A. (2010). NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med*, 16(1) :90–97.
- Coqueiro, A. Y., Raizel, R., Bonvini, A., Tirapegui, J., and Rogero, M. M. (2019). Probiotics for inflammatory bowel diseases : a promising adjuvant treatment. *Int J Food Sci Nutr*, 70(1) :20–29.
- Cosin-Roger, J., Simmen, S., Melhem, H., Atrott, K., Frey-Wagner, I., Hausmann, M., de Vallière, C., Spalinger, M. R., Spielmann, P., Wenger, R. H., Zeitz, J., Vavricka, S. R., Rogler, G., and Ruiz, P. A. (2017). Hypoxia ameliorates intestinal inflammation through NLRP3/mTOR downregulation and autophagy activation. *Nat Commun*, 8(1) :98.
- Cosnes, J. (2010). Smoking, physical activity, nutrition and lifestyle : environmental factors and their impact on IBD. *Dig Dis*, 28(3) :411–417.
- Cosnes, J., Beaugerie, L., Carbonnel, F., and Gendre, J. P. (2001). Smoking cessation and the course of Crohn's disease : an intervention study. *Gastroenterology*, 120(5) :1093–1099.
- Cosnes, J., Bourrier, A., Nion-Larmurier, I., Sokol, H., Beaugerie, L., and Seksik, P. (2012). Factors affecting outcomes in Crohn's disease over 15 years. *Gut*, 61(8) :1140–1145.
- Cossart, P., Vicente, M. F., Mengaud, J., Baquero, F., Perez-Diaz, J. C., and Berche, P. (1989). Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes* : direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun*, 57(11) :3629–3636.
- Crohn, B. B., Ginzburg, L., and Oppenheimer, G. D. (1932). Regional ileitis : a pathologic and clinical entity. *Journal of the American Medical Association*, 99(16) :1323–1329.
- Dalmaso, G., Nguyen, H. T. T., Faïs, T., Massier, S., Barnich, N., Delmas, J., and Bonnet, R. (2019). Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Manipulate Host Autophagy by Impairing SUMOylation. *Cells*, 8(1) :35.
- Dalmaso, G., Nguyen, H. T. T., Faïs, T., Massier, S., Chevarin, C., Vazeille, E., Barnich, N., Delmas, J., and Bonnet, R. (2021). Yersiniabactin Siderophore of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Is Involved in Autophagy Activation in Host Cells. *Int J Mol Sci*, 22(7) :3512.

- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swid-sinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 127(2) :412–421.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J. F. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 115(6) :1405–1413.
- David, L., Taieb, F., Pénary, M., Bordignon, P.-J., Planès, R., Bagayoko, S., Duplan-Eche, V., Meunier, E., and Oswald, E. (2022). Outer membrane vesicles produced by pathogenic strains of *Escherichia coli* block autophagic flux and exacerbate inflammasome activation. *Autophagy*, 18(12) :2913–2925.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., and Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484) :559–563.
- de Bruyn, M. and Vermeire, S. (2017). NOD2 and bacterial recognition as therapeutic targets for Crohn's disease. *Expert Opin Ther Targets*, 21(12) :1123–1139.
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., and Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(33) :14691–14696.
- De Hertogh, G., Aerssens, J., Geboes, K. P., and Geboes, K. (2008). Evidence for the involvement of infectious agents in the pathogenesis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 14(6) :845–852.
- de Jong, M. F., Liu, Z., Chen, D., and Alto, N. M. (2016). *Shigella flexneri* suppresses NF- $\kappa$ B activation by inhibiting linear ubiquitin chain ligation. *Nat Microbiol*, 1(7) :16084.
- de Lange, K. M., Moutsianas, L., Lee, J. C., Lamb, et al. (2017). Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. *Nat Genet*, 49(2) :256–261.
- de Souza, H. S. P. and Fiocchi, C. (2016). Immunopathogenesis of IBD : current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 13(1) :13–27.
- DeJesus, M. A., Nambi, S., Smith, C. M., Baker, R. E., Sasseti, C. M., and Ioerger, T. R. (2017). Statistical analysis of genetic interactions in Tn-Seq data. *Nucleic Acids Res*, 45(11) :e93.
- Demarre, G., Prudent, V., Schenk, H., Rousseau, E., Bringer, M.-A., Barnich, N., Tran Van Nhieu, G., Rimsky, S., De Monte, S., and Espéli, O. (2019). The Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82 relies on SOS and stringent responses to survive, multiply and tolerate antibiotics within macrophages. *PLoS Pathog*, 15(11) :e1008123.
- Denizot, J., Desrichard, A., Agus, A., Uhrhammer, N., Dreux, N., Vouret-Craviari, V., Hofman, P., Darfeuille-Michaud, A., and Barnich, N. (2015). Diet-induced hypoxia responsive element demethylation increases CEACAM6 expression, favouring Crohn's disease-associated *Escherichia coli* colonisation. *Gut*, 64(3) :428–437.
- Denizot, J., Sivignon, A., Barreau, F., Darcha, C., Chan, H. F. C., Stanners, C. P., Hofman, P., Darfeuille-Michaud, A., and Barnich, N. (2012). Adherent-invasive *Escherichia coli* induce claudin-2 expression and barrier defect in CEABAC10 mice and Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis*, 18(2) :294–304.
- Deosaran, E., Larsen, K. B., Hua, R., Sargent, G., Wang, Y., Kim, S., Lamark, T., Jauregui, M., Law, K., Lippincott-Schwartz, J., Brech, A., Johansen, T., and Kim, P. K. (2013). NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *J Cell Sci*, 126(Pt 4) :939–952.

- Deretic, V. (2012). Autophagy as an innate immunity paradigm : expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. *Curr Opin Immunol*, 24(1) :21–31.
- Derrien, M., van Passel, M. W., van de Bovenkamp, J. H., Schipper, R. G., de Vos, W. M., and Dekker, J. (2010). Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes*, 1(4) :254–268.
- Desai, M. S., Seekatz, A. M., Koropatkin, N. M., Kamada, N., Hickey, C. A., Wolter, M., Pudlo, N. A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., Young, V. B., Henrissat, B., Wilmes, P., Stappenbeck, T. S., Núñez, G., and Martens, E. C. (2016). A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*, 167(5) :1339–1353.e21.
- Deuring, J. J., Fuhler, G. M., Konstantinov, S. R., Peppelenbosch, M. P., Kuipers, E. J., de Haar, C., and van der Woude, C. J. (2014). Genomic ATG16L1 risk allele-restricted Paneth cell ER stress in quiescent Crohn’s disease. *Gut*, 63(7) :1081–1091.
- Devkota, S., Wang, Y., Musch, M. W., Leone, V., Fehlner-Peach, H., Nadimpalli, A., Antonopoulos, D. A., Jabri, B., and Chang, E. B. (2012). Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in *Il10<sup>-/-</sup>* mice. *Nature*, 487(7405) :104–108.
- D’Haens, G., Baert, F., van Assche, G., Caenepeel, P., Vergauwe, et al. (2008). Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn’s disease : an open randomised trial. *Lancet*, 371(9613) :660–667.
- D’Haens, G., Ferrante, M., Vermeire, S., Baert, F., Noman, M., Moortgat, L., Geens, P., Iwens, D., Aerden, I., Van Assche, G., Van Olmen, G., and Rutgeerts, P. (2012). Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 18(12) :2218–2224.
- Di Paola, M., Rizzetto, L., Stefanini, I., Vitali, F., Massi-Benedetti, C., Tocci, N., Romani, L., Ramazzotti, M., Lionetti, P., De Filippo, C., and Cavalieri, D. (2020). Comparative immunophenotyping of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida* spp. strains from Crohn’s disease patients and their interactions with the gut microbiome. *J Transl Autoimmun*, 3 :100036.
- Diaz-Gallo, L.-M., Espino-Paisán, L., Fransen, K., Gómez-García, et al. (2011). Differential association of two PTPN22 coding variants with Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 17(11) :2287–2294.
- D’Incà, R., Di Leo, V., Corrao, G., Martines, D., D’Odorico, A., Mestriner, C., Venturi, C., Longo, G., and Sturniolo, G. C. (1999). Intestinal permeability test as a predictor of clinical course in Crohn’s disease. *Am J Gastroenterol*, 94(10) :2956–2960.
- Ding, S., Sun, S., Ding, R., Song, S., Cao, Y., and Zhang, L. (2022). Association between exposure to air pollutants and the risk of inflammatory bowel diseases visits. *Environ Sci Pollut Res Int*, 29(12) :17645–17654.
- Ding, W., Ding, Z., Wang, Y., Zhu, Y., Gao, Q., Cao, W., and Du, R. (2020). Evodiamine Attenuates Experimental Colitis Injury Via Activating Autophagy and Inhibiting NLRP3 Inflammasome Assembly. *Front Pharmacol*, 11 :573870.
- Dogan, B., Fu, J., Zhang, S., Scherl, E. J., and Simpson, K. W. (2018). Rifaximin decreases virulence of Crohn’s disease-associated *Escherichia coli* and epithelial inflammatory responses. *J Antibiot (Tokyo)*, 71(5) :485–494.
- Dogan, B., Scherl, E., Bosworth, B., Yantiss, R., Altier, C., McDonough, P. L., Jiang, Z.-D., Dupont, H. L., Garneau, P., Harel, J., Rishniw, M., and Simpson, K. W. (2013). Multidrug resistance is common in *Escherichia coli* associated with ileal Crohn’s disease. *Inflamm Bowel Dis*, 19(1) :141–150.
- Donaldson, G. P., Lee, S. M., and Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*, 14(1) :20–32.

- Dorofeyev, A. E., Vasilenko, I. V., Rassokhina, O. A., and Kondratiuk, R. B. (2013). Mucosal barrier in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Res Pract*, 2013 :431231.
- Dortet, L., Mostowy, S., Samba-Louaka, A., Gouin, E., Nahori, M.-A., Wiemer, E. A. C., Dussurget, O., and Cossart, P. (2011). Recruitment of the major vault protein by InlK : a *Listeria monocytogenes* strategy to avoid autophagy. *PLoS Pathog*, 7(8) :e1002168.
- Dos Santos, A., Rollins, D. E., Hari-Gupta, Y., McArthur, H., Du, M., Ru, S. Y. Z., Pidlisna, K., Stranger, A., Lorgat, F., Lambert, D., Brown, I., Howland, K., Aaron, J., Wang, L., Ellis, P. J. I., Chew, T.-L., Martin-Fernandez, M., Pyne, A. L. B., and Toseland, C. P. (2023). Autophagy receptor NDP52 alters DNA conformation to modulate RNA polymerase II transcription. *Nat Commun*, 14(1) :2855.
- Douadi, C., Vazeille, E., Chambon, C., Hébraud, M., Fargeas, M., Dodel, M., Coban, D., Pereira, B., Birer, A., Sauvanet, P., Buisson, A., and Barnich, N. (2022). Anti-TNF Agents Restrict Adherent-invasive *Escherichia coli* Replication Within Macrophages Through Modulation of Chitinase 3-like 1 in Patients with Crohn's Disease. *J Crohns Colitis*, 16(7) :1140–1150.
- Dreux, N., Denizot, J., Martinez-Medina, M., Mellmann, A., Billig, M., Kisiela, D., Chattopadhyay, S., Sokurenko, E., Neut, C., Gower-Rousseau, C., Colombel, J.-F., Bonnet, R., Darfeuille-Michaud, A., and Barnich, N. (2013). Point Mutations in FimH Adhesin of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Enhance Intestinal Inflammatory Response. *PLoS Pathog*, 9(1) :e1003141.
- Drouet, M., Vignal, C., Singer, E., Djouina, M., Dubreuil, L., Cortot, A., Desreumaux, P., and Neut, C. (2012). AIEC colonization and pathogenicity : influence of previous antibiotic treatment and preexisting inflammation. *Inflamm Bowel Dis*, 18(10) :1923–1931.
- Duan, L., Yi, M., Chen, J., Li, S., and Chen, W. (2016). Mycobacterium tuberculosis EIS gene inhibits macrophage autophagy through up-regulation of IL-10 by increasing the acetylation of histone H3. *Biochem Biophys Res Commun*, 473(4) :1229–1234.
- Duan, X., Zhang, T., Ding, S., Wei, J., Su, C., Liu, H., and Xu, G. (2015). microRNA-17-5p Modulates Bacille Calmette-Guerin Growth in RAW264.7 Cells by Targeting ULK1. *PLoS One*, 10(9) :e0138011.
- Dumortier, J., Lapalus, M.-G., Guillaud, O., Poncet, G., Gagnieu, M.-C., Partensky, C., and Scoazec, J.-Y. (2008). Everolimus for refractory Crohn's disease : a case report. *Inflamm Bowel Dis*, 14(6) :874–877.
- Dumych, T., Yamakawa, N., Sivignon, A., Garenaux, E., Robakiewicz, S., Coddeville, B., Bongiovanni, A., Bray, F., Barnich, N., Szunerits, S., Slomianny, C., Herrmann, M., Gouin, S. G., Lutsyk, A. D., Munoz, L. E., Lafont, F., Rolando, C., Bilyy, R., and Bouckaert, J. M. J. (2018). Oligomannose-Rich Membranes of Dying Intestinal Epithelial Cells Promote Host Colonization by Adherent-Invasive *E. coli*. *Front Microbiol*, 9 :742.
- Dunn, J. D. and Valdivia, R. H. (2010). Uncivil engineers : Chlamydia, Salmonella and Shigella alter cytoskeleton architecture to invade epithelial cells. *Future Microbiol*, 5(8) :1219–1232.
- Duran, A., Linares, J. F., Galvez, A. S., Wikenheiser, K., Flores, J. M., Diaz-Meco, M. T., and Moscat, J. (2008). The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell*, 13(4) :343–354.
- Dörr, T., Alvarez, L., Delgado, F., Davis, B. M., Cava, F., and Waldor, M. K. (2016). A cell wall damage response mediated by a sensor kinase/response regulator pair enables beta-lactam tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(2) :404–409.
- Eapen, V. V., Swarup, S., Hoyer, M. J., Paulo, J. A., and Harper, J. W. (2021). Quantitative proteomics reveals the selectivity of ubiquitin-binding autophagy receptors in the turnover of damaged lysosomes by lysophagy. *Elife*, 10 :e72328.

- Economou, M., Trikalinos, T. A., Loizou, K. T., Tsianos, E. V., and Ioannidis, J. P. A. (2004). Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations : a metaanalysis. *Am J Gastroenterol*, 99(12) :2393–2404.
- El-Khider, F. and McDonald, C. (2016). Links of Autophagy Dysfunction to Inflammatory Bowel Disease Onset. *Dig Dis*, 34(1-2) :27–34.
- Elatrech, I., Marzaioli, V., Boukemara, H., Bournier, O., Neut, C., Darfeuille-Michaud, A., Luis, J., Dubuquoy, L., El-Benna, J., My-Chan Dang, P., and Marie, J.-C. (2015). Escherichia coli LF82 differentially regulates ROS production and mucin expression in intestinal epithelial T84 cells : implication of NOX1. *Inflamm Bowel Dis*, 21(5) :1018–1026.
- Elhenawy, W., Hordienko, S., Gould, S., Oberc, A. M., Tsai, C. N., Hubbard, T. P., Waldor, M. K., and 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. *Nat Commun*, 12(1) :2032.
- Elhenawy, W., Tsai, C. N., and Coombes, B. K. (2019). Host-Specific Adaptive Diversification of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli. *Cell Host Microbe*, 25(2) :301–312.e5.
- Ellinghaus, D., Zhang, H., Zeissig, S., Lipinski, S., Till, A., Jiang, T., Stade, B., Bromberg, et al. (2013). Association between variants of PRDM1 and NDP52 and Crohn's disease, based on exome sequencing and functional studies. *Gastroenterology*, 145(2) :339–347.
- Elliott, T. R., Hudspith, B. N., Rayment, N. B., Prescott, N. J., Petrovska, L., Hermon-Taylor, J., Brostoff, J., Boussioutas, A., Mathew, C. G., and Sanderson, J. D. (2015). Defective macrophage handling of Escherichia coli in Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 30(8) :1265–1274.
- Engström, P., Burke, T. P., Mitchell, G., Ingabire, N., Mark, K. G., Golovkine, G., Iavarone, A. T., Rape, M., Cox, J. S., and Welch, M. D. (2019). Evasion of autophagy mediated by Rickettsia surface protein OmpB is critical for virulence. *Nat Microbiol*, 4(12) :2538–2551.
- Engström, P., Burke, T. P., Tran, C. J., Iavarone, A. T., and Welch, M. D. (2021). Lysine methylation shields an intracellular pathogen from ubiquitylation and autophagy. *Sci Adv*, 7(26) :eabg2517.
- Eun, C. S., Mishima, Y., Wohlgemuth, S., Liu, B., Bower, M., Carroll, I. M., and Sartor, R. B. (2014). Induction of bacterial antigen-specific colitis by a simplified human microbiota consortium in gnotobiotic interleukin-10-/- mice. *Infect Immun*, 82(6) :2239–2246.
- Evans, C. S. and Holzbaur, E. L. (2020). Degradation of engulfed mitochondria is rate-limiting in Optineurin-mediated mitophagy in neurons. *Elife*, 9 :e50260.
- Farzaei, M. H., El-Senduny, F. F., Momtaz, S., Parvizi, F., Iranpanah, A., Tewari, D., Naseri, R., Abdolghaf-fari, A. H., and Rezaei, N. (2018). An update on dietary consideration in inflammatory bowel disease : anthocyanins and more. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 12(10) :1007–1024.
- Fasseu, M., Tréton, X., Guichard, C., Pedruzzi, E., Cazals-Hatem, D., Richard, C., Aparicio, T., Daniel, F., Soulé, J.-C., Moreau, R., Bouhnik, Y., Laburthe, M., Groyer, A., and Ogier-Denis, E. (2010). Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One*, 5(10) :e13160.
- Federici, S., Kredon-Russo, S., Valdés-Mas, R., Kviatcovsky, D., Weinstock, et al. (2022). Targeted suppression of human IBD-associated gut microbiota commensals by phage consortia for treatment of intestinal inflammation. *Cell*, 185(16) :2879–2898.e24.
- Fedorak, R. N., Feagan, B. G., Hotte, N., Leddin, D., Dieleman, L. A., Petrunia, D. M., Enns, R., Bitton, A., Chiba, N., Paré, P., Rostom, A., Marshall, J., Depew, W., Bernstein, C. N., Panaccione, R., Aumais,

- G., Steinhart, A. H., Cockeram, A., Bailey, R. J., Gionchetti, P., Wong, C., and Madsen, K. (2015). The probiotic VSL#3 has anti-inflammatory effects and could reduce endoscopic recurrence after surgery for Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 13(5) :928–935.e2.
- Feller, M., Huwiler, K., Schoepfer, A., Shang, A., Furrer, H., and Egger, M. (2010). Long-term antibiotic treatment for Crohn's disease : systematic review and meta-analysis of placebo-controlled trials. *Clin Infect Dis*, 50(4) :473–480.
- Feller, M., Huwiler, K., Stephan, R., Altpeter, E., Shang, A., Furrer, H., Pfyffer, G. E., Jemmi, T., Baumgartner, A., and Egger, M. (2007). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease : a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 7(9) :607–613.
- Fernandes, M. A., Verstraete, S. G., Phan, T. G., Deng, X., Stekol, E., LaMere, B., Lynch, S. V., Heyman, M. B., and Delwart, E. (2019). Enteric Virome and Bacterial Microbiota in Children With Ulcerative Colitis and Crohn Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 68(1) :30–36.
- Fernández-Ponce, C., Navarro Quiroz, R., Díaz Perez, A., Aroca Martinez, G., Cadena Bonfanti, A., Acosta Hoyos, A., Gómez Escorcía, L., Hernández Agudelo, S., Orozco Sánchez, C., Villarreal Camacho, J., Atencio Ibarra, L., Consuegra Machado, J., Espinoza Garavito, A., García-Cózar, F., and Navarro Quiroz, E. (2021). MicroRNAs overexpressed in Crohn's disease and their interactions with mechanisms of epigenetic regulation explain novel aspects of Crohn's disease pathogenesis. *Clin Epigenetics*, 13 :39.
- Ferrand, A., Al Nabhani, Z., Tapias, N. S., Mas, E., Hugot, J.-P., and Barreau, F. (2019). NOD2 Expression in Intestinal Epithelial Cells Protects Toward the Development of Inflammation and Associated Carcinogenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 7(2) :357–369.
- Figueira, R., Watson, K. G., Holden, D. W., and Helaine, S. (2013). Identification of salmonella pathogenicity island-2 type III secretion system effectors involved in intramacrophage replication of S. enterica serovar typhimurium : implications for rational vaccine design. *mBio*, 4(2) :e00065.
- Fili, N., Hari-Gupta, Y., Dos Santos, A., Cook, A., Poland, S., Ameer-Beg, S. M., Parsons, M., and Toseland, C. P. (2017). NDP52 activates nuclear myosin VI to enhance RNA polymerase II transcription. *Nat Commun*, 8(1) :1871.
- Fiorino, G., Estevinho, M. M., Lopes, D. J. M., Chersi, F., Allocca, M., Souto, M. T., Danese, S., and Magro, F. (2021). Inflammatory Bowel Disease in Migrant Populations : Should we Look Even Further Back ? *Curr Drug Targets*, 22(15) :1706–1715.
- Fiskin, E., Bhogaraju, S., Herhaus, L., Kalayil, S., Hahn, M., and Dikic, I. (2017). Structural basis for the recognition and degradation of host TRIM proteins by Salmonella effector SopA. *Nat Commun*, 8 :14004.
- Fiskin, E., Bionda, T., Dikic, I., and Behrends, C. (2016). Global Analysis of Host and Bacterial Ubiquitinome in Response to Salmonella Typhimurium Infection. *Mol Cell*, 62(6) :967–981.
- Fogel, O., Richard-Miceli, C., and Tost, J. (2017). Epigenetic Changes in Chronic Inflammatory Diseases. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 106 :139–189.
- Forstner, G. (1995). Signal transduction, packaging and secretion of mucins. *Annu Rev Physiol*, 57 :585–605.
- Frade-Proud'Hon-Clerc, S., Smol, T., Frenois, F., Sand, O., Vaillant, E., Dhennin, V., Bonnefond, A., Froguel, P., Fumery, M., Guillon-Dellac, N., Gower-Rousseau, C., and Vasseur, F. (2019). A Novel Rare Missense Variation of the NOD2 Gene : Evidences of Implication in Crohn's Disease. *Int J Mol Sci*, 20(4) :835.
- Franco, L. H., Nair, V. R., Scharn, C. R., Xavier, R. J., Torrealba, J. R., Shiloh, M. U., and Levine, B. (2017). The ubiquitin-ligase Smurf1 functions in selective autophagy of M. tuberculosis and anti-tuberculous host defense. *Cell Host Microbe*, 21(1) :59–72.

- Frank, D. N., Robertson, C. E., Hamm, C. M., Kpadeh, Z., Zhang, T., Chen, H., Zhu, W., Sartor, R. B., Boedeker, E. C., Harpaz, N., Pace, N. R., and Li, E. (2011). Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 17(1) :179–184.
- Frank, D. N., St Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., and Pace, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(34) :13780–13785.
- Franzè, E., Caruso, R., Stolfi, C., Sarra, M., Cupi, M. L., Caprioli, F., Monteleone, I., Zorzi, F., Nitto, D. D., Colantoni, A., Biancone, L., Pallone, F., and Monteleone, G. (2013). Lesional Accumulation of CD163-Expressing Cells in the Gut of Patients with Inflammatory Bowel Disease. *PLOS ONE*, 8(7) :e69839. Publisher : Public Library of Science.
- Fraser, G. M., Bennett, J. C. Q., and Hughes, C. (1999). Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FliT, putative chaperones for flagellum assembly. *Molecular Microbiology*, 32(3) :569–580.   
\_eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2958.1999.01372.x>.
- Friedrich, M., Gerbeth, L., Gerling, M., Rosenthal, R., Steiger, K., Weidinger, C., Keye, J., Wu, H., Schmidt, F., Weichert, W., Siegmund, B., and Glauben, R. (2019). HDAC inhibitors promote intestinal epithelial regeneration via autocrine TGF $\beta$ 1 signalling in inflammation. *Mucosal Immunology*, 12(3) :656–667.
- Fries, W., Renda, M. C., Lo Presti, M. A., Raso, A., Orlando, A., Oliva, L., Giofrè, M. R., Maggio, A., Mattaliano, A., Macaluso, A., and Cottone, M. (2005). Intestinal permeability and genetic determinants in patients, first-degree relatives, and controls in a high-incidence area of Crohn's disease in Southern Italy. *Am J Gastroenterol*, 100(12) :2730–2736.
- Froicu, M. and Cantorna, M. T. (2007). Vitamin D and the vitamin D receptor are critical for control of the innate immune response to colonic injury. *BMC Immunol*, 8 :5.
- Fu, B., Ying, J., Chen, Q., Zhang, Q., Lu, J., Zhu, Z., and Yu, P. (2023). Enhancing the biosynthesis of riboflavin in the recombinant Escherichia coli BL21 strain by metabolic engineering. *Front Microbiol*, 13 :1111790.
- Fu, T., Liu, J., Wang, Y., Xie, X., Hu, S., and Pan, L. (2018). Mechanistic insights into the interactions of NAP1 with the SKICH domains of NDP52 and TAX1BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(50) :E11651–E11660.
- Fu, T., Zhang, M., Zhou, Z., Wu, P., Peng, C., Wang, Y., Gong, X., Li, Y., Wang, Y., Xu, X., Li, M., Shen, L., and Pan, L. (2021). Structural and biochemical advances on the recruitment of the autophagy-initiating ULK and TBK1 complexes by autophagy receptor NDP52. *Sci Adv*, 7(33) :eabi6582.
- Fu, Y., Waldor, M. K., and Mekalanos, J. J. (2013). Tn-Seq analysis of Vibrio cholerae intestinal colonization reveals a role for T6SS-mediated antibacterial activity in the host. *Cell Host Microbe*, 14(6) :652–663.
- Fujimoto, T., Imaeda, H., Takahashi, K., Kasumi, E., Bamba, S., Fujiyama, Y., and Andoh, A. (2013). Decreased abundance of Faecalibacterium prausnitzii in the gut microbiota of Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 28(4) :613–619.
- Fujimura, Y., Kamo, R., and Iida, M. (1996). Pathogenesis of aphthoid ulcers in Crohn's disease : correlative findings by magnifying colonoscopy, electron microscopy, and immunohistochemistry. *Gut*, 38(5) :724–732.
- Gajendran, M., Loganathan, P., Catinella, A. P., and Hashash, J. G. (2018). A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Dis Mon*, 64(2) :20–57.
- Galluzzi, L., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Pedro, B.-S., et al. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J*, 36(13) :1811–1836.
- Galtier, M., De Sordi, L., Maura, D., Arachchi, H., Volant, S., Dillies, M.-A., and Debarbieux, L. (2016). Bacteriophages to reduce gut carriage of antibiotic resistant uropathogens with low impact on microbiota composition. *Environ Microbiol*, 18(7) :2237–2245.

- Galtier, M., De Sordi, L., Sivignon, A., de Vallée, A., Maura, D., Neut, C., Rahmouni, O., Wannerberger, K., Darfeuille-Michaud, A., Desreumaux, P., Barnich, N., and Debarbieux, L. (2017). Bacteriophages Targeting Adherent Invasive Escherichia coli Strains as a Promising New Treatment for Crohn's Disease. *J Crohns Colitis*, 11(7) :840–847.
- Ganley, I. G., Lam, D. H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*, 284(18) :12297–12305.
- Gao, D. and Li, W. (2017). Structures and recognition modes of toll-like receptors. *Proteins*, 85(1) :3–9.
- Gatt, K., Schembri, J., Katsanos, K. H., Christodoulou, D., Karmiris, K., Kopylov, U., Pontas, C., Koutroubakis, I. E., Foteinogiannopoulou, K., Fabian, A., Molnar, T., Zammit, D., Fragaki, M., Balomenos, D., Zingboim, N., Ben Horin, S., Mantzaris, G. J., and Ellul, P. (2019). Inflammatory Bowel Disease [IBD] and Physical Activity : A Study on the Impact of Diagnosis on the Level of Exercise Amongst Patients With IBD. *J Crohns Colitis*, 13(6) :686–692.
- Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G. R., and Di Sabatino, A. (2014). Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev*, 13(1) :3–10.
- Gerner, R. R., Hossain, S., Sargun, A., Siada, K., Norton, G. J., Zheng, T., Neumann, W., Nuccio, S.-P., Nolan, E. M., and Raffatellu, M. (2022). Siderophore Immunization Restricted Colonization of Adherent-Invasive Escherichia coli and Ameliorated Experimental Colitis. *mBio*, 13(5) :e0218422.
- Gerster, R., Eloranta, J. J., Hausmann, M., Ruiz, P. A., Cosin-Roger, J., Terhalle, A., Ziegler, U., Kullak-Ublick, G. A., von Eckardstein, A., and Rogler, G. (2015). Anti-inflammatory Function of High-Density Lipoproteins via Autophagy of I $\kappa$ B Kinase. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 1(2) :171–187.e1.
- Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L. A., Vázquez-Baeza, Y., Treuren, V., et al. (2014). The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe*, 15(3) :382–392.
- Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., and Madara, J. L. (2001). Cutting edge : bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol*, 167(4) :1882–1885.
- 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., and Delmas, J. (2016). The Vat-AIEC protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated Escherichia coli. *Cell Microbiol*, 18(5) :617–631.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., and Reid, G. (2017). Expert consensus document : The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 14(8) :491–502.
- Gill, P. A., Inniss, S., Kumagai, T., Rahman, F. Z., and Smith, A. M. (2022). The Role of Diet and Gut Microbiota in Regulating Gastrointestinal and Inflammatory Disease. *Front Immunol*, 13 :866059.
- Glas, J., Wagner, J., Seiderer, J., Olszak, T., Wetzke, M., Beigel, F., Tillack, C., Stallhofer, J., Friedrich, M., Steib, C., Göke, B., Ochsenkühn, T., Karbalai, N., Diegelmann, J., Czamara, D., and Brand, S. (2012). PTPN2 gene variants are associated with susceptibility to both Crohn's disease and ulcerative colitis supporting a common genetic disease background. *PLoS One*, 7(3) :e33682.
- Glasser, A. L., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, M. H., Colombel, J. F., and Darfeuille-Michaud, A. (2001). Adherent invasive Escherichia coli strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun*, 69(9) :5529–5537.



- Gleason, C. E., Ordureau, A., Gourlay, R., Arthur, J. S. C., and Cohen, P. (2011). Polyubiquitin binding to optineurin is required for optimal activation of TANK-binding kinase 1 and production of interferon  $\beta$ . *J Biol Chem*, 286(41) :35663–35674.
- Glebov, K., Schütze, S., and Walter, J. (2011). Functional Relevance of a Novel SlyX Motif in Non-conventional Secretion of Insulin-degrading Enzyme. *J Biol Chem*, 286(26) :22711–22715.
- Gomollón, F., Dignass, A., Annese, V., Tilg, H., Van Assche, G., Lindsay, J. O., Peyrin-Biroulet, L., Cullen, G. J., Daperno, M., Kucharzik, T., Rieder, F., Almer, S., Armuzzi, A., Harbord, M., Langhorst, J., Sans, M., Chowers, Y., Fiorino, G., Juillerat, P., Mantzaris, G. J., Rizzello, F., Vavricka, S., Gionchetti, P., and ECCO (2017). 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016 : Part 1 : Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis*, 11(1) :3–25.
- Gong, Z., Zhao, S., Zhou, J., Yan, J., Wang, L., Du, X., Li, H., Chen, Y., Cai, W., and Wu, J. (2018). Curcumin alleviates DSS-induced colitis via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and IL-1 $\beta$  production. *Mol Immunol*, 104 :11–19.
- Goodall, E. A., Kraus, F., and Harper, J. W. (2022). Mechanisms underlying ubiquitin-driven selective mitochondrial and bacterial autophagy. *Mol Cell*, pages S1097–2765(22)00221–0.
- Gradzka, S., Thomas, O. S., Kretz, O., Haimovici, A., Vasilikos, L., Wong, W. W.-L., Häcker, G., and Gentle, I. E. (2018). Inhibitor of apoptosis proteins are required for effective fusion of autophagosomes with lysosomes. *Cell Death Dis*, 9(5) :529.
- Graham, D. B. and Xavier, R. J. (2020). Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. *Nature*, 578(7796) :527–539.
- Gruber, L., Kisling, S., Lichti, P., Martin, F.-P., May, S., Klingenspor, M., Lichtenegger, M., Rychlik, M., and Haller, D. (2013). High fat diet accelerates pathogenesis of murine Crohn's disease-like ileitis independently of obesity. *PLoS One*, 8(8) :e71661.
- Grudniak, A. M., Włodkowska, J., and Wolska, K. I. (2015). Chaperone DnaJ Influences the Formation of Biofilm by Escherichia coli. *Pol J Microbiol*, 64(3) :279–283.
- Grützka, A., Hanski, C., Hahn, H., and Riecken, E. O. (1990). Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches : a common mechanism shared by Yersinia enterocolitica and other enteroinvasive bacteria. *Gut*, 31(9) :1011–1015.
- Gulati, A., Kaur, D., Krishna Prasad, G. V. R., and Mukhopadhyaya, A. (2018). PRR Function of Innate Immune Receptors in Recognition of Bacteria or Bacterial Ligands. *Adv Exp Med Biol*, 1112 :255–280.
- Guo, L., Zhao, J., Qu, Y., Yin, R., Gao, Q., Ding, S., Zhang, Y., Wei, J., and Xu, G. (2016). microRNA-20a Inhibits Autophagic Process by Targeting ATG7 and ATG16L1 and Favors Mycobacterial Survival in Macrophage Cells. *Front Cell Infect Microbiol*, 6 :134.
- Guo, W., Sun, Y., Liu, W., Wu, X., Guo, L., Cai, P., Wu, X., Wu, X., Shen, Y., Shu, Y., Gu, Y., and Xu, Q. (2014). Small molecule-driven mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inhibition is responsible for the prevention of colitis-associated cancer. *Autophagy*, 10(6) :972–985.
- Guo, X., Li, J., Tang, R., Zhang, G., Zeng, H., Wood, R. J., and Liu, Z. (2017). High Fat Diet Alters Gut Microbiota and the Expression of Paneth Cell-Antimicrobial Peptides Preceding Changes of Circulating Inflammatory Cytokines. *Mediators Inflamm*, 2017 :9474896.
- Guo, Z., Cai, X., Guo, X., Xu, Y., Gong, J., Li, Y., and Zhu, W. (2018). Let-7b ameliorates Crohn's disease-associated adherent-invasive E coli induced intestinal inflammation via modulating Toll-Like Receptor 4 expression in intestinal epithelial cells. *Biochem Pharmacol*, 156 :196–203.

- Gutin, L., Piceno, Y., Fadrosch, D., Lynch, K., Zydek, M., Kassam, Z., LaMere, B., Terdiman, J., Ma, A., Somsouk, M., Lynch, S., and El-Nachef, N. (2019). Fecal microbiota transplant for Crohn disease : A study evaluating safety, efficacy, and microbiome profile. *United European Gastroenterol J*, 7(6) :807–814.
- Günzel, D. and Yu, A. S. L. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*, 93(2) :525–569.
- Halfvarson, J., Bodin, L., Tysk, C., Lindberg, E., and Järnerot, G. (2003). Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort : a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology*, 124(7) :1767–1773.
- Halfvarson, J., Standaert-Vitse, A., Järnerot, G., Sendid, B., Jouault, T., Bodin, L., Duhamel, A., Colombel, J. F., Tysk, C., and Poulain, D. (2005). Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in twins with inflammatory bowel disease. *Gut*, 54(9) :1237–1243.
- Halme, L., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Lappalainen, M., Farkkila, M., and Kontula, K. (2006). Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 12(23) :3668–3672.
- Ham, M., Longhi, M. S., Lahiff, C., Cheifetz, A., Robson, S., and Moss, A. C. (2014). Vitamin D levels in adults with Crohn’s disease are responsive to disease activity and treatment. *Inflamm Bowel Dis*, 20(5) :856–860.
- Hamilton, T. A., Pellegrino, G. M., Therrien, J. A., Ham, D. T., Bartlett, P. C., Karas, B. J., Gloor, G. B., and Edgell, D. R. (2019). Efficient inter-species conjugative transfer of a CRISPR nuclease for targeted bacterial killing. *Nat Commun*, 10(1) :4544.
- Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F. M., Briggs, J., Günther, S., Prescott, N. J., Onnie, C. M., Häslér, R., Sipos, B., Fölsch, U. R., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, C. G., Krawczak, M., and Schreiber, S. (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*, 39(2) :207–211.
- Hanada, T., Noda, N. N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., and Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem*, 282(52) :37298–37302.
- Haobam, B., Nozawa, T., Minowa-Nozawa, A., Tanaka, M., Oda, S., Watanabe, T., Aikawa, C., Maruyama, F., and Nakagawa, I. (2014). Rab17-mediated recycling endosomes contribute to autophagosome formation in response to Group A Streptococcus invasion. *Cell Microbiol*, 16(12) :1806–1821.
- Haraga, A. and Miller, S. I. (2003). A Salmonella enterica serovar typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF-kappa B-dependent gene expression. *Infect Immun*, 71(7) :4052–4058.
- Haraga, A. and Miller, S. I. (2006). A Salmonella type III secretion effector interacts with the mammalian serine/threonine protein kinase PKN1. *Cell Microbiol*, 8(5) :837–846.
- Hart, A. L., Al-Hassi, H. O., Rigby, R. J., Bell, S. J., Emmanuel, A. V., Knight, S. C., Kamm, M. A., and Stagg, A. J. (2005). Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 129(1) :50–65.
- Harvey, C. J., Thimmulappa, R. K., Sethi, S., Kong, X., Yarmus, L., Brown, R. H., Feller-Kopman, D., Wise, R., and Biswal, S. (2011). Targeting Nrf2 signaling improves bacterial clearance by alveolar macrophages in patients with COPD and in a mouse model. *Sci Transl Med*, 3(78) :78ra32.
- Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G. S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Yabashi, A., Waguri, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Imura, M., Hamura, K., Fukuoka, S.-I., Lowe, A. W., Itoh, K., Kiyono, H., and Ohno, H. (2009). Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*, 462(7270) :226–230.

- Hattula, K. and Peränen, J. (2000). FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis. *Curr Biol*, 10(24) :1603–1606.
- Heath, R. J., Goel, G., Baxt, L. A., Rush, J. S., Mohanan, V., Paulus, G. L. C., Jani, V., Lassen, K. G., and Xavier, R. J. (2016). RNF166 Determines Recruitment of Adaptor Proteins during Antibacterial Autophagy. *Cell Rep*, 17(9) :2183–2194.
- Henckaerts, L., Cleynen, I., Brinar, M., John, J. M., Van Steen, K., Rutgeerts, P., and Vermeire, S. (2011). Genetic variation in the autophagy gene ULK1 and risk of Crohn’s disease. *Inflamm Bowel Dis*, 17(6) :1392–1397.
- Henderson, P. and Stevens, C. (2012). The role of autophagy in Crohn’s disease. *Cells*, 1(3) :492–519.
- Henke, M. T., Kenny, D. J., Cassilly, C. D., Vlamakis, H., Xavier, R. J., and Clardy, J. (2019). Ruminococcus gnavus, a member of the human gut microbiome associated with Crohn’s disease, produces an inflammatory polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(26) :12672–12677.
- Heo, J.-M., Ordureau, A., Paulo, J. A., Rinehart, J., and Harper, J. W. (2015). The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy. *Mol Cell*, 60(1) :7–20.
- Herath, M., Hosie, S., Bornstein, J. C., Franks, A. E., and Hill-Yardin, E. L. (2020). The Role of the Gastrointestinal Mucus System in Intestinal Homeostasis : Implications for Neurological Disorders. *Front Cell Infect Microbiol*, 10 :248.
- Hermanns, T. and Hofmann, K. (2019). Bacterial DUBs : deubiquitination beyond the seven classes. *Biochem Soc Trans*, 47(6) :1857–1866.
- Hershko, A., Ciechanover, A., and Varshavsky, A. (2000). Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nat Med*, 6(10) :1073–1081.
- Higuchi, L. M., Khalili, H., Chan, A. T., Richter, J. M., Bousvaros, A., and Fuchs, C. S. (2012). A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. *Am J Gastroenterol*, 107(9) :1399–1406.
- Hildebrandt, M. A., Hoffmann, C., Sherrill-Mix, S. A., Keilbaugh, S. A., Hamady, M., Chen, Y.-Y., Knight, R., Ahima, R. S., Bushman, F., and Wu, G. D. (2009). High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*, 137(5) :1716–1724.e1–2.
- Hlavaty, T., Toth, J., Koller, T., Krajcovicova, A., Oravcova, S., Zelinkova, Z., and Huorka, M. (2013). Smoking, breastfeeding, physical inactivity, contact with animals, and size of the family influence the risk of inflammatory bowel disease : A Slovak case-control study. *United European Gastroenterol J*, 1(2) :109–119.
- Hoarau, G., Mukherjee, P. K., Gower-Rousseau, C., Hager, C., Chandra, J., Retuerto, M. A., Neut, C., Vermeire, S., Clemente, J., Colombel, J. F., Fujioka, H., Poulain, D., Sendid, B., and Ghannoum, M. A. (2016). Bacteriome and Mycobiome Interactions Underscore Microbial Dysbiosis in Familial Crohn’s Disease. *mBio*, 7(5) :e01250–16.
- Hoefkens, E., Nys, K., John, J. M., Van Steen, K., Arijis, I., Van der Goten, J., Van Assche, G., Agostinis, P., Rutgeerts, P., Vermeire, S., and Cleynen, I. (2013). Genetic association and functional role of Crohn disease risk alleles involved in microbial sensing, autophagy, and endoplasmic reticulum (ER) stress. *Autophagy*, 9(12) :2046–2055.
- Hoffmann, P., Lamerz, D., Hill, P., Kirchner, M., and Gauss, A. (2021). Gene Polymorphisms of NOD2, IL23R, PTPN2 and ATG16L1 in Patients with Crohn’s Disease : On the Way to Personalized Medicine? *Genes (Basel)*, 12(6) :866.

- Hollander, D., Vadheim, C. M., Brettholz, E., Petersen, G. M., Delahunty, T., and Rotter, J. I. (1986). Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med*, 105(6) :883–885.
- Homer, C. R., Richmond, A. L., Rebert, N. A., Achkar, J.-P., and McDonald, C. (2010). ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology*, 139(5) :1630–1641, 1641.e1–2.
- Honap, S., Johnston, E., Agrawal, G., Al-Hakim, B., Hermon-Taylor, J., and Sanderson, J. (2021). Anti-*Mycobacterium paratuberculosis* (MAP) therapy for Crohn's disease : an overview and update. *Frontline Gastroenterol*, 12(5) :397–403.
- Honda, K. and Littman, D. R. (2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*, 535(7610) :75–84.
- Hooper, K. M., Casanova, V., Kemp, S., Staines, K. A., Satsangi, J., Barlow, P. G., Henderson, P., and Stevens, C. (2019). The Inflammatory Bowel Disease Drug Azathioprine Induces Autophagy via mTORC1 and the Unfolded Protein Response Sensor PERK. *Inflamm Bowel Dis*, 25(9) :1481–1496.
- Horstman, A. L. and Kuehn, M. J. (2002). Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. *J Biol Chem*, 277(36) :32538–32545.
- Hos, N. J., Fischer, J., Hos, D., Hejazi, Z., Calabrese, C., Ganesan, R., Murthy, A. M. V., Rybniker, J., Kumar, S., Krönke, M., and Robinson, N. (2020). TRIM21 Is Targeted for Chaperone-Mediated Autophagy during *Salmonella Typhimurium* Infection. *J Immunol*, 205(9) :2456–2467.
- Howell, K. J., Kraiczy, J., Nayak, K. M., Gasparetto, M., Ross, A., Lee, C., Mak, T. N., Koo, B.-K., Kumar, N., Lawley, T., Sinha, A., Rosenstiel, P., Heuschkel, R., Stegle, O., and Zilbauer, M. (2018). DNA Methylation and Transcription Patterns in Intestinal Epithelial Cells From Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Diseases Differentiate Disease Subtypes and Associate With Outcome. *Gastroenterology*, 154(3) :585–598.
- Hoyles, L., McCartney, A. L., Neve, H., Gibson, G. R., Sanderson, J. D., Heller, K. J., and van Sinderen, D. (2014). Characterization of virus-like particles associated with the human faecal and caecal microbiota. *Res Microbiol*, 165(10) :803–812.
- Hu, D., Wu, J., Wang, W., Mu, M., Zhao, R., Xu, X., Chen, Z., Xiao, J., Hu, F., Yang, Y., and Zhang, R. (2015). Autophagy regulation revealed by SapM-induced block of autophagosome-lysosome fusion via binding RAB7. *Biochem Biophys Res Commun*, 461(2) :401–407.
- Hu, J., Lin, S., Zheng, B., and Cheung, P. C. K. (2018a). Short-chain fatty acids in control of energy metabolism. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 58(8) :1243–1249.
- Hu, S., Guo, Y., Wang, Y., Li, Y., Fu, T., Zhou, Z., Wang, Y., Liu, J., and Pan, L. (2019). Structure of Myosin VI/Tom1 complex reveals a cargo recognition mode of Myosin VI for tethering. *Nat Commun*, 10(1) :3459.
- Hu, S., Wang, Y., Gong, Y., Liu, J., Li, Y., and Pan, L. (2018b). Mechanistic Insights into Recognitions of Ubiquitin and Myosin VI by Autophagy Receptor TAX1BP1. *J Mol Biol*, 430(18 Pt B) :3283–3296.
- Hu, W., Chan, H., Lu, L., Wong, K. T., Wong, S. H., Li, M. X., Xiao, Z. G., Cho, C. H., Gin, T., Chan, M. T. V., Wu, W. K. K., and Zhang, L. (2020). Autophagy in intracellular bacterial infection. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 101 :41–50.
- Huang, J. and Brumell, J. H. (2014). Bacteria-autophagy interplay : a battle for survival. *Nat Rev Microbiol*, 12(2) :101–114.
- Huett, A., Heath, R. J., Begun, J., Sassi, S. O., Baxt, L. A., Vyas, J. M., Goldberg, M. B., and Xavier, R. J. (2012). The LRR and RING domain protein LRSAM1 is an E3 ligase crucial for ubiquitin-dependent autophagy of intracellular *Salmonella Typhimurium*. *Cell Host Microbe*, 12(6) :778–790.

- Hugot, J.-P., Alberti, C., Berrebi, D., Bingen, E., and Cézard, J.-P. (2003). Crohn's disease : the cold chain hypothesis. *Lancet*, 362(9400) :2012–2015.
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M., and Thomas, G. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411(6837) :599–603.
- Hugot, J.-P., Zaccaria, I., Cavanaugh, J., Yang, H., Vermeire, S., Lappalainen, M., Schreiber, S., Annese, V., Jewell, D. P., Fowler, E. V., Brant, S. R., Silverberg, M. S., Cho, J., Rioux, J. D., Satsangi, J., Parkes, M., and Consortium, f. t. I. I. G. (2007). Prevalence of CARD15/NOD2 Mutations in Caucasian Healthy People. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG*, 102(6) :1259.
- Hui, K. Y., Fernandez-Hernandez, H., Hu, J., Schaffner, A., Pankratz, N., Hsu, et al. (2018). Functional Variants in LRRK2 Confer Pleiotropic Effects on Risk for Crohn's Disease and Parkinson's Disease. *Sci Transl Med*, 10(423) :eaai7795.
- Hung, Y.-H., Chen, L. M.-W., Yang, J.-Y., and Yuan Yang, W. (2013). Spatiotemporally controlled induction of autophagy-mediated lysosome turnover. *Nat Commun*, 4(1) :2111. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., Mathiasen, I. S., and Jäättelä, M. (2007). Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell*, 25(2) :193–205.
- Ichimura, Y., Waguri, S., Sou, Y.-S., Kageyama, S., Hasegawa, J., Ishimura, R., Saito, T., Yang, Y., Kouno, T., Fukutomi, T., Hoshii, T., Hirao, A., Takagi, K., Mizushima, T., Motohashi, H., Lee, M.-S., Yoshimori, T., Tanaka, K., Yamamoto, M., and Komatsu, M. (2013). Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol Cell*, 51(5) :618–631.
- Iebba, V., Santangelo, F., Totino, V., Nicoletti, M., Gagliardi, A., De Biase, R. V., Cucchiara, S., Nencioni, L., Conte, M. P., and Schippa, S. (2013). Higher prevalence and abundance of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the human gut of healthy subjects. *PLoS One*, 8(4) :e61608.
- Iha, H., Peloponese, J.-M., Verstrepen, L., Zapart, G., Ikeda, F., Smith, C. D., Starost, M. F., Yedavalli, V., Heyninck, K., Dikic, I., Beyaert, R., and Jeang, K.-T. (2008). Inflammatory cardiac valvulitis in TAX1BP1-deficient mice through selective NF-kappaB activation. *EMBO J*, 27(4) :629–641.
- Iida, T., Yokoyama, Y., Wagatsuma, K., Hirayama, D., and Nakase, H. (2018). Impact of Autophagy of Innate Immune Cells on Inflammatory Bowel Disease. *Cells*, 8(1) :7.
- Ikezu, T., Koro, L., Wolozin, B., Farraye, F. A., Strongosky, A. J., and Wszolek, Z. K. (2020). Crohn's and Parkinson's Disease-Associated LRRK2 Mutations Alter Type II Interferon Responses in Human CD14+ Blood Monocytes Ex Vivo. *J Neuroimmune Pharmacol*, 15(4) :794–800.
- Imai, T., Inoue, R., Nishida, A., Yokota, Y., Morishima, S., Kawahara, M., Kusada, H., Tamaki, H., and Andoh, A. (2022). Features of the gut prokaryotic virome of Japanese patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol*, 57(8) :559–570.
- Imhann, F., Vich Vila, A., Bonder, M. J., Fu, J., Gevers, D., Visschedijk, M. C., Spekhorst, L. M., Alberts, R., Franke, L., van Dullemen, H. M., Ter Steege, R. W. F., Huttenhower, C., Dijkstra, G., Xavier, R. J., Festen, E. A. M., Wijmenga, C., Zhernakova, A., and Weersma, R. K. (2018). Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease. *Gut*, 67(1) :108–119.
- Inomata, M., Niida, S., Shibata, K.-i., and Into, T. (2012). Regulation of Toll-like receptor signaling by NDP52-mediated selective autophagy is normally inactivated by A20. *Cell Mol Life Sci*, 69(6) :963–979.

- Into, T., Inomata, M., Niida, S., Murakami, Y., and Shibata, K.-i. (2010). Regulation of MyD88 aggregation and the MyD88-dependent signaling pathway by sequestosome 1 and histone deacetylase 6. *J Biol Chem*, 285(46) :35759–35769.
- Ishimura, R., Tanaka, K., and Komatsu, M. (2014). Dissection of the role of p62/Sqstm1 in activation of Nrf2 during xenophagy. *FEBS Lett*, 588(5) :822–828.
- Ivanov, S. and Roy, C. R. (2009). NDP52 : the missing link between ubiquitinated bacteria and autophagy. *Nat Immunol*, 10(11) :1137–1139.
- Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K. B., Awuh, J. A., Øvervatn, A., McMahon, M., Hayes, J. D., and Johansen, T. (2010). p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem*, 285(29) :22576–22591.
- James, J. P., Riis, L. B., Malham, M., Høgdall, E., Langholz, E., and Nielsen, B. S. (2020). MicroRNA Biomarkers in IBD-Differential Diagnosis and Prediction of Colitis-Associated Cancer. *Int J Mol Sci*, 21(21) :7893.
- Jan, A. T. (2017). Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria : A Perspective Update. *Front Microbiol*, 8 :1053.
- Jaramillo, A. P., Abaza, A., Sid Idris, F., Anis, H., Vahora, I., Moparthi, K. P., Al Rushaidi, M. T., Muddam, M., and Obajeun, O. A. (2023). Diet as an Optional Treatment in Adults With Inflammatory Bowel Disease : A Systematic Review of the Literature. *Cureus*, 15(7) :e42057.
- Ji, C. H., Kim, H. Y., Heo, A. J., Lee, S. H., Lee, M. J., Kim, S. B., Srinivasrao, G., Mun, S. R., Cha-Molstad, H., Ciechanover, A., Choi, C. Y., Lee, H. G., Kim, B. Y., and Kwon, Y. T. (2019). The N-Degron Pathway Mediates ER-phagy. *Mol Cell*, 75(5) :1058–1072.e9.
- Jigaranu, A. O., Nedelciuc, O., Blaj, A., Badea, M., Mihai, C., Diculescu, M., and Cijevischi-Prelipcean, C. (2014). Is rifaximin effective in maintaining remission in Crohn's disease? *Dig Dis*, 32(4) :378–383.
- Jin, S., Tian, S., Luo, M., Xie, W., Liu, T., Duan, T., Wu, Y., and Cui, J. (2017). Tetherin Suppresses Type I Interferon Signaling by Targeting MAVS for NDP52-Mediated Selective Autophagic Degradation in Human Cells. *Mol Cell*, 68(2) :308–322.e4.
- Jo, C., Gundemir, S., Pritchard, S., Jin, Y. N., Rahman, I., and Johnson, G. V. W. (2014). Nrf2 reduces levels of phosphorylated tau protein by inducing autophagy adaptor protein NDP52. *Nat Commun*, 5 :3496.
- Johansen, T. and Lamark, T. (2020). Selective Autophagy : ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. *J Mol Biol*, 432(1) :80–103.
- Johnson, A. M. F., Costanzo, A., Gareau, M. G., Armando, A. M., Quehenberger, O., Jameson, J. M., and Olefsky, J. M. (2015). High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability. *PLoS One*, 10(4) :e0122195.
- Joo, H.-S. and Otto, M. (2012). Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem Biol*, 19(12) :1503–1513.
- Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Vandamme, P., and Vermeire, S. (2011). Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*, 60(5) :631–637.
- Josenhans, C., Müthing, J., Elling, L., Bartfeld, S., and Schmidt, H. (2020). How bacterial pathogens of the gastrointestinal tract use the mucosal glyco-code to harness mucus and microbiota : New ways to study an ancient bag of tricks. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(2) :151392.

- Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R. K., Duerr, R. H., McGovern, et al. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 491(7422) :119–124.
- Jung, H., Kim, J. S., Lee, K. H., Tizaoui, K., Terrazzino, S., Cargnin, S., Smith, L., Koyanagi, A., Jacob, L., Li, H., Hong, S. H., Yon, D. K., Lee, S. W., Kim, M. S., Wasuwanich, P., Karnsakul, W., Shin, J. I., and Kronbichler, A. (2021). Roles of micrnas in inflammatory bowel disease. *International journal of biological sciences*, 17(8) :2112–2123. Publisher : Ivyspring International Publisher.
- Kabat, A. M., Harrison, O. J., Riffelmacher, T., Moghaddam, A. E., Pearson, C. F., Laing, A., Abeler-Dörner, L., Forman, S. P., Grecis, R. K., Sattentau, Q., Simon, A. K., Pott, J., and Maloy, K. J. (2016). The autophagy gene Atg1611 differentially regulates Treg and TH2 cells to control intestinal inflammation. *Elife*, 5 :e12444.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 19(21) :5720–5728.
- Kalla, R., Ventham, N. T., Kennedy, N. A., Quintana, J. F., Nimmo, E. R., Buck, A. H., and Satsangi, J. (2015). MicroRNAs : new players in IBD. *Gut*, 64(3) :504–513. Publisher : BMJ Publishing Group Section : Recent advances in basic science.
- Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., Sato, T., Sakuraba, A., Kitazume, M. T., Sugita, A., Koganei, K., Akagawa, K. S., and Hibi, T. (2008). Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest*, 118(6) :2269–2280.
- Kamali Dolatabadi, R., Feizi, A., Halaji, M., Fazeli, H., and Adibi, P. (2021). The Prevalence of Adherent-Invasive Escherichia coli and Its Association With Inflammatory Bowel Diseases : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne)*, 8 :730243.
- Kamanova, J., Sun, H., Lara-Tejero, M., and Galán, J. E. (2016). The Salmonella Effector Protein SopA Modulates Innate Immune Responses by Targeting TRIM E3 Ligase Family Members. *PLoS Pathog*, 12(4) :e1005552.
- Kamen, D. L. and Tangpricha, V. (2010). Vitamin D and molecular actions on the immune system : modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med (Berl)*, 88(5) :441–450.
- Kamp, H. D., Patimalla-Dipali, B., Lazinski, D. W., Wallace-Gadsden, F., and Camilli, A. (2013). Gene fitness landscapes of Vibrio cholerae at important stages of its life cycle. *PLoS Pathog*, 9(12) :e1003800.
- Kaplan, G. G., Hubbard, J., Korzenik, J., Sands, B. E., Panaccione, R., Ghosh, S., Wheeler, A. J., and Ville-neuve, P. J. (2010). The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution : a novel association. *Am J Gastroenterol*, 105(11) :2412–2419.
- Kaplan, G. G. and Ng, S. C. (2016). Globalisation of inflammatory bowel disease : perspectives from the evolution of inflammatory bowel disease in the UK and China. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 1(4) :307–316.
- Kaplan, G. G. and Ng, S. C. (2017). Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 152(2) :313–321.e2.
- Karanasios, E., Stapleton, E., Manifava, M., Kaizuka, T., Mizushima, N., Walker, S. A., and Ktistakis, N. T. (2013). Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J Cell Sci*, 126(Pt 22) :5224–5238.
- Ke, P., Shao, B.-Z., Xu, Z.-Q., Wei, W., Han, B.-Z., Chen, X.-W., Su, D.-F., and Liu, C. (2016). Activation of Cannabinoid Receptor 2 Ameliorates DSS-Induced Colitis through Inhibiting NLRP3 Inflammasome in Macrophages. *PLoS One*, 11(9) :e0155076.

- Keita, A. V., Alkaissi, L. Y., Holm, E. B., Heil, S. D. S., Chassaing, B., Darfeuille-Michaud, A., McKay, D. M., and Söderholm, J. D. (2020). Enhanced E. coli LF82 Translocation through the Follicle-associated Epithelium in Crohn's Disease is Dependent on Long Polar Fimbriae and CEACAM6 expression, and Increases Paracellular Permeability. *J Crohns Colitis*, 14(2) :216–229.
- Kelly, C. J., Zheng, L., Campbell, E. L., Saeedi, B., Scholz, C. C., Bayless, A. J., Wilson, K. E., Glover, L. E., Kominsky, D. J., Magnuson, A., Weir, T. L., Ehrentraut, S. F., Pickel, C., Kuhn, K. A., Lanis, J. M., Nguyen, V., Taylor, C. T., and Colgan, S. P. (2015). Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell Host Microbe*, 17(5) :662–671.
- Kelly, D., Kotliar, M., Woo, V., Jagannathan, S., Whitt, J., Moncivaiz, J., Aronow, B. J., Dubinsky, M. C., Hyams, J. S., Markowitz, J. F., Baldassano, R. N., Stephens, M. C., Walters, T. D., Kugathasan, S., Haberman, Y., Sundaram, N., Rosen, M. J., Helmuth, M., Karns, R., Barski, A., Denson, L. A., and Alenghat, T. (2018). Microbiota-sensitive epigenetic signature predicts inflammation in Crohn's disease. *JCI Insight*, 3(18). Publisher : American Society for Clinical Investigation.
- Kerman, D. H. and Deshpande, A. R. (2014). Gut microbiota and inflammatory bowel disease : the role of antibiotics in disease management. *Postgrad Med*, 126(4) :7–19.
- Khalafi, M. and Symonds, M. E. (2020). The impact of high-intensity interval training on inflammatory markers in metabolic disorders : A meta-analysis. *Scand J Med Sci Sports*, 30(11) :2020–2036.
- Khalili, H., Ananthakrishnan, A. N., Konijeti, G. G., Liao, X., Higuchi, L. M., Fuchs, C. S., Spiegelman, D., Richter, J. M., Korzenik, J. R., and Chan, A. T. (2013). Physical activity and risk of inflammatory bowel disease : prospective study from the Nurses' Health Study cohorts. *BMJ*, 347 :f6633.
- Khan, I., Ullah, N., Zha, L., Bai, Y., Khan, A., Zhao, T., Che, T., and Zhang, C. (2019). Alteration of Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease (IBD) : Cause or Consequence? IBD Treatment Targeting the Gut Microbiome. *Pathogens*, 8(3) :126.
- Khan, K. J., Ullman, T. A., Ford, A. C., Abreu, M. T., Abadir, A., Marshall, J. K., Talley, N. J., and Moayyedi, P. (2011). Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease : a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 106(4) :661–673.
- Khanna, R., Bressler, B., Levesque, B. G., Zou, G., Stitt, L. W., Greenberg, G. R., Panaccione, R., Bitton, A., Paré, P., Vermeire, S., D'Haens, G., MacIntosh, D., Sandborn, W. J., Donner, A., Vandervoort, M. K., Morris, J. C., Feagan, B. G., and REACT Study Investigators (2015). Early combined immunosuppression for the management of Crohn's disease (REACT) : a cluster randomised controlled trial. *Lancet*, 386(10006) :1825–1834.
- Khanna, S. and Raffals, L. E. (2017). The Microbiome in Crohn's Disease : Role in Pathogenesis and Role of Microbiome Replacement Therapies. *Gastroenterol Clin North Am*, 46(3) :481–492.
- Khor, B., Gardet, A., and Xavier, R. J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351) :307–317.
- Kim, B.-W., Kwon, D. H., and Song, H. K. (2016a). Structure biology of selective autophagy receptors. *BMB Rep*, 49(2) :73–80.
- Kim, J. K., Lee, H.-M., Park, K.-S., Shin, D.-M., Kim, T. S., Kim, Y. S., Suh, H.-W., Kim, S. Y., Kim, I. S., Kim, J.-M., Son, J.-W., Sohn, K. M., Jung, S. S., Chung, C., Han, S.-B., Yang, C.-S., and Jo, E.-K. (2017). MIR144\* inhibits antimicrobial responses against Mycobacterium tuberculosis in human monocytes and macrophages by targeting the autophagy protein DRAM2. *Autophagy*, 13(2) :423–441.
- Kim, J. K., Yuk, J.-M., Kim, S. Y., Kim, T. S., Jin, H. S., Yang, C.-S., and Jo, E.-K. (2015). MicroRNA-125a Inhibits Autophagy Activation and Antimicrobial Responses during Mycobacterial Infection. *J Immunol*, 194(11) :5355–5365.



- Kim, J. Y. and Ozato, K. (2009). The sequestosome 1/p62 attenuates cytokine gene expression in activated macrophages by inhibiting IFN regulatory factor 8 and TNF receptor-associated factor 6/NF-kappaB activity. *J Immunol*, 182(4) :2131–2140.
- Kim, K.-A., Gu, W., Lee, I.-A., Joh, E.-H., and Kim, D.-H. (2012). High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One*, 7(10) :e47713.
- Kim, P. K., Hailey, D. W., Mullen, R. T., and Lippincott-Schwartz, J. (2008). Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(52) :20567–20574.
- Kim, S., Eun, H. S., and Jo, E.-K. (2019). Roles of Autophagy-Related Genes in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Cells*, 8(1) :77.
- Kim, Y. K., Shin, J. S., and Nahm, M. H. (2016b). NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med J*, 57(1) :5–14.
- Kirkin, V. (2020). History of the Selective Autophagy Research : How Did It Begin and Where Does It Stand Today? *J Mol Biol*, 432(1) :3–27.
- Kirkin, V., Lamark, T., Sou, Y.-S., Bjørkøy, G., Nunn, J. L., Bruun, J.-A., Shvets, E., McEwan, D. G., Clausen, T. H., Wild, P., Bilusic, I., Theurillat, J.-P., Øvervatn, A., Ishii, T., Elazar, Z., Komatsu, M., Dikic, I., and Johansen, T. (2009). A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell*, 33(4) :505–516.
- Kitamoto, S., Alteri, C. J., Rodrigues, M., Nagao-Kitamoto, H., Sugihara, K., Himpls, S. D., Bazzi, M., Miyoshi, M., Nishioka, T., Hayashi, A., Morhardt, T. L., Kuffa, P., Grasberger, H., El-Zaatari, M., Bishu, S., Ishii, C., Hirayama, A., Eaton, K. A., Dogan, B., Simpson, K. W., Inohara, N., Mobley, H. L. T., Kao, J. Y., Fukuda, S., Barnich, N., and Kamada, N. (2020). Dietary L-serine confers a competitive fitness advantage to Enterobacteriaceae in the inflamed gut. *Nat Microbiol*, 5(1) :116–125.
- Kleanthous, C., Hemmings, A. M., Moore, G. R., and James, R. (1998). Immunity proteins and their specificity for endonuclease colicins : telling right from wrong in protein-protein recognition. *Mol Microbiol*, 28(2) :227–233.
- Klinger, A. L. and Kann, B. R. (2019). Endoscopy in Inflammatory Bowel Disease. *Surg Clin North Am*, 99(6) :1063–1082.
- Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, et al. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. *Autophagy*, 17(1) :1–382.
- Knights, D., Silverberg, M. S., Weersma, R. K., Gevers, D., Dijkstra, G., Huang, H., Tyler, A. D., van Sommeren, S., Imhann, F., Stempak, J. M., Huang, H., Vangay, P., Al-Ghalith, G. A., Russell, C., Sauk, J., Knight, J., Daly, M. J., Huttenhower, C., and Xavier, R. J. (2014). Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. *Genome Med*, 6(12) :107.
- Knösel, T., Schewe, C., Petersen, N., Dietel, M., and Petersen, I. (2009). Prevalence of infectious pathogens in Crohn's disease. *Pathol Res Pract*, 205(4) :223–230.
- Koelink, P. J., Bloemendaal, F. M., Li, B., Westera, L., Vogels, E. W. M., van Roest, M., Gloudemans, A. K., van 't Wout, A. B., Korf, H., Vermeire, S., Te Velde, A. A., Ponsioen, C. Y., D'Haens, G. R., Verbeek, J. S., Geiger, T. L., Wildenberg, M. E., and van den Brink, G. R. (2020). Anti-TNF therapy in IBD exerts its therapeutic effect through macrophage IL-10 signalling. *Gut*, 69(6) :1053–1063.
- Koerver, L., Papadopoulos, C., Liu, B., Kravic, B., Rota, G., Brecht, L., Veenendaal, T., Polajnar, M., Bluemke, A., Ehrmann, M., Klumperman, J., Jäättelä, M., Behrends, C., and Meyer, H. (2019). The ubiquitin-conjugating enzyme UBE2QL1 coordinates lysophagy in response to endolysosomal damage. *EMBO Rep*, 20(10) :e48014.

- Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K. I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S.-i., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., and Yamamoto, M. (2010). The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol*, 12(3) :213–223.
- Kong, W., Li, H., Tuma, R. F., and Ganea, D. (2014). Selective CB2 receptor activation ameliorates EAE by reducing Th17 differentiation and immune cell accumulation in the CNS. *Cell Immunol*, 287(1) :1–17.
- Korac, J., Schaeffer, V., Kovacevic, I., Clement, A. M., Jungblut, B., Behl, C., Terzic, J., and Dikic, I. (2013). Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates. *J Cell Sci*, 126(Pt 2) :580–592.
- Kordjazy, N., Haj-Mirzaian, A., Haj-Mirzaian, A., Rohani, M. M., Gelfand, E. W., Rezaei, N., and Abdolghafari, A. H. (2018). Role of toll-like receptors in inflammatory bowel disease. *Pharmacological Research*, 129 :204–215.
- Korioth, F., Gieffers, C., Maul, G. G., and Frey, J. (1995). Molecular characterization of NDP52, a novel protein of the nuclear domain 10, which is redistributed upon virus infection and interferon treatment. *J Cell Biol*, 130(1) :1–13.
- Kostic, A. D., Xavier, R. J., and Gevers, D. (2014). The microbiome in inflammatory bowel disease : current status and the future ahead. *Gastroenterology*, 146(6) :1489–1499.
- Kotlowski, R., Bernstein, C. N., Sepehri, S., and Krause, D. O. (2007). High prevalence of Escherichia coli belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut*, 56(5) :669–675.
- Kotłowski, R. (2016). Use of Escherichia coli Nissle 1917 producing recombinant colicins for treatment of IBD patients. *Med Hypotheses*, 93 :8–10.
- Koyama-Honda, I., Itakura, E., Fujiwara, T. K., and Mizushima, N. (2013). Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy*, 9(10) :1491–1499.
- Kraft, C., Peter, M., and Hofmann, K. (2010). Selective autophagy : ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol*, 12(9) :836–841.
- Kreibich, S., Emmenlauer, M., Fredlund, J., Rämö, P., Münz, C., Dehio, C., Enninga, J., and Hardt, W.-D. (2015). Autophagy Proteins Promote Repair of Endosomal Membranes Damaged by the Salmonella Type Three Secretion System 1. *Cell Host Microbe*, 18(5) :527–537.
- Kronman, M. P., Zaoutis, T. E., Haynes, K., Feng, R., and Coffin, S. E. (2012). Antibiotic exposure and IBD development among children : a population-based cohort study. *Pediatrics*, 130(4) :e794–803.
- Ktistakis, N. T., Andrews, S., and Long, J. (2011). What is the advantage of a transient precursor in autophagosome biogenesis? *Autophagy*, 7(1) :118–122.
- Kuballa, P., Huett, A., Rioux, J. D., Daly, M. J., and Xavier, R. J. (2008). Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One*, 3(10) :e3391.
- Kökten, T., Gibot, S., Lepage, P., D'Alessio, S., Hablot, J., Ndiaye, N.-C., Busby-Venner, H., Monot, C., Garnier, B., Moulin, D., Jouzeau, J.-Y., Hansmannel, F., Danese, S., Guéant, J.-L., Muller, S., and Peyrin-Biroulet, L. (2018). TREM-1 Inhibition Restores Impaired Autophagy Activity and Reduces Colitis in Mice. *J Crohns Colitis*, 12(2) :230–244.
- Lacher, M., Schroepf, S., Ballauff, A., Lohse, P., Von Schweinitz, D., Kappler, R., and Koletzko, S. (2009). Autophagy 16-like 1 rs2241880 G allele is associated with Crohn's disease in German children. *Acta Paediatrica*, 98(11) :1835–1840. \_eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1651-2227.2009.01438.x>.

- Lagishetty, V., Misharin, A. V., Liu, N. Q., Lisse, T. S., Chun, R. F., Ouyang, Y., McLachlan, S. M., Adams, J. S., and Hewison, M. (2010). Vitamin D deficiency in mice impairs colonic antibacterial activity and predisposes to colitis. *Endocrinology*, 151(6) :2423–2432.
- Laharie, D., Debeugny, S., Peeters, M., Van Gossum, A., Gower-Rousseau, C., Bélaïche, J., Fiasse, R., Dupas, J. L., Lerebours, E., Piotte, S., Cortot, A., Vermeire, S., Grandbastien, B., and Colombel, J. F. (2001). Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology*, 120(4) :816–819.
- Lakatos, P. L., Vegh, Z., Lovasz, B. D., David, G., Pandur, T., Erdelyi, Z., Szita, I., Mester, G., Balogh, M., Szipocs, I., Molnar, C., Komaromi, E., Golovics, P. A., Mandel, M., Horvath, A., Szathmari, M., Kiss, L. S., and Lakatos, L. (2013). Is current smoking still an important environmental factor in inflammatory bowel diseases? Results from a population-based incident cohort. *Inflamm Bowel Dis*, 19(5) :1010–1017.
- Lamark, T. and Johansen, T. (2021). Mechanisms of Selective Autophagy. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 37 :143–169.
- Lambert, C., Morehouse, K. A., Chang, C.-Y., and Sockett, R. E. (2006). *Bdellovibrio* : growth and development during the predatory cycle. *Curr Opin Microbiol*, 9(6) :639–644.
- Lamps, L. W., Madhusudhan, K. T., Havens, J. M., Greenson, J. K., Bronner, M. P., Chiles, M. C., Dean, P. J., and Scott, M. A. (2003). Pathogenic *Yersinia* DNA is detected in bowel and mesenteric lymph nodes from patients with Crohn's disease. *Am J Surg Pathol*, 27(2) :220–227.
- Landy, J., Ronde, E., English, N., Clark, S. K., Hart, A. L., Knight, S. C., Ciclitira, P. J., and Al-Hassi, H. O. (2016). Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 22(11) :3117–3126.
- Lapaquette, P., Bringer, M.-A., and Darfeuille-Michaud, A. (2012). Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell Microbiol*, 14(6) :791–807.
- Lapaquette, P., Glasser, A.-L., Huett, A., Xavier, R. J., and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol*, 12(1) :99–113.
- Lapaquette, P., Nguyen, H. T. T., and Faure, M. (2017). [Regulation of immunity and inflammation by autophagy : « All is well, all is fine, all goes as well as possible»]. *Med Sci (Paris)*, 33(3) :305–311.
- Larabi, A., Barnich, N., and Nguyen, H. T. T. (2020a). New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD. *Autophagy*, 16(1) :38–51.
- Larabi, A., Dalmaso, G., Delmas, J., Barnich, N., and Nguyen, H. T. T. (2020b). Exosomes transfer miRNAs from cell-to-cell to inhibit autophagy during infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli*. *Gut Microbes*, 11(6) :1677–1694.
- Las Heras, V., Clooney, A. G., Ryan, F. J., Cabrera-Rubio, R., Casey, P. G., Hueston, C. M., Pinheiro, J., Rudkin, J. K., Melgar, S., Cotter, P. D., Hill, C., and Gahan, C. G. M. (2019). Short-term consumption of a high-fat diet increases host susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiome*, 7(1) :7.
- Lassen, K. G., Kuballa, P., Conway, K. L., Patel, K. K., Becker, C. E., Peloquin, J. M., Villablanca, E. J., Norman, J. M., Liu, T.-C., Heath, R. J., Becker, M. L., Fagbami, L., Horn, H., Mercer, J., Yilmaz, O. H., Jaffe, J. D., Shamji, A. F., Bhan, A. K., Carr, S. A., Daly, M. J., Virgin, H. W., Schreiber, S. L., Stappenbeck, T. S., and Xavier, R. J. (2014). Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(21) :7741–7746.

- Lassen, K. G., McKenzie, C. I., Mari, M., Murano, T., Begun, J., Baxt, L. A., Goel, G., Villablanca, E. J., Kuo, S.-Y., Huang, H., Macia, L., Bhan, A. K., Batten, M., Daly, M. J., Reggiori, F., Mackay, C. R., and Xavier, R. J. (2016). Genetic Coding Variant in GPR65 Alters Lysosomal pH and Links Lysosomal Dysfunction with Colitis Risk. *Immunity*, 44(6) :1392–1405.
- Laudisi, F., Di Fusco, D., Dinallo, V., Stolfi, C., Di Grazia, A., Marafini, I., Colantoni, A., Ortenzi, A., Alteri, C., Guerrieri, F., Mavilio, M., Ceccherini-Silberstein, F., Federici, M., MacDonald, T. T., Monteleone, I., and Monteleone, G. (2019). The Food Additive Maltodextrin Promotes Endoplasmic Reticulum Stress-Driven Mucus Depletion and Exacerbates Intestinal Inflammation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 7(2) :457–473.
- Lavoie, S., Conway, K. L., Lassen, K. G., Jijon, H. B., Pan, H., Chun, E., Michaud, M., Lang, J. K., Gallini Comeau, C. A., Dreyfuss, J. M., Glickman, J. N., Vlamakis, H., Ananthakrishnan, A., Kostic, A., Garrett, W. S., and Xavier, R. J. (2019). The Crohn's disease polymorphism, ATG16L1 T300A, alters the gut microbiota and enhances the local Th1/Th17 response. *Elife*, 8 :e39982.
- Lazarou, M., Sliter, D. A., Kane, L. A., Sarraf, S. A., Wang, C., Burman, J. L., Sideris, D. P., Fogel, A. I., and Youle, R. J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*, 524(7565) :309–314. Number : 7565 Publisher : Nature Publishing Group.
- Le Baut, G., O'Brien, C., Pavli, P., Roy, M., Seksik, P., Tréton, X., Nancey, S., Barnich, N., Bezault, M., Auzolle, C., Cazals-Hatem, D., Viala, J., Allez, M., REMIND GROUP, Hugot, J.-P., and Dumay, A. (2018). Prevalence of Yersinia Species in the Ileum of Crohn's Disease Patients and Controls. *Front Cell Infect Microbiol*, 8 :336.
- Lee, H. K., Mattei, L. M., Steinberg, B. E., Alberts, P., Lee, Y. H., Chervonsky, A., Mizushima, N., Grinstein, S., and Iwasaki, A. (2010). In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. *Immunity*, 32(2) :227–239.
- Leu, S. B., Shulman, S. C., Steelman, C. K., Lamps, L. W., Bulut, O. P., Abramowsky, C. R., Gold, B. D., Szlam, S., Stockwell, C., Havens, J., Kolta, S., and Shehata, B. M. (2013). Pathogenic Yersinia DNA in intestinal specimens of pediatric patients with Crohn's disease. *Fetal Pediatr Pathol*, 32(5) :367–370.
- Levine, A., Rhodes, J. M., Lindsay, J. O., Abreu, M. T., Kamm, M. A., Gibson, P. R., Gasche, C., Silverberg, M. S., Mahadevan, U., Boneh, R. S., Wine, E., Damas, O. M., Syme, G., Trakman, G. L., Yao, C. K., Stockhamer, S., Hammami, M. B., Garces, L. C., Rogler, G., Koutroubakis, I. E., Ananthakrishnan, A. N., McKeever, L., and Lewis, J. D. (2020). Dietary Guidance From the International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 18(6) :1381–1392.
- Levine, A., Sigall Boneh, R., and Wine, E. (2018). Evolving role of diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Gut*, 67(9) :1726–1738.
- Li, E., Hamm, C. M., Gulati, A. S., Sartor, R. B., Chen, H., Wu, X., Zhang, T., Rohlf, F. J., Zhu, W., Gu, C., Robertson, C. E., Pace, N. R., Boedeker, E. C., Harpaz, N., Yuan, J., Weinstock, G. M., Sodergren, E., and Frank, D. N. (2012). Inflammatory bowel diseases phenotype, *C. difficile* and NOD2 genotype are associated with shifts in human ileum associated microbial composition. *PLoS One*, 7(6) :e26284.
- Li, F., Xie, X., Wang, Y., Liu, J., Cheng, X., Guo, Y., Gong, Y., Hu, S., and Pan, L. (2016). Structural insights into the interaction and disease mechanism of neurodegenerative disease-associated optineurin and TBK1 proteins. *Nat Commun*, 7 :12708.
- Li, F., Xu, D., Wang, Y., Zhou, Z., Liu, J., Hu, S., Gong, Y., Yuan, J., and Pan, L. (2018). Structural insights into the ubiquitin recognition by OPTN (optineurin) and its regulation by TBK1-mediated phosphorylation. *Autophagy*, 14(1) :66–79.
- Li, M., Yang, L., Mu, C., Sun, Y., Gu, Y., Chen, D., Liu, T., and Cao, H. (2022). Gut microbial metabolome in inflammatory bowel disease : From association to therapeutic perspectives. *Comput Struct Biotechnol J*, 20 :2402–2414.

- Li, Q., Wang, C., Tang, C., He, Q., Li, N., and Li, J. (2014). Dysbiosis of gut fungal microbiota is associated with mucosal inflammation in Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol*, 48(6) :513–523.
- Li, X. V., Leonardi, I., and Iliev, I. D. (2019). Gut Mycobiota in Immunity and Inflammatory Disease. *Immunity*, 50(6) :1365–1379.
- Lichtenstein, G. R., Loftus, E. V., Isaacs, K. L., Regueiro, M. D., Gerson, L. B., and Sands, B. E. (2018). ACG Clinical Guideline : Management of Crohn's Disease in Adults. *Am J Gastroenterol*, 113(4) :481–517.
- Lichtenstein, L., Avni-Biron, I., and Ben-Bassat, O. (2016). Probiotics and prebiotics in Crohn's disease therapies. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 30(1) :81–88.
- Liguori, G., Lamas, B., Richard, M. L., Brandi, G., da Costa, G., Hoffmann, T. W., Di Simone, M. P., Calabrese, C., Poggioli, G., Langella, P., Campieri, M., and Sokol, H. (2016). Fungal Dysbiosis in Mucosa-associated Microbiota of Crohn's Disease Patients. *J Crohns Colitis*, 10(3) :296–305.
- Limon, J. J., Tang, J., Li, D., Wolf, A. J., Michelsen, K. S., Funari, V., Gargus, M., Nguyen, C., Sharma, P., Maymi, V. I., Iliev, I. D., Skalski, J. H., Brown, J., Landers, C., Borneman, J., Braun, J., Targan, S. R., McGovern, D. P. B., and Underhill, D. M. (2019). *Malassezia* Is Associated with Crohn's Disease and Exacerbates Colitis in Mouse Models. *Cell Host Microbe*, 25(3) :377–388.e6.
- Lin, C.-Y., Nozawa, T., Minowa-Nozawa, A., Toh, H., Hikichi, M., Iibushi, J., and Nakagawa, I. (2020). Autophagy Receptor Tollip Facilitates Bacterial Autophagy by Recruiting Galectin-7 in Response to Group A Streptococcus Infection. *Front Cell Infect Microbiol*, 10 :583137.
- Lin, X.-T., Zheng, X.-B., Fan, D.-J., Yao, Q.-Q., Hu, J.-C., Lian, L., Wu, X.-J., Lan, P., and He, X.-S. (2018). MicroRNA-143 Targets ATG2B to Inhibit Autophagy and Increase Inflammatory Responses in Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*, 24(4) :781–791.
- Lindoso, L., Mondal, K., Venkateswaran, S., Somineni, H. K., Ballengee, et al. (2018). The Effect of Early-Life Environmental Exposures on Disease Phenotype and Clinical Course of Crohn's Disease in Children. *Am J Gastroenterol*, 113(10) :1524–1529.
- Liu, B., Gulati, A. S., Cantillana, V., Henry, S. C., Schmidt, E. A., Daniell, X., Grossniklaus, E., Schoenborn, A. A., Sartor, R. B., and Taylor, G. A. (2013). *Irgm1*-deficient mice exhibit Paneth cell abnormalities and increased susceptibility to acute intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 305(8) :G573–584.
- Liu, C., Wang, J., Yang, Y., Liu, X., Zhu, Y., Zou, J., Peng, S., Le, T. H., Chen, Y., Zhao, S., He, B., Mi, Q., Zhang, X., and Du, Q. (2018a). Ginsenoside Rd ameliorates colitis by inducing p62-driven mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inactivation in mice. *Biochem Pharmacol*, 155 :366–379.
- Liu, F., Chen, J., Wang, P., Li, H., Zhou, Y., Liu, H., Liu, Z., Zheng, R., Wang, L., Yang, H., Cui, Z., Wang, F., Huang, X., Wang, J., Sha, W., Xiao, H., and Ge, B. (2018b). MicroRNA-27a controls the intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* by regulating calcium-associated autophagy. *Nat Commun*, 9(1) :4295.
- Liu, H., Gao, P., Jia, B., Lu, N., Zhu, B., and Zhang, F. (2021a). IBD-Associated Atg16L1T300A Polymorphism Regulates Commensal Microbiota of the Intestine. *Front Immunol*, 12 :772189.
- Liu, J. Z., van Sommeren, S., Huang, H., Ng, S. C., Alberts, R., Takahashi, et al. (2015). Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet*, 47(9) :979–986.
- Liu, R., Li, X., Ma, H., Yang, Q., Shang, Q., Song, L., Zheng, Z., Zhang, S., Pan, Y., Huang, P., Fang, J., Li, Y., Liu, Z., Cao, L., Feng, C., Gong, Z., Chen, Y., Wang, Y., Melino, G., Shao, C., and Shi, Y. (2020). Spermidine endows macrophages anti-inflammatory properties by inducing mitochondrial superoxide-dependent AMPK activation, Hif-1 $\alpha$  upregulation and autophagy. *Free Radic Biol Med*, 161 :339–350.

- Liu, T.-C., Kern, J. T., Jain, U., Sonnek, N. M., Xiong, S., Simpson, K. F., VanDussen, K. L., Winkler, E. S., Haritunians, T., Malique, A., Lu, Q., Sasaki, Y., Storer, C., Diamond, M. S., Head, R. D., McGovern, D. P. B., and Stappenbeck, T. S. (2021b). Western diet induces Paneth cell defects through microbiome alterations and farnesoid X receptor and type I interferon activation. *Cell Host Microbe*, 29(6) :988–1001.e6.
- Liu, T.-C., Kern, J. T., VanDussen, K. L., Xiong, S., Kaiko, G. E., Wilen, C. B., Rajala, M. W., Caruso, R., Holtzman, M. J., Gao, F., McGovern, D. P., Nunez, G., Head, R. D., and Stappenbeck, T. S. (2018c). Interaction between smoking and ATG16L1T300A triggers Paneth cell defects in Crohn's disease. *J Clin Invest*, 128(11) :5110–5122.
- Lo, C.-H., Lochhead, P., Khalili, H., Song, M., Tabung, F. K., Burke, K. E., Richter, J. M., Giovannucci, E. L., Chan, A. T., and Ananthakrishnan, A. N. (2020). Dietary Inflammatory Potential and Risk of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*, 159(3) :873–883.e1.
- Lopez-Siles, M., Martinez-Medina, M., Busquets, D., Sabat-Mir, M., Duncan, S. H., Flint, H. J., Aldeguer, X., and Garcia-Gil, L. J. (2014). Mucosa-associated Faecalibacterium prausnitzii and Escherichia coli co-abundance can distinguish Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease phenotypes. *Int J Med Microbiol*, 304(3-4) :464–475.
- Lou, J., Wang, Y., Zheng, X., and Qiu, W. (2018). TRIM22 regulates macrophage autophagy and enhances Mycobacterium tuberculosis clearance by targeting the nuclear factor-multiplicity  $\kappa$ B/beclin 1 pathway. *J Cell Biochem*, 119(11) :8971–8980.
- Low, D., Tran, H. T., Lee, I.-A., Dreux, N., Kamba, A., Reinecker, H.-C., Darfeuille-Michaud, A., Barnich, N., and Mizoguchi, E. (2013). Chitin-binding domains of Escherichia coli ChiA mediate interactions with intestinal epithelial cells in mice with colitis. *Gastroenterology*, 145(3) :602–612.e9.
- Lu, C., Chen, J., Xu, H.-G., Zhou, X., He, Q., Li, Y.-L., Jiang, G., Shan, Y., Xue, B., Zhao, R.-X., Wang, Y., Werle, K. D., Cui, R., Liang, J., and Xu, Z.-X. (2014a). MIR106B and MIR93 prevent removal of bacteria from epithelial cells by disrupting ATG16L1-mediated autophagy. *Gastroenterology*, 146(1) :188–199.
- Lu, R., Zhang, Y.-G., Xia, Y., and Sun, J. (2019). Imbalance of autophagy and apoptosis in intestinal epithelium lacking the vitamin D receptor. *FASEB J*, 33(11) :11845–11856.
- Lu, Y., Li, C.-Y., Lin, S.-S., and Yuan, P. (2014b). IRGM rs13361189 polymorphism may contribute to susceptibility to Crohn's disease : A meta-analysis. *Exp Ther Med*, 8(2) :607–613.
- Lutz, P., Krämer, B., Kaczmarek, D. J., Hübner, M. P., Langhans, B., Appenrodt, B., Lammert, F., Nattermann, J., Hoerauf, A., Strassburg, C. P., Spengler, U., and Nischalke, H. D. (2016). A variant in the nuclear dot protein 52kDa gene increases the risk for spontaneous bacterial peritonitis in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Dig Liver Dis*, 48(1) :62–68.
- Lystad, A. H., Carlsson, S. R., de la Ballina, L. R., Kauffman, K. J., Nag, S., Yoshimori, T., Melia, T. J., and Simonsen, A. (2019). Distinct functions of ATG16L1 isoforms in membrane binding and LC3B lipidation in autophagy-related processes. *Nat Cell Biol*, 21(3) :372–383.
- Maeda, S., Hsu, L.-C., Liu, H., Bankston, L. A., Iimura, M., Kagnoff, M. F., Eckmann, L., and Karin, M. (2005). Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science*, 307(5710) :734–738.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., and Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria : an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, 18(3) :268–281.

- Mahid, S. S., Minor, K. S., Soto, R. E., Hornung, C. A., and Galandiuk, S. (2006). Smoking and inflammatory bowel disease : a meta-analysis. *Mayo Clin Proc*, 81(11) :1462–1471.
- Mai, C.-T., Wu, M.-M., Wang, C.-L., Su, Z.-R., Cheng, Y.-Y., and Zhang, X.-J. (2019). Palmatine attenuated dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis via promoting mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inactivation. *Mol Immunol*, 105 :76–85.
- Maillard, F., Vazeille, E., Sauvanet, P., Sirvent, P., Bonnet, R., Combaret, L., Chausse, P., Chevarin, C., Otero, Y. F., Delcros, G., Chavanelle, V., Boisseau, N., and Barnich, N. (2019). Preventive Effect of Spontaneous Physical Activity on the Gut-Adipose Tissue in a Mouse Model That Mimics Crohn’s Disease Susceptibility. *Cells*, 8(1) :33.
- Malesza, I. J., Malesza, M., Walkowiak, J., Mussin, N., Walkowiak, D., Aringazina, R., Bartkowiak-Wieczorek, J., and Mądry, E. (2021). High-Fat, Western-Style Diet, Systemic Inflammation, and Gut Microbiota : A Narrative Review. *Cells*, 10(11) :3164.
- Mansour, S., Asrar, T., and Elhenawy, W. (2023). The multifaceted virulence of adherent-invasive Escherichia coli. *Gut Microbes*, 15(1) :2172669.
- Manzanillo, P. S., Ayres, J. S., Watson, R. O., Collins, A. C., Souza, G., Rae, C. S., Schneider, D. S., Nakamura, K., Shiloh, M. U., and Cox, J. S. (2013). The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature*, 501(7468) :512–516.
- Mao, R., Kurada, S., Gordon, I. O., Baker, M. E., Gandhi, N., McDonald, C., Coffey, J. C., and Rieder, F. (2019). The Mesenteric Fat and Intestinal Muscle Interface : Creeping Fat Influencing Stricture Formation in Crohn’s Disease. *Inflamm Bowel Dis*, 25(3) :421–426.
- Marcella, A. M. and Barb, A. W. (2017). The R117A variant of the Escherichia coli transacylase FabD synthesizes novel acyl-(acyl carrier proteins). *Appl Microbiol Biotechnol*, 101(23) :8431–8441.
- Marchiando, A. M., Ramanan, D., Ding, Y., Gomez, L. E., Hubbard-Lucey, V. M., Maurer, K., Wang, C., Ziel, J. W., van Rooijen, N., Nuñez, G., Finlay, B. B., Mysorekar, I. U., and Cadwell, K. (2013). A deficiency in the autophagy gene Atg16L1 enhances resistance to enteric bacterial infection. *Cell Host Microbe*, 14(2) :216–224.
- Martin, P. K., Marchiando, A., Xu, R., Rudensky, E., Yeung, F., Schuster, S. L., Kernbauer, E., and Cadwell, K. (2018). Autophagy proteins suppress protective type I interferon signalling in response to the murine gut microbiota. *Nat Microbiol*, 3(10) :1131–1141.
- 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., and Darfeuille-Michaud, A. (2009a). Molecular diversity of Escherichia coli in the human gut : new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. coli (AIEC) in Crohn’s disease. *Inflamm Bowel Dis*, 15(6) :872–882.
- Martinez-Medina, M., Denizot, J., Dreux, N., Robin, F., Billard, E., Bonnet, R., Darfeuille-Michaud, A., and Barnich, N. (2014). Western diet induces dysbiosis with increased E coli in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut*, 63(1) :116–124.
- Martinez-Medina, M., Naves, P., Blanco, J., Aldeguer, X., Blanco, J. E., Blanco, M., Ponte, C., Soriano, F., Darfeuille-Michaud, A., and Garcia-Gil, L. J. (2009b). Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive Escherichia coli (AIEC). *BMC Microbiol*, 9 :202.
- Martinez-Medina, M., Strozzi, F., Castillo, B. R. D., Serrano-Morillas, N., Bustins, N. F., and Martínez-Martínez, L. (2020). Antimicrobial Resistance Profiles of Adherent Invasive Escherichia coli Show Increased Resistance to  $\beta$ -Lactams. *Antibiotics (Basel)*, 9(5) :251.

- Masseret, E., Boudeau, J., Colombel, J. F., Neut, C., Desreumaux, P., Joly, B., Cortot, A., and Darfeuille-Michaud, A. (2001). Genetically related *Escherichia coli* strains associated with Crohn's disease. *Gut*, 48(3) :320–325.
- Matsuda, C., Ito, T., Song, J., Mizushima, T., Tamagawa, H., Kai, Y., Hamanaka, Y., Inoue, M., Nishida, T., Matsuda, H., and Sawa, Y. (2007). Therapeutic effect of a new immunosuppressive agent, everolimus, on interleukin-10 gene-deficient mice with colitis. *Clin Exp Immunol*, 148(2) :348–359.
- Matsumoto, G., Shimogori, T., Hattori, N., and Nukina, N. (2015). TBK1 controls autophagosomal engulfment of polyubiquitinated mitochondria through p62/SQSTM1 phosphorylation. *Hum Mol Genet*, 24(15) :4429–4442.
- Matsumoto, S., Okabe, Y., Setoyama, H., Takayama, K., Ohtsuka, J., Funahashi, H., Imaoka, A., Okada, Y., and Umesaki, Y. (1998). Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. *Gut*, 43(1) :71–78.
- Matsumoto, T., Nakamura, S., Jin-No, Y., Sawa, Y., Hara, J., Oshitani, N., Arakawa, T., Otani, H., and Nagura, H. (2001). Role of granuloma in the immunopathogenesis of Crohn's disease. *Digestion*, 63 Suppl 1 :43–47.
- Matsuzawa-Ishimoto, Y., Shono, Y., Gomez, L. E., Hubbard-Lucey, V. M., Cammer, M., Neil, J., Dewan, M. Z., Lieberman, S. R., Lazrak, A., Marinis, J. M., Beal, A., Harris, P. A., Bertin, J., Liu, C., Ding, Y., van den Brink, M. R. M., and Cadwell, K. (2017). Autophagy protein ATG16L1 prevents necroptosis in the intestinal epithelium. *J Exp Med*, 214(12) :3687–3705.
- Mazur-Bialy, A. I., Bilski, J., Wojcik, D., Brzozowski, B., Surmiak, M., Hubalewska-Mazgaj, M., Chmura, A., Magierowski, M., Magierowska, K., Mach, T., and Brzozowski, T. (2017). Beneficial Effect of Voluntary Exercise on Experimental Colitis in Mice Fed a High-Fat Diet : The Role of Irisin, Adiponectin and Proinflammatory Biomarkers. *Nutrients*, 9(4) :410.
- McCarroll, S. A., Huett, A., Kuballa, P., Chilewski, S. D., Landry, A., Goyette, P., Zody, M. C., Hall, J. L., Brant, S. R., Cho, J. H., Duerr, R. H., Silverberg, M. S., Taylor, K. D., Rioux, J. D., Altshuler, D., Daly, M. J., and Xavier, R. J. (2008). Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet*, 40(9) :1107–1112.
- McKenzie, H., Main, J., Pennington, C. R., and Parratt, D. (1990). Antibody to selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's and brewer's yeast) and *Candida albicans* in Crohn's disease. *Gut*, 31(5) :536–538.
- McPhee, J. B., Small, C. L., Reid-Yu, S. A., Brannon, J. R., Le Moual, H., and Coombes, B. K. (2014). Host defense peptide resistance contributes to colonization and maximal intestinal pathology by Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 82(8) :3383–3393.
- Meena, N. P., Zhu, G., Mittelstadt, P. R., Giardino Torchia, M. L., Pourcelot, M., Arnault, D., Ashwell, J. D., and Munitic, I. (2016). The TBK1-binding domain of optineurin promotes type I interferon responses. *FEBS Lett*, 590(10) :1498–1508.
- Mehto, S., Chauhan, S., Jena, K. K., Chauhan, N. R., Nath, P., Sahu, R., Dhar, K., Das, S. K., and Chauhan, S. (2019a). IRGM restrains NLRP3 inflammasome activation by mediating its SQSTM1/p62-dependent selective autophagy. *Autophagy*, 15(9) :1645–1647.
- Mehto, S., Jena, K. K., Nath, P., Chauhan, S., Kolapalli, S. P., Das, S. K., Sahoo, P. K., Jain, A., Taylor, G. A., and Chauhan, S. (2019b). The Crohn's Disease Risk Factor IRGM Limits NLRP3 Inflammasome Activation by Impeding Its Assembly and by Mediating Its Selective Autophagy. *Mol Cell*, 73(3) :429–445.e7.
- Mei, L., Qiu, X., Jiang, C., and Yang, A. (2021). Host Delipidation Mediated by Bacterial Effectors. *Trends Microbiol*, 29(3) :238–250.



- Meinzer, U., Barreau, F., Esmiol-Welterlin, S., Jung, C., Villard, C., Léger, T., Ben-Mkaddem, S., Berrebi, D., Dussailant, M., Alnabhani, Z., Roy, M., Bonacorsi, S., Wolf-Watz, H., Perroy, J., Ollendorff, V., and Hugot, J.-P. (2012). *Yersinia pseudotuberculosis* effector YopJ subverts the Nod2/RICK/TAK1 pathway and activates caspase-1 to induce intestinal barrier dysfunction. *Cell Host Microbe*, 11(4) :337–351.
- Meinzer, U., Esmiol-Welterlin, S., Barreau, F., Berrebi, D., Dussailant, M., Bonacorsi, S., Chareyre, F., Niwa-Kawakita, M., Alberti, C., Sterkers, G., Villard, C., Lesuffleur, T., Peuchmaur, M., Karin, M., Eckmann, L., Giovannini, M., Ollendorff, V., Wolf-Watz, H., and Hugot, J.-P. (2008). Nod2 mediates susceptibility to *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. *PLoS One*, 3(7) :e2769.
- Mesquita, F. S., Thomas, M., Sachse, M., Santos, A. J. M., Figueira, R., and Holden, D. W. (2012). The *Salmonella* deubiquitinase SseL inhibits selective autophagy of cytosolic aggregates. *PLoS Pathog*, 8(6) :e1002743.
- Mestre, M. B., Fader, C. M., Sola, C., and Colombo, M. I. (2010). Alpha-hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus*-infected cells. *Autophagy*, 6(1) :110–125.
- Michielan, A. and D’Incà, R. (2015). Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease : Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators Inflamm*, 2015 :628157.
- Middel, P., Raddatz, D., Gunawan, B., Haller, F., and Radzun, H.-J. (2006). Increased number of mature dendritic cells in Crohn’s disease : evidence for a chemokine mediated retention mechanism. *Gut*, 55(2) :220–227.
- Mimouna, S., Bazin, M., Mograbi, B., Darfeuille-Michaud, A., Brest, P., Hofman, P., and Vouret-Craviari, V. (2014). HIF1A regulates xenophagic degradation of adherent and invasive *Escherichia coli* (AIEC). *Autophagy*, 10(12) :2333–2345.
- Min, Y., Kim, M.-J., Lee, S., Chun, E., and Lee, K.-Y. (2018). Inhibition of TRAF6 ubiquitin-ligase activity by PRDX1 leads to inhibition of NFκB activation and autophagy activation. *Autophagy*, 14(8) :1347–1358.
- Minot, S., Bryson, A., Chehoud, C., Wu, G. D., Lewis, J. D., and Bushman, F. D. (2013). Rapid evolution of the human gut virome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(30) :12450–12455.
- Minowa-Nozawa, A., Nozawa, T., Okamoto-Furuta, K., Kohda, H., and Nakagawa, I. (2017). Rab35 GTPase recruits NDP52 to autophagy targets. *EMBO J*, 36(18) :2790–2807.
- Mintz, M. J. and Lukin, D. J. (2023). *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) and Crohn’s disease : the debate continues. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 8 :28.
- Miquel, S., Peyretailade, E., Claret, L., de Vallée, A., Dossat, C., Vacherie, B., Zineb, E. H., Segurens, B., Barbe, V., Sauvanet, P., Neut, C., Colombel, J.-F., Medigue, C., Mojica, F. J. M., Peyret, P., Bonnet, R., and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Complete genome sequence of Crohn’s disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS One*, 5(9) :e12714.
- Mitchell, G., Ge, L., Huang, Q., Chen, C., Kianian, S., Roberts, M. F., Schekman, R., and Portnoy, D. A. (2015). Avoidance of autophagy mediated by PlcA or ActA is required for *Listeria monocytogenes* growth in macrophages. *Infect Immun*, 83(5) :2175–2184.
- Mitsuyama, K., Niwa, M., Takedatsu, H., Yamasaki, H., Kuwaki, K., Yoshioka, S., Yamauchi, R., Fukunaga, S., and Torimura, T. (2016). Antibody markers in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 22(3) :1304–1310.
- Miyashita, H., Oikawa, D., Terawaki, S., Kabata, D., Shintani, A., and Tokunaga, F. (2021). Crosstalk Between NDP52 and LUBAC in Innate Immune Responses, Cell Death, and Xenophagy. *Front Immunol*, 12 :635475.
- Miyazaki, R., Ai, M., Tanaka, N., Suzuki, T., Dhomae, N., Tsukazaki, T., Akiyama, Y., and Mori, H. (2022). Inner membrane YfgM–PpiD heterodimer acts as a functional unit that associates with the SecY/E/G translocon and promotes protein translocation. *J Biol Chem*, 298(11) :102572.

- Mizoguchi, E. (2006). Chitinase 3-like-1 exacerbates intestinal inflammation by enhancing bacterial adhesion and invasion in colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, 130(2) :398–411.
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci*, 116(Pt 9) :1679–1688.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395(6700) :395–398.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct*, 27(6) :421–429.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27 :107–132.
- Moehle, C., Ackermann, N., Langmann, T., Aslanidis, C., Kel, A., Kel-Margoulis, O., Schmitz-Madry, A., Zahn, A., Stremmel, W., and Schmitz, G. (2006). Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease. *J Mol Med (Berl)*, 84(12) :1055–1066.
- Mokhonov, V. V., Vasilenko, E. A., Gorshkova, E. N., Astrakhantseva, I. V., Novikov, D. V., and Novikov, V. V. (2018). SlyD-deficient Escherichia coli strains : A highway to contaminant-free protein extraction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 499(4) :967–972.
- Molejon, M. I., Ropolo, A., Re, A. L., Boggio, V., and Vaccaro, M. I. (2013). The VMP1-Beclin 1 interaction regulates autophagy induction. *Sci Rep*, 3 :1055.
- Moller, F. T., Andersen, V., Wohlfahrt, J., and Jess, T. (2015). Familial risk of inflammatory bowel disease : a population-based cohort study 1977-2011. *Am J Gastroenterol*, 110(4) :564–571.
- Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H. W., and Kaplan, G. G. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142(1) :46–54.e42; quiz e30.
- Mondot, S., Barreau, F., Al Nabhani, Z., Dussailant, M., Le Roux, K., Doré, J., Leclerc, M., Hugot, J.-P., and Lepage, P. (2012). Altered gut microbiota composition in immune-impaired Nod2(-/-) mice. *Gut*, 61(4) :634–635.
- Montecalvo, A., Watkins, S. C., Orange, J., and Kane, L. P. (2017). Inducible turnover of optineurin regulates T cell activation. *Mol Immunol*, 85 :9–17.
- Moon, C. M., Shin, D.-J., Kim, S. W., Son, N.-H., Park, A., Park, B., Jung, E. S., Kim, E. S., Hong, S. P., Kim, T. I., Kim, W. H., and Cheon, J. H. (2013). Associations between genetic variants in the IRGM gene and inflammatory bowel diseases in the Korean population. *Inflamm Bowel Dis*, 19(1) :106–114.
- Moore, A. S. and Holzbaur, E. L. F. (2016). Dynamic recruitment and activation of ALS-associated TBK1 with its target optineurin are required for efficient mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(24) :E3349–3358.
- Moreau, K., Lacas-Gervais, S., Fujita, N., Sebbane, F., Yoshimori, T., Simonet, M., and Lafont, F. (2010). Autophagosomes can support Yersinia pseudotuberculosis replication in macrophages. *Cell Microbiol*, 12(8) :1108–1123.
- Morgan, A. R., Lam, W.-J., Han, D.-Y., Fraser, A. G., and Ferguson, L. R. (2012). Association Analysis of ULK1 with Crohn's Disease in a New Zealand Population. *Gastroenterol Res Pract*, 2012 :715309.

- Morriswood, B., Ryzhakov, G., Puri, C., Arden, S. D., Roberts, R., Dendrou, C., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2007). T6BP and NDP52 are myosin VI binding partners with potential roles in cytokine signalling and cell adhesion. *J Cell Sci*, 120(Pt 15) :2574–2585.
- Morón, B., Spalinger, M., Kasper, S., Atrott, K., Frey-Wagner, I., Fried, M., McCole, D. F., Rogler, G., and Scharl, M. (2013). Activation of protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2 by spermidine exerts anti-inflammatory effects in human THP-1 monocytes and in a mouse model of acute colitis. *PLoS One*, 8(9) :e73703.
- Mosli, M. H., Zou, G., Garg, S. K., Feagan, S. G., MacDonald, J. K., Chande, N., Sandborn, W. J., and Feagan, B. G. (2015). C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol*, 110(6) :802–819; quiz 820.
- Mostowy, S. and Cossart, P. (2012). Bacterial autophagy : restriction or promotion of bacterial replication? *Trends Cell Biol*, 22(6) :283–291.
- Mostowy, S., Sancho-Shimizu, V., Hamon, M. A., Simeone, R., Brosch, R., Johansen, T., and Cossart, P. (2011). p62 and NDP52 proteins target intracytosolic Shigella and Listeria to different autophagy pathways. *J Biol Chem*, 286(30) :26987–26995.
- Motta, V., Soares, F., Sun, T., and Philpott, D. J. (2015). NOD-like receptors : versatile cytosolic sentinels. *Physiol Rev*, 95(1) :149–178.
- Mowat, C., Cole, A., Windsor, A., Ahmad, T., Arnott, I., Driscoll, R., Mitton, S., Orchard, T., Rutter, M., Younge, L., Lees, C., Ho, G.-T., Satsangi, J., Bloom, S., and IBD Section of the British Society of Gastroenterology (2011). Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, 60(5) :571–607.
- Mukhopadhyay, I., Hansen, R., Meharg, C., Thomson, J. M., Russell, R. K., Berry, S. H., El-Omar, E. M., and Hold, G. L. (2015). The fungal microbiota of de-novo paediatric inflammatory bowel disease. *Microbes Infect*, 17(4) :304–310.
- Munitic, I., Giardino Torchia, M. L., Meena, N. P., Zhu, G., Li, C. C., and Ashwell, J. D. (2013). Optineurin insufficiency impairs IRF3 but not NF- $\kappa$ B activation in immune cells. *J Immunol*, 191(12) :6231–6240.
- Murase, K., Martin, P., Porcheron, G., Houle, S., Helloin, E., Pénary, M., Nougayrède, J.-P., Dozois, C. M., Hayashi, T., and Oswald, E. (2016). HlyF Produced by Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli Is a Virulence Factor That Regulates Outer Membrane Vesicle Biogenesis. *J Infect Dis*, 213(5) :856–865.
- Murthy, A., Li, Y., Peng, I., Reichelt, M., Katakam, A. K., Noubade, R., Roose-Girma, M., DeVoss, J., Diehl, L., Graham, R. R., and van Lookeren Campagne, M. (2014). A Crohn's disease variant in Atg1611 enhances its degradation by caspase 3. *Nature*, 506(7489) :456–462.
- Mutalib, M., Borrelli, O., Blackstock, S., Kiparissi, F., Elawad, M., Shah, N., and Lindley, K. (2014). The use of sirolimus (rapamycin) in the management of refractory inflammatory bowel disease in children. *J Crohns Colitis*, 8(12) :1730–1734.
- Möll, A., Dörr, T., Alvarez, L., Davis, B. M., Cava, F., and Waldor, M. K. (2015). A D, D-carboxypeptidase is required for Vibrio cholerae halotolerance. *Environ Microbiol*, 17(2) :527–540.
- Mörbe, U. M., Jørgensen, P. B., Fenton, T. M., von Burg, N., Riis, L. B., Spencer, J., and Agace, W. W. (2021). Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunol*, 14(4) :793–802.
- Na, S. Y., Park, S. S., and Seo, J. K. (2015). Genetic Polymorphisms in Autophagy-Associated Genes in Korean Children With Early-Onset Crohn Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 61(3) :285–291.

- Nadalian, B., Yadegar, A., Hourii, H., Olfatifar, M., Shahrokh, S., Asadzadeh Aghdaei, H., Suzuki, H., and Zali, M. R. (2021). Prevalence of the pathobiont adherent-invasive *Escherichia coli* and inflammatory bowel disease : a systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*, 36(4) :852–863.
- Nagabhushana, A., Bansal, M., and Swarup, G. (2011). Optineurin is required for CYLD-dependent inhibition of TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation. *PLoS One*, 6(3) :e17477.
- Nagao-Kitamoto, H., Shreiner, A. B., Gilliland, M. G., Kitamoto, S., Ishii, C., Hirayama, A., Kuffa, P., El-Zaatari, M., Grasberger, H., Seekatz, A. M., Higgins, P. D. R., Young, V. B., Fukuda, S., Kao, J. Y., and Kamada, N. (2016). Functional Characterization of Inflammatory Bowel Disease-Associated Gut Dysbiosis in Gnotobiotic Mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2(4) :468–481.
- Naimi, S., Viennois, E., Gewirtz, A. T., and Chassaing, B. (2021). Direct impact of commonly used dietary emulsifiers on human gut microbiota. *Microbiome*, 9(1) :66.
- Nakamura, K., Kimple, A. J., Siderovski, D. P., and Johnson, G. L. (2010). PB1 domain interaction of p62/sequestosome 1 and MEKK3 regulates NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, 285(3) :2077–2089.
- Nakano, S., Ikebe, E., Tsukamoto, Y., Wang, Y., Matsumoto, T., Mitsui, T., Yahiro, T., Inoue, K., Kawazato, H., Yasuda, A., Ito, K., Yokoyama, S., Takahashi, N., Hori, M., Shimada, T., Moriyama, M., Kubota, T., Ono, K., Fujibuchi, W., Jeang, K.-T., Iha, H., and Nishizono, A. (2013). Commensal microbiota contributes to chronic endocarditis in TAX1BP1 deficient mice. *PLoS One*, 8(9) :e73205.
- Nakatogawa, H. (2013). Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy. *Essays Biochem*, 55 :39–50.
- Nakazawa, S., Oikawa, D., Ishii, R., Ayaki, T., Takahashi, H., Takeda, H., Ishitani, R., Kamei, K., Takeyoshi, I., Kawakami, H., Iwai, K., Hatada, I., Sawasaki, T., Ito, H., Nureki, O., and Tokunaga, F. (2016). Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Commun*, 7 :12547.
- Narula, N., Wong, E. C. L., Dehghan, M., Mente, A., Rangarajan, et al. (2021). Association of ultra-processed food intake with risk of inflammatory bowel disease : prospective cohort study. *BMJ*, 374 :n1554.
- Naser, S. A., Romero, C., Urbina, P., Naser, N., and Valentine, J. (2011). Cellular infiltration and cytokine expression correlate with fistulizing state in Crohn's disease. *Clin Vaccine Immunol*, 18(9) :1416–1419.
- Naser, S. A., Sagramsingh, S. R., Naser, A. S., and Thanigachalam, S. (2014). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol*, 20(23) :7403–7415.
- Nath, S., Dancourt, J., Shteyn, V., Puente, G., Fong, W. M., Nag, S., Bewersdorf, J., Yamamoto, A., Antony, B., and Melia, T. J. (2014). Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3. *Nat Cell Biol*, 16(5) :415–424.
- Navarro-Garcia, F., Ruiz-Perez, F., Cataldi, A., and Larzábal, M. (2019). Type VI Secretion System in Pathogenic *Escherichia coli* : Structure, Role in Virulence, and Acquisition. *Front Microbiol*, 10 :1965.
- Nazareth, N., Magro, F., Machado, E., Ribeiro, T. G., Martinho, A., Rodrigues, P., Alves, R., Macedo, G. N., Gracio, D., Coelho, R., Abreu, C., Appelberg, R., Dias, C., Macedo, G., Bull, T., and Sarmiento, A. (2015). Prevalence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and *Escherichia coli* in blood samples from patients with inflammatory bowel disease. *Med Microbiol Immunol*, 204(6) :681–692.
- Negróni, A., Colantoni, E., Vitali, R., Palone, F., Pierdomenico, M., Costanzo, M., Cesi, V., Cucchiara, S., and Stronati, L. (2016). NOD2 induces autophagy to control AIEC bacteria infectiveness in intestinal epithelial cells. *Inflamm Res*, 65(10) :803–813.

- Ng, A. C. Y., Eisenberg, J. M., Heath, R. J. W., Huett, A., Robinson, C. M., Nau, G. J., and Xavier, R. J. (2011). Human leucine-rich repeat proteins : a genome-wide bioinformatic categorization and functional analysis in innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl 1(Suppl 1) :4631–4638.
- Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., and Kaplan, G. G. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century : a systematic review of population-based studies. *Lancet*, 390(10114) :2769–2778.
- Ng, S. C., Tsoi, K. K. F., Kamm, M. A., Xia, B., Wu, J., Chan, F. K. L., and Sung, J. J. Y. (2012). Genetics of inflammatory bowel disease in Asia : systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*, 18(6) :1164–1176.
- Nguyen, H. T. T., Dalmaso, G., Müller, S., Carrière, J., Seibold, F., and Darfeuille-Michaud, A. (2014). Crohn's Disease-Associated Adherent Invasive Escherichia coli Modulate Levels of microRNAs in Intestinal Epithelial Cells to Reduce Autophagy. *Gastroenterology*, 146(2) :508–519.
- Nguyen, H. T. T., Lapaquette, P., Bringer, M.-A., and Darfeuille-Michaud, A. (2013). Autophagy and Crohn's disease. *J Innate Immun*, 5(5) :434–443.
- Nguyen, N. H., Singh, S., and Sandborn, W. J. (2020). Positioning Therapies in the Management of Crohn's Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 18(6) :1268–1279.
- Nickerson, K. P., Chanin, R., and McDonald, C. (2015). Dereglulation of intestinal anti-microbial defense by the dietary additive, maltodextrin. *Gut Microbes*, 6(1) :78–83.
- Nickerson, K. P. and 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.
- Night, P. K., Hu, C.-A. A., and Ma, T. Y. (2015). Autophagy enhances intestinal epithelial tight junction barrier function by targeting claudin-2 protein degradation. *J Biol Chem*, 290(11) :7234–7246.
- Nimmo, E. R., Prendergast, J. G., Aldhous, M. C., Kennedy, N. A., Henderson, P., Drummond, H. E., Ramsahoye, B. H., Wilson, D. C., Semple, C. A., and Satsangi, J. (2012). Genome-wide methylation profiling in Crohn's disease identifies altered epigenetic regulation of key host defense mechanisms including the Th17 pathway. *Inflamm Bowel Dis*, 18(5) :889–899.
- Nitzan, O., Elias, M., Peretz, A., and Saliba, W. (2016). Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 22(3) :1078–1087.
- Noad, J., von der Malsburg, A., Pathe, C., Michel, M. A., Komander, D., and Randow, F. (2017). LUBAC-synthesized linear ubiquitin chains restrict cytosol-invading bacteria by activating autophagy and NF- $\kappa$ B. *Nat Microbiol*, 2 :17063.
- Nold-Petry, C. A., Nold, M. F., Levy, O., Kliger, Y., Oren, A., Borukhov, I., Becker, C., Wirtz, S., Sandhu, M. K., Neurath, M., and Dinarello, C. A. (2017). Gp96 Peptide Antagonist gp96-II Confers Therapeutic Effects in Murine Intestinal Inflammation. *Front Immunol*, 8 :1531.
- Norman, J. M., Handley, S. A., Baldrige, M. T., Droit, L., Liu, C. Y., Keller, B. C., Kambal, A., Monaco, C. L., Zhao, G., Fleshner, P., Stappenbeck, T. S., McGovern, D. P. B., Keshavarzian, A., Mutlu, E. A., Sauk, J., Gevers, D., Xavier, R. J., Wang, D., Parkes, M., and Virgin, H. W. (2015). Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell*, 160(3) :447–460.
- Nozawa, T., Aikawa, C., Goda, A., Maruyama, F., Hamada, S., and Nakagawa, I. (2012). The small GTPases Rab9A and Rab23 function at distinct steps in autophagy during Group A Streptococcus infection. *Cell Microbiol*, 14(8) :1149–1165.

- Nunes, T., Etchevers, M. J., Domènech, E., García-Sánchez, V., Ber, Y., Peñalva, et al. (2013). Smoking does influence disease behaviour and impacts the need for therapy in Crohn's disease in the biologic era. *Aliment Pharmacol Ther*, 38(7) :752–760.
- Nys, K., Agostinis, P., and Vermeire, S. (2013). Autophagy : a new target or an old strategy for the treatment of Crohn's disease? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10(7) :395–401.
- O'Brien, C. L., Bringer, M.-A., Holt, K. E., Gordon, D. M., Dubois, A. L., Barnich, N., Darfeuille-Michaud, A., and Pavli, P. (2017). Comparative genomics of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Gut*, 66(8) :1382–1389.
- Ogata, M., Hino, S.-i., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J. A., Urano, F., and Imaizumi, K. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*, 26(24) :9220–9231.
- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., and Sasakawa, C. (2005). Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science*, 307(5710) :727–731.
- Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nuñez, G., and Cho, J. H. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411(6837) :603–606.
- Olén, O., Erichsen, R., Sachs, M. C., Pedersen, L., Halfvarson, J., Askling, J., Ekblom, A., Sørensen, H. T., and Ludvigsson, J. F. (2020). Colorectal cancer in Crohn's disease : a Scandinavian population-based cohort study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 5(5) :475–484.
- Omotade, T. O. and Roy, C. R. (2020). *Legionella pneumophila* Excludes Autophagy Adaptors from the Ubiquitin-Labeled Vacuole in Which It Resides. *Infect Immun*, 88(8) :e00793–19.
- Oostenbrug, L. E., Drenth, J. P. H., de Jong, D. J., Nolte, I. M., Oosterom, E., van Dullemen, H. M., van der Linde, K., te Meerman, G. J., van der Steege, G., Kleibeuker, J. H., and Jansen, P. L. M. (2005). Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 11(6) :567–575.
- Orholm, M., Binder, V., Sørensen, T. I., Rasmussen, L. P., and Kyvik, K. O. (2000). Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol*, 35(10) :1075–1081.
- Ortiz-Masiá, D., Cosín-Roger, J., Calatayud, S., Hernández, C., Alós, R., Hinojosa, J., Apostolova, N., Alvarez, A., and Barrachina, M. D. (2014). Hypoxic macrophages impair autophagy in epithelial cells through Wnt1 : relevance in IBD. *Mucosal Immunol*, 7(4) :929–938.
- Otten, E. G., Werner, E., Crespillo-Casado, A., Boyle, K. B., Dharamdasani, V., Pathe, C., Santhanam, B., and Randow, F. (2021). Ubiquitylation of lipopolysaccharide by RNF213 during bacterial infection. *Nature*, 594(7861) :111–116.
- Ouimet, M., Koster, S., Sakowski, E., Ramkhalawon, B., van Solingen, C., Oldebeken, S., Karunakaran, D., Portal-Celhay, C., Sheedy, F. J., Ray, T. D., Cecchini, K., Zamore, P. D., Rayner, K. J., Marcel, Y. L., Phillips, J. A., and Moore, K. J. (2016). *Mycobacterium tuberculosis* induces the miR-33 locus to reprogram autophagy and host lipid metabolism. *Nat Immunol*, 17(6) :677–686.
- Owen, K. A. and Casanova, J. E. (2015). *Salmonella* Manipulates Autophagy to "Serve and Protect". *Cell Host Microbe*, 18(5) :517–519.
- Owen, K. A., Meyer, C. B., Bouton, A. H., and Casanova, J. E. (2014). Activation of focal adhesion kinase by *Salmonella* suppresses autophagy via an Akt/mTOR signaling pathway and promotes bacterial survival in macrophages. *PLoS Pathog*, 10(6) :e1004159.

- Palmela, C., Chevarin, C., Xu, Z., Torres, J., Sevrin, G., Hirten, R., Barnich, N., Ng, S. C., and Colombel, J.-F. (2018). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*, 67(3) :574–587.
- Palomino-Morales, R. J., Oliver, J., Gómez-García, M., López-Nevot, M. A., Rodrigo, L., Nieto, A., Alizadeh, B. Z., and Martín, J. (2009). Association of ATG16L1 and IRGM genes polymorphisms with inflammatory bowel disease : a meta-analysis approach. *Genes Immun*, 10(4) :356–364.
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy\*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33) :24131–24145.
- Papadopoulos, C., Kirchner, P., Bug, M., Grum, D., Koerver, L., Schulze, N., Poehler, R., Dressler, A., Fengler, S., Arhzaouy, K., Lux, V., Ehrmann, M., Weihl, C. C., and Meyer, H. (2017). VCP/p97 cooperates with YOD1, UBXD1 and PLAA to drive clearance of ruptured lysosomes by autophagy. *EMBO J*, 36(2) :135–150.
- Park, B.-C., Shen, X., Samaraweera, M., and Yue, B. Y. J. T. (2006). Studies of optineurin, a glaucoma gene : Golgi fragmentation and cell death from overexpression of wild-type and mutant optineurin in two ocular cell types. *Am J Pathol*, 169(6) :1976–1989.
- Park, I., Chung, J., Walsh, C. T., Yun, Y., Strominger, J. L., and Shin, J. (1995). Phosphotyrosine-independent binding of a 62-kDa protein to the src homology 2 (SH2) domain of p56lck and its regulation by phosphorylation of Ser-59 in the lck unique N-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(26) :12338–12342.
- Parkes, M. (2012). Evidence from genetics for a role of autophagy and innate immunity in IBD pathogenesis. *Dig Dis*, 30(4) :330–333.
- Parkes, M., Barrett, J. C., Prescott, N. J., Tremelling, M., Anderson, C. A., Fisher, S. A., Roberts, R. G., Nimmo, E. R., Cummings, F. R., Soars, D., Drummond, H., Lees, C. W., Khawaja, S. A., Bagnall, R., Burke, D. A., Todhunter, C. E., Ahmad, T., Onnie, C. M., McArdle, W., Strachan, D., Bethel, G., Bryan, C., Lewis, C. M., Deloukas, P., Forbes, A., Sanderson, J., Jewell, D. P., Satsangi, J., Mansfield, J. C., Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon, L., and Mathew, C. G. (2007). Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn’s disease susceptibility. *Nat Genet*, 39(7) :830–832.
- Pascal, V., Pozuelo, M., Borruel, N., Casellas, F., Campos, D., Santiago, A., Martinez, X., Varela, E., Sarra-bayrouse, G., Machiels, K., Vermeire, S., Sokol, H., Guarner, F., and Manichanh, C. (2017). A microbial signature for Crohn’s disease. *Gut*, 66(5) :813–822.
- Pasquinelli, A. E. (2012). MicroRNAs and their targets : recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet*, 13(4) :271–282.
- Patterson, J. (2021). Effectiveness of antibiotics as a treatment option for patients with crohn’s disease : a meta analysis. *Gastroenterology*, 160(3) :S9. Publisher : Elsevier.
- Pennazio, M., Spada, C., Eliakim, R., Keuchel, M., May, A., Mulder, et al. (2015). Small-bowel capsule endoscopy and device-assisted enteroscopy for diagnosis and treatment of small-bowel disorders : European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline. *Endoscopy*, 47(4) :352–376.
- Peters, V., Bolte, L., Schuttert, E. M., Andreu-Sánchez, S., Dijkstra, G., Weersma, R. K., and Campmans-Kuijpers, M. J. E. (2022). Western and Carnivorous Dietary Patterns are Associated with Greater Likelihood of IBD Development in a Large Prospective Population-based Cohort. *J Crohns Colitis*, 16(6) :931–939.
- Peterson, L. W. and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells : regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14(3) :141–153.

- Petnicki-Ocwieja, T., Hrcir, T., Liu, Y.-J., Biswas, A., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H., and Kobayashi, K. S. (2009). Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(37) :15813–15818.
- Peyrin-Biroulet, L., Ferrante, M., Magro, F., Campbell, S., Franchimont, D., Fidder, H., Strid, H., Ardizzone, S., Veereman-Wauters, G., Chevaux, J.-B., Allez, M., Danese, S., Sturm, A., and Scientific Committee of the European Crohn's and Colitis Organization (2011). Results from the 2nd Scientific Workshop of the ECCO. I : Impact of mucosal healing on the course of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*, 5(5) :477–483.
- Peyrin-Biroulet, L., Reinisch, W., Colombel, J.-F., Mantzaris, G. J., Kornbluth, A., Diamond, R., Rutgeerts, P., Tang, L. K., Cornillie, F. J., and Sandborn, W. J. (2014). Clinical disease activity, C-reactive protein normalisation and mucosal healing in Crohn's disease in the SONIC trial. *Gut*, 63(1) :88–95.
- Peyrin-Biroulet, L., Sandborn, W., Sands, B. E., Reinisch, W., Bemelman, et al. (2015). Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE) : Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target. *Am J Gastroenterol*, 110(9) :1324–1338.
- Picco, M. F. and Bayless, T. M. (2003). Tobacco consumption and disease duration are associated with fistulizing and stricturing behaviors in the first 8 years of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, 98(2) :363–368.
- Pierik, M., Joossens, S., Van Steen, K., Van Schuerbeek, N., Vlietinck, R., Rutgeerts, P., and Vermeire, S. (2006). Toll-Like Receptor-1, -2, and -6 Polymorphisms Influence Disease Extension in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*, 12(1) :1–8.
- Pietrzak, B., Tomela, K., Olejnik-Schmidt, A., Mackiewicz, A., and Schmidt, M. (2020). Secretory IgA in Intestinal Mucosal Secretions as an Adaptive Barrier against Microbial Cells. *Int J Mol Sci*, 21(23) :9254.
- Pike, K. A. and Tremblay, M. L. (2018). Protein Tyrosine Phosphatases : Regulators of CD4 T Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol*, 9 :2504.
- Pilli, M., Arko-Mensah, J., Ponpuak, M., Roberts, E., Master, S., Mandell, M. A., Dupont, N., Ornatowski, W., Jiang, S., Bradfute, S. B., Bruun, J.-A., Hansen, T. E., Johansen, T., and Deretic, V. (2012). TBK-1 promotes autophagy-mediated antimicrobial defense by controlling autophagosome maturation. *Immunity*, 37(2) :223–234.
- Pineton de Chambrun, G., Body-Malapel, M., Frey-Wagner, I., Djouina, M., Deknuydt, F., Atrott, K., Esquerre, N., Altare, F., Neut, C., Arrieta, M. C., Kanneganti, T.-D., Rogler, G., Colombel, J.-F., Cortot, A., Desreumaux, P., and Vignal, C. (2014). Aluminum enhances inflammation and decreases mucosal healing in experimental colitis in mice. *Mucosal Immunol*, 7(3) :589–601.
- Pineton de Chambrun, G., Peyrin-Biroulet, L., Lémann, M., and Colombel, J.-F. (2010). Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 7(1) :15–29.
- Plissonneau, C., Sivignon, A., Chassaing, B., Capel, F., Martin, V., Etienne, M., Wawrzyniak, I., Chausse, P., Dutheil, F., Mairesse, G., Chesneau, G., Boisseau, N., and Barnich, N. (2022). Beneficial Effects of Linseed Supplementation on Gut Mucosa-Associated Microbiota in a Physically Active Mouse Model of Crohn's Disease. *Int J Mol Sci*, 23(11) :5891.
- Png, C. W., Lindén, S. K., Gilshenan, K. S., Zoetendal, E. G., McSweeney, C. S., Sly, L. I., McGuckin, M. A., and Florin, T. H. J. (2010). Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol*, 105(11) :2420–2428.
- Pott, J., Kabat, A. M., and Maloy, K. J. (2018). Intestinal Epithelial Cell Autophagy Is Required to Protect against TNF-Induced Apoptosis during Chronic Colitis in Mice. *Cell Host Microbe*, 23(2) :191–202.e4.
- Prakash, S., Rodes, L., Coussa-Charley, M., and Tomaro-Duchesneau, C. (2011). Gut microbiota : next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics*, 5 :71–86.



- Prescott, N. J., Dominy, K. M., Kubo, M., Lewis, C. M., Fisher, S. A., Redon, R., Huang, N., Stranger, B. E., Blaszczyk, K., Hudspith, B., Parkes, G., Hosono, N., Yamazaki, K., Onnie, C. M., Forbes, A., Dermizakis, E. T., Nakamura, Y., Mansfield, J. C., Sanderson, J., Hurles, M. E., Roberts, R. G., and Mathew, C. G. (2010). Independent and population-specific association of risk variants at the IRGM locus with Crohn's disease. *Hum Mol Genet*, 19(9) :1828–1839.
- Prescott, N. J., Fisher, S. A., Franke, A., Hampe, J., Onnie, C. M., Soars, D., Bagnall, R., Mirza, M. M., Sanderson, J., Forbes, A., Mansfield, J. C., Lewis, C. M., Schreiber, S., and Mathew, C. G. (2007). A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology*, 132(5) :1665–1671.
- Proikas-Cezanne, T., Takacs, Z., Dönnes, P., and Kohlbacher, O. (2015). WIPI proteins : essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *J Cell Sci*, 128(2) :207–217.
- Prosberg, M., Bendtsen, F., Vind, I., Petersen, A. M., and Gluud, L. L. (2016). The association between the gut microbiota and the inflammatory bowel disease activity : a systematic review and meta-analysis. *Scand J Gastroenterol*, 51(12) :1407–1415.
- Prudent, V., Demarre, G., Vazeille, E., Wery, M., Quenech'Du, N., Ravet, A., Dauverd-Girault, J., van Dijk, E., Bringer, M.-A., Descrimes, M., Barnich, N., Rimsky, S., Morillon, A., and Espéli, O. (2021). The Crohn's disease-related bacterial strain LF82 assembles biofilm-like communities to protect itself from phagolysosomal attack. *Commun Biol*, 4(1) :627.
- Pérez-Brocal, V., García-López, R., Vázquez-Castellanos, J. F., Nos, P., Beltrán, B., Latorre, A., and Moya, A. (2013). Study of the viral and microbial communities associated with Crohn's disease : a metagenomic approach. *Clin Transl Gastroenterol*, 4(6) :e36.
- Qiu, J., Sheedlo, M. J., Yu, K., Tan, Y., Nakayasu, E. S., Das, C., Liu, X., and Luo, Z.-Q. (2016). Ubiquitination independent of E1 and E2 enzymes by bacterial effectors. *Nature*, 533(7601) :120–124.
- Qiu, Y., Wang, J., Li, H., Yang, B., Wang, J., He, Q., and Weng, Q. (2022). Emerging views of OPTN (optineurin) function in the autophagic process associated with disease. *Autophagy*, 18(1) :73–85.
- Ramanan, D., Tang, M. S., Bowcutt, R., Loke, P., and Cadwell, K. (2014). Bacterial sensor Nod2 prevents inflammation of the small intestine by restricting the expansion of the commensal *Bacteroides vulgatus*. *Immunity*, 41(2) :311–324.
- Raso, T., Crivellaro, S., Chirillo, M. G., Pais, P., Gaia, E., and Savoia, D. (2011). Analysis of *Escherichia coli* isolated from patients affected by Crohn's disease. *Curr Microbiol*, 63(2) :131–137.
- Ravenhill, B. J., Boyle, K. B., von Muhlinen, N., Ellison, C. J., Masson, G. R., Otten, E. G., Foeglein, A., Williams, R., and Randow, F. (2019). The Cargo Receptor NDP52 Initiates Selective Autophagy by Recruiting the ULK Complex to Cytosol-Invading Bacteria. *Mol Cell*, 74(2) :320–329.e6.
- Reinisch, W., Panés, J., Lémann, M., Schreiber, S., Feagan, B., Schmidt, S., Sturniolo, G. C., Mikhailova, T., Alexeeva, O., Sanna, L., Haas, T., Korom, S., and Mayer, H. (2008). A multicenter, randomized, double-blind trial of everolimus versus azathioprine and placebo to maintain steroid-induced remission in patients with moderate-to-severe active Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, 103(9) :2284–2292.
- Rendulic, S., Jagtap, P., Rosinus, A., Eppinger, M., Baar, C., Lanz, C., Keller, H., Lambert, C., Evans, K. J., Goesmann, A., Meyer, F., Sockett, R. E., and Schuster, S. C. (2004). A predator unmasked : life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science*, 303(5658) :689–692.
- Reyes, A., Haynes, M., Hanson, N., Angly, F. E., Heath, A. C., Rohwer, F., and Gordon, J. I. (2010). Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*, 466(7304) :334–338.

- Ribaldone, D. G., Caviglia, G. P., Abdulle, A., Pellicano, R., Ditto, M. C., Morino, M., Fusaro, E., Saracco, G. M., Bugianesi, E., and Astegiano, M. (2019). Adalimumab Therapy Improves Intestinal Dysbiosis in Crohn's Disease. *J Clin Med*, 8(10) :1646.
- Richter, B., Sliter, D. A., Herhaus, L., Stolz, A., Wang, C., Beli, P., Zaffagnini, G., Wild, P., Martens, S., Wagner, S. A., Youle, R. J., and Dikic, I. (2016). Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113(15) :4039–4044.
- Riebisch, A. K., Mühlen, S., Beer, Y. Y., and Schmitz, I. (2021). Autophagy—A Story of Bacteria Interfering with the Host Cell Degradation Machinery. *Pathogens*, 10(2) :110.
- Riley, M. A. and Wertz, J. E. (2002). Bacteriocin diversity : ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84(5-6) :357–364.
- Rioux, J. D., Xavier, R. J., Taylor, K. D., Silverberg, M. S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M. M., Datta, L. W., Shugart, Y. Y., Griffiths, A. M., Targan, S. R., Ippoliti, A. F., Bernard, E.-J., Mei, L., Nicolae, D. L., Regueiro, M., Schumm, L. P., Steinhart, A. H., Rotter, J. I., Duerr, R. H., Cho, J. H., Daly, M. J., and Brant, S. R. (2007). Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet*, 39(5) :596–604.
- Roberts, C. L., Keita, A. V., Duncan, S. H., O'Kennedy, N., Söderholm, J. D., Rhodes, J. M., and Campbell, B. J. (2010). Translocation of Crohn's disease Escherichia coli across M-cells : contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers. *Gut*, 59(10) :1331–1339.
- Roberts, C. L., Rushworth, S. L., Richman, E., and Rhodes, J. M. (2013). Hypothesis : Increased consumption of emulsifiers as an explanation for the rising incidence of Crohn's disease. *J Crohns Colitis*, 7(4) :338–341.
- Roberts, R. L., Hollis-Moffatt, J. E., Gearry, R. B., Kennedy, M. A., Barclay, M. L., and Merriman, T. R. (2008). Confirmation of association of IRGM and NCF4 with ileal Crohn's disease in a population-based cohort. *Genes Immun*, 9(6) :561–565.
- Roda, G., Chien Ng, S., Kotze, P. G., Argollo, M., Panaccione, R., Spinelli, A., Kaser, A., Peyrin-Biroulet, L., and Danese, S. (2020). Crohn's disease. *Nat Rev Dis Primers*, 6(1) :22.
- Rodrigues, M., McBride, S. W., Hullahalli, K., Palmer, K. L., and Duerkop, B. A. (2019). Conjugative Delivery of CRISPR-Cas9 for the Selective Depletion of Antibiotic-Resistant Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 63(11) :e01454–19.
- Rogala, A. R., Schoenborn, A. A., Fee, B. E., Cantillana, V. A., Joyce, M. J., Gharaibeh, R. Z., Roy, S., Fodor, A. A., Sartor, R. B., Taylor, G. A., and Gulati, A. S. (2018). Environmental factors regulate Paneth cell phenotype and host susceptibility to intestinal inflammation in Irgm1-deficient mice. *Dis Model Mech*, 11(2) :dmm031070.
- Rogler, G., Biedermann, L., and Scharl, M. (2018). New insights into the pathophysiology of inflammatory bowel disease : microbiota, epigenetics and common signalling pathways. *Swiss Med Wkly*, 148 :w14599.
- Rohde, J. R., Breikreutz, A., Chenal, A., Sansonetti, P. J., and Parsot, C. (2007). Type III secretion effectors of the IpaH family are E3 ubiquitin ligases. *Cell Host Microbe*, 1(1) :77–83.
- Rohr, M. W., Narasimhulu, C. A., Rudeski-Rohr, T. A., and Parthasarathy, S. (2020). Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability : A Review. *Adv Nutr*, 11(1) :77–91.
- Rolhion, N., Barnich, N., Bringer, M.-A., Glasser, A.-L., Ranc, J., Hébuterne, X., Hofman, P., and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive Escherichia coli invasion. *Gut*, 59(10) :1355–1362.

- Rolhion, N., Barnich, N., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2005). Strong decrease in invasive ability and outer membrane vesicle release in Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 with the *yfgL* gene deleted. *J Bacteriol*, 187(7) :2286–2296.
- Rolhion, N., Carvalho, F. A., and Darfeuille-Michaud, A. (2007). OmpC and the sigma(E) regulatory pathway are involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82. *Mol Microbiol*, 63(6) :1684–1700.
- Rolhion, N., Hofman, P., and Darfeuille-Michaud, A. (2011). The endoplasmic reticulum stress response chaperone : Gp96, a host receptor for Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, 2(2) :115–119.
- Round, J. L. and Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*, 9(5) :313–323.
- Roy, S., Esmaeilniakooshkghazi, A., Patnaik, S., Wang, Y., George, S. P., Ahrorov, A., Hou, J. K., Herron, A. J., Sesaki, H., and Khurana, S. (2018). Villin-1 and Gelsolin Regulate Changes in Actin Dynamics That Affect Cell Survival Signaling Pathways and Intestinal Inflammation. *Gastroenterology*, 154(5) :1405–1420.e2.
- Rufini, S., Ciccacci, C., Di Fusco, D., Ruffa, A., Pallone, F., Novelli, G., Biancone, L., and Borgiani, P. (2015). Autophagy and inflammatory bowel disease : Association between variants of the autophagy-related IRGM gene and susceptibility to Crohn's disease. *Dig Liver Dis*, 47(9) :744–750.
- Ruiz, P. A., Morón, B., Becker, H. M., Lang, S., Atrott, K., Spalinger, M. R., Scharl, M., Wojtal, K. A., Fischbeck-Terhalle, A., Frey-Wagner, I., Hausmann, M., Kraemer, T., and Rogler, G. (2017). Titanium dioxide nanoparticles exacerbate DSS-induced colitis : role of the NLRP3 inflammasome. *Gut*, 66(7) :1216–1224.
- Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T. P., Dillin, A., and Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol*, 15(7) :741–750.
- Russo, E., Giudici, F., Fiorindi, C., Ficari, F., Scaringi, S., and Amedei, A. (2019). Immunomodulating Activity and Therapeutic Effects of Short Chain Fatty Acids and Tryptophan Post-biotics in Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol*, 10 :2754.
- Rutgeerts, P., Hiele, M., Geboes, K., Peeters, M., Penninckx, F., Aerts, R., and Kerremans, R. (1995). Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection. *Gastroenterology*, 108(6) :1617–1621.
- Ryzhakov, G. and Randow, F. (2007). SINTBAD, a novel component of innate antiviral immunity, shares a TBK1-binding domain with NAP1 and TANK. *EMBO J*, 26(13) :3180–3190.
- Sadaghian Sadabad, M., Regeling, A., de Goffau, M. C., Blokzijl, T., Weersma, R. K., Penders, J., Faber, K. N., Harmsen, H. J. M., and Dijkstra, G. (2015). The ATG16L1-T300A allele impairs clearance of pathosymbionts in the inflamed ileal mucosa of Crohn's disease patients. *Gut*, 64(10) :1546–1552.
- Sadler, T., Bhasin, J. M., Xu, Y., Barnholz-Sloan, J., Chen, Y., Ting, A. H., and Stylianou, E. (2016). Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression defines molecular characteristics of Crohn's disease-associated fibrosis. *Clin Epigenetics*, 8 :30.
- Saha, S. and Khanna, S. (2019). Management of *Clostridioides difficile* colitis : insights for the gastroenterologist. *Therap Adv Gastroenterol*, 12 :1756284819847651.
- Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M. H., Uematsu, S., Yang, B.-G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., Tanaka, K., Kawai, T., Tsujimura, T., Takeuchi, O., Yoshimori, T., and Akira, S. (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature*, 456(7219) :264–268.

- Saitz, W., Montero, D. A., Pardo, M., Araya, D., De la Fuente, M., Hermoso, M. A., Farfán, M. J., Ginard, D., Rosselló-Móra, R., Rasko, D. A., Del Canto, F., and Vidal, R. M. (2022). Characterization of Adherent-Invasive Escherichia coli (AIEC) Outer Membrane Proteins Provides Potential Molecular Markers to Screen Putative AIEC Strains. *Int J Mol Sci*, 23(16) :9005.
- Sakiyama, T., Musch, M. W., Ropeleski, M. J., Tsubouchi, H., and Chang, E. B. (2009). Glutamine increases autophagy under Basal and stressed conditions in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 136(3) :924–932.
- Sakowski, E. T., Koster, S., Portal Celhay, C., Park, H. S., Shrestha, E., Hetzenecker, S. E., Maurer, K., Cadwell, K., and Philips, J. A. (2015). Ubiquilin 1 Promotes IFN- $\gamma$ -Induced Xenophagy of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog*, 11(7) :e1005076.
- Salem, M., Ammitzboell, M., Nys, K., Seidelin, J. B., and Nielsen, O. H. (2015). ATG16L1 : A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease. *Autophagy*, 11(4) :585–594.
- Sancho-Shimizu, V. and Mostowy, S. (2018). Bacterial Autophagy : How to Take a Complement. *Cell Host & Microbe*, 23(5) :580–582.
- Sandborn, W. J. (2014). Crohn's disease evaluation and treatment : clinical decision tool. *Gastroenterology*, 147(3) :702–705.
- Santeford, A., Wiley, L. A., Park, S., Bamba, S., Nakamura, R., Gdoura, A., Ferguson, T. A., Rao, P. K., Guan, J.-L., Saitoh, T., Akira, S., Xavier, R., Virgin, H. W., and Apte, R. S. (2016). Impaired autophagy in macrophages promotes inflammatory eye disease. *Autophagy*, 12(10) :1876–1885.
- Santos, M. P. C., Gomes, C., and Torres, J. (2018). Familial and ethnic risk in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol*, 31(1) :14–23.
- Sarker, S. A., Sultana, S., Reuteler, G., Moine, D., Descombes, P., Charton, F., Bourdin, G., McCallin, S., Ngom-Bru, C., Neville, T., Akter, M., Huq, S., Qadri, F., Talukdar, K., Kassam, M., Delley, M., Loiseau, C., Deng, Y., El Aidy, S., Berger, B., and Brüssow, H. (2016). Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea With Two Coliphage Preparations : A Randomized Trial in Children From Bangladesh. *EBioMedicine*, 4 :124–137.
- Sarraf, S. A., Shah, H. V., Kanfer, G., Pickrell, A. M., Holtzclaw, L. A., Ward, M. E., and Youle, R. J. (2020). Loss of TAX1BP1-Directed Autophagy Results in Protein Aggregate Accumulation in the Brain. *Mol Cell*, 80(5) :779–795.e10.
- Sartor, R. B. (2012). Gut microbiota : Diet promotes dysbiosis and colitis in susceptible hosts. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9(10) :561–562.
- Sasaki, M., Sitaraman, S. V., Babbin, B. A., Gerner-Smidt, P., Ribot, E. M., Garrett, N., Alpern, J. A., Akyildiz, A., Theiss, A. L., Nusrat, A., and Klapproth, J.-M. A. (2007). Invasive Escherichia coli are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest*, 87(10) :1042–1054.
- Satsangi, J., Silverberg, M. S., Vermeire, S., and Colombel, J.-F. (2006). The Montreal classification of inflammatory bowel disease : controversies, consensus, and implications. *Gut*, 55(6) :749–753.
- Sausset, R., Petit, M. A., Gaboriau-Routhiau, V., and De Paepe, M. (2020). New insights into intestinal phages. *Mucosal Immunol*, 13(2) :205–215.
- Savarino, E., Bertani, L., Ceccarelli, L., Bodini, G., Zingone, F., Buda, A., Facchin, S., Lorenzon, G., Marchi, S., Marabotto, E., De Bortoli, N., Savarino, V., Costa, F., and Blandizzi, C. (2019). Antimicrobial treatment with the fixed-dose antibiotic combination RHB-104 for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Crohn's disease : pharmacological and clinical implications. *Expert Opin Biol Ther*, 19(2) :79–88.

- Saxena, A., Fletcher, E., Larsen, B., Baliga, M. S., Durstine, J. L., and Fayad, R. (2012). Effect of exercise on chemically-induced colitis in adiponectin deficient mice. *J Inflamm (Lond)*, 9(1) :30.
- Sazonovs, A., Stevens, C. R., Venkataraman, G. R., Yuan, K., Avila, B., Abreu, M. T., Ahmad, et al. (2022). Large-scale sequencing identifies multiple genes and rare variants associated with Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet*.
- Scharl, M., Paul, G., Weber, A., Jung, B. C., Docherty, M. J., Hausmann, M., Rogler, G., Barrett, K. E., and McCole, D. F. (2009). Protection of epithelial barrier function by the Crohn's disease associated gene protein tyrosine phosphatase n2. *Gastroenterology*, 137(6) :2030–2040.e5.
- Schilling, B., Hunt, J., Gibson, B. W., and Apicella, M. A. (2014). Site-specific acylation changes in the lipid A of Escherichia coli lpxL mutants grown at high temperatures. *Innate Immun*, 20(3) :269–282.
- Schmitz, J. M., Tonkonogy, S. L., Dogan, B., Leblond, A., Whitehead, K. J., Kim, S. C., Simpson, K. W., and Sartor, R. B. (2019). Murine Adherent and Invasive E. coli Induces Chronic Inflammation and Immune Responses in the Small and Large Intestines of Monoassociated IL-10-/- Mice Independent of Long Polar Fimbriae Adhesin A. *Inflamm Bowel Dis*, 25(5) :875–885.
- Schnaith, A., Kashkar, H., Leggio, S. A., Addicks, K., Krönke, M., and Krut, O. (2007). Staphylococcus aureus subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. *J Biol Chem*, 282(4) :2695–2706.
- Schreiner, P., Martinho-Grueber, M., Studerus, D., Vavricka, S. R., Tilg, H., Biedermann, L., and on behalf of Swiss IBDnet, an official working group of the Swiss Society of Gastroenterology (2020). Nutrition in Inflammatory Bowel Disease. *Digestion*, 101 Suppl 1 :120–135.
- Schroeder, B. O., Birchenough, G. M. H., Ståhlman, M., Arike, L., Johansson, M. E. V., Hansson, G. C., and Bäckhed, F. (2018). Bifidobacteria or Fiber Protects against Diet-Induced Microbiota-Mediated Colonic Mucus Deterioration. *Cell Host Microbe*, 23(1) :27–40.e7.
- Schultsz, C., Van Den Berg, F. M., Ten Kate, F. W., Tytgat, G. N., and Dankert, J. (1999). The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology*, 117(5) :1089–1097.
- Schwamborn, K., Weil, R., Courtois, G., Whiteside, S. T., and Israël, A. (2000). Phorbol esters and cytokines regulate the expression of the NEMO-related protein, a molecule involved in a NF-kappa B-independent pathway. *J Biol Chem*, 275(30) :22780–22789.
- Seksik, P., Nion-Larmurier, I., Sokol, H., Beaugerie, L., and Cosnes, J. (2009). Effects of light smoking consumption on the clinical course of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 15(5) :734–741.
- Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., and Doré, J. (2003). Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, 52(2) :237–242.
- Selby, W., Pavli, P., Crotty, B., Florin, T., Radford-Smith, G., Gibson, P., Mitchell, B., Connell, W., Read, R., Merrett, M., Ee, H., Hetzel, D., and Antibiotics in Crohn's Disease Study Group (2007). Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology*, 132(7) :2313–2319.
- Septhri, S., Kotlowski, R., Bernstein, C. N., and Krause, D. O. (2007). Microbial diversity of inflamed and noninflamed gut biopsy tissues in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 13(6) :675–683.
- Serena, C., Millan, M., Ejarque, M., Saera-Vila, A., Maymó-Masip, E., Núñez-Roa, C., Monfort-Ferré, D., Terrón-Puig, M., Bautista, M., Menacho, M., Martí, M., Espin, E., Vendrell, J., and Fernández-Veledo, S. (2020). Adipose stem cells from patients with Crohn's disease show a distinctive DNA methylation pattern. *Clin Epigenetics*, 12(1) :53.

- Sevrin, G., Massier, S., Chassaing, B., Agus, A., Delmas, J., Denizot, J., Billard, E., and Barnich, N. (2020). Adaptation of adherent-invasive *E. coli* to gut environment : Impact on flagellum expression and bacterial colonization ability. *Gut Microbes*, 11(3) :364–380.
- Sgambato, D., Miranda, A., Ranaldo, R., Federico, A., and Romano, M. (2017). The Role of Stress in Inflammatory Bowel Diseases. *Curr Pharm Des*, 23(27) :3997–4002.
- Shafraan, I., Kugler, L., El-Zaatari, F. a. K., Naser, S. A., and Sandoval, J. (2002). Open clinical trial of rifabutin and clarithromycin therapy in Crohn's disease. *Dig Liver Dis*, 34(1) :22–28.
- Shanahan, E. R., Shah, A., Koloski, N., Walker, M. M., Talley, N. J., Morrison, M., and Holtmann, G. J. (2018). Influence of cigarette smoking on the human duodenal mucosa-associated microbiota. *Microbiome*, 6(1) :150.
- Shao, B.-Z., Wang, S.-L., Fang, J., Li, Z.-S., Bai, Y., and Wu, K. (2019). Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Alleviates Inflammatory Bowel Disease Through Induction of AMPK-mTOR-p70S6K-Mediated Autophagy. *Inflammation*, 42(5) :1666–1679.
- Shao, B.-Z., Wei, W., Ke, P., Xu, Z.-Q., Zhou, J.-X., and Liu, C. (2014). Activating cannabinoid receptor 2 alleviates pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis via activation of autophagy and inhibiting NLRP3 inflammasome. *CNS Neurosci Ther*, 20(12) :1021–1028.
- Sharma, V., Verma, S., Seranova, E., Sarkar, S., and Kumar, D. (2018). Selective Autophagy and Xenophagy in Infection and Disease. *Front Cell Dev Biol*, 6 :147.
- Shawki, A., Ramirez, R., Spalinger, M. R., Ruegger, P. M., Sayoc-Becerra, A., Santos, A. N., Chatterjee, P., Canale, V., Mitchell, J. D., Macbeth, J. C., Gries, C. M., Tremblay, M. L., Hsiao, A., Borneman, J., and McCole, D. F. (2020). The autoimmune susceptibility gene, PTPN2, restricts expansion of a novel mouse adherent-invasive *E. coli*. *Gut Microbes*, 11(6) :1547–1566.
- Shen, X., Shi, R., Zhang, H., Li, K., Zhao, Y., and Zhang, R. (2010). The Toll-like receptor 4 D299G and T399I polymorphisms are associated with Crohn's disease and ulcerative colitis : a meta-analysis. *Digestion*, 81(2) :69–77.
- Shen, Y., Giardino Torchia, M. L., Lawson, G. W., Karp, C. L., Ashwell, J. D., and Mazmanian, S. K. (2012). Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. *Cell Host Microbe*, 12(4) :509–520.
- Shen, Z., Zhu, C., Quan, Y., Yuan, W., Wu, S., Yang, Z., Luo, W., Tan, B., and Wang, X. (2017). Update on intestinal microbiota in Crohn's disease 2017 : Mechanisms, clinical application, adverse reactions, and outlook. *J Gastroenterol Hepatol*, 32(11) :1804–1812.
- Sheridan, J., Mack, D. R., Amre, D. K., Israel, D. M., Cherkasov, A., Li, H., Grimard, G., and Steiner, T. S. (2013). A non-synonymous coding variant (L616F) in the TLR5 gene is potentially associated with Crohn's disease and influences responses to bacterial flagellin. *PLoS One*, 8(4) :e61326.
- Shi, C.-S., Shenderov, K., Huang, N.-N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K. A., Sher, A., and Kehrl, J. H. (2012). Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol*, 13(3) :255–263.
- Shi, X., Chang, C., Yokom, A. L., Jensen, L. E., and Hurley, J. H. (2020a). The autophagy adaptor NDP52 and the FIP200 coiled-coil allosterically activate ULK1 complex membrane recruitment. *Elife*, 9 :e59099.
- Shi, X., Yokom, A. L., Wang, C., Young, L. N., Youle, R. J., and Hurley, J. H. (2020b). ULK complex organization in autophagy by a C-shaped FIP200 N-terminal domain dimer. *J Cell Biol*, 219(7) :e201911047.

- Shiomi, D., Toyoda, A., Aizu, T., Ejima, F., Fujiyama, A., Shini, T., Kohara, Y., and Niki, H. (2013). Mutations in cell elongation genes mreB, mrdA and mrdB suppress the shape defect of RodZ-deficient cells. *Mol Microbiol*, 87(5) :1029–1044.
- Shizukuishi, S., Ogawa, M., Matsunaga, S., Tomokiyo, M., Ikebe, T., Fushinobu, S., Ryo, A., and Ohnishi, M. (2020). Streptococcus pneumoniae hijacks host autophagy by deploying CbpC as a decoy for Atg14 depletion. *EMBO Rep*, 21(5) :e49232.
- Shoji-Kawata, S., Sumpter, R., Leveno, M., Campbell, G. R., Zou, Z., Kinch, L., Wilkins, A. D., Sun, Q., Pallauf, K., MacDuff, D., Huerta, C., Virgin, H. W., Helms, J. B., Eerland, R., Tooze, S. A., Xavier, R., Lenschow, D. J., Yamamoto, A., King, D., Lichtarge, O., Grishin, N. V., Spector, S. A., Kaloyanova, D. V., and Levine, B. (2013). Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature*, 494(7436) :201–206.
- Sicard, J.-F., Le Bihan, G., Vogeleer, P., Jacques, M., and Harel, J. (2017). Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Front Cell Infect Microbiol*, 7 :387.
- Sicard, J.-F., Vogeleer, P., Le Bihan, G., Rodriguez Olivera, Y., Beaudry, F., Jacques, M., and Harel, J. (2018). N-Acetyl-glucosamine influences the biofilm formation of Escherichia coli. *Gut Pathog*, 10 :26.
- Simms, L. A., Doecke, J. D., Walsh, M. D., Huang, N., Fowler, E. V., and Radford-Smith, G. L. (2008). Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*, 57(7) :903–910.
- Simonsen, K. T., Nielsen, G., Bjerrum, J. V., Kruse, T., Kallipolitis, B. H., and Møller-Jensen, J. (2011). A role for the RNA chaperone Hfq in controlling adherent-invasive Escherichia coli colonization and virulence. *PLoS One*, 6(1) :e16387.
- Singh, R. P., Halaka, D. A., Hayouka, Z., and Tirosh, O. (2020). High-Fat Diet Induced Alteration of Mice Microbiota and the Functional Ability to Utilize Fructooligosaccharide for Ethanol Production. *Front Cell Infect Microbiol*, 10 :376.
- Sipponen, T. and Kolho, K.-L. (2015). Fecal calprotectin in diagnosis and clinical assessment of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*, 50(1) :74–80.
- Sipponen, T., Savilahti, E., Kolho, K.-L., Nuutinen, H., Turunen, U., and Färkkilä, M. (2008). Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin : correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm Bowel Dis*, 14(1) :40–46.
- Sivignon, A., de Vallée, A., Barnich, N., Denizot, J., Darcha, C., Pignède, G., Vandekerckove, P., and Darfeuille-Michaud, A. (2015a). Saccharomyces cerevisiae CNCM I-3856 prevents colitis induced by AIEC bacteria in the transgenic mouse model mimicking Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 21(2) :276–286.
- Sivignon, A., Yan, X., Alvarez Dorta, D., Bonnet, R., Bouckaert, J., Fleury, E., Bernard, J., Gouin, S. G., Darfeuille-Michaud, A., and Barnich, N. (2015b). Development of Heptylmannoside-Based Glycoconjugate Antiadhesive Compounds against Adherent-Invasive Escherichia coli Bacteria Associated with Crohn's Disease. *mBio*, 6(6) :e01298–01215.
- Six, D. A., Carty, S. M., Guan, Z., and Raetz, C. R. H. (2008). Purification and Mutagenesis of LpxL, the Lauroyltransferase of Escherichia coli Lipid A Biosynthesis. *Biochemistry*, 47(33) :8623–8637.
- Six, D. A., Lambert, B., Raetz, C. R. H., and Doerrler, W. T. (2012). Density gradient enrichment of Escherichia coli lpxL mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(7) :989–993.
- Slowicka, K. and van Loo, G. (2018). Optineurin Functions for Optimal Immunity. *Front Immunol*, 9 :769.

- Slowicka, K., Vereecke, L., Mc Guire, C., Sze, M., Maelfait, J., Kolpe, A., Saelens, X., Beyaert, R., and van Loo, G. (2016). Optineurin deficiency in mice is associated with increased sensitivity to Salmonella but does not affect proinflammatory NF- $\kappa$ B signaling. *Eur J Immunol*, 46(4) :971–980.
- Smith, A. M., Rahman, F. Z., Hayee, B., Graham, S. J., Marks, D. J. B., Sewell, G. W., Palmer, C. D., Wilde, J., Foxwell, B. M. J., Gloger, I. S., Sweeting, T., Marsh, M., Walker, A. P., Bloom, S. L., and Segal, A. W. (2009). Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J Exp Med*, 206(9) :1883–1897.
- Smith, A. M., Sewell, G. W., Levine, A. P., Chew, T. S., Dunne, J., O'Shea, N. R., Smith, P. J., Harrison, P. J., Macdonald, C. M., Bloom, S. L., and Segal, A. W. (2015). Disruption of macrophage pro-inflammatory cytokine release in Crohn's disease is associated with reduced optineurin expression in a subset of patients. *Immunology*, 144(1) :45–55.
- Smith, E. J., Thompson, A. P., O'Driscoll, A., and Clarke, D. J. (2013). Pathogenesis of adherent-invasive Escherichia coli. *Future Microbiol*, 8(10) :1289–1300.
- Sokol, H., Brot, L., Stefanescu, C., Auzolle, C., Barnich, N., Buisson, A., Fumery, M., Pariente, B., Le Bourhis, L., Treton, X., Nancey, S., Allez, M., Seksik, P., and REMIND Study Group Investigators (2020a). Prominence of ileal mucosa-associated microbiota to predict postoperative endoscopic recurrence in Crohn's disease. *Gut*, 69(3) :462–472.
- Sokol, H., Landman, C., Seksik, P., Berard, L., Montil, M., Nion-Larmurier, I., Bourrier, A., Le Gall, G., Lalande, V., De Rougemont, A., Kirchgessner, J., Daguanel, A., Cachanado, M., Rousseau, A., Drouet, E., Rosenzweig, M., Hagege, H., Dray, X., Klatzman, D., Marteau, P., Saint-Antoine IBD Network, Beaugerie, L., and Simon, T. (2020b). Fecal microbiota transplantation to maintain remission in Crohn's disease : a pilot randomized controlled study. *Microbiome*, 8(1) :12.
- Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H.-P., Jegou, S., Landman, C., Cohen, D., Liguori, G., Bourrier, A., Nion-Larmurier, I., Cosnes, J., Seksik, P., Langella, P., Skurnik, D., Richard, M. L., and Beaugerie, L. (2017). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*, 66(6) :1039–1048.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H. M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., and Langella, P. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(43) :16731–16736.
- Solem, C. A., Loftus, E. V., Tremaine, W. J., Harmsen, W. S., Zinsmeister, A. R., and Sandborn, W. J. (2005). Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 11(8) :707–712.
- Sorbara, M. T., Foerster, E. G., Tsalikis, J., Abdel-Nour, M., Mangiapane, J., Sirluck-Schroeder, I., Tattoli, I., van Dalen, R., Isenman, D. E., Rohde, J. R., Girardin, S. E., and Philpott, D. J. (2018). Complement C3 Drives Autophagy-Dependent Restriction of Cyto-invasive Bacteria. *Cell Host Microbe*, 23(5) :644–652.e5.
- Spalinger, M. R., Lang, S., Gottier, C., Dai, X., Rawlings, D. J., Chan, A. C., Rogler, G., and Scharl, M. (2017). PTPN22 regulates NLRP3-mediated IL1B secretion in an autophagy-dependent manner. *Autophagy*, 13(9) :1590–1601.
- Spalinger, M. R., Manzini, R., Hering, L., Riggs, J. B., Gottier, C., Lang, S., Atrott, K., Fettelschoss, A., Olomski, F., Kundig, T. M., Fried, M., McCole, D. F., Rogler, G., and Scharl, M. (2018). PTPN22 Regulates Inflammasome Activation and Controls Onset of Intestinal Inflammation and Colon Cancer. *Cell Rep*, 22(7) :1835–1848.



- Spalinger, M. R., McCole, D. F., Rogler, G., and Scharl, M. (2016). Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2 and inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 22(3) :1034–1044.
- Spalinger, M. R., Shawki, A., Chatterjee, P., Canale, V., Santos, A., Sayoc-Becerra, A., Scharl, M., Tremblay, M. L., Borneman, J., and McCole, D. F. (2021). Autoimmune susceptibility gene PTPN2 is required for clearance of adherent-invasive Escherichia coli by integrating bacterial uptake and lysosomal defence. *Gut*, pages gutjnl–2020–323636.
- Spiceland, C. M. and Lodhia, N. (2018). Endoscopy in inflammatory bowel disease : Role in diagnosis, management, and treatment. *World J Gastroenterol*, 24(35) :4014–4020.
- Steed, H., Macfarlane, G. T., Blackett, K. L., Bahrami, B., Reynolds, N., Walsh, S. V., Cummings, J. H., and Macfarlane, S. (2010). Clinical trial : the microbiological and immunological effects of synbiotic consumption - a randomized double-blind placebo-controlled study in active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 32(7) :872–883.
- Steinbach, E. C. and Plevy, S. E. (2014). The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD. *Inflamm Bowel Dis*, 20(1) :166–175.
- Sternsdorf, T., Jensen, K., Züchner, D., and Will, H. (1997). Cellular localization, expression, and structure of the nuclear dot protein 52. *J Cell Biol*, 138(2) :435–448.
- Stidham, R. W. and Higgins, P. D. R. (2018). Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Clin Colon Rectal Surg*, 31(3) :168–178.
- Stolp, H. and Starr, M. P. (1963). *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 29 :217–248.
- Strugala, V., Dettmar, P. W., and Pearson, J. P. (2008). Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int J Clin Pract*, 62(5) :762–769.
- Su, J. W., Ma, J. J., and Zhang, H. J. (2015). Use of antibiotics in patients with Crohn's disease : a systematic review and meta-analysis. *J Dig Dis*, 16(2) :58–66.
- Sudhakar, P., Jacomin, A.-C., Hautefort, I., Samavedam, S., Fatemian, K., Ari, E., Gul, L., Demeter, A., Jones, E., Korcsmaros, T., and Nezis, I. P. (2019). Targeted interplay between bacterial pathogens and host autophagy. *Autophagy*, 15(9) :1620–1633.
- Sutherland, L. R., Ramcharan, S., Bryant, H., and Fick, G. (1990). Effect of cigarette smoking on recurrence of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 98(5 Pt 1) :1123–1128.
- Swidsinski, A., Ung, V., Sydora, B. C., Loening-Baucke, V., Doerffel, Y., Verstraelen, H., and Fedorak, R. N. (2009). Bacterial overgrowth and inflammation of small intestine after carboxymethylcellulose ingestion in genetically susceptible mice. *Inflamm Bowel Dis*, 15(3) :359–364.
- Taguchi, K., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*, 16(2) :123–140.
- Takagawa, T., Kitani, A., Fuss, I., Levine, B., Brant, S. R., Peter, I., Tajima, M., Nakamura, S., and Strober, W. (2018). An increase in LRRK2 suppresses autophagy and enhances Dectin-1-induced immunity in a mouse model of colitis. *Sci Transl Med*, 10(444) :eaan8162.
- Takahama, M., Akira, S., and Saitoh, T. (2018). Autophagy limits activation of the inflammasomes. *Immunol Rev*, 281(1) :62–73.
- Takahashi, K., Nishida, A., Fujimoto, T., Fujii, M., Shioya, M., Imaeda, H., Inatomi, O., Bamba, S., Sugimoto, M., and Andoh, A. (2016). Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Digestion*, 93(1) :59–65.

- Takahashi, Y., Meyerkord, C. L., Hori, T., Runkle, K., Fox, T. E., Kester, M., Loughran, T. P., and Wang, H.-G. (2011). Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy*, 7(1) :61–73.
- Takenaka, K., Kitazume, Y., Fujii, T., Tsuchiya, K., Watanabe, M., and Ohtsuka, K. (2020). Objective evaluation for treat to target in Crohn's disease. *J Gastroenterol*, 55(6) :579–587.
- Tang, C., Livingston, M. J., Liu, Z., and Dong, Z. (2020). Autophagy in kidney homeostasis and disease. *Nat Rev Nephrol*, 16(9) :489–508.
- Tanida, I., Mizushima, N., Kiyooka, M., Ohsumi, M., Ueno, T., Ohsumi, Y., and Kominami, E. (1999). Apg7p/Cvt2p : A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol Biol Cell*, 10(5) :1367–1379.
- Tanishima, M., Takashima, S., Honda, A., Yasuda, D., Tanikawa, T., Ishii, S., and MaruYama, T. (2017). Identification of optineurin as an interleukin-1 receptor-associated kinase 1-binding protein and its role in regulation of MyD88-dependent signaling. *J Biol Chem*, 292(42) :17250–17257.
- Tartakover Matalon, S., Ringel, Y., Konikoff, F., Drucker, L., Pery, S., and Naftali, T. (2020). Cannabinoid receptor 2 agonist promotes parameters implicated in mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *United European Gastroenterol J*, 8(3) :271–283.
- Teimoori-Toolabi, L., Samadpoor, S., Mehrtash, A., Ghadir, M., and Vahedi, H. (2018). Among autophagy genes, ATG16L1 but not IRGM is associated with Crohn's disease in Iranians. *Gene*, 675 :176–184.
- Thompson, N. P., Driscoll, R., Pounder, R. E., and Wakefield, A. J. (1996). Genetics versus environment in inflammatory bowel disease : results of a British twin study. *BMJ*, 312(7023) :95–96.
- Thurston, T. L., Boyle, K. B., Allen, M., Ravenhill, B. J., Karpiyevich, M., Bloor, S., Kaul, A., Noad, J., Foeglein, A., Matthews, S. A., Komander, D., Bycroft, M., and Randow, F. (2016). Recruitment of TBK1 to cytosol-invading Salmonella induces WIPI2-dependent antibacterial autophagy. *EMBO J*, 35(16) :1779–1792.
- Thurston, T. L. M., Ryzhakov, G., Bloor, S., von Muhlinen, N., and Randow, F. (2009). The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat Immunol*, 10(11) :1215–1221.
- Thurston, T. L. M., Wandel, M. P., von Muhlinen, N., Foeglein, A., and Randow, F. (2012). Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature*, 482(7385) :414–418.
- Tilija Pun, N. and Park, P.-H. (2017). Role of p62 in the suppression of inflammatory cytokine production by adiponectin in macrophages : Involvement of autophagy and p21/Nrf2 axis. *Sci Rep*, 7(1) :393.
- Titécat, M., Rousseaux, C., Dubuquoy, C., Foligné, B., Rahmouni, O., Mahieux, S., Desreumaux, P., Woolston, J., Sulakvelidze, A., Wannerberger, K., and Neut, C. (2022). Safety and Efficacy of an AIEC-targeted Bacteriophage Cocktail in a Mice Colitis Model. *J Crohns Colitis*, page jjac064.
- Tlaskalová-Hogenová, H., Tucková, L., Stepánková, R., Hudcovic, T., Palová-Jelínková, L., Kozáková, H., Rossmann, P., Sanchez, D., Cinová, J., Hrnčíř, T., Kverka, M., Frolová, L., Uhlig, H., Powrie, F., and Bland, P. (2005). Involvement of innate immunity in the development of inflammatory and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 1051 :787–798.
- To, N., Gracie, D. J., and Ford, A. C. (2016). Systematic review with meta-analysis : the adverse effects of tobacco smoking on the natural history of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 43(5) :549–561.
- Tong, J., Yan, X., and Yu, L. (2010). The late stage of autophagy : cellular events and molecular regulation. *Protein Cell*, 1(10) :907–915.

- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F., and Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *Lancet*, 389(10080) :1741–1755.
- Tran, H. Q., Ley, R. E., Gewirtz, A. T., and Chassaing, B. (2019). Flagellin-elicited adaptive immunity suppresses flagellated microbiota and vaccinates against chronic inflammatory diseases. *Nat Commun*, 10(1) :5650.
- Travassos, L. H., Carneiro, L. A. M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.-G., Magalhães, J. G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., Boneca, I. G., Allaoui, A., Jones, N. L., Nuñez, G., Girardin, S. E., and Philpott, D. J. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol*, 11(1) :55–62.
- Tripathi-Giesgen, I., Behrends, C., and Alpi, A. F. (2021). The ubiquitin ligation machinery in the defense against bacterial pathogens. *EMBO Rep*, 22(11) :e52864.
- Tsaprouni, L. G., Ito, K., Powell, J. J., Adcock, I. M., and Pouchard, N. (2011). Differential patterns of histone acetylation in inflammatory bowel diseases. *Journal of Inflammation*, 8(1) :1.
- Tschurtschenthaler, M. and Adolph, T. E. (2018). The Selective Autophagy Receptor Optineurin in Crohn's Disease. *Front Immunol*, 9 :766.
- Tschurtschenthaler, M., Adolph, T. E., Ashcroft, J. W., Niederreiter, L., Bharti, R., Saveljeva, et al. (2017). Defective ATG16L1-mediated removal of IRE1 $\alpha$  drives Crohn's disease-like ileitis. *J Exp Med*, 214(2) :401–422.
- Tsianos, V. E., Kostoulas, C., Gazouli, M., Frilingos, S., Georgiou, I., Christodoulou, D. K., Katsanos, K. H., and Tsianos, E. V. (2020). ATG16L1 T300A polymorphism is associated with Crohn's disease in a Northwest Greek cohort, but ECM1 T130M and G290S polymorphisms are not associated with ulcerative colitis. *Ann Gastroenterol*, 33(1) :38–44.
- Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G., and Rescigno, M. (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease : comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut*, 61(7) :1007–1015.
- Tsironi, E., Feakins, R. M., Probert, C. S. J., Rampton, D. S., and Phil, D. (2004). Incidence of inflammatory bowel disease is rising and abdominal tuberculosis is falling in Bangladeshis in East London, United Kingdom. *Am J Gastroenterol*, 99(9) :1749–1755.
- Tsuboi, K., Nishitani, M., Takakura, A., Imai, Y., Komatsu, M., and Kawashima, H. (2015). Autophagy Protects against Colitis by the Maintenance of Normal Gut Microflora and Secretion of Mucus. *J Biol Chem*, 290(33) :20511–20526.
- Tsui, J. J. and Huynh, H. Q. (2018). Is top-down therapy a more effective alternative to conventional step-up therapy for Crohn's disease? *Ann Gastroenterol*, 31(4) :413–424.
- Tsukada, M. and Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 333(1-2) :169–174.
- Tumbarello, D. A., Manna, P. T., Allen, M., Bycroft, M., Arden, S. D., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2015). The Autophagy Receptor TAX1BP1 and the Molecular Motor Myosin VI Are Required for Clearance of *Salmonella Typhimurium* by Autophagy. *PLoS Pathog*, 11(10) :e1005174.
- Tumbarello, D. A., Waxse, B. J., Arden, S. D., Bright, N. A., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2012). Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat Cell Biol*, 14(10) :1024–1035.

- Turco, E., Savova, A., Gere, F., Ferrari, L., Romanov, J., Schuschnig, M., and Martens, S. (2021). Reconstitution defines the roles of p62, NBR1 and TAX1BP1 in ubiquitin condensate formation and autophagy initiation. *Nat Commun*, 12 :5212.
- Turco, E., Witt, M., Abert, C., Bock-Bierbaum, T., Su, M.-Y., Trapannone, R., Sztacho, M., Danieli, A., Shi, X., Zaffagnini, G., Gamper, A., Schuschnig, M., Fracchiolla, D., Bernklau, D., Romanov, J., Hartl, M., Hurley, J. H., Daumke, O., and Martens, S. (2019). FIP200 Claw Domain Binding to p62 Promotes Autophagosome Formation at Ubiquitin Condensates. *Mol Cell*, 74(2) :330–346.e11.
- Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R., and Gordon, J. I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome : a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*, 1(6) :6ra14.
- Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 9(11) :799–809.
- Turner, K., Genta, R. M., Lujan, G., Robiou, C., and Sonnenberg, A. (2014). Significance of the epithelioid granuloma in biopsies of Crohn’s colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 20(12) :2271–2275.
- Turpin, W., Lee, S.-H., Raygoza Garay, J. A., Madsen, K. L., Meddings, et al. (2020). Increased Intestinal Permeability Is Associated With Later Development of Crohn’s Disease. *Gastroenterology*, 159(6) :2092–2100.e5.
- Tyakht, A. V., Manolov, A. I., Kanygina, A. V., Ischenko, D. S., Kovarsky, B. A., Popenko, et al. (2018). Genetic diversity of Escherichia coli in gut microbiota of patients with Crohn’s disease discovered using metagenomic and genomic analyses. *BMC Genomics*, 19(1) :968.
- Uhlir, H. H. and Powrie, F. (2018). Translating Immunology into Therapeutic Concepts for Inflammatory Bowel Disease. *Annu Rev Immunol*, 36 :755–781.
- Umeno, J., Asano, K., Matsushita, T., Matsumoto, T., Kiyohara, Y., Iida, M., Nakamura, Y., Kamatani, N., and Kubo, M. (2011). Meta-analysis of published studies identified eight additional common susceptibility loci for Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 17(12) :2407–2415.
- Underner, M., Perriot, J., Cosnes, J., Beau, P., Peiffer, G., and Meurice, J.-C. (2016). [Smoking, smoking cessation and Crohn’s disease]. *Presse Med*, 45(4 Pt 1) :390–402.
- Ungaro, F., Massimino, L., Furfaro, F., Rimoldi, V., Peyrin-Biroulet, L., D’Alessio, S., and Danese, S. (2019). Metagenomic analysis of intestinal mucosa revealed a specific eukaryotic gut virome signature in early-diagnosed inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, 10(2) :149–158.
- Ungaro, R., Bernstein, C. N., Geary, R., Hviid, A., Kolho, K.-L., Kronman, M. P., Shaw, S., Van Kruiningen, H., Colombel, J.-F., and Atreja, A. (2014). Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn’s disease but not ulcerative colitis : a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 109(11) :1728–1738.
- Vainshtein, A. and Grumati, P. (2020). Selective Autophagy by Close Encounters of the Ubiquitin Kind. *Cells*, 9(11) :E2349.
- van Beek, N., Klionsky, D. J., and Reggiori, F. (2018). Genetic aberrations in macroautophagy genes leading to diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1865(5) :803–816.
- Van den Abbeele, P., Marzorati, M., Derde, M., De Weirtdt, R., Joan, V., Possemiers, S., and Van de Wiele, T. (2016). Arabinoxylans, inulin and Lactobacillus reuteri 1063 repress the adherent-invasive Escherichia coli from mucus in a mucosa-comprising gut model. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2 :16016.
- van der Sloot, K. W. J., Amini, M., Peters, V., Dijkstra, G., and Alizadeh, B. Z. (2017). Inflammatory Bowel Diseases : Review of Known Environmental Protective and Risk Factors Involved. *Inflammatory Bowel Diseases*, 23(9) :1499–1509.

- van Langenberg, D. R., Papandony, M. C., and Gibson, P. R. (2015). Sleep and physical activity measured by accelerometry in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 41(10) :991–1004.
- Van Limbergen, J., Wilson, D. C., and Satsangi, J. (2009). The genetics of Crohn's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 10 :89–116.
- van Wijk, S. J. L., Fricke, F., Herhaus, L., Gupta, J., Hötte, K., Pampaloni, F., Grumati, P., Kaulich, M., Sou, Y.-S., Komatsu, M., Greten, F. R., Fulda, S., Heilemann, M., and Dikic, I. (2017). Linear ubiquitination of cytosolic Salmonella Typhimurium activates NF- $\kappa$ B and restricts bacterial proliferation. *Nat Microbiol*, 2 :17066.
- VanDussen, K. L., Liu, T.-C., Li, D., Towfic, F., Modiano, N., Winter, R., Haritunians, T., Taylor, K. D., Dhall, D., Targan, S. R., Xavier, R. J., McGovern, D. P. B., and Stappenbeck, T. S. (2014). Genetic variants synthesize to produce paneth cell phenotypes that define subtypes of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 146(1) :200–209.
- Vangay, P., Johnson, A. J., Ward, T. L., Al-Ghalith, G. A., Shields-Cutler, R. R., Hillmann, B. M., Lucas, S. K., Beura, L. K., Thompson, E. A., Till, L. M., Batres, R., Paw, B., Pergament, S. L., Saenyakul, P., Xiong, M., Kim, A. D., Kim, G., Masopust, D., Martens, E. C., Angkurawaranon, C., McGready, R., Kashyap, P. C., Culhane-Pera, K. A., and Knights, D. (2018). US Immigration Westernizes the Human Gut Microbiome. *Cell*, 175(4) :962–972.e10.
- Vargas, J. N. S., Hamasaki, M., Kawabata, T., Youle, R. J., and Yoshimori, T. (2022). The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals. *Nat Rev Mol Cell Biol*.
- Vargas, J. N. S., Wang, C., Bunker, E., Hao, L., Maric, D., Schiavo, G., Randow, F., and Youle, R. J. (2019). Spatiotemporal Control of ULK1 Activation by NDP52 and TBK1 during Selective Autophagy. *Mol Cell*, 74(2) :347–362.e6.
- Vaughn, B. P., Vatanen, T., Allegretti, J. R., Bai, A., Xavier, R. J., Korzenik, J., Gevers, D., Ting, A., Robson, S. C., and Moss, A. C. (2016). Increased Intestinal Microbial Diversity Following Fecal Microbiota Transplant for Active Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*, 22(9) :2182–2190.
- Vavricka, S. R., Brun, L., Ballabeni, P., Pittet, V., Prinz Vavricka, B. M., Zeitz, J., Rogler, G., and Schoepfer, A. M. (2011). Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss inflammatory bowel disease cohort. *Am J Gastroenterol*, 106(1) :110–119.
- Vazeille, E., Bringer, M.-A., Gardarin, A., Chambon, C., Becker-Pauly, C., Pender, S. L. F., Jakob, C., Müller, S., Lottaz, D., and Darfeuille-Michaud, A. (2011). Role of meprins to protect ileal mucosa of Crohn's disease patients from colonization by adherent-invasive E. coli. *PLoS One*, 6(6) :e21199.
- Vazeille, E., Buisson, A., Bringer, M.-A., Goutte, M., Ouchchane, L., Hugot, J.-P., de Vallée, A., Barnich, N., Bommelaer, G., and Darfeuille-Michaud, A. (2015). Monocyte-derived macrophages from Crohn's disease patients are impaired in the ability to control intracellular adherent-invasive Escherichia coli and exhibit disordered cytokine secretion profile. *J Crohns Colitis*, 9(5) :410–420.
- 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., and Bringer, M.-A. (2016). GipA Factor Supports Colonization of Peyer's Patches by Crohn's Disease-associated Escherichia Coli. *Inflamm Bowel Dis*, 22(1) :68–81.
- Ventham, N. T., Kennedy, N. A., Nimmo, E. R., and Satsangi, J. (2013). Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease : the emerging role of epigenetics. *Gastroenterology*, 145(2) :293–308.
- Vergne, I., Chua, J., Lee, H.-H., Lucas, M., Belisle, J., and Deretic, V. (2005). Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(11) :4033–4038.

- Verlhac, P., Grégoire, I. P., Azocar, O., Petkova, D. S., Baguet, J., Viret, C., and Faure, M. (2015). Autophagy receptor NDP52 regulates pathogen-containing autophagosome maturation. *Cell Host Microbe*, 17(4) :515–525.
- Vermeire, S., Joossens, S., Peeters, M., Monsuur, F., Marien, G., Bossuyt, X., Groenen, P., Vlietinck, R., and Rutgeerts, P. (2001). Comparative study of ASCA (Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody) assays in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 120(4) :827–833.
- Vernia, F., Di Ruscio, M., Stefanelli, G., Viscido, A., Frieri, G., and Latella, G. (2020). Is fecal calprotectin an accurate marker in the management of Crohn's disease? *J Gastroenterol Hepatol*, 35(3) :390–400.
- Verschuere, S., Bracke, K. R., Demoor, T., Plantinga, M., Verbrugghe, P., Ferdinande, L., Lambrecht, B. N., Brusselle, G. G. G., and Cuvelier, C. A. (2011). Cigarette smoking alters epithelial apoptosis and immune composition in murine GALT. *Lab Invest*, 91(7) :1056–1067.
- Verstrepen, L., Verhelst, K., Carpentier, I., and Beyaert, R. (2011). TAX1BP1, a ubiquitin-binding adaptor protein in innate immunity and beyond. *Trends Biochem Sci*, 36(7) :347–354.
- Vetrano, S., Rescigno, M., Cera, M. R., Correale, C., Rumio, C., Doni, A., Fantini, M., Sturm, A., Borroni, E., Repici, A., Locati, M., Malesci, A., Dejana, E., and Danese, S. (2008). Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 135(1) :173–184.
- Viennois, E., Bretin, A., Dubé, P. E., Maue, A. C., Dauriat, C. J. G., Barnich, N., Gewirtz, A. T., and Chassaing, B. (2020). Dietary Emulsifiers Directly Impact Adherent-Invasive E. coli Gene Expression to Drive Chronic Intestinal Inflammation. *Cell Rep*, 33(1) :108229.
- Viennois, E. and Chassaing, B. (2018). First victim, later aggressor : How the intestinal microbiota drives the pro-inflammatory effects of dietary emulsifiers? *Gut Microbes*, 9(3) :1–4.
- Vijay, K. (2018). Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases : Past, present, and future. *Int Immunopharmacol*, 59 :391–412.
- Vijay-Kumar, M., Sanders, C. J., Taylor, R. T., Kumar, A., Aitken, J. D., Sitaraman, S. V., Neish, A. S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I. R., and Gewirtz, A. T. (2007). Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest*, 117(12) :3909–3921.
- Viladomiu, M., Kivolowitz, C., Abdulhamid, A., Dogan, B., Victorio, D., Castellanos, J. G., Woo, V., Teng, F., Tran, N. L., Szczesnak, A., Chai, C., Kim, M., Diehl, G. E., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., Zhou, X. K., Schwartzman, S., Mandl, L. A., Abramowitz, M., Jacob, V., Bosworth, B., Steinlauf, A., Scherl, E. J., Wu, H.-J. J., Simpson, K. W., and Longman, R. S. (2017). IgA-coated E. coli enriched in Crohn's disease spondyloarthritis promote TH17-dependent inflammation. *Sci Transl Med*, 9(376) :eaaf9655.
- Vivinus-Nébot, M., Frin-Mathy, G., Bziouche, H., Dainese, R., Bernard, G., Anty, R., Filippi, J., Saint-Paul, M. C., Tulic, M. K., Verhasselt, V., Hébuterne, X., and Piche, T. (2014). Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases : role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut*, 63(5) :744–752.
- von Muhlinen, N., Akutsu, M., Ravenhill, B. J., Foeglein, A., Bloor, S., Rutherford, T. J., Freund, S. M. V., Komander, D., and Randow, F. (2012). LC3C, bound selectively by a noncanonical LIR motif in NDP52, is required for antibacterial autophagy. *Mol Cell*, 48(3) :329–342.
- Voth, D. E., Beare, P. A., Howe, D., Sharma, U. M., Samoilis, G., Cockrell, D. C., Omsland, A., and Heinzen, R. A. (2011). The Coxiella burnetii cryptic plasmid is enriched in genes encoding type IV secretion system substrates. *J Bacteriol*, 193(7) :1493–1503.

- Vujkovic-Cvijin, I., Welles, H. C., Ha, C. W. Y., Huq, L., Mistry, S., Brenchley, J. M., Trinchieri, G., Devkota, S., and Belkaid, Y. (2022). The systemic anti-microbiota IgG repertoire can identify gut bacteria that translocate across gut barrier surfaces. *Sci Transl Med*, 14(658) :eab13927.
- Wagner, J., Maksimovic, J., Farries, G., Sim, W. H., Bishop, R. F., Cameron, D. J., Catto-Smith, A. G., and Kirkwood, C. D. (2013). Bacteriophages in gut samples from pediatric Crohn's disease patients : metagenomic analysis using 454 pyrosequencing. *Inflamm Bowel Dis*, 19(8) :1598–1608.
- Wai, S. N., Takade, A., and Amako, K. (1995). The release of outer membrane vesicles from the strains of enterotoxigenic Escherichia coli. *Microbiol Immunol*, 39(7) :451–456.
- Walker, A. W. and Hoyles, L. (2023). Human microbiome myths and misconceptions. *Nat Microbiol*, 8(8) :1392–1396.
- Walker, A. W., Sanderson, J. D., Churcher, C., Parkes, G. C., Hudspith, B. N., Rayment, N., Brostoff, J., Parkhill, J., Dougan, G., and Petrovska, L. (2011). High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol*, 11 :7.
- Wallings, R., Manzoni, C., and Bandopadhyay, R. (2015). Cellular processes associated with LRRK2 function and dysfunction. *FEBS J*, 282(15) :2806–2826.
- Wan, M., Wang, X., Huang, C., Xu, D., Wang, Z., Zhou, Y., and Zhu, Y. (2019). A bacterial effector deubiquitinase specifically hydrolyses linear ubiquitin chains to inhibit host inflammatory signalling. *Nat Microbiol*, 4(8) :1282–1293.
- Wang, F., Jiang, Z., Li, Y., He, X., Zhao, J., Yang, X., Zhu, L., Yin, Z., Li, X., Wang, X., Liu, W., Shang, W., Yang, Z., Wang, S., Zhen, Q., Zhang, Z., Yu, Y., Zhong, H., Ye, Q., Huang, L., and Yuan, J. (2013). Shigella flexneri T3SS effector IpaH4.5 modulates the host inflammatory response via interaction with NF- $\kappa$ B p65 protein. *Cell Microbiol*, 15(3) :474–485.
- Wang, H., Zhang, X., Zuo, Z., Zhang, Q., Pan, Y., Zeng, B., Li, W., Wei, H., and Liu, Z. (2017). Rip2 Is Required for Nod2-Mediated Lysozyme Sorting in Paneth Cells. *J Immunol*, 198(9) :3729–3736.
- Wang, L., Klionsky, D. J., and Shen, H.-M. (2023). The emerging mechanisms and functions of microautophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 24(3) :186–203.
- Wang, M., Herrmann, C. J., Simonovic, M., Szklarczyk, D., and von Mering, C. (2015). Version 4.0 of PaxDb : Protein abundance data, integrated across model organisms, tissues, and cell-lines. *Proteomics*, 15(18) :3163–3168.
- Wang, S.-L., Wang, Z.-R., and Yang, C.-Q. (2012). Meta-analysis of broad-spectrum antibiotic therapy in patients with active inflammatory bowel disease. *Exp Ther Med*, 4(6) :1051–1056.
- Wang, Z., Shi, L., Hua, S., Qi, C., and Fang, M. (2019). IL-33 ameliorates experimental colitis involving regulation of autophagy of macrophages in mice. *Cell Biosci*, 9 :10.
- Wasilewski, A., Zielińska, M., Storr, M., and Fichna, J. (2015). Beneficial Effects of Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Psychobiotics in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*, 21(7) :1674–1682.
- Watanabe, T., Asano, N., Murray, P. J., Ozato, K., Taylor, P., Fuss, I. J., Kitani, A., and Strober, W. (2008). Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest*, 118(2) :545–559.
- Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P. J., and Strober, W. (2004). NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol*, 5(8) :800–808.

- Waters, S., Marchbank, K., Solomon, E., Whitehouse, C., and Gautel, M. (2009). Interactions with LC3 and polyubiquitin chains link nbr1 to autophagic protein turnover. *FEBS Lett*, 583(12) :1846–1852.
- Watson, R. O., Manzanillo, P. S., and Cox, J. S. (2012). Extracellular M. tuberculosis DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell*, 150(4) :803–815.
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schäffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K. R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., Schröder, J. M., Bevins, C. L., Fellermann, K., and Stange, E. F. (2004). NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*, 53(11) :1658–1664.
- Wei, Y., Liu, M., Li, X., Liu, J., and Li, H. (2018). Origin of the Autophagosome Membrane in Mammals. *Biomed Res Int*, 2018 :1012789.
- Weingarden, A. R. and Vaughn, B. P. (2017). Intestinal microbiota, fecal microbiota transplantation, and inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, 8(3) :238–252.
- Wild, P., Farhan, H., McEwan, D. G., Wagner, S., Rogov, V. V., Brady, N. R., Richter, B., Korac, J., Waidmann, O., Choudhary, C., Dötsch, V., Bumann, D., and Dikic, I. (2011). Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science*, 333(6039) :228–233.
- Wildenberg, M. E., Vos, A. C. W., Wolfkamp, S. C. S., Duijvestein, M., Verhaar, A. P., Te Velde, A. A., van den Brink, G. R., and Hommes, D. W. (2012). Autophagy attenuates the adaptive immune response by destabilizing the immunologic synapse. *Gastroenterology*, 142(7) :1493–1503.e6.
- Wine, E., Ossa, J. C., Gray-Owen, S. D., and Sherman, P. M. (2009). Adherent-invasive Escherichia coli, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia. *BMC Microbiol*, 9 :180.
- Wittkopf, N., Günther, C., Martini, E., Waldner, M., Amann, K. U., Neurath, M. F., and Becker, C. (2012). Lack of intestinal epithelial atg7 affects paneth cell granule formation but does not compromise immune homeostasis in the gut. *Clin Dev Immunol*, 2012 :278059.
- Wong, D., Bach, H., Sun, J., Hmama, Z., and Av-Gay, Y. (2011). Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(48) :19371–19376.
- Wong, Y. C. and Holzbaur, E. L. F. (2014). Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(42) :E4439–4448.
- Wooten, M. W., Geetha, T., Seibenhener, M. L., Babu, J. R., Diaz-Meco, M. T., and Moscat, J. (2005). The p62 scaffold regulates nerve growth factor-induced NF-kappaB activation by influencing TRAF6 polyubiquitination. *J Biol Chem*, 280(42) :35625–35629.
- Wright, E. K., Kamm, M. A., Teo, S. M., Inouye, M., Wagner, J., and Kirkwood, C. D. (2015). Recent advances in characterizing the gastrointestinal microbiome in Crohn's disease : a systematic review. *Inflamm Bowel Dis*, 21(6) :1219–1228.
- Wu, R., Xiong, R., Li, Y., Chen, J., and Yan, R. (2023). Gut microbiome, metabolome, host immunity associated with inflammatory bowel disease and intervention of fecal microbiota transplantation. *J Autoimmun*, page 103062.
- Wu, S., Zhang, Y.-G., Lu, R., Xia, Y., Zhou, D., Petrof, E. O., Claud, E. C., Chen, D., Chang, E. B., Carmeliet, G., and Sun, J. (2015). Intestinal epithelial vitamin D receptor deletion leads to defective autophagy in colitis. *Gut*, 64(7) :1082–1094.



- Wu, Y., Jin, S., Liu, Q., Zhang, Y., Ma, L., Zhao, Z., Yang, S., Li, Y.-P., and Cui, J. (2021). Selective autophagy controls the stability of transcription factor IRF3 to balance type I interferon production and immune suppression. *Autophagy*, 17(6) :1379–1392.
- Xia, Y., Liu, N., Xie, X., Bi, G., Ba, H., Li, L., Zhang, J., Deng, X., Yao, Y., Tang, Z., Yin, B., Wang, J., Jiang, K., Li, Z., Choi, Y., Gong, F., Cheng, X., O’Shea, J. J., Chae, J. J., Laurence, A., and Yang, X.-P. (2019). The macrophage-specific V-ATPase subunit ATP6V0D2 restricts inflammasome activation and bacterial infection by facilitating autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 15(6) :960–975.
- Xie, X., Li, F., Wang, Y., Wang, Y., Lin, Z., Cheng, X., Liu, J., Chen, C., and Pan, L. (2015). Molecular basis of ubiquitin recognition by the autophagy receptor CALCOCO2. *Autophagy*, 11(10) :1775–1789.
- Xu, X., Araki, K., Li, S., Han, J.-H., Ye, L., Tan, W. G., Konieczny, B. T., Bruinsma, M. W., Martinez, J., Pearce, E. L., Green, D. R., Jones, D. P., Virgin, H. W., and Ahmed, R. (2014). Autophagy is essential for effector CD8(+) T cell survival and memory formation. *Nat Immunol*, 15(12) :1152–1161.
- Xu, Y., Shen, J., and Ran, Z. (2020). Emerging views of mitophagy in immunity and autoimmune diseases. *Autophagy*, 16(1) :3–17.
- Xue, L.-N., Xu, K.-Q., Zhang, W., Wang, Q., Wu, J., and Wang, X.-Y. (2013). Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to ulcerative colitis and Crohn’s disease : a meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*, 19(1) :54–60.
- Yamaichi, Y. and Dörr, T. (2017). Transposon Insertion Site Sequencing for Synthetic Lethal Screening. *Methods Mol Biol*, 1624 :39–49.
- Yamano, K., Kikuchi, R., Kojima, W., Hayashida, R., Koyano, F., Kawawaki, J., Shoda, T., Demizu, Y., Naito, M., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2020). Critical role of mitochondrial ubiquitination and the OPTN-ATG9A axis in mitophagy. *J Cell Biol*, 219(9) :e201912144.
- Yamashita, S.-i., Abe, K., Tatemichi, Y., and Fujiki, Y. (2014). The membrane peroxin PEX3 induces peroxisome-ubiquitination-linked pexophagy. *Autophagy*, 10(9) :1549–1564.
- Yan, X., Sivignon, A., Yamakawa, N., Crepet, A., Travelet, C., Borsali, R., Dumych, T., Li, Z., Bilyy, R., Deniaud, D., Fleury, E., Barnich, N., Darfeuille-Michaud, A., Gouin, S. G., Bouckaert, J., and Bernard, J. (2015). Glycopolymers as Antiadhesives of E. coli Strains Inducing Inflammatory Bowel Diseases. *Biomacromolecules*, 16(6) :1827–1836.
- Yanai, H., Salomon, N., and Lahat, A. (2016). Complementary Therapies in Inflammatory Bowel Diseases. *Curr Gastroenterol Rep*, 18(12) :62.
- Yang, C. K., Kim, J. H., and Stallcup, M. R. (2006). Role of the N-terminal activation domain of the coiled-coil coactivator in mediating transcriptional activation by beta-catenin. *Mol Endocrinol*, 20(12) :3251–3262.
- Yang, H., Ni, H.-M., Guo, F., Ding, Y., Shi, Y.-H., Lahiri, P., Fröhlich, L. F., Rüllicke, T., Smole, C., Schmidt, V. C., Zatloukal, K., Cui, Y., Komatsu, M., Fan, J., and Ding, W.-X. (2016). Sequestosome 1/p62 Protein Is Associated with Autophagic Removal of Excess Hepatic Endoplasmic Reticulum in Mice. *J Biol Chem*, 291(36) :18663–18674.
- Yang, J., Li, D., Zhang, M., Lin, G., Hu, S., and Xu, H. (2023). From the updated landscape of the emerging biologics for IBDs treatment to the new delivery systems. *J Control Release*, 361 :568–591.
- Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z., and Su, B. (2001). The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol*, 2(7) :620–624.
- Yang, L., Liu, C., Zhao, W., He, C., Ding, J., Dai, R., Xu, K., Xiao, L., Luo, L., Liu, S., Li, W., and Meng, H. (2018). Impaired Autophagy in Intestinal Epithelial Cells Alters Gut Microbiota and Host Immune Responses. *Appl Environ Microbiol*, 84(18) :e00880–18.

- Yim, A. Y. F. L., Duijvis, N. W., Ghiboub, M., Sharp, C., Ferrero, E., Mannens, M. M. A. M., D'Haens, G. R., Jonge, W. J. d., Velde, A. A. t., and Henneman, P. (2020). Whole-Genome DNA Methylation Profiling of CD14+ Monocytes Reveals Disease Status and Activity Differences in Crohn's Disease Patients. *Journal of Clinical Medicine*, 9(4). Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
- Yin, Z., Pascual, C., and Klionsky, D. J. (2016). Autophagy : machinery and regulation. *Microb Cell*, 3(12) :588–596.
- Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Yoshida, M., Fukumatsu, M., Kim, M., Mimuro, H., Nakagawa, I., Yanagawa, T., Ishii, T., Kakizuka, A., Sztul, E., Chakraborty, T., and Sasakawa, C. (2009). *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat Cell Biol*, 11(10) :1233–1240.
- Yu, Z.-Q., Ni, T., Hong, B., Wang, H.-Y., Jiang, F.-J., Zou, S., Chen, Y., Zheng, X.-L., Klionsky, D. J., Liang, Y., and Xie, Z. (2012). Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy*, 8(6) :883–892.
- Yue, W., Liu, Y., Li, X., Lv, L., Huang, J., and Liu, J. (2019). Curcumin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice via regulation of autophagy and intestinal immunity. *Turk J Gastroenterol*, 30(3) :290–298.
- Zachari, M. and Ganley, I. G. (2017). The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem*, 61(6) :585–596.
- Zangara, M. T., Darwish, L., and Coombes, B. K. (2023). Characterizing the Pathogenic Potential of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli. *EcoSal Plus*, page eesp00182022.
- Zaslloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870) :389–395.
- Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A. J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.-D. (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*, 56(1) :61–72.
- Zellner, S., Schifferer, M., and Behrends, C. (2021). Systematically defining selective autophagy receptor-specific cargo using autophagosome content profiling. *Molecular Cell*, 81(6) :1337–1354.e8. Publisher : Elsevier.
- Zhang, C., Yan, J., Xiao, Y., Shen, Y., Wang, J., Ge, W., and Chen, Y. (2017a). Inhibition of Autophagic Degradation Process Contributes to Claudin-2 Expression Increase and Epithelial Tight Junction Dysfunction in TNF- $\alpha$  Treated Cell Monolayers. *Int J Mol Sci*, 18(1) :157.
- Zhang, H., Lang, W., Liu, X., Bai, J., Jia, Q., and Shi, Q. (2022a). Procyanidin A1 alleviates DSS-induced ulcerative colitis via regulating AMPK/mTOR/p70S6K-mediated autophagy. *J Physiol Biochem*, 78(1) :213–227.
- Zhang, H., Luo, X., Ke, J., Duan, Y., He, Y., Zhang, D., Cai, M., Sun, G., and Sun, X. (2016). Procyanidins, from *Castanea mollissima* Bl. shell, induces autophagy following apoptosis associated with PI3K/AKT/mTOR inhibition in HepG2 cells. *Biomed Pharmacother*, 81 :15–24.
- Zhang, H., Zheng, L., McGovern, D. P. B., Hamill, A. M., Ichikawa, R., Kanazawa, Y., Luu, J., Kumagai, K., Cilluffo, M., Fukata, M., Targan, S. R., Underhill, D. M., Zhang, X., and Shih, D. Q. (2017b). Myeloid ATG16L1 Facilitates Host-Bacteria Interactions in Maintaining Intestinal Homeostasis. *J Immunol*, 198(5) :2133–2146.
- Zhang, J., Hoedt, E. C., Liu, Q., Berendsen, E., Teh, J. J., Hamilton, A., O' Brien, A. W., Ching, J. Y. L., Wei, H., Yang, K., Xu, Z., Wong, S. H., Mak, J. W. Y., Sung, J. J. Y., Morrison, M., Yu, J., Kamm, M. A., and Ng, S. C. (2021). Elucidation of *Proteus mirabilis* as a Key Bacterium in Crohn's Disease Inflammation. *Gastroenterology*, 160(1) :317–330.e11.

- Zhang, Q., Pan, Y., Yan, R., Zeng, B., Wang, H., Zhang, X., Li, W., Wei, H., and Liu, Z. (2015). Commensal bacteria direct selective cargo sorting to promote symbiosis. *Nat Immunol*, 16(9) :918–926.
- Zhang, X., Agrawal, A., and San, K.-Y. (2012). Improving fatty acid production in *Escherichia coli* through the overexpression of malonyl coA-acyl carrier protein transacylase. *Biotechnol Prog*, 28(1) :60–65.
- Zhang, Y.-G., Lu, R., Xia, Y., Zhou, D., Petrof, E., Claud, E. C., and Sun, J. (2019). Lack of Vitamin D Receptor Leads to Hyperfunction of Claudin-2 in Intestinal Inflammatory Responses. *Inflamm Bowel Dis*, 25(1) :97–110.
- Zhang, Z., Zhang, H., Chen, T., Shi, L., Wang, D., and Tang, D. (2022b). Regulatory role of short-chain fatty acids in inflammatory bowel disease. *Cell Commun Signal*, 20(1) :64.
- Zhao, J., Sun, Y., Shi, P., Dong, J.-N., Zuo, L.-G., Wang, H.-G., Gong, J.-F., Li, Y., Gu, L.-L., Li, N., Li, J.-S., and Zhu, W.-M. (2015). Celastrol ameliorates experimental colitis in IL-10 deficient mice via the up-regulation of autophagy. *Int Immunopharmacol*, 26(1) :221–228.
- Zhao, Y., Guo, Q., Zhao, K., Zhou, Y., Li, W., Pan, C., Qiang, L., Li, Z., and Lu, N. (2017). Small molecule GL-V9 protects against colitis-associated colorectal cancer by limiting NLRP3 inflammasome through autophagy. *Oncotarget*, 7(1) :e1375640.
- Zhao, Y. and Shao, F. (2015). The NAIP-NLRC4 inflammasome in innate immune detection of bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Immunol Rev*, 265(1) :85–102.
- Zhao, Y. G. and Zhang, H. (2019). Autophagosome maturation : An epic journey from the ER to lysosomes. *J Cell Biol*, 218(3) :757–770.
- Zheng, X., Hu, M., Zang, X., Fan, Q., Liu, Y., Che, Y., Guan, X., Hou, Y., Wang, G., and Hao, H. (2019). Kynurenic acid/GPR35 axis restricts NLRP3 inflammasome activation and exacerbates colitis in mice with social stress. *Brain Behav Immun*, 79 :244–255.
- Zheng, Y. T., Shahnazari, S., Brech, A., Lamark, T., Johansen, T., and Brummel, J. H. (2009). The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J Immunol*, 183(9) :5909–5916.
- Zheng, Z., Wei, C., Guan, K., Yuan, Y., Zhang, Y., Ma, S., Cao, Y., Wang, F., Zhong, H., and He, X. (2016). Bacterial E3 Ubiquitin Ligase IpaH4.5 of *Shigella flexneri* Targets TBK1 To Dampen the Host Antibacterial Response. *J Immunol*, 196(3) :1199–1208.
- Zhilu, X., Xiangqian, D., Keli, Y., Caroline, C., Jingwan, Z., Yu, L., Tao, Z., Cheung, C. L., Yang, S., Fengrui, Z., Kl, C. F., Jy, S. J., Jun, Y., Anthony, B., Nicolas, B., Jean-Frédéric, C., Sunny Hei, W., Yinglei, M., and Siew C, N. (2021). Association of Adherent-invasive *Escherichia coli* with severe Gut Mucosal dysbiosis in Hong Kong Chinese population with Crohn’s disease. *Gut Microbes*, 13(1) :1994833.
- Zhou, G., Song, Y., Yang, W., Guo, Y., Fang, L., Chen, Y., and Liu, Z. (2016). ASCA, ANCA, ALCA and Many More : Are They Useful in the Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease ? *Dig Dis*, 34(1-2) :90–97.
- Zhou, Y., Hua, S., and Song, L. (2023). The versatile defender : exploring the multifaceted role of p62 in intracellular bacterial infection. *Front Cell Infect Microbiol*, 13 :1180708.
- Zhu, G., Wu, C.-J., Zhao, Y., and Ashwell, J. D. (2007). Optineurin negatively regulates TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. *Curr Biol*, 17(16) :1438–1443.
- Zhu, J. and Mohan, C. (2010). Toll-like receptor signaling pathways—therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm*, 2010 :781235.
- Zong, X., Fu, J., Xu, B., Wang, Y., and Jin, M. (2020). Interplay between gut microbiota and antimicrobial peptides. *Anim Nutr*, 6(4) :389–396.
- Zuo, T. and Ng, S. C. (2018). The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory Bowel Disease. *Front Microbiol*, 9 :2247.



# **Annexe**



# Valorisation scientifique

## MODULES DE L'ÉCOLE DOCTORALE

### Modules socio-professionnels

- Éthique de la recherche et intégrité scientifique.
- Analyse du travail enseignant.
- Principe de relaxation : découvrir son corps pour mieux gérer le stress et les tensions musculaires.
- Comment financer son projet de recherche - Partie 1 : Opportunités de financement.
- Sauveteur secouriste du travail.
- Préparation et participation à la finale clermontoise du concours « Ma Thèse en 180 secondes ».

### Modules de biologie

- Formation d'une semaine dans un laboratoire extérieur à l'école doctorale SVSAE sur la méthode de Transposon Sequencing appliquée à l'infection des bactéries AIEC (adherent-invasive *Escherichia coli*) au Collège de France, Paris.
- Encadrement de stagiaires : Aubin GRIMAUD, un stagiaire de 3<sup>ème</sup> pendant une semaine et Sébastien SIMON, un stagiaire de licence 3 pendant deux semaines.
- Préparation et participation aux Nuées Ardentes 2022 : réunions et réflexion pour concevoir de nouveaux outils, recherche d'images, conception des tubes digestifs sain/pathologique, recherche et achat des matériaux, construction des bactéries en pate Fimo et participation à la tenue du stand « Le Laboratoire des Explorateurs du Vivant » pendant deux jours (installation du stand et animation du stand).
- Module « Découverte de la microscopie et de l'imagerie : de la molécule au tissu ».

## ENSEIGNEMENTS

**1<sup>ère</sup> année de thèse (64h)** : TD Biologie Moléculaire + TP Microbiologie (Génétique Bactérienne) à l'IUT d'Aubière.

- Janvier 2021 : 8h de TD de biologie moléculaire en distanciel aux étudiants de 1<sup>ère</sup> année de DUT ABB (Analyses Biologiques et Biochimiques). Réalisation de 5 exercices par les étudiants et correction à l'aide d'un support visuel. Le TD portait sur les acides nucléiques au cours duquel les étudiants devaient dessiner une molécule d'ADN, identifier les différentes liaisons entre les bases azotées, calculer la pureté des acides nucléiques, etc.
- Février/Mars 2021 : 56h de TP de génétique bactérienne en présentiel aux étudiants de 2<sup>ème</sup> année de DUT ABB. Les étudiants ont réalisé une conjugaison bactérienne entre deux souches, pesé et resuspendu des antibiotiques, réalisé des dilutions en série, coulé et ensemencé des géloses avec des billes et une oese (travail sous PSM et au bec bunsen). Les étudiants ont analysé leurs résultats et rédigé un compte-rendu que j'ai corrigé.

**2<sup>ème</sup> année de thèse (64h)** : TP Microbiologie (Génétique Bactérienne) à l'IUT d'Aubière.

- Janvier-Mars 2022 : 64h de TP de génétique bactérienne en présentiel aux étudiants de 2<sup>ème</sup> année de DUT ABB. Les étudiants ont réalisé une conjugaison bactérienne entre deux souches, pesé et resuspendu des antibiotiques, réalisé des dilutions en série, coulé et ensemencé des géloses avec des billes et une oese (travail sous PSM et au bec bunsen). Les étudiants ont analysé leurs résultats et rédigé un compte-rendu que j'ai corrigé.

**3<sup>ème</sup> année de thèse (64h)** : TP Microbiologie (Antibiotique + Génétique Bactérienne + Coloration Bactérienne) à l'IUT d'Aubière.

- Octobre 2022 : 48h de TP Antibiotique et Génétique Bactérienne en présentiel aux étudiants de 2<sup>ème</sup> année de DUT ABB. Les étudiants ont appris à déterminer les CMI et CMB de deux souches, réaliser des antibiogrammes et un dosage microbiologique. Les étudiants ont également réalisé une conjugaison bactérienne entre deux souches, pesé et resuspendu des antibiotiques, réalisé des dilutions en série, coulé et ensemencé des géloses avec des billes et une oese (travail sous PSM et au bec bunsen). Les étudiants ont analysé leurs résultats et rédigé un compte-rendu que j'ai corrigé.
- Février 2023 : 16h de TP Coloration en présentiel aux étudiants de 1<sup>ère</sup> année de DUT ABB. Les étudiants ont appris à reconnaître les différentes structures d'une bactérie (paroi, cytoplasme, capsule, flagelle, endospore) grâce à des colorations et des observations au microscope (réalisation d'un frottis flambé à l'alcool, coloration de Gram, coloration de Ziehl-Neelsen, coloration à l'encre de Chine, état frais, test de mobilité).

## VALORISATION SCIENTIFIQUE

### Communications orales

- *JED (Journées de l'École Doctorale sciences de la vie, santé, agronomie et environnement)* - Clermont-Ferrand - Juin 2023 : Da Silva A., Dalmaso G., Larabi A., Thi Hoang H., Billard E., Barnich N., Nguyen H. **Identification of autophagy receptors for the Crohn's disease associated adherent-invasive *Escherichia coli*.**
- *19<sup>ème</sup> Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois* - Clermont-Ferrand - Avril 2023 : Da Silva A., Dalmaso G., Larabi A., Thi Hoang H., Billard E., Barnich N., Nguyen H. **Identification des récepteurs autophagiques impliqués dans la prise en charge des *Escherichia coli* adhérents et invasifs associés à la maladie de Crohn.**

### Posters

- *Adherent Invasive E. coli (AIEC) : Past, Present, and Future* - New York - Novembre 2023 : Da Silva A., Dalmaso G., Larabi A., Thi Hoang H., Billard E., Barnich N., Nguyen H. **Identification of autophagy receptors for the Crohn's disease associated adherent-invasive *Escherichia coli*.**
- *Cell Symposia : Infection Biology in the Age of Microbiome* - Paris - Juin 2023 : Da Silva A., Dalmaso G., Larabi A., Thi Hoang H., Billard E., Barnich N., Nguyen H. **Identification of autophagy receptors for the Crohn's disease associated adherent-invasive *Escherichia coli*.**
- *Journée du CIR3 (Centre International de Recherche 3)* - Clermont-Ferrand - Novembre 2022 : Da Silva A., Dalmaso G., Larabi A., Thi Hoang H., Billard E., Barnich N., Nguyen H. **Identification of autophagy receptors for the Crohn's disease associated adherent-invasive *Escherichia coli*.**
- *CFATG (Club Francophone de l'Autophagie)* - Besançon - Juin 2022 : Da Silva A., Dalmaso G., Larabi A., Thi Hoang H., Billard E., Barnich N., Nguyen H. **Identification of autophagy receptors for the Crohn's disease associated adherent-invasive *Escherichia coli*.**

### Manuscrits en révision ou en soumission

- Da Silva A., Dalmaso G., Larabi A., Thi Hoang H., Billard E., Barnich N., Nguyen H. **Identification of autophagy receptors for the Crohn's disease associated adherent-invasive *Escherichia coli*.** En révision dans le journal « *Frontiers in cellular and infection microbiology* ».
- Salesse L., Duval A., Sauvanet P., Da Silva A., Barnich N., Godfraind C., Dalmaso G., Nguyen H. **Autophagy in myeloid cells inhibits colorectal tumor growth in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice infected with colibactin-producing *Escherichia coli*.** En soumission dans le journal « *Autophagy* ».

## **Vulgarisation scientifique**

- Finale régionale du concours « Ma Thèse en 180 secondes », Mars 2023, Clermont-Ferrand.
- Animation du stand « Le Laboratoire des Explorateurs du Vivant » au Festival des Nuées Ardentes, Juin 2022, Clermont-Ferrand.



# Résumé

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin, dont l'étiologie est multifactorielle. Elle résulte de l'interaction complexe entre des prédispositions génétiques, des facteurs environnementaux et des altérations de la composition du microbiote intestinal, induisant une dérégulation du système immunitaire intestinal. À ce jour, la MC est incurable, seuls des traitements visant à soulager les symptômes et à prévenir les récurrences et complications sont disponibles. Chez les patients atteints de la MC, une augmentation de la prévalence de souches particulières d'*Escherichia coli*, appelées les AIEC (adherent-invasive *E. coli*), a été rapportée. Les AIEC sont des pathobiontes capables d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales ainsi que de se répliquer en macrophages sans induire la mort cellulaire, entraînant une réponse immunitaire dérégulée. Par ailleurs, des études ont montré que plusieurs polymorphismes dans les gènes de l'autophagie (*ATG16L1*, *IRGM*, *ULK1*, etc.) sont associés à un risque augmenté de développer la MC. L'autophagie est un processus essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire permettant la dégradation et le recyclage de composants cytoplasmiques et de pathogènes *via* le lysosome. Toutefois, certains pathogènes intracellulaires développent diverses stratégies pour échapper à la dégradation par l'autophagie. Dans ce contexte, l'objectif de mes travaux de thèse était d'identifier les récepteurs autophagiques responsables de la reconnaissance des AIEC, ainsi que les gènes nécessaires aux AIEC pour échapper à l'autophagie.

Le 1<sup>er</sup> axe de mes travaux de thèse a montré que la déficience de p62 ou NDP52 dans les cellules HeLa entraîne une augmentation de la réplication intracellulaire de la souche de référence AIEC LF82 et de la production de cytokines pro-inflammatoires. L'analyse par microscopie confocale a révélé la colocalisation de p62 ou NDP52 avec la bactérie AIEC LF82 et la protéine LC3, un marqueur de l'autophagie. Ainsi, nos résultats suggèrent que p62 et NDP52 agiraient comme des récepteurs autophagiques pour contrôler la réplication intracellulaire des AIEC. De plus, nous avons étudié l'impact d'un polymorphisme du gène *NDP52* associé à une susceptibilité augmentée de développer la MC, appelé *NDP52<sup>Val248Ala</sup>*, sur le contrôle des AIEC. Aucune différence n'a été observée dans le nombre de bactéries AIEC LF82 intracellulaires entre les cellules HeLa exprimant le variant à risque *NDP52<sup>Val248Ala</sup>* et celles exprimant l'allèle sauvage, suggérant un autre rôle de ce variant, probablement dans le contrôle de l'inflammation.

Le 2<sup>ème</sup> axe de mes travaux de thèse s'est concentré sur l'identification de gènes nécessaires aux AIEC pour échapper au contrôle par l'autophagie en utilisant la technique Transposon Sequencing (Tn-Seq). Brièvement, une banque de mutants de la souche AIEC LF82 a été créée de manière « saturée », c'est-à-dire que chacun des gènes du génome bactérien a été interrompu par au moins un transposon, conduisant à son invalidation. Cette banque de mutants a été utilisée pour infecter des cellules HeLa contrôles et déficientes pour l'autophagie. À 24h post-infection, l'ADN des mutants a été extrait et les sites d'insertion du transposon déterminés par séquençage ont permis d'identifier 68 gènes différentiellement représentés entre nos deux conditions. Les gènes sur-représentés dans les cellules HeLa déficientes pour l'autophagie par rapport aux cellules contrôles, sont les gènes potentiellement nécessaires aux AIEC pour échapper à l'autophagie. Ainsi, cette étude permettrait d'identifier de nouvelles cibles pour limiter la virulence des AIEC.

En conclusion, ces travaux contribuent à la compréhension des divers aspects de l'interaction entre les cellules hôtes et les bactéries AIEC associées à la MC et permettront, à l'avenir, de mieux caractériser la pathogenèse de cette maladie.

**Mots clés :** Maladie de Crohn, adherent-invasive *E. coli*, autophagie, récepteurs autophagiques, Tn-Seq.