



**HAL**  
open science

# Étude de l'effet de différents antibiotiques sur l'expression de gènes de virulence sur une collection de souches d'*Escherichia coli* adhérentes invasives.

Bouziane Seddiki

► **To cite this version:**

Bouziane Seddiki. Étude de l'effet de différents antibiotiques sur l'expression de gènes de virulence sur une collection de souches d'*Escherichia coli* adhérentes invasives.. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-04090117

**HAL Id: dumas-04090117**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04090117>**

Submitted on 5 May 2023

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

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

# UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE UFR DE PHARMACIE

Année : 2021

N°

## THESE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Le 29 septembre 2021

Bouziane Mourad SEDDIKI

### **Étude de l'effet de différents antibiotiques sur l'expression de gènes de virulence sur une collection de souches d'*Escherichia coli* adhérentes invasives.**

**Directeur de thèse : Docteur Frédéric ROBIN**

#### **JURY :**

Présidente

**Mme Valérie LIVRELLI**, Pharmacien, Professeure des Universités, UFR de Pharmacie, Université Clermont Auvergne

Membres

**M. Richard BONNET**, Pharmacien, Professeur des Universités praticien hospitalier, UFR de Médecine, Université Clermont Auvergne

**M. Anthony BUISSON**, Médecin, Maître de conférences praticien hospitalier, UFR de Médecine, praticien hospitalier, Université Clermont Auvergne

**M. Frédéric ROBIN**, Pharmacien, Maître de conférences praticien hospitalier, UFR de Médecine, Université Clermont Auvergne



# UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE UFR DE PHARMACIE

Année : 2021

N°

## THESE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Le 29 septembre 2021

Bouziane Mourad SEDDIKI

**Étude de l'effet de différents antibiotiques sur l'expression de gènes de virulence sur une collection de souches d'*Escherichia coli* adhérentes invasives.**

**Directeur de thèse : Docteur Frédéric ROBIN.**

### JURY :

Présidente

**Mme Valérie LIVRELLI**, Pharmacien, Professeure des Universités, UFR de Pharmacie, Université Clermont Auvergne.

Membres

**M. Richard BONNET**, Pharmacien, Professeur des Universités praticien hospitalier, UFR de Médecine, Université Clermont Auvergne.

**M. Anthony BUISSON**, Médecin, Maître de conférences praticien hospitalier, UFR de Médecine, praticien hospitalier, Université Clermont Auvergne.

**M. Frédéric ROBIN**, Pharmacien, Maître de conférences praticien hospitalier, UFR de Médecine, Université Clermont Auvergne.



**PROFESSEURS des UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS (HDR)**

Mme SAUTOU Valérie (pharmacien)

M. WALRAND Stéphane

**PROFESSEURS des UNIVERSITES (HDR)**

Mme ALRIC Monique

Mme BARTHOMEUF Chantal (pharmacien)

M. BEYSSAC Éric (pharmacien)

Mme CALDEFIE-CHEZET Florence (pharmacien)

M. CARDOT Jean-Michel (pharmacien)

M. CHAVIGNON Olivier

M. CHEZAL Jean-Michel

M. COUDERT Pascal (pharmacien)

Mme COURTEIX Christine

Mme FORESTIER Christiane (pharmacien)

M. GAUMET Vincent

Mme GUEIRARD Pascale (pharmacien)

Mme LIVRELLI Valérie (pharmacien)

M. MAUNIT Benoît

Mme RANCHON-COLE Isabelle (pharmacien)

Mme SAUVANT-ROCHAT Marie-Pierre (pharmacien)

Mme TERRAIL Laurence (pharmacien)

Mme VENNAT Brigitte (pharmacien)

**MAITRES DE CONFERENCES**

Mme ALBA DELGADO Cristina

Mme ARCHIMBAUD Christine (HDR) (pharmacien)

M. AUZELOUX Philippe (pharmacien)

M. BALAYSSAC David (HDR) (pharmacien)

M. BALESTRINO Damien (HDR)

Mme BEGOU Mélina (pharmacien)

Mme BLANQUET-DIOT Stéphanie (HDR)

M. BONNET Jean-Louis

Mme BOYER Anne (pharmacien)

M. CIA David

Mme CIVIALE Marie-Ange (HDR) (pharmacien)

M. CHENNEL Philip (pharmacien)

M. CLUZEL Jacques (HDR)

Mme COLLIN Aurore (pharmacien)

Mme COUDERT Catherine (HDR) (pharmacien)

M. DEBITON Éric

Mme DECOMBAT Caroline (pharmacien)

Mme DELORT Laetitia (HDR)

M. DOLY Stéphane

Mme FARGES Marie-Chantal

Mme FELGINES Catherine (HDR) (pharmacien)

Mme GALMIER Marie-Josèphe (HDR) (pharmacien)

M. GARRAIT Ghislain (HDR)

M. GONCALVES-MENDES Nicolas

Mme HENNEQUIN-ROBIN Claire (pharmacien)

Mme LAINE Emmanuelle

Mme MAISONIAL Aurélie

M. MALLET Christophe

Mme MIQUEL Sylvie

M. MOREAU Emmanuel (HDR)

Mme PEYRODE Caroline (pharmacien)

Mme QUINTANA DA INES Mercedes

M. ROMOND Pierre-Charles (pharmacien)

M. ROSSARY Adrien (HDR) (pharmacien)

M. ROUZAIER Paul (HDR) (pharmacien)

Mme SAPIN Anne-Françoise (pharmacien)

Mme SAVANOVITCH Chantal

M. SENEJOUX François (pharmacien)

M. SION Benoit (pharmacien)

M. TALVAS Jérémie

Mme TY Nancy (pharmacien)

Mme VAREILLE Marjolaine

Mme VIVIER Magali (pharmacien)

Mme WEBER Valérie

M. WERSINGER Éric

**MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIES**

Mme BEDHOMME Sabrina (pharmacien)

Mme BERNARD Lise (pharmacien)

Mme VAN LANDER Axelle (psychologue)

Mme LAFARGE Elodie (pharmacien)

Mme PERETON Bénédicte (pharmacien)

## UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

---

PRESIDENTS HONORAIRES  
UNIVERSITE D'AUVERGNE

: **JOYON** Louis  
: **DOLY** Michel  
: **TURPIN** Dominique  
: **VEYRE** Annie  
: **DULBECCO** Philippe  
: **ESCHALIER** Alain

PRESIDENTS HONORAIRES  
UNIVERSITE BLAISE PASCAL

: **CABANES** Pierre  
: **FONTAINE** Jacques  
: **BOUTIN** Christian  
: **MONTEIL** Jean-Marc  
: **ODOUARD** Albert  
: **LAVIGNOTTE** Nadine

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE et  
PRESIDENT DU CONSEIL ACADEMIQUE PLENIER  
PRESIDENT DU CONSEIL ACADEMIQUE RESTREINT  
VICE-PRESIDENTE DU CONSEIL D'ADMINISTRATION  
VICE-PRESIDENTE DE LA COMMISSION DE LA RECHERCHE  
VICE PRESIDENTE DE LA COMMISSION DE LA  
FORMATION ET DE LA VIE UNIVERSITAIRE  
DIRECTEUR GENERAL DES SERVICES

: **BERNARD** Mathias  
: **DEQUIEDT** Vianney  
: **FOGLI** Anne  
: **HENRARD** Pierre  
: **PEYRARD** Françoise  
: **PAQUIS** François



## UFR DE MEDECINE ET DES PROFESSIONS PARAMEDICALES

DOYENS HONORAIRES

: **DETEIX** Patrice  
: **CHAZAL** Jean

DOYEN  
RESPONSABLE ADMINISTRATIVE

: **CLAVELOU** Pierre  
: **ROBERT** Gaëlle

## LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

### **PROFESSEURS HONORAIRES :**

MM. BACIN Franck - BEGUE René-Jean - BEYTOUT Jean - BOMMELAER Gilles - BOUCHER Daniel - BUSSIÈRE Jean-Louis - CANO Noël - CASSAGNES Jean - CATILINA Pierre - CHABANNES Jacques - CHAZAL Jean - CHIPPONI Jacques - CHOLLET Philippe - CITRON Bernard - COUDERT Jean - DASTUGUE Bernard - DAUPLAT Jacques - DECHELOTTE Pierre - DEMEOCQ François - DE RIBEROLLES Charles - DETEIX Patrice - ESCANDE Georges - Mme FONCK Yvette - MM. GENTOU Claude - Mme GLANDDIER Phyllis - MM. IRTIUM Bernard - JACQUETIN Bernard - Mme LAVARENNE Jeanine - MM. LAVERAN Henri - LESOURD Bruno - LEVAI Jean-Paul - MAGE Gérard - MARCHEIX Jean-Claude - MICHEL Jean-Luc - MONDIE Jean-Michel - PHILIPPE Pierre - PLAGNE Robert - PLANCHE Roger - PONSONNAILLE Jean - REY Michel - Mme RIGAL Danièle - MM. ROZAN Raymond - SCHOEFFLER Pierre - SIROT Jacques - RIBAL Jean-Pierre - SOUTEYRAND Pierre - TANGUY Alain - TERVER Sylvain - THIEBLOT Philippe - TOURNILHAC Michel - VANNEUVILLE Guy - VIALLET Jean-François - Mlle VEYRE Annie

### **PROFESSEURS EMERITES :**

MM. AUMAITRE Olivier - BOITEUX Jean-Paul - CHAMOUX Alain - DUBRAY Claude - ESCHALIER Alain - KEMENY Jean-Louis - LABBE André - Mme LAFEUILLE Hélène - MM. LEMERY Didier - LUSSON Jean-René

## **PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS**

### **CLASSE EXCEPTIONNELLE**

M. VAGO Philippe	Histologie-Embryologie Cytogénétique
M. AVAN Paul	Biophysique et Traitement de l'Image
M. DURIF Franck	Neurologie
M. BOIRE Jean-Yves	Biostatistiques, Informatique Médicale et Technologies de Communication
M. BOYER Louis	Radiologie et Imagerie Médicale option Clinique
M. POULY Jean-Luc	Gynécologie et Obstétrique
M. CANIS Michel	Gynécologie-Obstétrique
Mme PENAULT-LLORCA Frédérique	Anatomie et Cytologie Pathologiques
M. BAZIN Jean-Etienne	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale
M. BIGNON Yves Jean	Cancérologie option Biologique
M. BOIRIE Yves	Nutrition Humaine
M. CLAVELOU Pierre	Neurologie
M. GILAIN Laurent	O.R.L.
M. LEMAIRE Jean-Jacques	Neurochirurgie
M. CAMILLERI Lionel	Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
M. DAPOIGNY Michel	Gastro-Entérologie
M. LLORCA Pierre-Michel	Psychiatrie d'Adultes



M.	PEZET Denis	Chirurgie Digestive
M.	SOUWEINE Bertrand	Réanimation Médicale
M.	BOISGARD Stéphane	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
Mme	DUCLOS Martine	Physiologie
M.	SCHMIDT Jeannot	Médecine d'Urgence
M.	BERGER Marc	Hématologie
M.	GARCIER Jean-Marc	Anatomie-Radiologie et Imagerie Médicale
M.	ROSSET Eugénio	Chirurgie Vasculaire
M.	SOUBRIER Martin	Rhumatologie
M.	ABERGEL Armando	Hépatologie
Mle	BARTHELEMY Isabelle	Chirurgie Maxillo-Faciale
M.	RUIVARD Marc	Médecine Interne

### *1ère CLASSE*

M.	CAILLAUD Denis	Pneumo-physiologie
M.	VERRELLE Pierre	Radiothérapie option Clinique
M.	D'INCAN Michel	Dermatologie -Vénérologie
Mme	JALENQUES Isabelle	Psychiatrie d'Adultes
M.	GERBAUD Laurent	Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention
M.	TAUVERON Igor	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
M.	MOM Thierry	Oto-Rhino-Laryngologie
M.	RICHARD Ruddy	Physiologie
M.	SAPIN-DEFOUR Vincent	Biochimie et Biologie Moléculaire
M.	BAY Jacques-Olivier	Cancérologie
M.	COUDEYRE Emmanuel	Médecine Physique et de Réadaptation
Mme	GODFRAIND Catherine	Anatomie et Cytologie Pathologiques
M.	LAURICHESSE Henri	Maladies Infectieuses et Tropicales
M.	TOURNILHAC Olivier	Hématologie
M.	CHIAMBARETTA Frédéric	Ophthalmologie
M.	FILAIRE Marc	Anatomie – Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
M.	GALLOT Denis	Gynécologie-Obstétrique
M.	GUY Laurent	Urologie
M.	TRAORE Ousmane	Hygiène Hospitalière
M.	ANDRE Marc	Médecine Interne
M.	BONNET Richard	Bactériologie, Virologie
M.	CACHIN Florent	Biophysique et Médecine Nucléaire
M.	COSTES Frédéric	Physiologie
M.	FUTIER Emmanuel	Anesthésiologie-Réanimation
Mme	HENG Anne-Elisabeth	Néphrologie
M.	MOTREFF Pascal	Cardiologie
Mme	PICKERING Gisèle	Pharmacologie Clinique
M.	RABISCHONG Benoît	Gynécologie Obstétrique
M.	CHABROT Pascal	Radiologie et Imagerie Médicale
M.	DESCAMPS Stéphane	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique
Mme	HENQUELL Cécile	Bactériologie Virologie
M.	POMEL Christophe	Cancérologie – Chirurgie Générale

**2ème CLASSE**

Mme CREVEAUX Isabelle	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. FAICT Thierry	Médecine Légale et Droit de la Santé
Mme KANOLD LASTAWIECKA Justyna	Pédiatrie
M. TCHIRKOV Andréï	Cytologie et Histologie
M. CORNELIS François	Génétique
M. LESENS Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
M. AUTHIER Nicolas	Pharmacologie Médicale
M. BROUSSE Georges	Psychiatrie Adultes/Addictologie
M. BUC Emmanuel	Chirurgie Digestive
M. LAUTRETTE Alexandre	Néphrologie Réanimation Médicale
Mme BRUGNON Florence	Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction
M. ESCHALIER Romain	Cardiologie
M. MERLIN Etienne	Pédiatrie
Mme TOURNADRE Anne	Rhumatologie
M. DURANDO Xavier	Cancérologie
M. DUTHEIL Frédéric	Médecine et Santé au Travail
Mme FANTINI Maria Livia	Neurologie
M. SAKKA Laurent	Anatomie – Neurochirurgie
M. BOURDEL Nicolas	Gynécologie-Obstétrique
M. GUIEZE Romain	Hématologie
M. POINCLOUX Laurent	Gastroentérologie
M. SOUTEYRAND Géraud	Cardiologie
M. EVRARD Bertrand	Immunologie
M. POIRIER Philippe	Parasitologie et Mycologie
Mme PHAM DANG Nathalie	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie
Mme SARRET Catherine	Pédiatrie

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE**

**1ère CLASSE**

M. CLEMENT Gilles	Médecine Générale
M. VORILHON Philippe	Médecine Générale

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

**2ème CLASSE**

Mme MALPUECH-BRUGERE Corinne	Nutrition Humaine
------------------------------	-------------------

## PROFESSEURS ASSOCIES DES UNIVERSITES

Mme BOTTET-MAULOUBIER Anne	Médecine Générale
M. CAMBON Benoît	Médecine Générale
M. TANGUY Gilles	Médecine Générale

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

### HORS CLASSE

Mme CHAMBON Martine	Bactériologie Virologie
Mme BOUTELOUP Corinne	Nutrition
Mme FOGLI Anne	Biochimie Biologie Moléculaire
Mle GOUAS Laetitia	Cytologie et Histologie, Cytogénétique

### 1ère CLASSE

M. MORVAN Daniel	Biophysique et Traitement de l'Image
Mle GOUMY Carole	Cytologie et Histologie, Cytogénétique
M. MARCEAU Geoffroy	Biochimie Biologie Moléculaire
Mme MINET-QUINARD Régine	Biochimie Biologie Moléculaire
M. ROBIN Frédéric	Bactériologie
Mle VERONESE Lauren	Cytologie et Histologie, Cytogénétique
M. DELMAS Julien	Bactériologie
Mle MIRAND Audrey	Bactériologie Virologie
M. OUCHCHANE Lemlih	Biostatistiques, Informatique Médicale et Technologies de Communication
M. LIBERT Frédéric	Pharmacologie Médicale
Mle COSTE Karen	Pédiatrie
Mle AUMERAN Claire	Hygiène Hospitalière
Mme CASSAGNES Lucie	Radiologie et Imagerie Médicale
M. LEBRETON Aurélien	Hématologie
M. BUISSON Anthony	Gastroentérologie
M. BOUVIER Damien	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. MAQDASY Salwan	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques
Mme NOURRISSON Céline	Parasitologie - Mycologie
Mme PONS Hanaë	Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction

**2ème CLASSE**

M. JABAUDON-GANDET Matthieu	Anesthésiologie – Réanimation Chirurgicale
M. COLL Guillaume	Neurochirurgie
M. GODET Thomas	Anesthésiologie-Réanimation et Médecine Péri-Opératoire
M. LACHAL Jonathan	Pédopsychiatrie
M. MOUSTAFA Farès	Médecine d'Urgence

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES  
DE MEDECINE GENERALE**

**1ère CLASSE**

Mme VAILLANT-ROUSSEL Hélène	Médecine Générale
-----------------------------	-------------------

**2ème CLASSE**

Mme LAPORTE Catherine	Médecine Générale
-----------------------	-------------------

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES**

**HORS CLASSE**

M. BLANCHON Loïc	Biochimie Biologie Moléculaire
M. MARCHAND Fabien	Pharmacologie Médicale
Mme VAURS-BARRIERE Catherine	Biochimie Biologie Moléculaire

**CLASSE NORMALE**

M. BAILLY Jean-Luc	Bactériologie Virologie
Mle AUBEL Corinne	Oncologie Moléculaire
Mle GUILLET Christelle	Nutrition Humaine
M. BIDET Yannick	Oncogénétique
M. DALMASSO Guillaume	Bactériologie
M. PIZON Frank	Santé Publique
M. SOLER Cédric	Biochimie Biologie Moléculaire
M. GIRAUDET Fabrice	Biophysique et Traitement de l'Image
M. LOLIGNIER Stéphane	Neurosciences – Neuropharmacologie

Mme MARTEIL Gaëlle  
M. PINEL Alexandre

Biologie de la Reproduction  
Nutrition Humaine

**MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DES UNIVERSITES**

M. BERNARD Pierre  
Mme ESCHALIER Bénédicte  
Mme RICHARD Amélie  
M. TESSIERES Frédéric  
Mme ROUGE Laure

Médecine Générale  
Médecine Générale  
Médecine Générale  
Médecine Générale  
Médecine Générale

# Remerciements

## Aux membres du Jury

### **A Madame le professeur Valérie LIVRELLI**

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Je te prie de croire en l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

### **A Monsieur le professeur Richard BONNET**

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury et de juger ce travail. Veuillez trouver ma sincère reconnaissance et ma profonde considération.

### **A Monsieur le docteur Anthony BUISSON**

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie des membres du jury de ma thèse et de juger ce travail. Je souhaite vous présenter mon respect et ma considération.

### **A Monsieur le docteur Frédéric ROBIN**

Je te remercie chaleureusement de m'avoir confié ce sujet, pour le temps que tu as pu me consacrer, pour ta disponibilité, ta bonne humeur inébranlable, ton aide et ta confiance dans l'accomplissement de cette thèse. Je t'en suis très reconnaissant.



A tous mes co-internes et amis, Il s'agit, dans le désordre, mais l'ordre n'importe peu, ils m'ont tous autant aidé, à temps perdu, à un moment ou à un autre, Issam, João, Wiwi, Solène, Émeline, Chloé, Élise, Samy, Vincent, Claudel, Gauthier... La liste est longue, mais vous vous reconnaîtrez. Merci pour tous ces moments partagés, de votre présence et votre soutien précieux. Merci pour tous ces moments partagés, de votre présence et votre soutien précieux.

A mes amis d'enfance, Salah, Charif, Simo, Yacine et Racime je suis ravi que nos chemins se soient croisés, pour notre amitié qui dure depuis notre plus tendre enfance et qui n'est pas près de s'arrêter !

Aux membres de l'équipe CNR entérobactérie : Un grand merci à Alexis Rudy et Pascaline pour votre accueil, votre soutien et votre disponibilité ainsi que vos précieux conseils.

A mes parents et mes deux sœurs, Rym et Fella, merci pour vos sacrifices et votre soutien inconditionnel tout au long du chemin parcouru, pour être toujours là dans les moments qui comptent pour moi. C'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui. Merci pour tout. Mon amour pour vous est sans faille.

A ma futur belle famille, Robert et Muriel, merci pour votre générosité et votre soutien tout au long de mes études.

Et Enfin, à Marine, ma force chaque jour, merci pour ton soutien, qui m'a poussé à surmonter tous les obstacles. Merci pour ta grande patience (surtout ces derniers mois). Avec toi, j'ai compris ce qu'est vivre pleinement sa vie, profiter de chaque instant. Merci pour tout ce que nous avons déjà partagé et pour tous nos projets futurs.

Merci à ceux que je ne cite pas mais que je n'oublie pas.





# Table des matières

Table des illustrations.....	21
Table des abréviations.....	27
I. Données bibliographiques sur la maladie de Crohn.....	37
A. Définitions.....	37
B. Facteurs environnementaux.....	39
a) Le tabagisme.....	39
b) Alimentation.....	39
c) Facteurs génétiques.....	41
C. Microbiote intestinal.....	47
a) Microbiote intestinal et maladie de Crohn.....	47
b) E.coli Adhérent Invasif et maladie de Crohn.....	49
D. Épidémiologie de la MC.....	51
a) La prévalence.....	51
b) L'incidence.....	51
a) Clinique.....	53
b) Examens biologiques et histologiques.....	55
c) L'imagerie.....	57
E. Objectifs thérapeutiques et traitements disponibles.....	61
a) Traitement disponible :.....	61
b) Antibiotiques et MC.....	63
c) Antibiothérapie et AIEC.....	69
II. Objectifs de l'étude.....	73
III. Matériels et méthodes.....	81
A. Condition de culture des AIEC.....	81
B. Extraction.....	83
C. Traitement des ARN à la DNase.....	87
D. Concentration et purification des ARN bactériens.....	87



E.	Reverse-transcription des ARN.....	89
F.	PCR en temps réel.....	91
G.	Analyse statistique : .....	93
IV.	Résultats .....	95
1.	Extraction, concentration et purifications .....	95
2.	Analyse de l'impact des solvants sur les niveaux d'expressions des ARN des gènes d'intérêts.....	95
o	Le gène fliC.....	97
o	Le gène prpC.....	97
o	Le gène fimH.....	97
o	Le gène gadC.....	97
o	Les gènes citC et entA.....	97
3.	Analyse de l'impact des antibiotiques sur les niveaux d'expressions des ARN des gènes d'intérêts.....	97
o	Condition de culture « C » vs « P2 ».....	99
o	Condition de culture « R » vs « P1 ».....	99
o	Condition de culture « RCla » vs « P4 ».....	99
o	Condition de culture « Cla » vs « P3 ».....	99
o	Condition de culture « CR » vs « P5 ».....	99
V.	Discussion .....	107
VI.	Conclusion.....	115
VII.	Annexes .....	118
VII.	Références bibliographiques .....	125



## Table des illustrations

Figure 1 : Diagramme de Venn.....	36
Figure 2 : Index Chao 1 et index Shannon.....	46
Figure 3 : Représentation de la $\beta$ -diversité.....	46
Figure 4 : Carte mondiale représentant l'incidence des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.....	50
Figure 5 : Répartition française du ratio standardisé d'incidence de la maladie de Crohn entre 2000 et 2002 (59).....	50
Figure 6 : Classification de Montréal et manifestations extra-digestives de la MC.....	52
Figure 7 : Lémann Score.....	52
Figure 8 : Représentation schématique de la régulation du pH.....	74
Figure 9 : Représentation enzymatique de la chaîne enzymatique pour la fermentation des substrats oxydables citrat dépendant par E. coli.....	76
Figure 10 : Représentation schématique du fonctionnement de l'entérobactine (95).....	76
Figure 11 : Représentation schématique illustrant la synthèse et l'incorporation du L-Ara4N dans le lipide A (98).....	78
Figure 12 : Représentation schématique de la troisième étape d'extraction.....	84
Figure 13 : Représentation schématique de l'étape de concentration et de purification.....	86
Figure 14 : Protocole de la rétro transcription.....	88
Figure 15 : Représentation schématique d'une microplaque de qPCR et du contenant (mix) nécessaire pour l'amplification.....	90
Figure 16 : Représentation schématique du protocole de la PCR en temps réel.....	90
Figure 17 : Analyse de l'impact des solvants sur les niveaux d'expressions des ARN des gènes d'intérêts. *p value <0,05.....	96
Figure 18 : Représentation graphique sous forme d'histogramme de l'expression des gènes citC, gadC et prpC sous l'effet de la ciprofloxacine. *p value <0,05.....	98
Figure 19 : Représentation graphique sous forme d'histogramme de l'expression des gènes arnT et citC sous l'effet de la rifaximine. *p value <0,05.....	98
Figure 20 : Représentation graphique sous forme d'histogramme de l'expression des gènes citC et fliC sous l'effet de l'association rifaximine-clarithromycine. *p value <0,05.....	102
Figure 21 : Représentation graphique sous forme d'histogramme de l'expression des gènes citC et prpC sous l'effet de la clarithromycine. *p value <0,05.....	102



Figure 22 : Représentation graphique sous forme d’histogramme de l'expression des gènes fliC, prpC, citC, arnC, et gadC sous l'effet de l’association rifaximine ciprofloxacine. *p value <0,05. .....	104
Figure 23 : Représentation graphique sous forme d’histogramme de l'expression des gènes fimH, et entA sous l'effet de l’association rifaximine ciprofloxacine. *p value <0,05.....	106
Figure 24 : Annexe 1 : Ce graphique sous forme d’histogramme représente tous les gènes ayant une tendance vers la sous expression (A, B, C, D, E) ou sur expressions (F, G) sans différence significative. ....	118
Figure 25 : Annexe 2 : Ce graphique sous forme d’histogramme représente l’expression à tous les gènes sous l’effet d’antibiotiques sans différence significative.....	120





## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Résultats de l'analyse RNA seq de la souche CEA614S.....	72
<b>Tableau 2</b> : Souches AIEC et CMI utilisées.....	80
<b>Tableau 3</b> : séquences oligonucléotidiques des amorces spécifiques des différents gènes utilisées en PCR en temps réel. ....	92
<b>Tableau 4</b> : valeurs des P value obtenus Analyse de l'impact des solvants sur les niveaux d'expressions des ARN des gènes d'intérêts.....	100
<b>Tableau 5</b> : valeurs des P value obtenues de l'analyse de l'impact des antibiotiques sur les niveaux d'expressions des ARN des gènes d'intérêts.....	100
<b>Tableau 6</b> : <b>Annexe 3</b> : DO260/DO280 des différentes condition de culture avant et après la concentration et purification.....	122
<b>Tableau 7</b> : <b>Annexe 4</b> : DO260/DO280 des différentes condition de culture avant et après la concentration et purification.....	124



## Table des abréviations

- ADN : Acide désoxyribonucléique.
- AIEC : *Escherichia coli* adhérent invasif.
- ARN : Acide ribonucléique.
- ASCA : Anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae*.
- ATG16L1 : Autophagy-related gene 16-like 1.
- C14 : Carbone 14.
- CDAI : Crohn's Disease Activity Index.
- CMH II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II.
- CRP : Protéine C réactive.
- *E. coli* : *Escherichia coli*.
- IL-2 : Interleukine 2.
- IL-6 : Interleukine 6.
- IL-8 : Interleukine 8.
- IL1 : Interleukine 1.
- IRGM : Immunity Related GTPase M.
- IRM : Imagerie à résonance magnétique.
- L-AraN4 : 4-amino-4-désoxy-l-arabinose.
- LB : Lysogeny broth
- LPS : Lipopolysaccharide.
- LRR : Leucine-Reach Repeat.
- LRRK2 : Leucine-rich repeat kinase 2.
- MAMP : Microbial-associated molecular pattern.
- MC : Maladie de Crohn.
- MDP : Muramyl dipeptide.
- MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.
- NF- $\kappa$ B : Nuclear factor-kappa B.
- NOD-like : NLR, Nucleotide oligomerization domain-like receptor.
- NOD2 : Nucleotide-binding oligomerization domain 2.
- p-ANCA : Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles.



- PNN : Polynucléaire neutrophile.
- PRR : Pattern recognition receptor.
- qPCR : Réaction en chaîne par polymérase en temps réel.
- RCH : Rectocolite hémorragique.
- RR : Risque relatif.
- RT : Rétro transcriptase.
- TNF-  $\alpha$  : Le facteur de nécrose tumorale alpha.
- TLR : Toll-Like Receptor.
- ULK1 : Unc-51 like autophagy activating kinase 1.
- UPR : Système unfolded protein response.



La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI), d'étiologie imparfaitement connue pouvant conduire à une destruction intestinale et dont les conséquences sur la qualité de vie des patients sont considérables. La physiopathologie résulterait d'une interaction anormale entre le microbiote intestinal et le système immunitaire de l'hôte sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux.

La MC reste un enjeu important de santé publique par son incidence en augmentation dans les pays développés, par le réel handicap qu'elle entraîne chez les sujets atteints et par le manque de thérapeutique permettant une guérison de la maladie car les traitements actuels ne sont malheureusement pas curatifs et permettent uniquement la prise en charge des poussées ou le maintien de la rémission.

Une dysbiose constante a été observée au sein du microbiote intestinal des patients atteints de la MC avec une augmentation de certains groupes bactériens pouvant favoriser les symptômes de la maladie. Au sein de ce microbiote, les *Escherichia coli* adhérents et invasifs (AIEC) colonisent la muqueuse iléale de certains patients atteints de la MC et sont capables de survivre et se multiplier à l'intérieur des macrophages ce qui favoriserait le développement d'une réponse inflammatoire inappropriée.

Face à ces bactéries l'utilisation d'antibiotiques pourrait être une option thérapeutique envisageable. Parmi les différents antibiotiques utilisés dans la prise en charge des patients atteints de la MC, la ciprofloxacine, la clarithromycine et la rifaximine sont parmi les plus utilisés.

La ciprofloxacine est une molécule présentant une bonne diffusion intra-cellulaire et dont le rôle anti-inflammatoire a déjà été mis en évidence. Tout comme la rifaximine, un antibiotique à faible absorption gastro-intestinale et ayant déjà fait ses preuves dans le traitement de la MC. L'association de ces molécules est actuellement évaluée dans le cadre de l'étude TEOREM (essai clinique contrôlé randomisé) sur des patients atteints de la maladie de Crohn et porteurs de bactéries AIEC. Parmi les autres classes d'antibiotiques, les macrolides ont des effets immunomodulateurs qui peuvent avoir un effet bénéfique dans le cadre de la MC (1). Des essais cliniques ont montré que la prise de clarithromycine chez les patients atteints de MC diminuait l'index d'activité de la MC et n'avait pas d'effets secondaires chez les patients. (1,2)

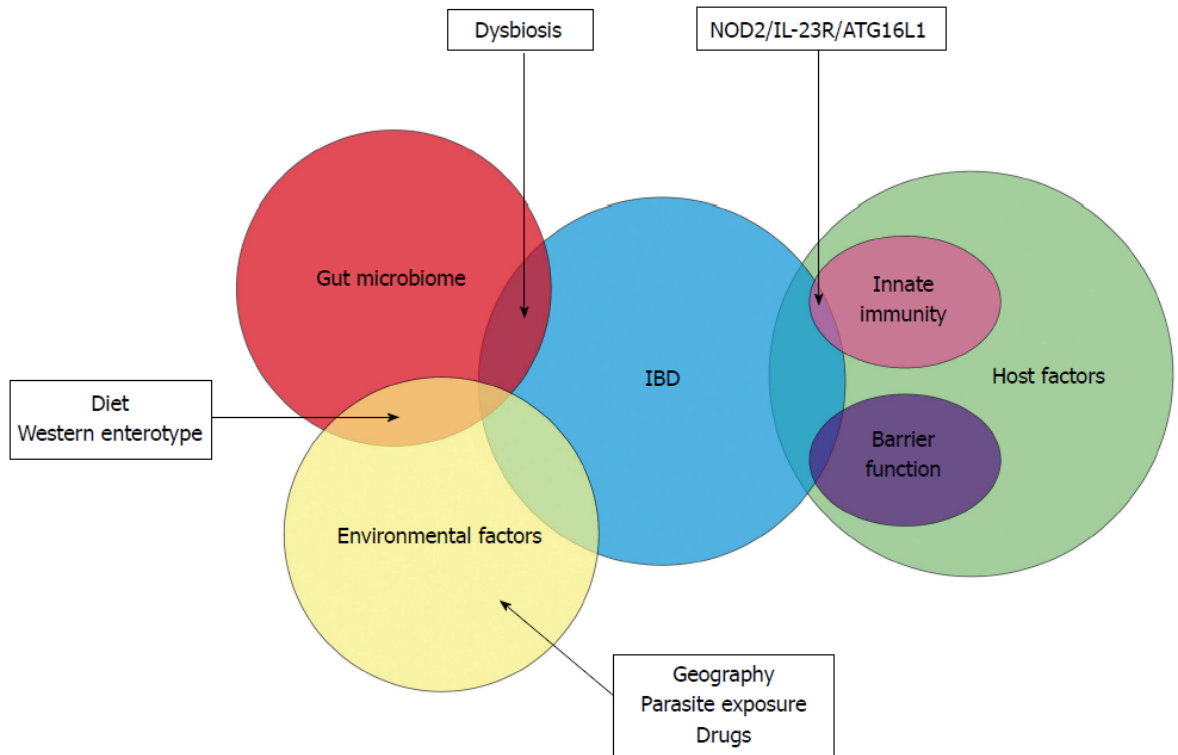




Des premiers travaux menés au laboratoire sur l'effet de la ciprofloxacine, de la rifaximine et de la clarythromycine ont montré un effet sur la virulence de souches AIEC pour la rifaximine et la clarythromycine à des doses sub-inhibitrices. Ces 2 antibiotiques semblent diminuer *in vitro* les capacités d'adhésion, d'invasion et de survie en macrophages des AIEC. Une première étude sur l'effet sur le transcriptome des AIEC a été menée sur une souche AIEC représentative et a montré un effet sur la transcription de plusieurs gènes impliqués potentiellement dans la virulence des AIEC. Afin de compléter ces résultats, nous avons souhaité étudier cet effet sur une collection de souches d'AIEC à l'aide d'une stratégie de RT qPCR.



# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE



**Figure 1 :** Diagramme de Venn.

Illustration du rôle du microbiote intestinal, de l'hôte et des facteurs environnementaux dans la physiopathologie MICI. NOD2 (Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2), ATG16L1 (Autophagy related protein 16-like 1) et IL-23R (Interleukin 23 receptor) sont des facteurs de susceptibilité génétique démontrables présents chez une petite proportion de patients atteints d'une MICI(6).

# **I. Données bibliographiques sur la maladie de Crohn**

## **A. Définitions**

La MC a été décrite en 1932 par le docteur Burrill B. Crohn, comme une « iléite terminale ou régionale » (3) et au même titre que la rectocolite hémorragique et que la colite indéterminée, elle appartient à la famille des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et se caractérise par une atteinte segmentaire et transmurale de la paroi digestive. L'iléon terminal et le côlon sont le plus souvent touchés, mais l'atteinte peut être hétérogène dans sa présentation clinique (4).

La MC est une affection altérant la qualité de vie et potentiellement responsable de véritables incapacités et handicaps (5). Elle se manifeste par des symptômes cliniques variés et par une évolution chronique avec une succession de poussées plus ou moins intenses, entrecoupées de phases de rémission plus ou moins longues. L'arsenal thérapeutique actuel n'est pas curatif et permet malheureusement uniquement la gestion et la stabilisation de l'évolution de la MC et reste un enjeu important de santé publique.

La MC est une maladie multifactorielle (figure 1) dont la physiopathologie est encore mal connue qui touche des patients prédisposés génétiquement. Elle résulterait d'une interaction anormale entre le microbiote intestinale et le système immunitaire sous l'influence de plusieurs facteurs environnementaux (6).



## **B. Facteurs environnementaux**

### **a) Le tabagisme**

Le tabagisme est vraisemblablement le facteur de risque le plus incriminé avec deux fois plus de risques de développer la MC par rapport aux non-fumeurs (7), même si son mécanisme d'action est imparfaitement compris, probablement lié à son action sur la muco-sécrétion, la perméabilité intestinale. Chez l'homme, la nicotine diminue la production d'eicosanoïdes muqueux et certaines cytokines pro-inflammatoires par des cellules mononuclées humaines (IL-2, TNF-  $\alpha$  et IL-8). De plus, une réduction du tonus musculaire et la diminution de l'activité contractile de l'intestin en raison de la libération d'oxyde nitrique. Les macrophages des fumeurs expriment un déficit fonctionnel sélectif dans leur capacité à éliminer les bactéries intracellulaires (8). Le tabagisme diminuerait l'efficacité thérapeutique de certains traitements (Infliximab) (9) et augmenterait le risque de poussées, d'hospitalisation ainsi que les complications (10) et les récurrences post-opératoire (11).

### **b) Alimentation**

Son rôle n'a pas encore été établi, mais certaines habitudes alimentaires notamment une alimentation riche en fibres aurait un effet bénéfique et serait un facteur protecteur de la survenue de la MC (12). Cet effet résulterait de la transformation de ces fibres en acides gras à courtes chaînes, en particulier le butyrate, capables d'inhiber la transcription de médiateurs pro-inflammatoires (13) et de limiter la translocation des *E. coli* dans les plaques de Peyer à travers les cellules M (14).

A l'inverse, une alimentation riche en graisses, en acides gras polyinsaturés ( $\Omega 6$ ), protéines animales et en sucres, favoriserait la survenue de la maladie (15). En modèle murin, un régime riche en sucres et en graisses serait associé à un déséquilibre de la flore intestinale favorisant l'inflammation (diminution des Firmicutes) (16) (17).22/09/2021 01:12:00





Un apport en Fer par voie oral (et d'autres métaux lourds) aurait également un effet (18) en augmentant l'inflammation colique via une voie impliquant l'IL-6 et le stress oxydant (19).

D'autres facteurs de risque seraient impliqués dans la pathogénèse de la MC, notamment la carence en vitamine D qui augmenterait l'inflammation colique (20) et la prise d'antibiotique pendant les premières années de vie qui favoriserait un déséquilibre au niveau de la flore digestive avec une augmentation des *Bacteroidetes* et une diminution des *Firmicutes* (21).

### **c) Facteurs génétiques**

#### **1. Généralité**

Plusieurs études ont permis d'identifier l'impact de la génétique dans la survenue de la MC et plus de 140 loci ont été identifiés comme potentiellement associés à la maladie (22), (23). Moller *et al* ont mis en évidence un risque relatif (RR) à 7,8 de développer la maladie pour une parenté au premier degré, un RR à 2,4 pour une parenté au second degré, et un RR à 1,9 pour une parenté au troisième degré. L'histoire familiale notamment le degré de parenté a été corrélé aux risques de survenue de la MC (24).

De nombreux micro-organismes pathogènes présents dans l'environnement sont en contact permanent avec notre organisme. Afin de se protéger des infections, des réponses immunitaires sont mises en place grâce à l'action conjointe et coordonnée du système immunitaire inné et du système immunitaire adaptatif. Il existe dans notre organisme des récepteurs de l'immunité innée appelés PRR qui reconnaissent des motifs moléculaires conservés au sein des espèces microbiennes (MAMP). Parmi les PRR, on distingue notamment des protéines transmembranaires tels que les récepteurs de type Toll (TLR) ainsi que des récepteurs cytoplasmiques comme les récepteurs NOD-like.



Cette liaison entre les PRR et les MAMP initie les réponses immunitaires nécessaires à la défense de l'hôte aboutissant à la transcription de médiateurs pro-inflammatoires (cytokines et chimiokines pro- inflammatoires, IL1, protéines anti-microbiennes), mais également au développement d'une immunité adaptative spécifique (25). Ces récepteurs sont exprimés par les cellules épithéliales et par les cellules présentatrices d'antigènes (les cellules dendritiques, les macrophages). Certaines mutations peuvent survenir au niveau du système immunitaire entérique. Ces dysfonctionnements peuvent aboutir à des pathologies touchant la paroi digestive notamment les MICI.

## 2. NOD2

NOD2 est essentiellement exprimé dans les cellules de Paneth et les cellules immunitaires telles que les macrophages et possède un domaine LRR impliqué dans la reconnaissance du muramyl dipeptide (MDP) constituant de la paroi bactérienne (26). Chez les patients atteints de MC, trois principaux polymorphismes dans le gène NOD2 ont été mis en évidence. Ils codent des protéines NOD2 variantes ou tronquées (27), (28). Ces dysfonctionnements favoriseraient, après fixation du MDP, l'hyperactivation de la voie NF- $\kappa$ B et conduirait à une plus grande susceptibilité à l'inflammation intestinale (29).

Chez des patients porteurs de ces polymorphismes, le risque de développer une MC est 2 à 4 fois supérieur chez les sujets hétérozygotes, et environ 40 fois supérieur chez les sujets homozygotes pour un allèle à risque ou hétérozygotes composites par rapport à des sujets non porteurs de ces polymorphismes (26). NOD2 interagit aussi avec la protéine de l'autophagie ATG16L1 (30). Dans les cellules dendritiques, l'interaction entre la protéine ATG16L1 et NOD2 tronqué entraîne un défaut d'autophagie ; la cellule n'élimine plus efficacement les bactéries intracellulaires, et un défaut de présentation des antigènes par le CMH II (31).



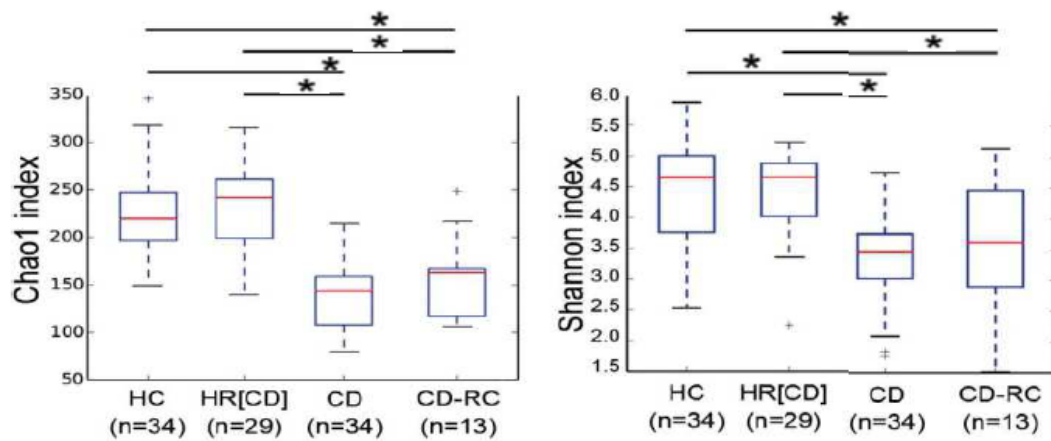
### **3. L'autophagie**

L'autophagie est nécessaire au maintien de l'homéostasie ; elle permet la dégradation et le recyclage d'éléments cytoplasmiques tels que des organites (mitochondrie, peroxyosome) ou des agrégats protéiques par les lysosomes. L'autophagie joue également un rôle important dans la défense immunitaire en éliminant des pathogènes intracellulaires (32). Plusieurs polymorphismes ont été identifiés en lien avec l'autophagie et associés à la MC. ATG16L1 est un gène qui code pour une protéine nécessaire à l'élongation de la membrane de l'autophagosome via la formation d'un complexe protéique (33). Plusieurs polymorphismes ont été identifiés dans la MC résultant d'un défaut de la formation de l'autophagosome et d'une plus grande susceptibilité à l'inflammation intestinale (34). D'autres gènes associés à la MC ont été identifiés tels que IRGM (35), ULK1 (36) et LRRK2 (37).

### **4. Autres gènes**

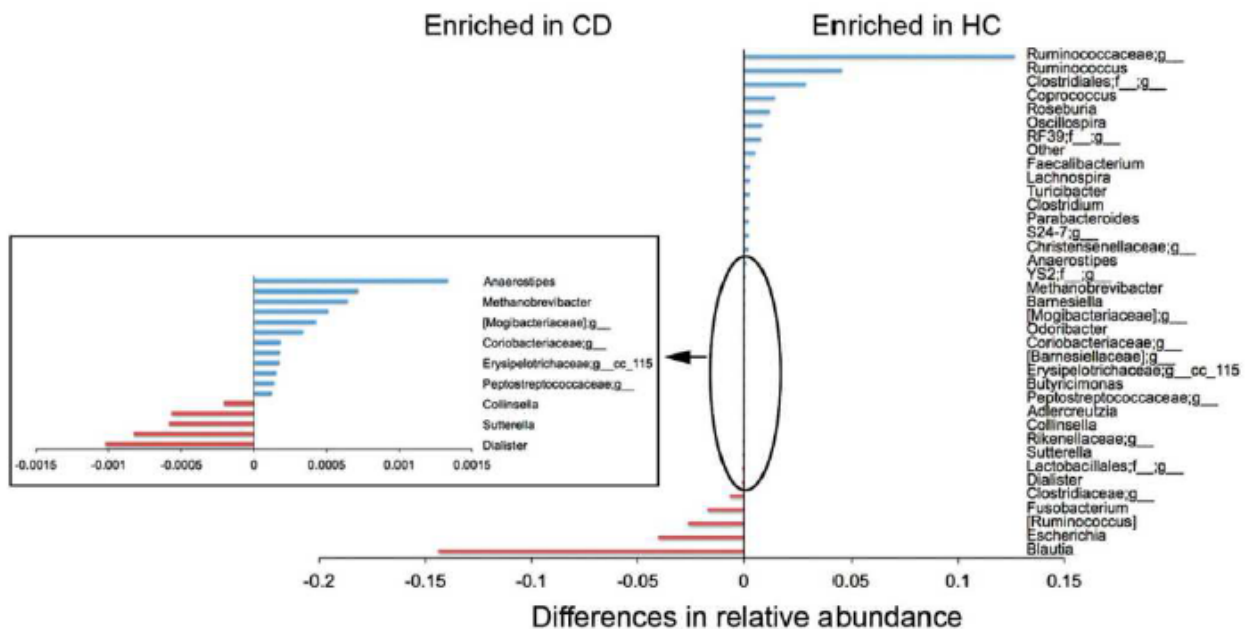
Il existe d'autres anomalies impliquées dans la MC (38), tels que le système UPR et le stress du réticulum endoplasmique nécessaire pour maintenir l'homéostasie cellulaire et rétablir une fonction normale de la cellule. Ce système est capable d'activer la production de molécules chaperonnes et de dégrader les protéines mal repliées, ainsi que de ralentir la traduction protéique. Dans le cas où le stress cellulaire se prolonge et où le système UPR ne parvient pas à restaurer l'équilibre cellulaire, alors ce dernier est capable d'induire la mort cellulaire par apoptose (38).

On peut également citer d'autres systèmes dont le dysfonctionnement est associé avec la MC tel que le système ubiquitine-protéasome impliqué dans la dégradation des protéines intracellulaires. En effet, les protéases ainsi que leurs inhibiteurs régulent la composition du microbiote, la réponse immunitaire et la fonction barrière de l'intestin (39), (40).



**Figure 2 :** Index Chao 1 et index Shannon.

Richesse du microbiote chez les sujets sains contrôles (HC), chez les sujets sains relatifs (parents au premier degré de patients atteints de la, HR(CD)), chez les patients atteints de la MC (CD) et chez les sujets atteints de la MC en rémission (CD-RC). L'index Chao1 permet d'estimer la richesse microbienne et l'index Shannon permet d'estimer la richesse et l'uniformité microbiennes. \**p value* < 0,05 (46).



**Figure 3 :** Représentation de la  $\beta$ -diversité.

Proportions des espèces bactériennes chez les sujets sains (« HC ») et les sujets atteints de la MC (« CD ») (48).

## C. Microbiote intestinal

### a) Microbiote intestinal et maladie de Crohn

Le microbiote intestinal, autrefois appelé microflore intestinale, est l'ensemble des bactéries, archaebactéries, virus, champignons, parasites qui vivent dans le tube digestif. On estime qu'un individu héberge entre  $10^{11}$  et  $10^{12}$  bactéries par gramme de contenu colique (41). Son rôle est important dans la maturation du système immunitaire et la défense contre les agents pathogènes et dans la fermentation des sucres et des protéines ainsi que le métabolisme des acides biliaires.

Une altération qualitative et quantitative de cet écosystème intestinal a été mise en évidence chez des patients atteints de MC (42). En effet on constate, une diminution de la richesse des espèces bactériennes ( $\alpha$ -diversité), ainsi qu'une dysbiose ( $\beta$ -diversité) (Figure 2 et figure 3)) (43).

D'une part, cette altération a pour conséquence une diminution des bactéries dites bénéfiques comme par exemple *Faecalibacterium prausnitzii* (44), *Lactobacillus* spp et *Bifidobacterium* spp aux capacités anti-inflammatoires (45) et d'autres genres tels que *Methanobrevibacter*, *Oscillospira* et la famille des *Christensenellaceae* via leur production de butyrate permettent la régulation du système immunitaire intestinal (43).

D'autre part, une augmentation de bactéries dites pathogènes (46), (47) a été constatée en proportions plus importantes chez les patients atteints de la MC tels que *Fusobacterium* spp ou *Escherichia* spp. Ce déséquilibre a pour conséquence la colonisation par d'autres espèces bactériennes entraînant une inflammation chronique. Parmi les espèces augmentées, des *E. coli* présentant des caractéristiques particulières d'adhésion aux cellules intestinales, d'invasion et de survie en macrophage ont pu être identifiées.





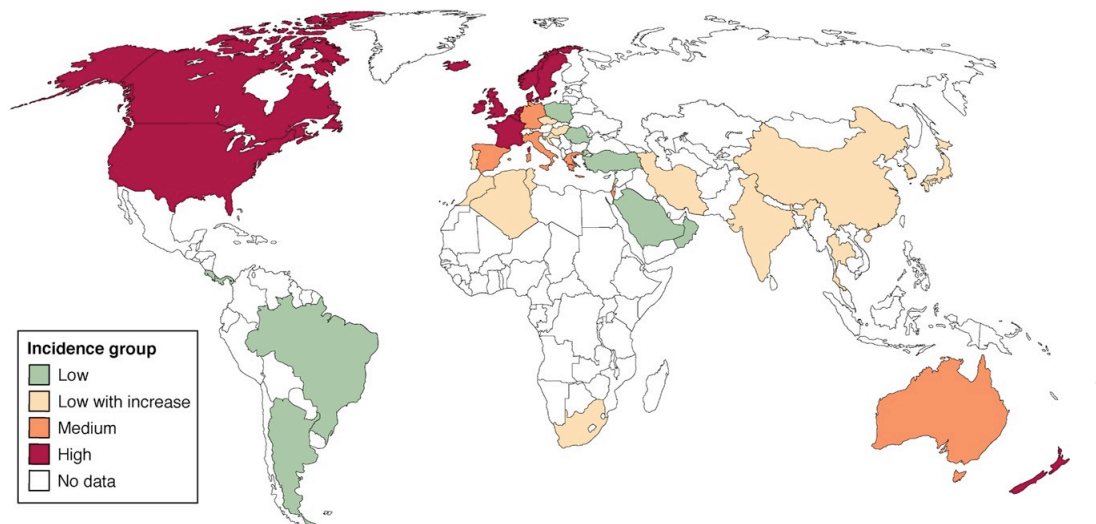
## **b) *E.coli* Adhérent Invasif et maladie de Crohn**

*E. coli* est une espèce de bacille à Gram négatif de l'ordre des *Enterobacterales*. Chez les patients atteints de MC, un pathobionte particulier d'*E. coli*, nommé *E. coli* adhérent invasif (AIEC) a été mis en évidence à partir de biopsies de la muqueuse iléale (47).

Les AIEC ont une capacité à adhérer, envahir les cellules épithéliales intestinales par un phénomène de macropinocytose et sont capables d'altérer la barrière épithéliale (48) et d'entraîner la formation de granulomes (49). D'une part, cette capacité d'adhésion est due notamment aux pili de type 1 (50) par reconnaissance du récepteur humain CEACAM6 surexprimé chez les patients atteints de la MC (51). Les flagelles situés à la surface des AIEC favorisent la mobilité et jouent également un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales (52). D'autre part, les AIEC se répliquent et survivent dans les macrophages sans induire d'apoptose et augmentent la sécrétion de TNF- $\alpha$  et de cytokines pro-inflammatoires.

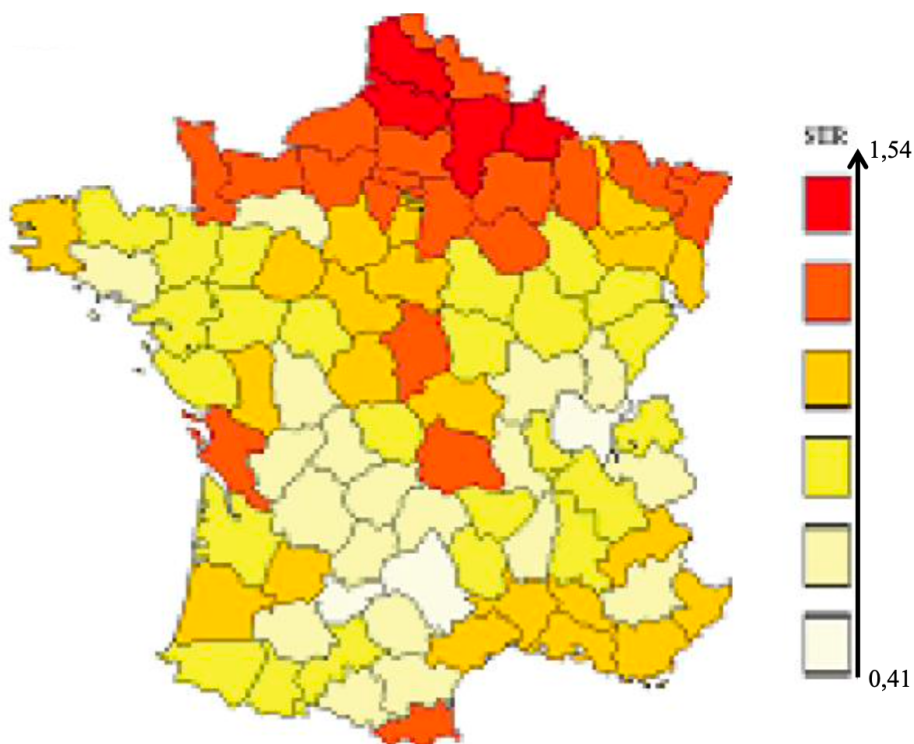
Darfeuille-Michaud *et al* ont retrouvé une prévalence de cette colonisation de l'ordre de 21,7% des lésions chroniques iléales de patients atteints de la MC contre 6,2% chez des sujets sains (53). Chez des patients atteints de la MC les AIEC ont été retrouvés dans 36,4% des lésions précoces et 22,2% des muqueuses saines. Au niveau de la muqueuse colique, des souches AIEC ont été retrouvées chez 3,7% des patients atteints de MC, 0% des patients atteints de colite ulcéreuse et 1,9% chez des patients sains (54).

Les AIEC sont associés spécifiquement à la muqueuse iléale des patients atteints de la MC (53) et leur prévalence est variable en fonction du stade de la maladie, et de son évolution faisant d'eux une cible thérapeutique intéressante à développer (55).



**Figure 4** : Carte mondiale représentant l'incidence des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Le rouge fait référence à une incidence annuelle supérieure à  $10/10^5$ , l'orange à une incidence de 5 à  $10/10^5$ , le vert à une incidence inférieure à  $4/10^5$ , le jaune à une incidence faible qui augmente continuellement. L'absence de couleur indique l'absence de données (56).



**Figure 5** : Répartition française du ratio standardisé d'incidence de la maladie de Crohn entre 2000 et 2002 (59).

## **D. Épidémiologie de la MC**

### **a) La prévalence**

Plus importante en Europe et en Amérique du Nord (respectivement à 8,3-250 cas et 44-201 cas pour 100 000 habitants et est en augmentation dans les pays en voie de développement notamment en Asie, en Océanie et au Moyen-Orient (56).

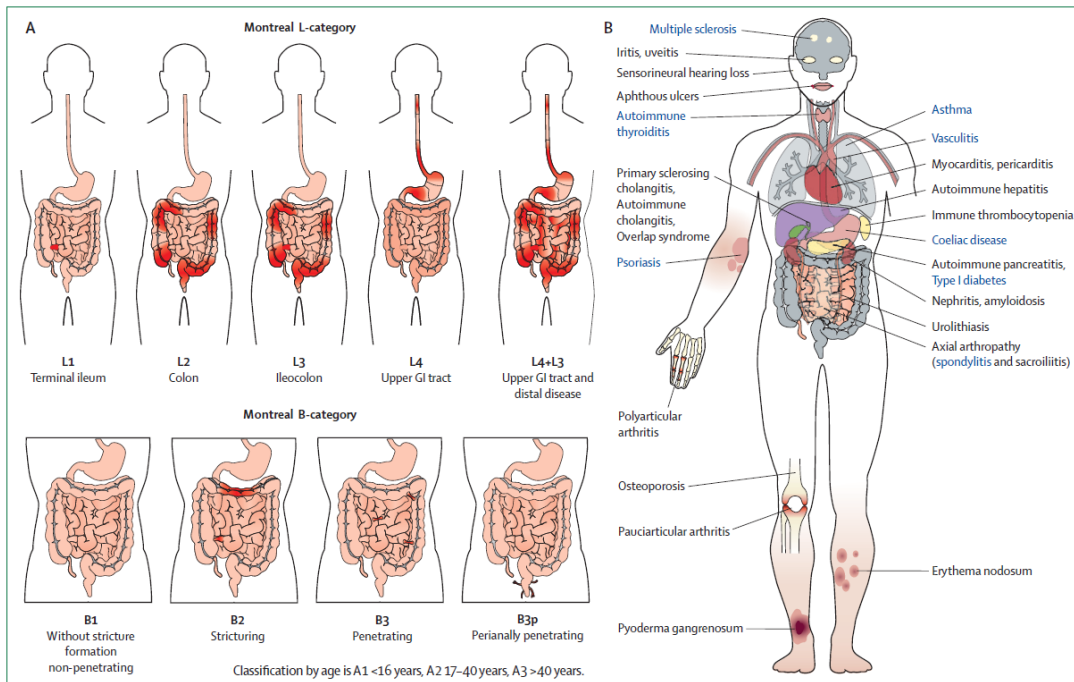
### **b) L'incidence**

La MC est une maladie qui peut se déclarer à tous les âges de la vie mais le pic d'incidence se situe le plus souvent chez l'adulte jeune, entre 20 ans et 30 ans (56). Néanmoins il existe des cas de MC pédiatrique avec une légère prédominance chez les sujets de sexe féminin (sex-ratio F/H) de 1,3 en France).

La population caucasienne est la plus touchée. Les populations hispaniques et asiatiques sont moins touchés mais l'incidence est en augmentation dans ces groupes (57).

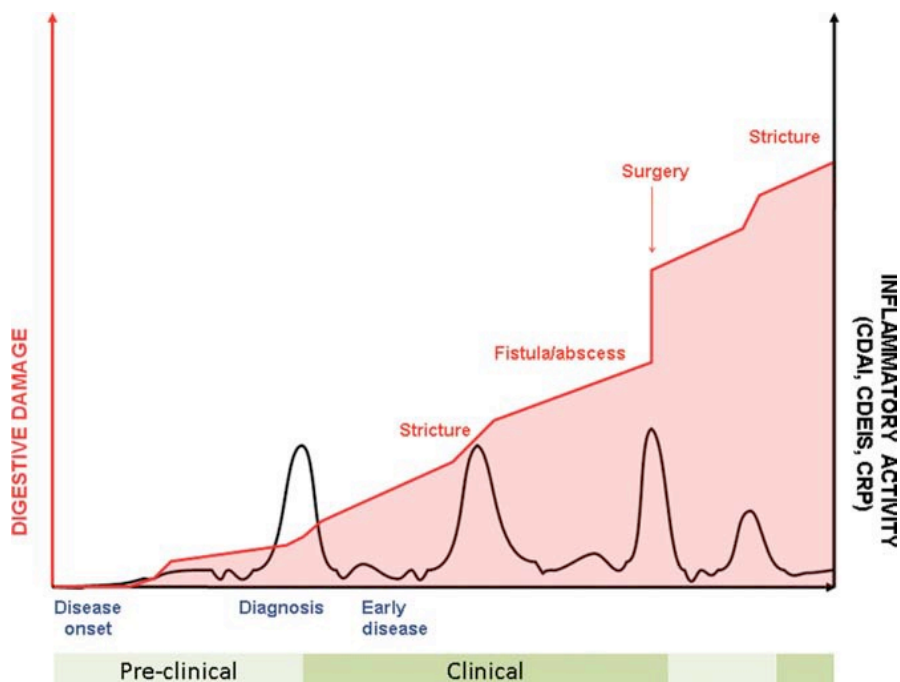
En Europe et en Amérique du Nord l'incidence est globalement similaire, avec respectivement 0,3 à 12,7 cas et de 0 à 20,2 cas pour 100 000 habitants (57) (Figure 4).

Un gradient Nord-Sud est classiquement décrit (56). Dans le continent Américain, les incidences les plus importantes sont observées au Canada et au nord des Etats-Unis en comparaison du sud du continent. On observe également une incidence moyenne plus élevée dans le nord de l'Europe que dans le sud (58). En France, ce gradient nord-sud a également été mis en évidence avec une incidence plus importante dans le Nord (59) (figure 5).



**Figure 6 :** Classification de Montréal et manifestations extra-digestives de la MC.

A : localisation des lésions (L1, L2, L3, L4, L4+3), phénotype (B1, B2, B3, B3p), âge du patient au diagnostic (A1, A2, A3). B : Représentation des manifestations extra-digestives et troubles auto-immuns associés (bleu) (63).



**Figure 7 :** Lémann Score.

Évolution de l'atteinte digestive de la maladie de Crohn au cours du temps (60).

## **E. Diagnostic**

Le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques, endoscopiques, radiologiques et histologiques ainsi que leur évolution dans le temps. La maladie peut être également révélée par des complications telles qu'une sténose (syndrome sub-occlusif) ou un abcès intra-abdominal secondaire à une fistule.

### **a) Clinique**

La symptomatologie de la MC est très variée et aspécifique. Elle peut toucher l'intégralité du tube digestif et les manifestations pouvant être observées dépendent de la localisation et la gravité des lésions. La MC évolue de manière chronique avec une succession de phases actives, dont l'intensité est variable, et de phases de rémission (60). Elle peut être révélée par des complications telles que des fistules, ou des lésions ano-périnéales (61). (Figure 6).

En fonction de la localisation des lésions, de leur phénotype et de l'âge des patients au moment du diagnostic, la classification de Montréal permet de classer la MC (figure 7).

Dans sa phase inaugurale, la MC se manifeste fréquemment par des diarrhées chroniques et des douleurs abdominales. D'autres signes peuvent être observés tel qu'une fièvre, une asthénie et un amaigrissement et un tiers des patients atteint de MC souffrent de signes extradiigestifs notamment des atteintes articulaires (20 à 30 % des patients) et des signes cutanés. Des manifestations ophtalmologiques (uvéite, épisclérite, sclérite) et des manifestations hépatobiliaires (cholangite sclérosante primitive) ont été observées (62).



## b) Examens biologiques et histologiques

Sur le plan biologique, un syndrome inflammatoire avec une CRP élevée est observé dans 75 % des cas au moment du diagnostic de la MC (64) et lors des complications infectieuses. Sa diminution est en faveur d'une bonne réponse thérapeutique. Cependant, la CRP n'est pas spécifique du tube digestif et reflète l'inflammation systémique. Ainsi d'autres marqueurs plus sensibles existent et reflètent mieux la migration des PNN à travers la paroi intestinale (36) tel que la calprotectine fécale (37). En effet le risque d'être atteint de la MC est <1% si la calprotectine fécale est inférieure à 40 µg/g (38). A l'inverse un seuil de 250 µg/g est associé avec la présence de lésions significatives dans la MC (39).

A cela se rajoute la numération-formule sanguine (NFS) où une anémie, une hyperleucocytose et une thrombocytose peuvent être observées. L'évaluation de l'état nutritionnel est à prendre en compte pour pallier les carences en vitamines et en micronutriments.

La sérologie reste un outil en perpétuel développement et pourrait constituer un outil diagnostique fiable. Certains anticorps ont montré une spécificité supérieure à 88% pour la RCH tels que des anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (p-ANCA) alors que les anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) ont montré une spécificité supérieure à 90 % pour la MC. La valeur prédictive d'une MC en cas de résultat ASCA<sup>+</sup>/p-ANCA<sup>-</sup> est de l'ordre de 88 %. En effet, l'association entre ses deux anticorps pourrait constituer un marqueur de diagnostic différentiel entre MICI et non MICI ainsi qu'entre MC et RCH. Cependant, ces tests manquent de sensibilité et leur négativité ne permet pas d'exclure la présence d'une MICI (65), (66).





## c) L'imagerie

### 1) L'endoscopie

Bien qu'invasifs les examens endoscopiques ont un rôle important pour le diagnostic positif et différentiel de la MC, et permettent de déterminer le pronostic et d'évaluer la réponse au traitement.

- L'iléocoloscopie par voie basse : L'iléo-coloscopie par voie basse avec biopsie est l'examen de référence pour établir le diagnostic et pour évaluer la topographie et la sévérité de la MC. Elle permet de mettre en évidence les principales lésions de MC (les pseudo-polypes, les ulcérations aphthoïdes, les sténoses) et ainsi confirmer le diagnostic. Les biopsies multiples du côlon et de l'iléon terminal sont par la suite envoyées en anatomo-pathologie à la recherche de signes histologiques (notamment de granulomes épithélioïdes) (67), (68).
- L'endoscopie par voie haute : L'endoscopie par voie haute oeso-gastro-duodénale avec biopsies étagées est recommandée à la recherche de localisations hautes de la maladie bien que la fréquence de celles-ci soit rare. Elle est généralement effectuée en même temps que l'iléo-coloscopie en profitant de l'anesthésie générale (67), (43).
- L'entéroscopie par voie haute : L'entéroscopie par voie haute n'est en général pas indiquée dans le diagnostic, en dehors de rares cas de suspicion de sténose au niveau jéjunal (67).

### 2) Examens radiologiques

Suite à l'avènement de l'endoscopie la place des examens radiologiques dans le cadre de la MC est réduite, mais ils restent cependant utiles dans certains cas, notamment lorsque l'iléo-coloscopie a été incomplète ou dans le cadre de l'urgence en cas de suspicion d'obstruction, de perforation, de sténose ou encore l'exploration de l'intestin grêle distal (68), (69).



### 3) Vidéocapsule endoscopique

A l'aide d'une petite capsule à usage unique fabriquée avec des matériaux biocompatibles et résistants à la digestion et munie d'une caméra vidéo, l'examen par vidéocapsule endoscopique peut être utile dans certains cas difficiles, pour l'exploration de l'intestin grêle lorsque les premières investigations ont été négatives. Cette technique est contre-indiquée en cas de signes occlusifs cliniques ou de sténose prolongée (68), (69).

### 4) Les autres techniques

- L'entéro-scanner : il présente un examen de choix pour la recherche de possibles complications digestives ou extra-digestives (69), (70).
- L'imagerie à résonance magnétique : L'entéro-IRM moderne a une résolution similaire au scanner et présente l'avantage d'être non irradiant et il ne nécessite pas l'utilisation de produits de contraste. Cette technique peut être utile à l'exploration de l'intestin grêle mais également pour la recherche des ulcérations, des abcès et des trajets fistuleux ou encore dans le suivi évolutif des patients (69), (70).
- L'échographie et le Doppler : ils sont utiles pour rechercher des complications telles que les abcès et les fistules (69), (70). En effet ces techniques permettent l'exploration de la paroi des viscères.

L'examen de référence dans le diagnostic de la MC reste actuellement l'endoscopie qui permet d'apprécier la topographie des lésions et d'évaluer la sévérité, néanmoins, d'autres techniques existent mais leurs intérêts restent limités dans certains cas particuliers ou les résultats de l'endoscopie ne sont pas concluants. Les techniques radiologiques, n'ont pas intérêt sauf dans certains cas particuliers (échec de l'endoscopie, sténose infranchissable, exploration



de l'intestin grêle (transit)). L'entéro-scanner et l'entéro-IRM sont utiles dans l'exploration initiale de l'intestin grêle et dans l'évaluation précise des complications digestives (70).

## **E. Objectifs thérapeutiques et traitements disponibles**

Les traitements actuels de la MC ne sont pas curatifs et permettent uniquement de maintenir une rémission clinique et endoscopique. Elle nécessite une thérapeutique prise au long cours, ce qui engendre un risque de complications liées aux traitements. Cette rémission clinique et endoscopique est appréciée par la cicatrisation des lésions intestinales visualisées par endoscopie et l'amélioration clinique.

Plusieurs stratégies existent et peuvent être employées en fonction de l'état du patient de la localisation, de l'activité et de la sévérité de la maladie. Ainsi une stratégie dite « step-up » qui consiste à l'utilisation d'un schéma thérapeutique de plus en plus lourd est employée dans les formes légères de la maladie. Ce schéma thérapeutique est poursuivi jusqu'à atteindre l'objectif souhaité. Dans les formes modérées, la stratégie dite « en escalier accéléré » est employée et consiste à une accélération plus rapide des stratégies thérapeutiques. Enfin, la stratégie « top-down » est utilisée dans les formes sévères et consiste dans un premier temps à maximiser le traitement afin d'atteindre les objectifs souhaités pour ensuite le diminuer (71).

### **a) Traitement disponible :**

Les corticoïdes sont employés dans la gestion des poussées. Les principales molécules utilisées sont le budésonide et la prednisolone pour leurs effets symptomatiques en traitement d'induction de la rémission. Cependant, ils ne peuvent pas constituer un traitement de fond de la MC et de nombreux effets indésirables ont été signalés suite à leur utilisation. Leurs mécanismes d'action ne sont pas parfaitement élucidés, Berrebi *et al* considèrent que les corticoïdes seraient capables d'inhiber certaines fonctions des macrophages en réponse à une stimulation par des PAMPs en modulant la voie NFκB (72). L'arsenal thérapeutique comprend également des molécules immunomodulatrices. Ces molécules sont utilisées en cas de résistance aux corticoïdes et pour le maintien de la rémission. L'azathioprine,



le 6-mercaptopurine, le méthotrexate et des anti-TNF (l'infliximab et l'adalimumab) peuvent constituer une alternative thérapeutique mais d'autres molécules existent, telles que des anticorps anti-intégrine (natalizumab, vedolizumab), ou encore l'ustekinumab (anti-corps anti-Interleukine 12/23 p40) (71). Ces classes thérapeutiques ont une action cytotoxique et de nombreux effets indésirables graves sont associés à leur utilisation au long cours.

La chirurgie est une alternative thérapeutique qui est employée dans les formes compliquées de la maladie ou en cas d'échec des traitements médicamenteux. Cela consiste à l'exérèse des lésions présentes dans l'intestin. Près de 50% des patients atteints de la MC subiront une intervention chirurgicale dans les 10 ans suivant le diagnostic (73). Certains patients requièrent des interventions chirurgicales à plusieurs reprises due aux taux de récurrences non négligeables sur l'intestin avec des conséquences lourdes sur la vie quotidienne notamment le syndrome du grêle court.

L'utilisation de certaines levures tel que *Saccharomyces cerevisiae* peut constituer un autre moyen thérapeutique. Sivignon *et al* ont montré sur un modèle murin que l'utilisation de cette probiotique inhiberait fortement l'adhésion et la colonisation des AIEC aux entérocytes. Ces effets étaient accompagnés d'une diminution de la libération de cytokines pro-inflammatoires par la muqueuse intestinale (74).

## **b) Antibiotiques et MC**

Actuellement, les traitements antibiotiques utilisés dans le cadre de la MC ont pour but de traiter les infections bactériennes pouvant apparaître à la suite de complications ou suite à une intervention chirurgicale (75). Le traitement par les antibiotiques pose de nombreux problèmes car ces derniers pourraient favoriser l'apparition de résistances bactériennes, de dysbiose intestinale ou la prolifération de bactéries pathogènes. Cependant, au vu de l'implication des AIEC dans cette maladie, l'utilisation des antibiotiques pourrait être une approche intéressante. Ainsi, plusieurs antibiotiques ont été évalués dans différentes études pour traiter les patients atteints de MC et porteurs d'AIEC tel que la ciprofloxacine, le métronidazole, la rifaximine ou encore la clarithromycine (1,2). Parmi ces antibiotiques trois présentent une activité *in vitro* sur les Entérobactéries et donc potentiellement sur les AIEC, la rifaximine, la clarithromycine et la ciprofloxacine.





- **Ciprofloxacine** :

La ciprofloxacine est un antibiotique de la famille des fluoroquinolones qui présente une activité bactéricide rapide, concentration dépendante et agit même sur les bactéries quiescentes. Elle inhibe la synthèse et la réplication de l'ADN bactérien en agissant sur les Topo-isomérases II et IV. Elle inhibe également l'ARN polymérase par formation de chélates avec les ions bivalents des bactéries. Le spectre d'action de cette molécule couvre la plupart des bactéries Gram Positif et Négatif, ainsi que les germes intracellulaires.

Au niveau de ses paramètres pharmacodynamiques, la ciprofloxacine présente une bonne résorption intestinale, rapide et importante avec une biodisponibilité orale aux alentours de 100%, une excellente diffusion tissulaire intracellulaire. Elle présente un métabolisme hépatique et une élimination mixte (rénale et fécale). Ses effets indésirables sont l'hypersensibilité qui est l'effet de classe, la photosensibilisation due à la formation de radicaux libres par les UV A. Une atteinte de l'appareil locomoteur peut survenir avec des arthralgies par lésions du cartilage de conjugaison, des douleurs musculaires, et des tendinites. La ciprofloxacine jouerait un rôle anti-inflammatoire en régulant la synthèse de certaines cytokines pro-inflammatoires telles que l'interlukine-1 et TNF- $\alpha$  (76).

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'efficacité de la ciprofloxacine dans la maladie de Crohn tel que George L Arnold *et al* en 2002 qui ont montré un bénéfice chez des patients traités pendant six mois évalués par le CDAI. A savoir qu'un CDAI < 150 est en faveur d'une rémission clinique. Ainsi on retrouve un CDAI à 111,7 chez les patients traités par la ciprofloxacine comparé à un CDAI à 205,4 chez les patients ayant reçu le placebo (77).

Jie Wen Su *et al* ont réalisé une recherche bibliographique concernant l'efficacité du traitement antibiotique chez les patients atteints de MC. Au total, 15 essais cliniques randomisés contrôlés par placebo portant sur 1407 participants ont été inclus dans la méta-analyse. Une analyse groupée a révélé que par rapport au placebo, il n'y avait pas de différence significative entre les patients traités par la ciprofloxacine et le placebo (RR combiné 1,35, IC à 95 % 0,92-1,97, P = 0,12). Cependant, la ciprofloxacine présentait des avantages cliniques significatifs chez les patients présentant des fistules péri-anales (RR 1,64, IC à 95 % 1,16-2,32, p = 0,005) (78).



Au-delà de l'efficacité clinique l'utilisation des fluoroquinolones nécessite d'être limitée du fait du risque d'émergence de résistance sous traitement et de sélection de souches résistantes dans les flores résidentes, notamment chez les Staphylocoques.

- **La clarithromycine**

La clarithromycine qui appartient également à la classe des macrolides (en C 14) est un antibiotique, dérivé semi-synthétique de l'érythromycine A, de la famille des macrolides. Comme la ciprofloxacine, la clarithromycine est un antibiotique bactériostatique empêchant la croissance bactérienne en interférant avec la synthèse des protéines bactériennes. La clarithromycine est couramment utilisée pour éradiquer *Helicobacter pylori*. Cependant elle reste active contre *E. coli* à des fortes doses. En raison de sa structure chimique (6-O-méthyl-érythromycine), la clarithromycine est plutôt résistante à la dégradation par l'acide gastrique et pénètre également le mucus gastrique (79). De plus, la clarithromycine a des effets immunomodulateurs en réduisant l'inflammation. En effet, les macrolides réduisent la production des cytokines inflammatoires telles qu'IL-1, IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$ . Par ailleurs, cet antibiotique pénètre au sein des macrophages ce qui peut être intéressant afin de cibler les AIEC qui ont la capacité de survivre et de se répliquer à l'intérieur des macrophages. Inoue *et al* ont montré l'efficacité et l'effet bénéfique de la clarithromycine chez des patients atteints de la MC (1,2).

- **La Rifaximine**

La rifaximine est un produit de synthèse appartenant à la famille des rifamycines. Cet antibiotique présente une faible absorption gastro-intestinale et une plus faible diffusion dans les tissus. Il inhibe la transcription bactérienne en se liant de manière irréversible à la sous-unité  $\beta$  de l'ARN-polymérase bactérienne. Son spectre d'action est large et touche aussi bien les bacilles à Gram positif que les bacilles à Gram négatif (à forte concentration sur les Entérobactéries). Elle est efficace contre les bactéries aérobies et anaérobies. Les effets indésirables de la rifaximine sont rares du fait de sa faible biodisponibilité (80). La possibilité d'une activité bénéfique de la rifaximine dans l'inflammation intestinale chronique et la MC a été débattue et évaluée avec différentes études ayant obtenu des données prometteuses mais encore préliminaires. Des essais plus importants sont donc nécessaires. Cet antibiotique



spécifique de l'intestin pourrait représenter une alternative aux antibiotiques systémiques grâce à son profil d'innocuité favorable et à des données d'efficacité prometteuses. La rifaximine pourrait exercer, le cas échéant, un effet synergique avec les immunomodulateurs dans les MICI, agissant à la fois sur les côtés microbiens et immunologiques de l'altération de la barrière intestinale (81).

Une recherche bibliographique a été faite par Sator en 2015 et plusieurs données *in vitro* suggèrent que la rifaximine semble avoir un effet anti-inflammatoire sur la barrière intestinale, notamment par la modulation de l'expression de TNF- $\alpha$ . Cet antibiotique est également capable de limiter la virulence des bactéries et réduit l'adhésion et l'internalisation des bactéries aux cellules épithéliales. La rifaximine inhibe également la translocation bactérienne dans les ganglions lymphatiques mésentériques. De plus, plusieurs données suggèrent que les mécanismes d'action de la rifaximine dans les MICI ne se limitent pas à une activité bactéricide directe et pourrait potentiellement être redéfinie comme un modulateur de l'environnement intestinal (82).

### **c) Antibiothérapie et AIEC**

En 2017, Dogan *et al* se sont intéressées à l'effet de la rifaximine sur des souches d'*Escherichia coli* associés à la MC. En plus de l'effet antibactérien, il a été montré à des doses sub-inhibitrices que l'effet de cet antibiotique en activant le pregnane X receptor localisé à la surface des cellules épithéliales intestinales, la sécrétion de l'IL8 était réduite. La rifaximine diminuerait également les capacités d'adhésion et d'invasion de ces bactéries limite leur capacité de survie dans les macrophages, et diminue la motilité bactérienne (83). Cependant une des limites de leur travail est que les auteurs ont maintenu un contact constant avec l'antibiotique, y compris lors des interactions avec les cellules, ne permettant pas d'exclure un effet, au moins partiel, sur les cellules elles-mêmes (83).

Une étude a été faite par Oberc *et al* au cours de laquelle des souris ont été infectées avec des AIEC avant ou après le traitement avec différentes classes d'antibiotiques. Le niveau d'AIEC a été évalué dans les selles et les tissus. Il a été constaté que certains antibiotiques tels que streptomycine, vancomycine et gentamicine pourraient rendre les hôtes plus sensibles à l'infection initiale par les AIEC et ainsi aggraver l'infection chez les hôtes précédemment colonisés. Cet effet n'était pas corrélé à un changement stéréotypé dans la communauté bactérienne intestinale, mais corrélé à une diminution de la diversité globale. Les AIEC



semblaient exploiter les réponses inflammatoires de l'hôte qui surviennent dans la période post-antibiotique, notamment grâce à l'utilisation de métabolites oxydés (84).

A ce jour, aucune étude n'a été faite pour démontrer l'effet de la ciprofloxacine sur les bactéries AIEC. Plusieurs études ont été menées pour évaluer le taux de résistance des *E. coli* associés à la MC, 29% des souches étaient résistantes à la ciprofloxacine (85) et de 17% à 25% résistantes à la rifaximine. L'usage antérieur du médicament et ces résistances est un lien qui a été établi (86).



**Tableau 1** : Résultats de l'analyse RNA seq de la souche CEA614S.

		Rifaximine	Ciprofloxacine	Clarithromycine	Rifaximine Clarithromycine	Rifaximine Ciprofloxacine
<b>Gènes d'intérêts</b>	<i>fliC</i>	Up	Down	None	Up	Up
	<i>prpC</i>	Down	None	Down	Down	Down
	<i>gadC</i>	Down	Up	Down	Down	Down
	<i>citC</i>	Up	None	None	Up	Up
	<i>arnT</i>	Up	None	None	Up	Up
	<i>entA</i>	Down	None	Down	Down	Down
	<i>fimH</i>	Down	None	None	Down	Down

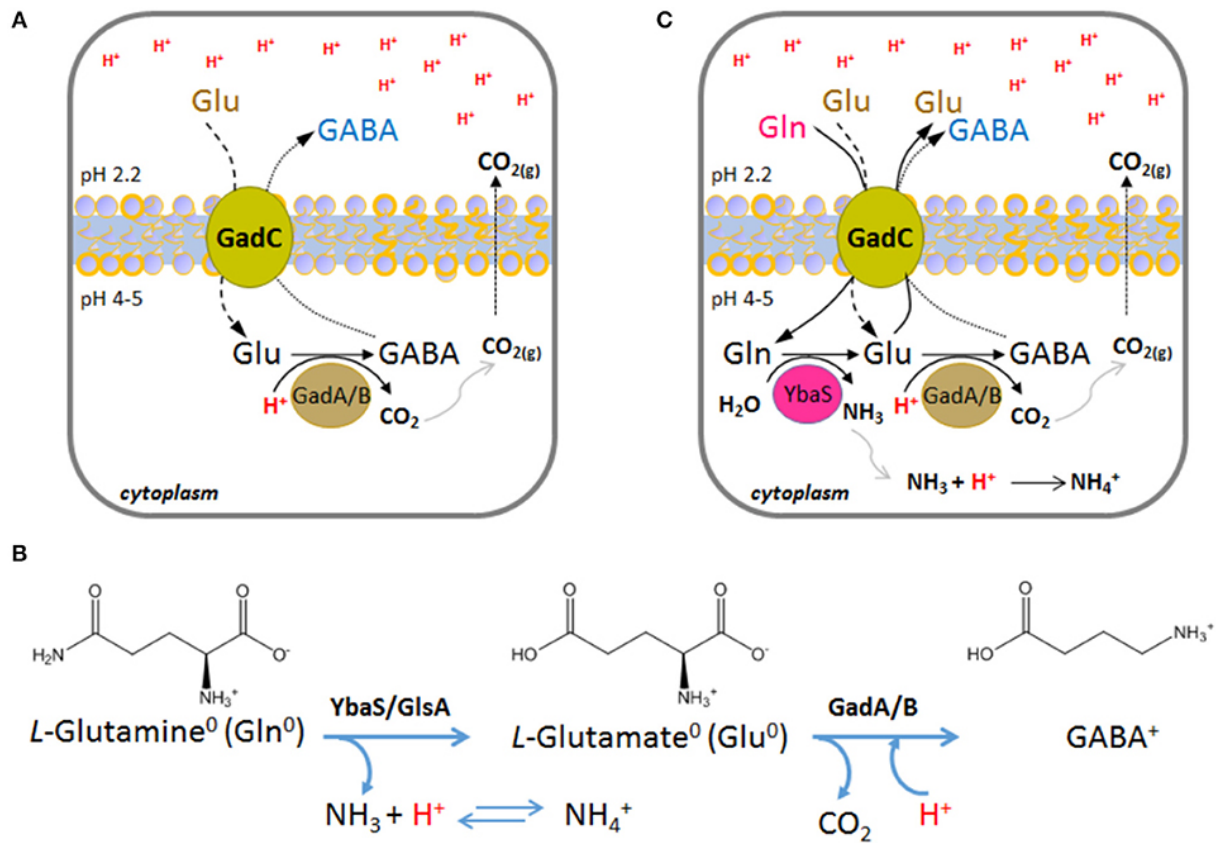
## II. Objectifs de l'étude

Devant les multiples arguments sur l'implication des AIEC dans la maladie de Crohn, ces travaux s'inscrivent dans la continuité d'une précédente étude menée au laboratoire qui consistait à étudier l'effet de la ciprofloxacine, de la rifaximine et de la clarithromycine. A des doses sub-inhibitrices, la rifaximine et la clarithromycine ont montré un effet sur la virulence de souches AIEC et semblent diminuaient *in vitro* les capacités d'adhésion, d'invasion et de survie en macrophages des AIEC. La rifaximine et de la ciprofloxacine sont actuellement évaluées dans le cadre de l'étude TEOREM (essai clinique contrôlé randomisé) sur des patients atteints de la maladie de Crohn et porteurs de bactéries AIEC.

Une première étude sur l'effet sur le transcriptome des AIEC a été menée sur une souche AIEC représentative et a montré un effet sur la transcription de plusieurs gènes impliqués potentiellement dans la virulence des AIEC (tableau 1). Afin de compléter ces résultats, nous avons souhaité étudier cet effet sur une collection de 10 souches d'AIEC isolées de biopsies gastro-intestinales à l'aide d'une stratégie de RT qPCR.

Ces travaux avaient pour but de comparer le niveau d'expression de sept gènes impliqués potentiellement dans la virulence des AIEC sous l'effet des différents antibiotiques (clarithromycine, rifaximine et ciprofloxacine) ainsi que de 2 associations (rifaximine-ciprofloxacine et rifaximine-clarithromycine).

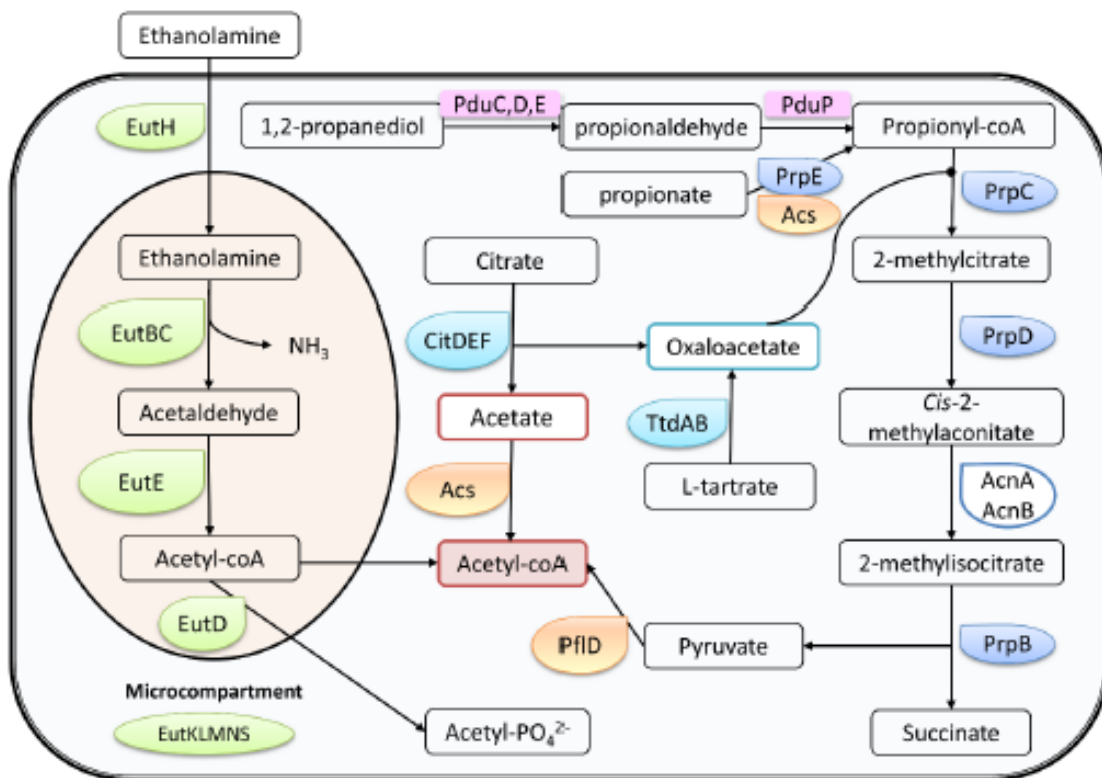
- ***prpC*** : Ce gène est impliqué dans le catabolisme des acides gras à chaîne courte, en particulier le propionate, aux propriétés anti-inflammatoires. La prévalence élevée d'AIEC dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MC et la dysbiose engendrée conduit à la perte significative des bactéries productrices d'acides gras à chaîne courte. A cela se rajoute, la consommation de propionate par les pathobiontes AIEC. Cela entraîne une augmentation de la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages et donc une inflammation accrue (figure 9) (87), (88).



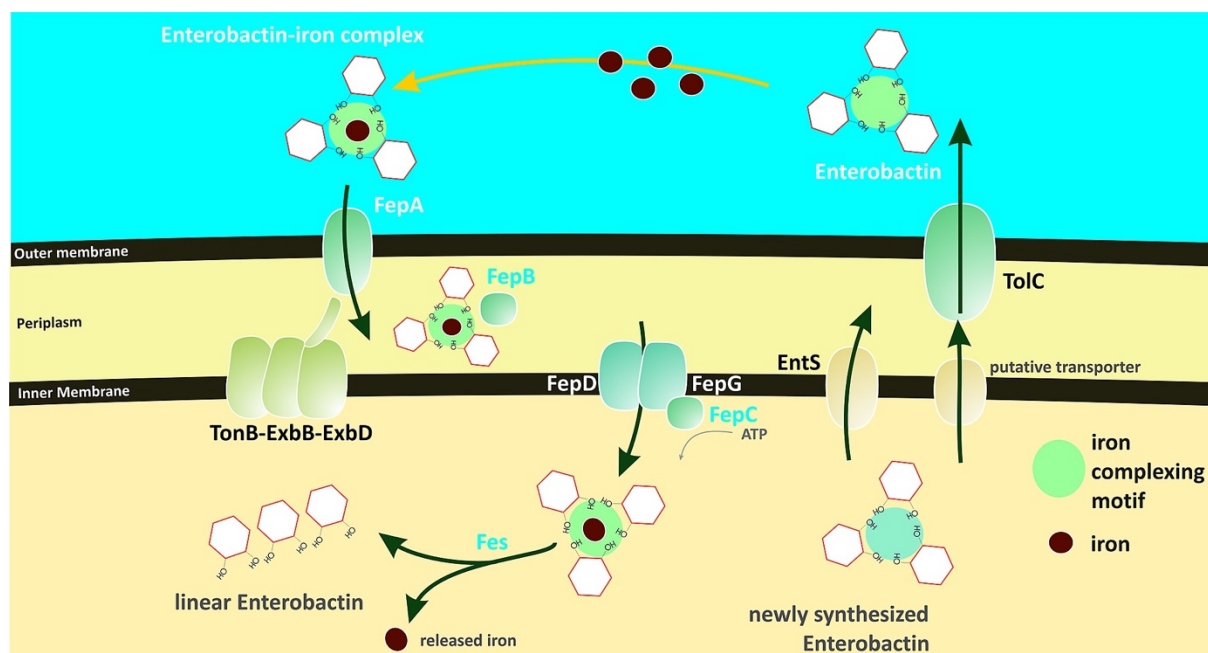
**Figure 8** : Représentation schématique de la régulation du pH.

(PH extracellulaire en dessous de 2,5, et PH intracellulaire en dessous de 5) chez *E. coli*. Activation de l'importation du glutamate (Glu) médiée par GadC et l'export du  $\gamma$ -aminobutyrate (A) cette réaction est consommatrice de protons (B). GadC est également un transporteur de la Glutamine (Gln) qui par désamination est transformé en Glu. Les protons sont capturés également lors de la formation des ions ammonium(C) (89).

- **citC** : participe au cycle de Krebs permettant le métabolisme du citrate en oxaloacétate nécessaire au métabolisme du propionate. Cette enzyme s'inscrit donc indirectement dans la voie de métabolisme des acides gras à courte chaîne comme *prpC* (90) (figure 9).
- **gadC** : Les bactéries neutrophiles ont développé des mécanismes spécifiques pour faire face au stress acide rencontré dans des environnements tels que le sol, les aliments fermentés et les compartiments de l'hôte. Chez *E. coli*, le système dépendant de la glutamate décarboxylase (Gad) est extrêmement efficace : il nécessite l'action concertée de la glutamate décarboxylase (GadA/GadB) et de l'antiporteur glutamate/ $\gamma$ -aminobutyrate, GadC. La capacité de survivre aux conditions extrêmement acides de l'estomac (en dessous de 2,5) est essentielle pour réussir la colonisation de l'hôte par des bactéries commensales et pathogènes (89) (Figure 8). L'importance de GadC a déjà été montrée pour plusieurs bactéries invasives telles que *Shigella flexneri* et *Brucella spp* (91), (92).
- **entA** : L'entérobactine, ou entérochéline, est le plus puissant sidérophore connu. Elle chélate les cations  $Fe^{3+}$  même à très faible concentration molaire dans le milieu extracellulaire. Les sidérophores permettent à la bactérie de puiser dans les réserves en fer de leur hôte et facilite donc leur survie dans l'organisme infecté. Selon une étude menée par Peralta et al, l'entérobactine protégerait intracellulairement la bactérie contre le stress oxydatif, cette protection est indépendante de la disponibilité du fer et serait le résultat de la capacité de l'entérobactine à stabiliser directement les radicaux grâce à ses fragments hydroxyle liés aux cycles aromatiques (93) (Figure 10).
- **fliC** : Ce gène code pour la flagelline, qui est la sous-unité de base qui se polymérise pour former le filament flagellaire rigide des flagelles d'*E. coli*. Les AIEC peuvent présenter un phénotype d'hypermotricité par la surexpression du gène *fliC*, notamment en présence de sels biliaires et de mucus, favorisant une réponse inflammatoire inappropriée (94).

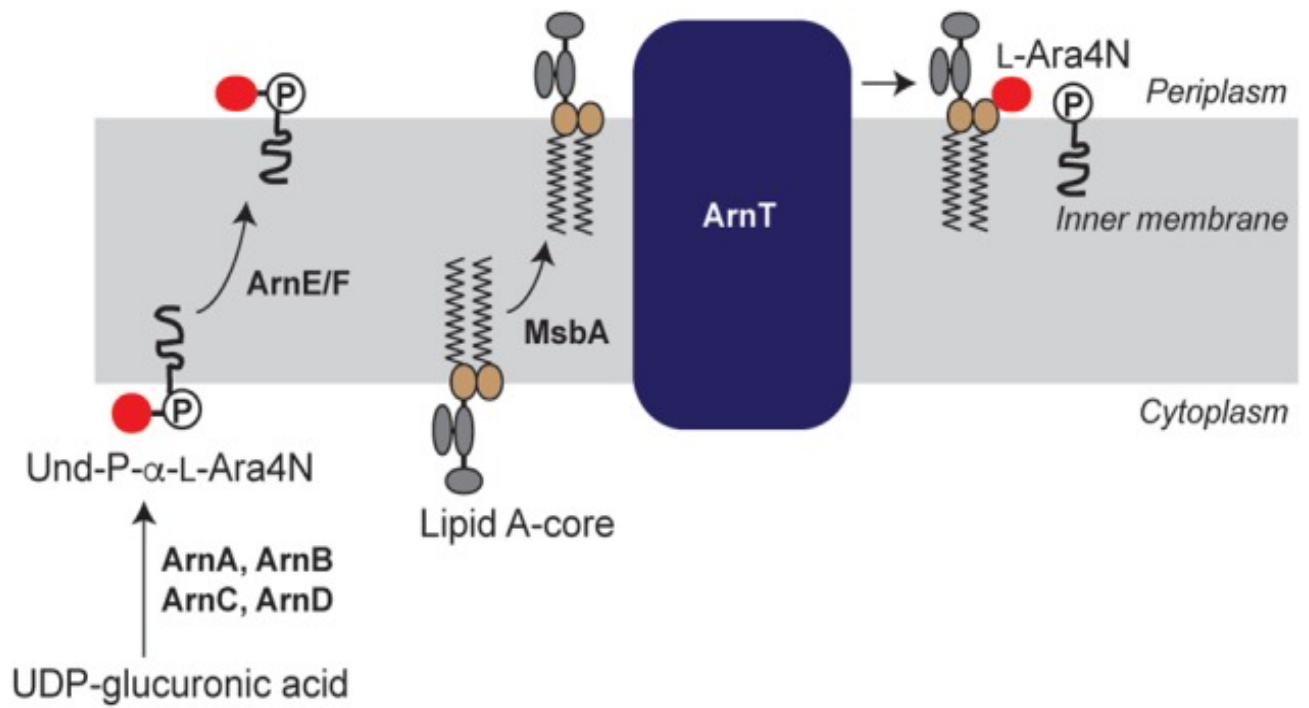


**Figure 9 :** Représentation enzymatique de la chaîne enzymatique pour la fermentation des substrats oxydables citrat dépendant par *E. coli*.



**Figure 10 :** Représentation schématique du fonctionnement de l'entérobactine (95).

- **arnT** : Ce gène code pour une glycosyltransférase qui catalyse l'addition de 4-amino-4-désoxy-l-arabinose (L-AraN4) au fragment lipide A du lipopolysaccharide (Figure 11). Ce type de modification du LPS est principalement connu comme impliqué dans la résistance aux antibiotiques de la famille des polymyxines comme la colistine, via la modification de charge qu'elle entraîne. Des travaux récents ont suggéré qu'un autre gène impliqué dans des modifications de charge du LPS, le gène *mcr-1*, codant une phosphoéthanolamine transférase, pourrait diminuer la virulence de souches d'*E. coli* (96).
  
- **Le gène de l'ARN ribosomique 16S et le gène tufA** : Ce sont deux gènes de ménage utilisés dans cette étude comme gènes de référence. L'ARN ribosomique 16S est l'ARN ribosomique constituant la petite sous-unité des ribosomes des procaryotes. Le gène *tufA* est un gène conservé qui code pour une molécule qui régule l'entrée d'un aminoacyl-ARNt dans le ribosome lors de la synthèse des protéines au cours de l'élongation de la chaîne peptidique à former (97).



**Figure 11 :** Représentation schématique illustrant la synthèse et l'incorporation du L-Ara4N dans le lipide A (98).

## TRAVAIL EXPERIMENTAL



**Tableau 2** : Souches AIEC et CMI utilisées.

Souches	Origine géographique	Localisation	CMI		
			Rifaximine	Ciprofloxacine	Clarythromycine
<b>CEA303S</b>	Lille	Biopsie iléale zone saine	16	0.032	32
<b>CEA813S</b>	Amiens	Biopsie iléale zone saine	32	0.016	32
<b>CEA816S</b>	Amiens	Biopsie iléale zone ulcérée	64	0.016	32
<b>CEA614S</b>	Nice	Biopsie iléale zone saine	16	0.016	16
<b>CEA501S</b>	Nancy	Biopsie iléale zone saine	32	0.016	32
<b>CEA501U</b>	Nancy	Biopsie iléale zone ulcérée	32	0.008	32
<b>CEA218U</b>	Clermont- Ferrand	Biopsie iléale zone ulcérée	16	0.008	64
<b>CEA218S</b>	Clermont- Ferrand	Biopsie iléale zone saine	16	0.008	64
<b>CEA224S</b>	Clermont- Ferrand	Biopsie iléale zone saine	8	0.008	64
<b>CEA814S</b>	Amiens	Biopsie iléale zone saine	16	0.004	32

### **III. Matériels et méthodes**

10 souches AIEC présentant des capacités à adhérer et à envahir les cellules épithéliales Intestine 407 (I-407) (American Type Culture Collection (ATCC) ® CCL-6™) provenant de biopsies iléales de patients atteints de la MC (tableau 2) inclus dans un protocole clinique transversal multicentrique (CEALIVE) approuvé par le "Comité de Protection des Personnes (CPP) Sud-Est 6" - France [n°AU 904] ont été mises en culture dans plusieurs conditions antibiotiques et en associations afin d'étudier le niveau d'expression génomiques de ses souches de sept gènes identifiés et impliqués dans la virulence et la physiopathologie des AIEC.

#### **A. Condition de culture des AIEC**

##### **a) Culture bactérienne en présence des antibiotiques**

Dans un premier temps, les souches AIEC conservées à -20°C ont étéensemencées sur un milieu solide Gélose Columbia sang et incubées pendant 18-24 heures.

Dans un deuxième temps, 100 µL d'une suspension à 0.5 McF en NaCl 0.85% de la culture des souches AIEC ont été mis en culture pendant 18-24 heures dans un milieu liquide LB de 25 ml en présence de l'antibiotique seul ou en association.

- « C » : Ciprofloxacine seule à une concentration de 0,001 µg/mL.
- « R » : Rifaximine seule à une concentration de 2 µg/mL.
- « Cla » : Clarithromycine seule à une concentration de 4 µg/mL.
- « CR » : association de rifaximine et de ciprofloxacine.
- « RCl a » : association de rifaximine et de clarithromycine.

La concentration d'antibiotique contenu dans le milieu de culture LB a été définie selon les résultats de concentration minimale inhibitrice (CMI).



En effet, les concentrations de ciprofloxacine, de clarithromycine et de rifaximine ont été choisies afin que les souches AIEC soient en culture dans un milieu contenant des concentrations sub-inhibitrices de ces antibiotiques. Pour les deux antibiotiques, nous avons retenu une concentration à deux dilutions en dessous de la plus basse CMI obtenue pour l'ensemble des dix souches AIEC (tableau 2).

## **b) Culture en présence des placebos**

Afin de ne négliger aucun facteur et d'éviter tout biais, et pour une bonne interprétation de nos résultats, plusieurs facteurs ont été pris en compte notamment les solvants nécessaires pour dissoudre nos antibiotiques. En effet, les différents antibiotiques n'étaient pas solubles en milieu aqueux. Pour la ciprofloxacine l'ajout de la soude est nécessaire pour une bonne dissolution dans l'eau. De même pour la rifaximine le solvant nécessaire à la dissolution est le méthanol et enfin la clarithromycine pure sous forme de poudre nécessite de l'acétone et de la soude pour se dissoudre. Ainsi nos 10 souches AIEC ont été ensemencées selon la même condition de culture que ceux en présence d'antibiotiques 18-24 heures dans un milieu LB.

- « P0 » : AIEC en culture dans un milieu LB seul (groupe témoin).
- « P1 » : AIEC en culture avec du méthanol et soude.
- « P2 » : AIEC en culture dans de l'eau et de la soude.
- « P3 » : AIEC en culture avec d'acétone et soude.
- « P4 » : AIEC en culture avec l'association méthanol, acétone et soude.
- « P5 » : AIEC en culture dans de l'eau, de méthanol et de soude.

## **B. Extraction**

Pour cette étape, il est nécessaire d'avoir au minimum  $10^9$  cellules. Dans un premier temps, une étape de centrifugation de nos cultures en présence ou non d'antibiotique (précédemment incubé 18-24 heures) à 5000 a été réalisée pendant 10 min afin de permettre d'obtenir des culots bactériens. Après avoir éliminé soigneusement le surnageant, il a été ajouté 1 ml une solution de thiocyanate de guanidinium (TRI Reagent®) préalablement préchauffé à 65°C, nécessaire à la séparation de l'ARNr, des protéines ribosomiques et la dénaturation des

Fixation

Lavage

Séchage

Élution

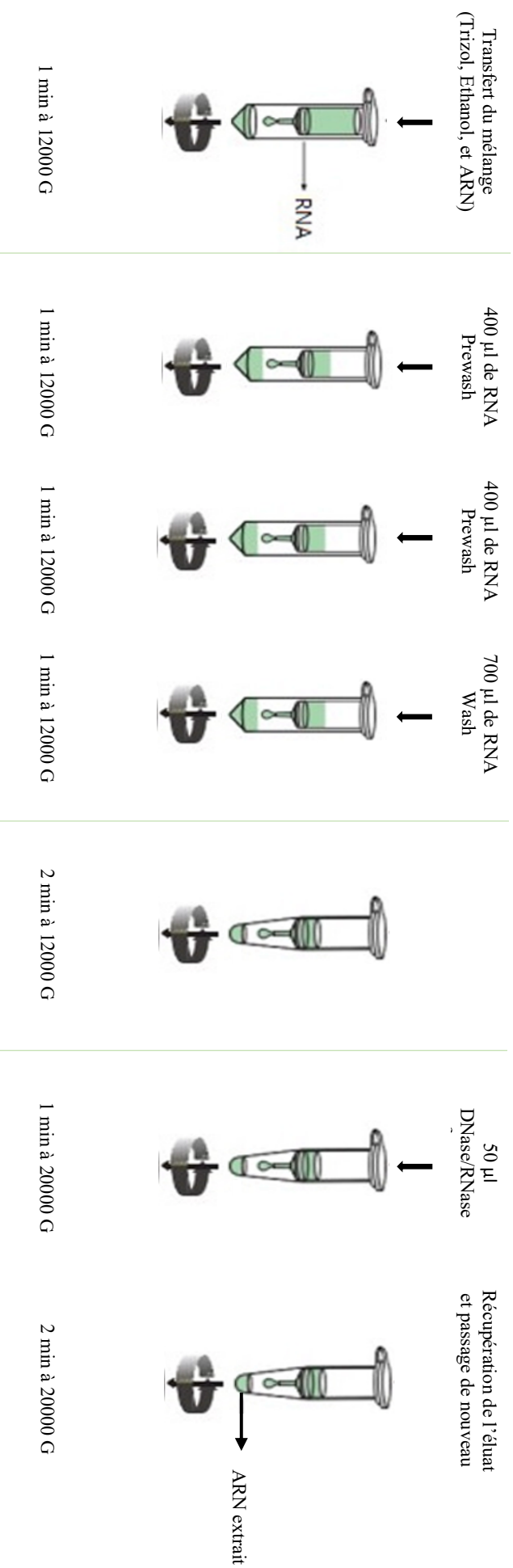
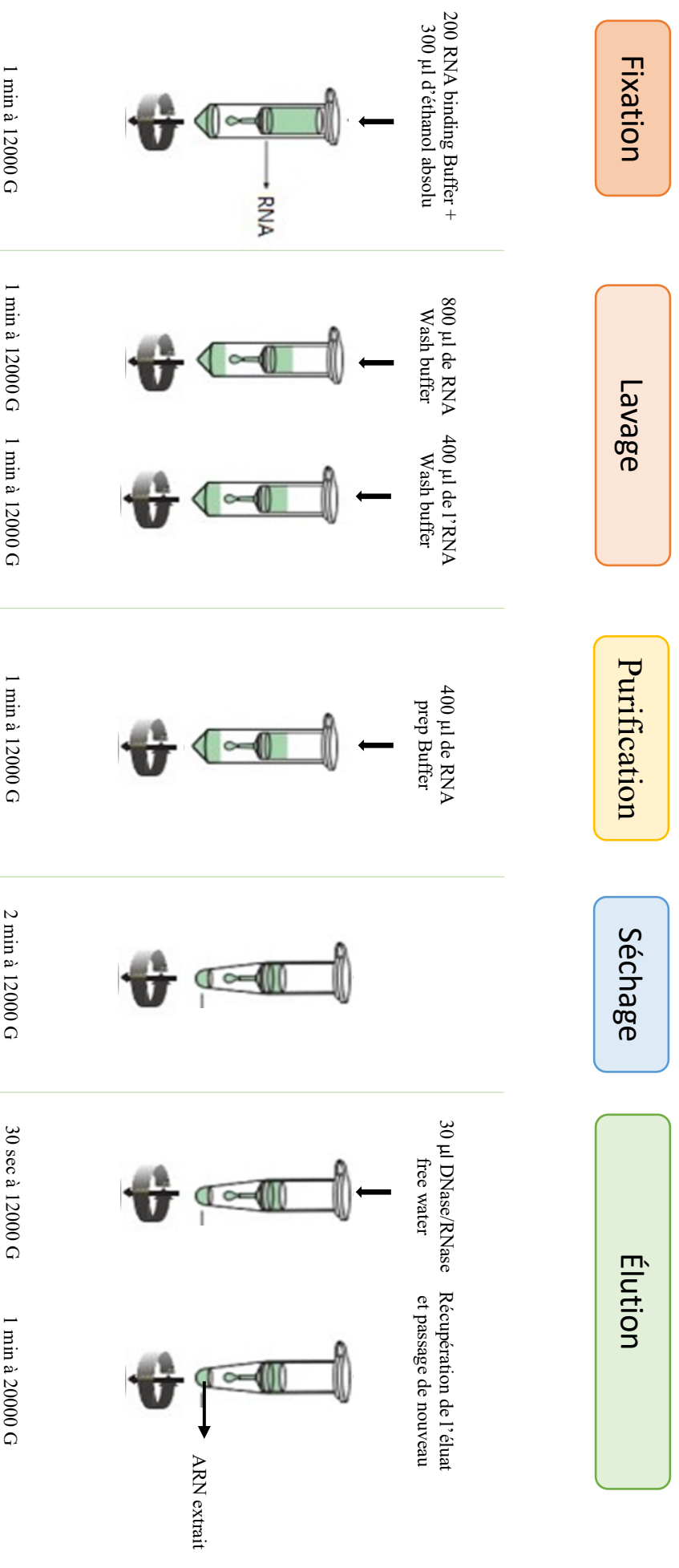


Figure 12 : Représentation schématique des différentes étapes d'extraction.

protéines, y compris les RNases. Une incubation de 10 min à 65°C a été réalisée tout en vortexant toutes les 2 minutes pendant 10 secondes afin de permettre la libération du matériel génétique et ainsi une meilleure lyse bactérienne.

Dans un second temps l'extraction proprement dite a été réalisée à l'aide du kit Direct-zol RNA Miniprep kit (Zymo research). Une succession d'étapes a été réalisée afin d'extraire les ARNm totaux précédemment traité avec du TRI Reagent® (figure12).

- Afin de précipiter les ARN totaux, 1 mL d'éthanol pur a été ajouté. Après vortexage, le mélange a été transféré dans une colonne Zymo-Spin IIC puis centrifugé 1 minute à 12000 g à température ambiante. Cette étape a été répétée jusqu'à ce que la totalité de l'échantillon soit passée sur la colonne.
- Afin de purifier les ARN totaux liés, 400 µl de Direct-zol RNA prewash ont été ajoutés à deux reprises avec une étape de centrifugation d'une minute à 12000 g après chaque rajout.
- Un lavage des ARN liés était nécessaire pour éliminer les contaminants, y compris les sels et les enzymes, et pour cela 700 µl de RNA wash buffer ont été ajoutés avec une étape de centrifugation d'une minute à 12000 g. Une étape supplémentaire de centrifugation de 2 minutes à 12000 g a été nécessaire afin de permettre le séchage de la colonne.
- Cette étape d'extraction a été suivie par l'élution des ARN totaux liés avec l'ajout de 50 µl de DNase/RNase-free water et une étape de centrifugation à 20000 g d'une minute. Pour un meilleur rendement, il a été nécessaire de récupérer l'éluat et le passer de nouveau directement sur la colonne avec une étape de centrifugation à 20000 g d'une minute.



**Figure 13 :** Représentation schématique de l'étape de concentration et de purification.

## **C. Traitement des ARN à la DNase**

Un traitement vigoureux, plus efficace à la DNase a été nécessaire pour permettre un meilleur rendement et éliminer toute trace d'ADN. Pour cela, le kit Turbo DNase a été utilisé. Dans un premier temps, dans des tubes RNase free, il a été rajouté le volume de l'éluat obtenu précédemment nécessaire pour traiter 20 µg d'ARN. Le dosage s'est effectué par spectrophotométrie (Nanodrop). Dans un deuxième temps, 10 µl de tampon 10X et 3 µl de DNase ont été ajoutés. Les tubes ont été vortexés et incubés 30 minutes à 37°C. Après cela, 20 µl de DNase inactivation reagent ont été rajoutés afin de stopper l'action de la DNase. Les tubes ont été vortexés et incubés 5 minutes à température ambiante avec des étapes d'homogénéisations intermédiaires. Environ 90 µl de surnageant contenant les ARN ont été récupérés après une étape de centrifugation à 12000 g pendant 1 min 30 sec.

## **D. Concentration et purification des ARN bactériens**

Pour cette étape, il a été utilisé le kit RNA clean & concentrator. Une succession de manipulations a été nécessaire pour le lavage et la purification des ARN bactériens.

- Pour cela, 200 µl de tampon de fixation à l'ARN (RNA binding Buffer) et 300 µl d'éthanol absolu froid ont été rajoutés afin de laver et concentrer les ARN bactériens. Le mélange a été transféré sur une colonne Zymo-spin IIC puis centrifugé à 12000 g pendant 1 minute.
  
- Afin d'optimiser la purification, il a été ajouté successivement, 400 µl de RNA prep Buffer, 800 µl puis 400 µl de RNA Wash buffer avec des étapes de centrifugation à 12000 g pendant 1 minute entre chaque rajout. Une étape supplémentaire de centrifugation de la colonne de 2 minutes à 12000 g a été nécessaire afin de permettre le séchage.



**Première étape**

0,5 µg d'ARN  
 1 µl de random  
 hexamers (50µM)  
 H<sub>2</sub>O DEPC QSP 14,5  
 ...1



Incubation pendant 5 min à 70°C

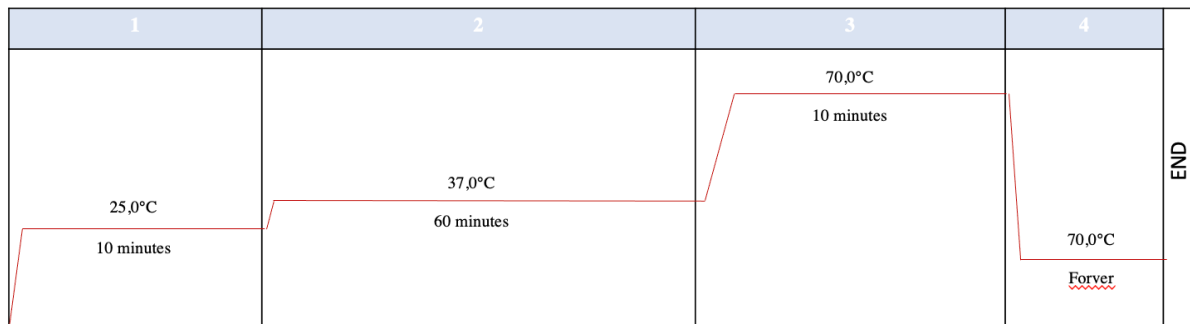
**Deuxième étape**

Mettre les tubes dans la  
 glace, puis rajouter :  
 - 2 µl buffer 10X  
 - 1 µl dNTP 20mM  
 - 1 µl H<sub>2</sub>O DEPC



Incubation pendant 5 min à 25°C

**Troisième étape** : Rajout de 1 µl de réverse transcriptase et ncubation selon le protocole suivant



**Figure 14** : Protocole de la rétro transcription.

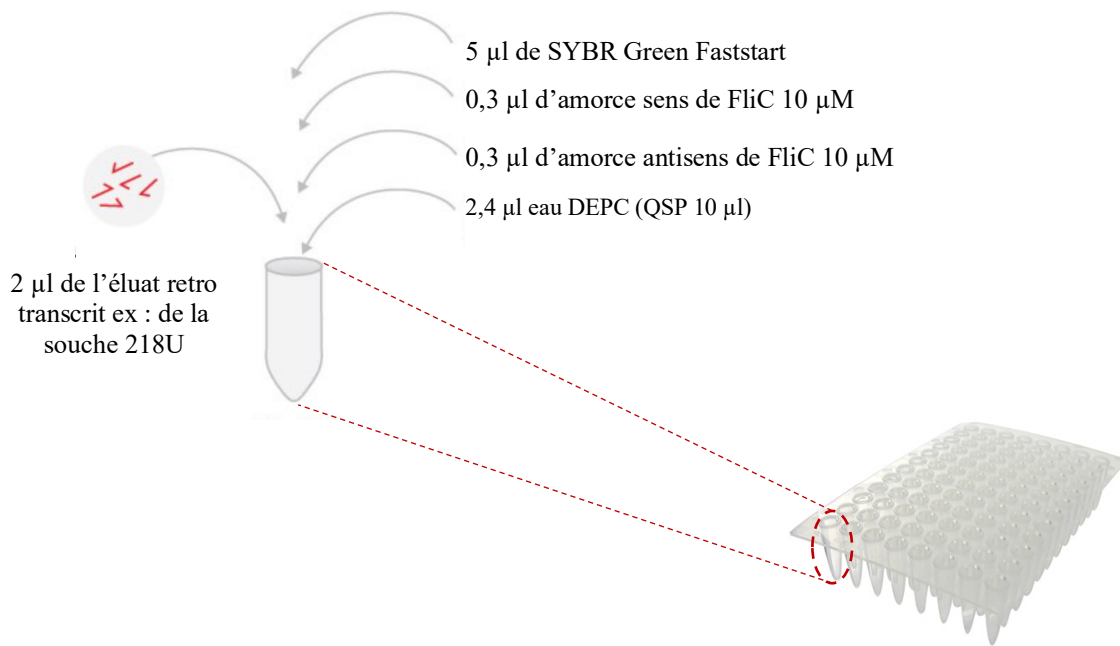
- Enfin, les éluats contenant les ARN totaux liés ont été obtenus par l'ajout de 30 µl de DNase/RNase-free water suivi d'une étape de centrifugation à 12000 g de 30 secondes. Pour un meilleur rendement, il a été nécessaire de récupérer l'éluat et le passer de nouveau directement sur la colonne avec une étape de centrifugation à 12000 g d'une minute supplémentaire (figure 13).

## **E. Reverse-transcription des ARN**

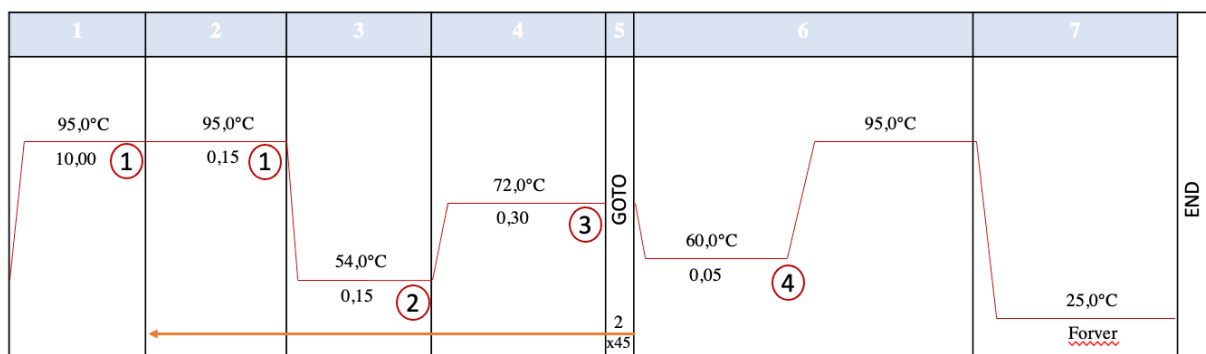
Afin d'apprécier la qualité de l'extraction, les éluats obtenus dans l'étape précédente ont été dosés par spectrophotométrie (Nanodrop) (quantité optimale = 200-300ng/µl avec des rapports  $DO_{260}/DO_{280} > 1,8-2$ ). Le volume nécessaire des ARN traités pour la rétrotranscription a été calculé pour une quantité de 0,5 µg.

La rétrotranscription a comporté 3 étapes (Figure 14) :

- La première étape, a consisté à incuber dans le thermocycler pendant 5 minutes à 70°C les ARN traités correspondant à 0,5 µg, les amorces non spécifiques (Radom hexamères) et une quantité en eau DEPC suffisante pour un total de 14,5 µl.
- La deuxième étape, après avoir mis les tubes dans de la glace a consisté à rajouter les éléments nécessaires à la rétrotranscription tels que les dNTP, le tampon 10X et de l'eau DEPC. Une étape d'incubation de 5 minutes à 25°C a été nécessaire.
- Enfin, la dernière étape, a consisté à l'ajout de la Reverse Transcriptase ; une enzyme qui permet de convertir l'ARN en ADN avec d'abord une incubation à 25°C pendant 10 minutes, puis une incubation de 60 minutes à 37°C et 10 minutes à 70°C pour stopper la réaction. Les ADNc obtenus ont été conservés à -20°C.



**Figure 15 :** Représentation schématique d'une microplaque de qPCR et du contenant (mix) nécessaire pour l'amplification.



**Figure 16 :** Représentation schématique du protocole de la PCR en temps réel.

## F. PCR en temps réel

C'est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro* et de quantification en temps réel. Cette étape est primordiale et permet de dupliquer en grand nombre les ADNc obtenus dans l'étape précédente à partir d'une faible quantité. Pour cela, un mix contenant du SYBR Green faststart, d'amorce sens et antisens du gène d'intérêt et de l'eau DEPC a été mis préalablement pour chaque échantillon et pour chaque puit de la plaque de qPCR (Figure 15). 2 µl de l'éluat rétro transcrit de chaque souche cultivée dans la condition précisée (cf condition de culture des AIEC) préalablement dilué au 1/50 a été réparti dans une plaque pour qPCR (en duplicat). L'amplification a été réalisée selon le protocole suivant (figure 16) :

- Phase de dénaturation initiale (1) permettant de séparer les brins d'ADN, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique et d'activer la polymérase. Elle s'est réalisée à 95°C pendant 10 min.
  - Phase de dénaturation et d'hybridation (appariement des amorces) : Cette étape a permis aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrice grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable. Peu de brins d'ADN matrice peuvent s'hybrider avec leur brin complémentaire. Elle a été réalisée selon les 2 étapes suivantes : une phase de 15 secondes de dénaturation à 95°C (1) et une phase de 15 secondes d'hybridation à 55°C (2).
  - Phase d'élongation (3) Cette étape a permis aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température de 72°C pendant 30 secondes. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. Les étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation sont répétées pendant 45 cycles.
  - La dernière étape (4) est celle où la température de fusion a été mesurée ; c'est la température à laquelle 50 % de l'ADN est dénaturé.
-

Gènes	Amorces		Tailles des amplicons
	Orientation	Séquences nucléotidiques 5'-3'	
<i>fliC</i>	<u>Sens</u>	ATGGCACAAGTCATTAATAC	179 pb
	<u>Antisens</u>	CAGGCGATTGCTAACCG	
<i>prpC</i>	<u>Sens</u>	GCTGGGAAAAGGCGATGC	208 pb
	<u>Antisens</u>	CGCTGGAGATCCAGCAAC	
<i>gadC</i>	<u>Sens</u>	GACAGGTAAAGCTAAGCAG	188 pb
	<u>Antisens</u>	CGTGGGACTTTGTGCTGC	
<i>citC</i>	<u>Sens</u>	ACCTCGCCTATGAGCGGC	95 pb
	<u>Antisens</u>	GGCGCTGTTCCGCCAGTG	
<i>arnT</i>	<u>Sens</u>	GCGTTATGCGGAAATCAG	138 pb
	<u>Antisens</u>	GGATTAACAGCATTGGGC	
<i>entA</i>	<u>Sens</u>	CGAAAGCGGCGCTGAAAAG	181 pb
	<u>Antisens</u>	CGTATTCGCGGCTTTGGC	
<i>fimH</i>	<u>Sens</u>	GTCACACTGCAACGAGG	141 pb
	<u>Antisens</u>	CGAGAACGGATAAGCCG	

**Tableau 3 :** séquences oligonucléotidiques des amorces spécifiques des différents gènes utilisées en PCR en temps réel.

## G. Analyse statistique :

Les analyses statistiques ont été réalisées avec les logiciels Graph Pad Prism (version 8), en considérant un risque d'erreur de première espèce bilatéral de 5%. Les résultats ont été exprimés sous forme de cycle de température (CT) qui représente le nombre de cycle d'amplification nécessaire à la détection de la quantité d'ADN de départ.

La comparaison statistique a été faite en comparant le  $2^{-\Delta\Delta CT}$  du groupe traité et celui du groupe contrôle (solvant). Exemple : Pour le gène *fliC*, et de la souche 218U sous l'effet de la rifaximine et de son solvant (Méthanol et soude) :

- Le  $\Delta CT$  est la différence entre la moyenne des CT des gènes de ménage (16S et *tufA*) et le CT du gène étudié (ici *fliC*)
- Le  $\Delta\Delta CT$  de la souche 218U sous l'influence de la rifaximine se calcule par la formule suivante : ( $\Delta CT$  de la souche 218U sous l'effet de la rifaximine) - (la moyenne générale de l'ensemble des  $\Delta CT$  des souches du groupe solvant).
- Le  $\Delta\Delta CT$  de la souche 218U sous l'influence du solvant se calcule par la formule suivante : ( $\Delta CT$  de la souche 218U sous l'effet du solvant) – (la moyenne générale de l'ensemble des  $\Delta CT$  des souches du groupe solvant).

L'étude de neuf gènes a été réalisée sur les 10 souches AIEC sous l'influence des antibiotiques et des solvants correspondants. La comparaison a été réalisée à l'aide du test apparié de Wilcoxon. C'est un test non paramétrique qui compare la médiane d'un ensemble de nombres à une médiane hypothétique avec un intervalle de confiance (IC) à 95 %.

Il a été choisi de représenter graphiquement la moyenne des  $\Delta\Delta CT$  pour faciliter la lecture des comparaisons du niveau d'expression des gènes d'intérêts sous l'effet de l'eau *versus* solvant ou solvants *versus* antibiotiques.



## **IV. Résultats**

### **1. Extraction, concentration et purifications**

Afin d'apprécier la qualité de l'extraction et les quantités d'ARN nécessaires à traiter, les éluats obtenus avant et après les étapes de purification ont été dosés par spectrophotométrie (Nanodrop) avec mesure de la densité optique (DO) à 260 nanomètres et 280 nanomètres. La pureté est évaluée par le rapport  $DO_{260}/DO_{280}$  qui doit être supérieure à 1,8 ( $DO_{260}/DO_{280}$  optimal = 1,8 et 2).

Les résultats de l'ensemble des ARN extraits dans les 11 conditions de cultures (solvant et antibiotiques) sont représentés en annexe (tableaux 6 et 7). L'évaluation de la pureté par le rapport  $DO_{260}/DO_{280}$  a été réalisée après l'étape d'extraction et après l'étape de concentration et de purification. En effet, les résultats montrent que l'ensemble des ARN extraits présentaient un taux de pureté satisfaisant.

### **2. Analyse de l'impact des solvants sur les niveaux d'expressions des ARN des gènes d'intérêts**

Dans un premier temps, nous avons cherché à connaître l'impact de la culture des souches AIEC dans les différents solvants (P1 à P5) nécessaire à la solubilisation des antibiotiques sur l'expression des gènes d'intérêts. Pour cela, nous avons analysé l'expression des mêmes gènes d'intérêts des souches AIEC mis en culture dans la condition témoin (P0 : LB seul).

Les résultats ont été obtenus à la suite de la comparaison des  $2^{-\Delta\Delta CT}$  du groupe témoin « P0 » et des solvants testés. On considère une différence significative si la p value est inférieure à 0,05 (figure 17)



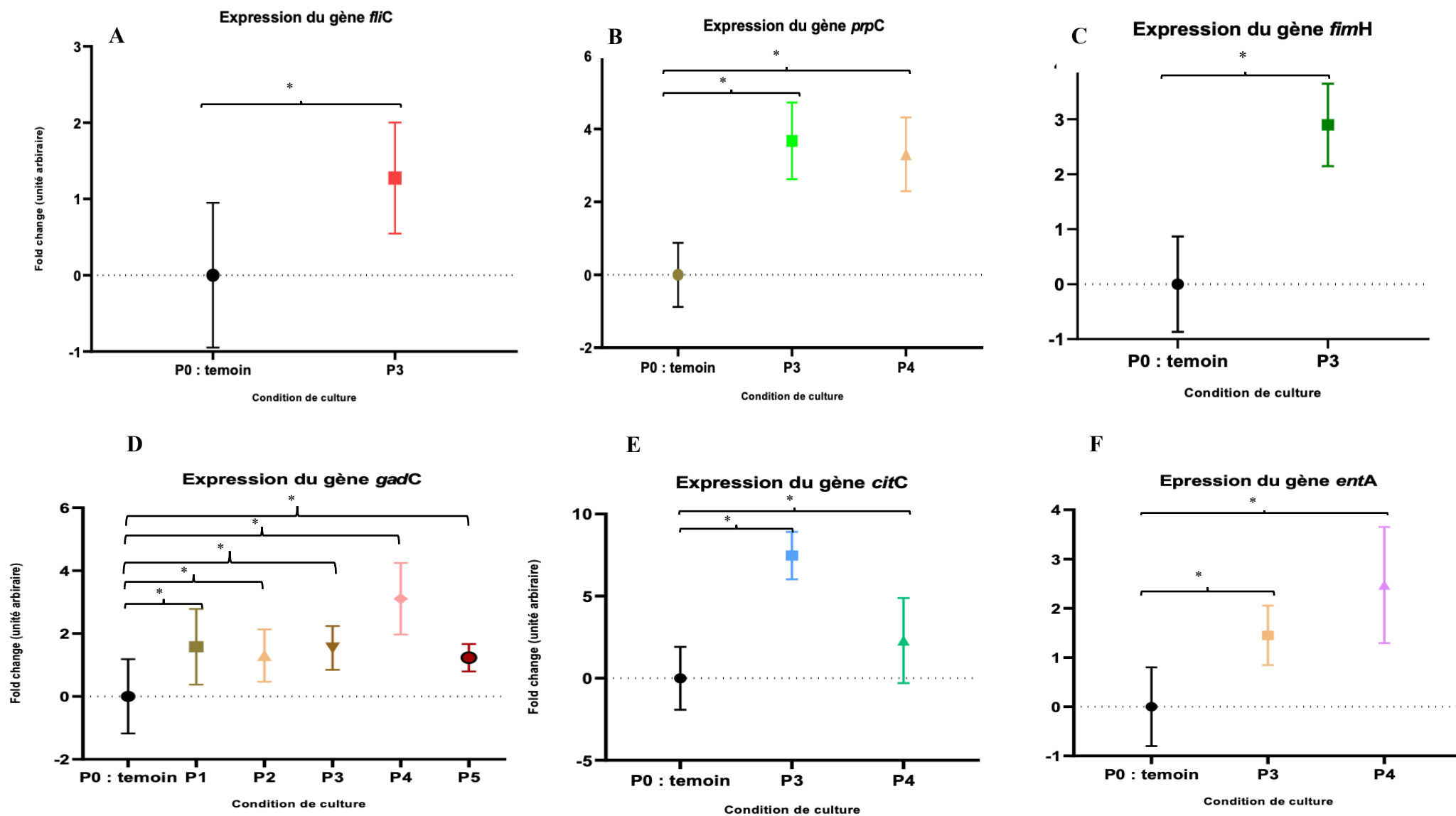


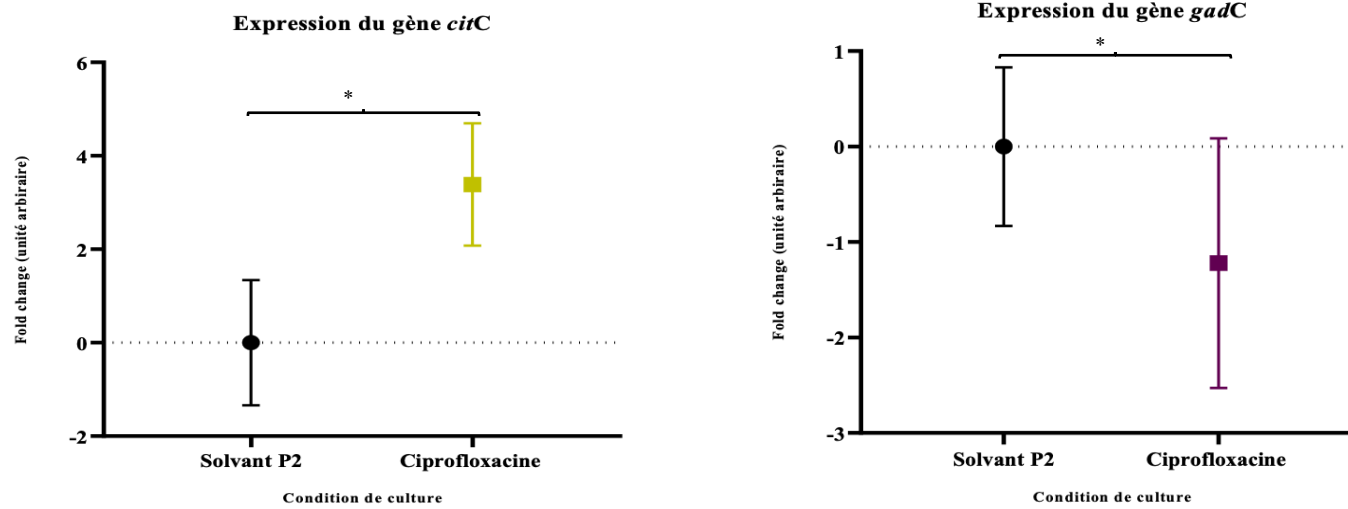
Figure 17 : Analyse de l'impact des solvants sur les niveaux d'expressions des ARN des gènes d'intérêts. \* $p$  value <0,05.

- Le gène *fliC* : Nous avons pu observer une surexpression de ce gène sous l'effet du solvant P3 (Acétone et soude) nécessaire à la solubilisation de la clarithromycine (figure A).
- Le gène *prpC* : Il a été observé, une surexpression sous l'effet de deux solvants : le solvant P3 et le solvant P4 (Acétone et méthanol plus soude) nécessaire à la solubilisation de l'association rifaximine et clarithromycine (figure B).
- Le gène *fimH* : *fimH* a été surexprimé uniquement sous l'effet du solvant P3 (figure C).
- Le gène *gadC* : Ce gène a été surexprimé dans toutes les conditions de cultures des solvants (P1 à P5) (figure D).
- Les gènes *citC* et *entA*: Ces deux gènes ont été surexprimés sous l'effet des solvants P3 et P4 (figure E et figure F).

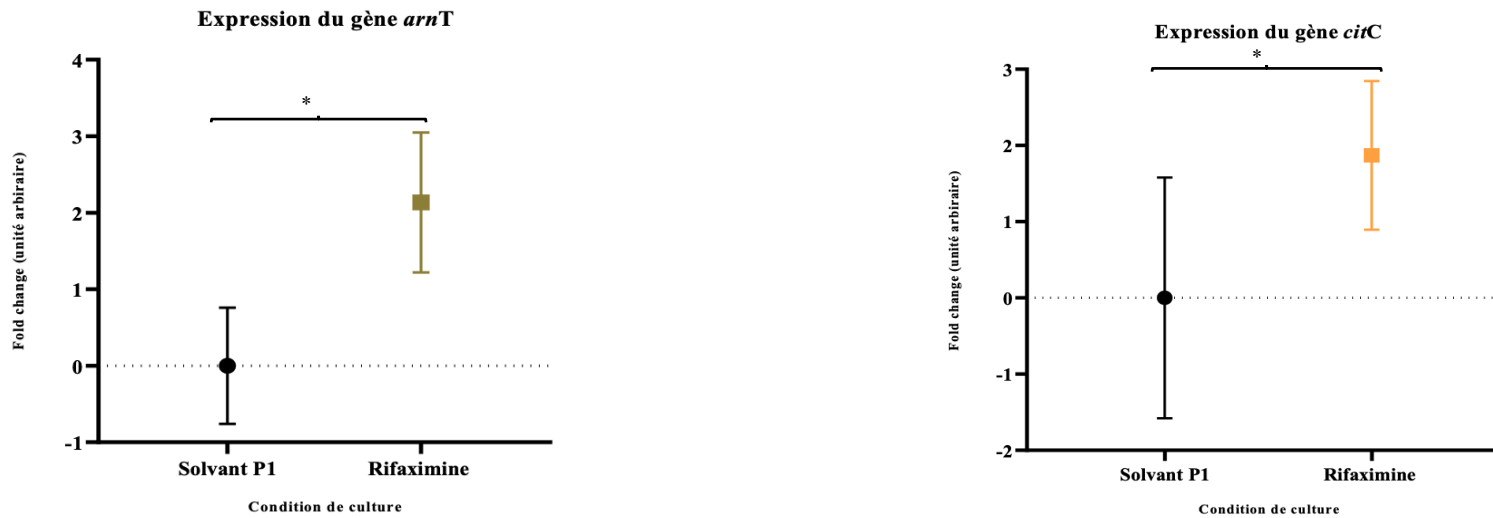
En conclusion, nous avons pu confirmer l'effet des solvants et des associations de solvants sur l'expression de certains gènes. Il n'a pas été observé de différence significative sur l'impact significatifs des solvants sur l'expression du gène *arnT* qui est impliqué dans les modifications du lipopolysaccharide. Le tableau 4 résume les résultats des *p value* de l'analyse statistique. Ces résultats confirment l'importance de comparer l'effet des antibiotiques avec l'effet de la condition solvant correspondante.

### **3. Analyse de l'impact des antibiotiques sur les niveaux d'expressions des ARN des gènes d'intérêts**

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à connaître l'impact des antibiotiques sur l'expression des gènes d'intérêts. De même que l'analyse de l'impact des solvants sur les niveaux d'expression des différents gènes d'intérêts, les résultats ont été obtenus à la suite de



**Figure 18 :** Représentation graphique sous forme d’histogramme de l’expression des gènes *citC*, *gadC* et *prpC* sous l’effet de la ciprofloxacine. \**p value* <0,05.



**Figure 19 :** Représentation graphique sous forme d’histogramme de l’expression des gènes *arnT* et *citC* sous l’effet de la rifaximine. \**p value* <0,05.

la comparaison des  $2^{-\Delta\Delta CT}$  du groupe témoin solvant (de « P1 à P5 ») et des antibiotiques testés correspondants. On considère une différence significative si la *p value* est inférieure à 0,05.

- Condition de culture « C » vs « P2 » (ciprofloxacine vs eau et soude) : il a été observé une surexpression de *citC* et une sous expression de *gadC* en présence de ciprofloxacine (figure 18). Il n'a pas été observé de différence significative dans l'expression des autres gènes. Concernant le gène *prpC*, malgré la l'absence de différence significative, il a été observé une tendance vers la sous expression du gène (figure 18).
- Condition de culture « R » vs « P1 » (Rifaximine vs méthanol et soude) : nous avons pu observer une surexpression significative des gènes *citC* et *arnT* (figure 19). Tous les autres gènes n'ont pas présenté de différence significative dans leurs expressions par rapport à la culture en condition « P1 ».
- Condition de culture « RClA » vs « P4 » (rifaximine-clarithromycine vs méthanol, acétone et soude) : les gènes *citC* et *fliC* des AIEC cultivés en présence de rifaximine et de clarithromycine ont été surexprimés par rapport à la culture en condition témoin (solvant « P4 ») (figure 20). Il n'a pas été observé de différence significative pour les autres gènes testés.
- Condition de culture « Cla » vs « P3 » (clarithromycine vs acétone et soude) : concernant cette condition, elle entraînait quant à elle une sous expression des gènes *citC* et *prpC* (figure 21), sans différence significative pour les autres gènes.
- Condition de culture « CR » vs « P5 » (rifaximine-ciprofloxacine vs méthanol, eau et soude) : Enfin, les plus fortes modifications ont été observées avec l'association rifaximine- ciprofloxacine pour laquelle tous les gènes étudiés étaient surexprimés (figure 22 et figure 23).

Le tableau 5 résume les résultats des *p value* de l'analyse statistique.

**Tableau 4 :** valeurs des P value obtenus Analyse de l'impact des solvants sur les niveaux d'expressions des ARN des gènes d'intérêts.

(Vert : surexpression).

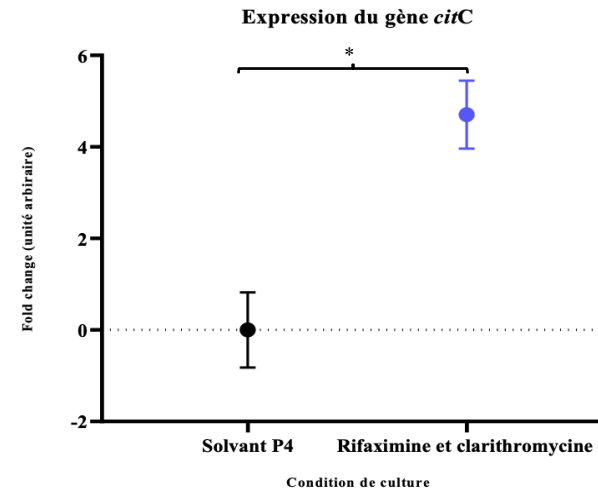
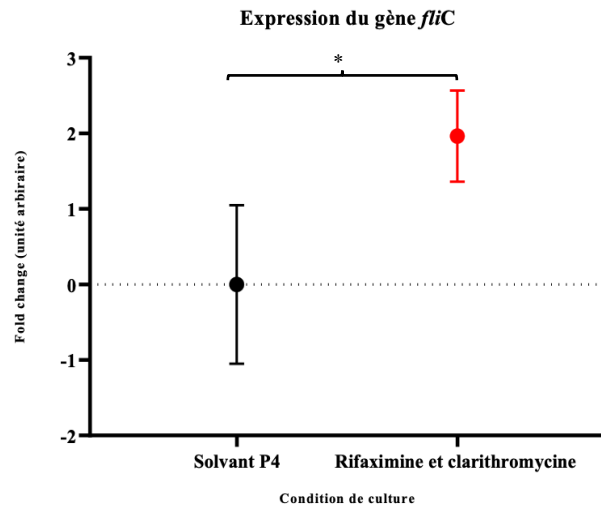
		<i>p value</i>				
		<b>P1</b> (Méthanol et soude)	<b>P2</b> (Eau et soude)	<b>P3</b> (Acétone et soude)	<b>P4</b> (Méthanol, acétone et soude)	<b>P4</b> (Méthanol, eau et soude)
Gènes d'intérêts	<i>fliC</i>	>0,9999	0,625	0,0371	0,4316	>0,9999
	<i>prpC</i>	0,625	<b>0,0273</b>	0,0195	0,0137	0,625
	<i>gadC</i>	0,0137	0,0098	0,0371	0,0039	0,0137
	<i>fimH</i>	0,1602	0,1309	0,0488	0,6953	0,1602
	<i>citC</i>	0,1602	0,9219	0,002	0,002	0,1602
	<i>arnT</i>	0,3223	0,2324	0,1309	0,1055	0,3223
	<i>entA</i>	0,375	0,8457	0,0195	0,0371	0,375

**Tableau 5 :** valeurs des P value obtenues de l'analyse de l'impact des antibiotiques sur les niveaux d'expressions des ARN des gènes d'intérêts.

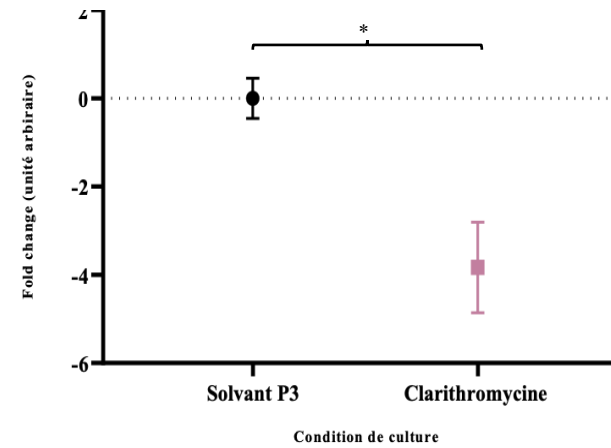
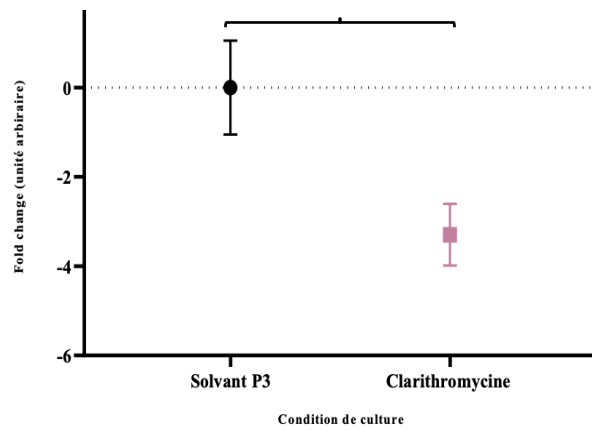
(Vert : surexpression. Rouge : sous expression).

		<i>p value</i>				
		<b>Rifaximine</b>	<b>Ciprofloxacine</b>	<b>Clarithromycine</b>	<b>Rifaximine Clarithromycine</b>	<b>Rifaximine Ciprofloxacine</b>
Gènes d'intérêts	<i>fliC</i>	0,2324	0,625	0,4922	0,0371	0,0137
	<i>prpC</i>	0,8457	0,0645	<b>0,0059</b>	0,6953	0,0059
	<i>gadC</i>	0,375	<b>0,0273</b>	0,3223	0,2324	0,0488
	<i>citC</i>	0,0273	0,0098	<b>0,0098</b>	0,002	0,002
	<i>arnT</i>	0,0273	0,5566	0,7695	>0,9999	0,0039
	<i>entA</i>	0,5566	0,5566	0,3223	>0,9999	0,0098
	<i>fimH</i>	0,2754	>0,9999	0,7695	0,2754	0,002





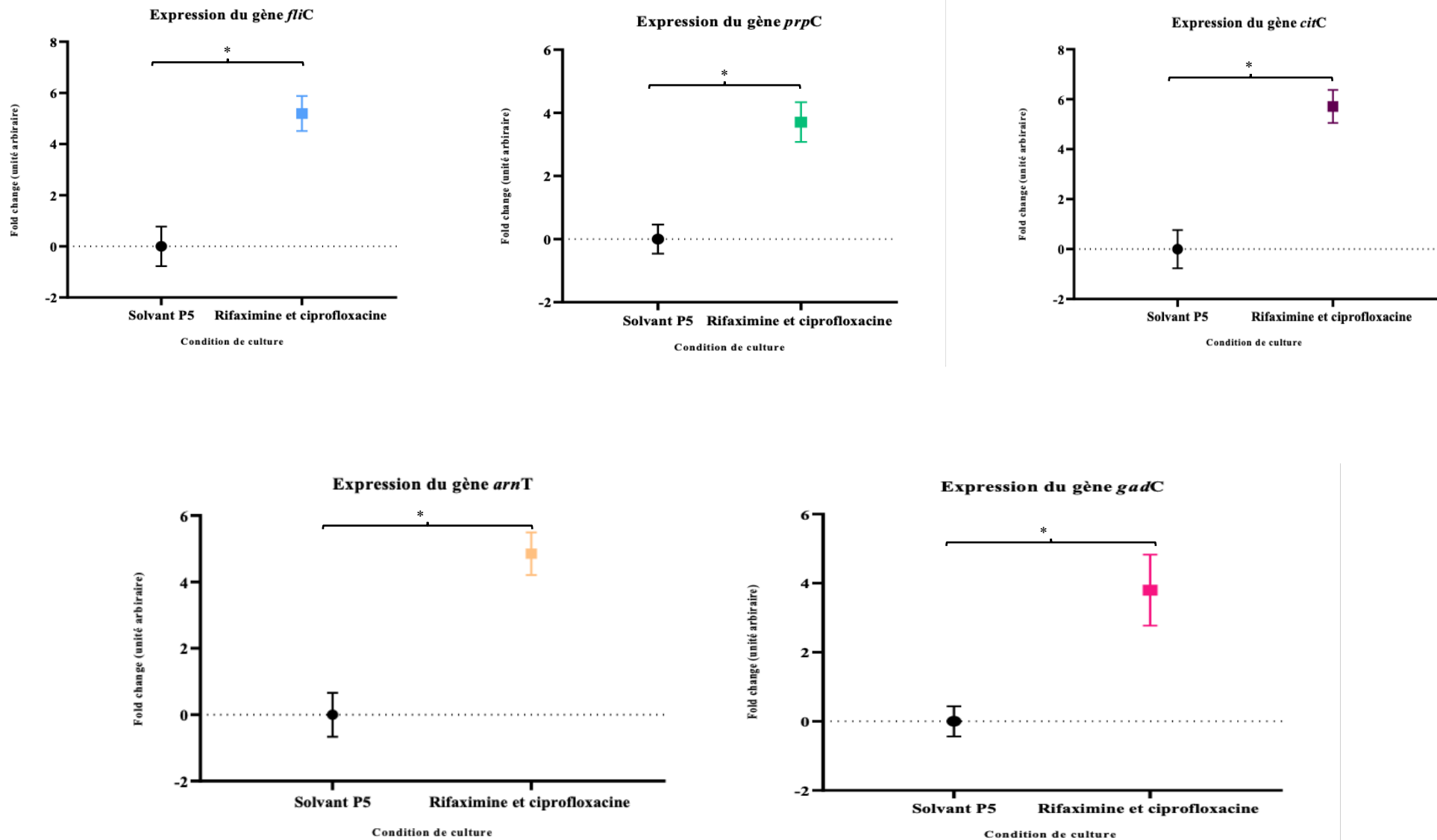
**Figure 20 :** Représentation graphique sous forme d'histogramme de l'expression des gènes *citC* et *fliC* sous l'effet de l'association rifaximine-clarithromycine. \**p* value <0,05.



**Figure 21 :** Représentation graphique sous forme d'histogramme de l'expression des gènes *citC* et *prpC* sous l'effet de la clarithromycine. \**p* value <0,05.

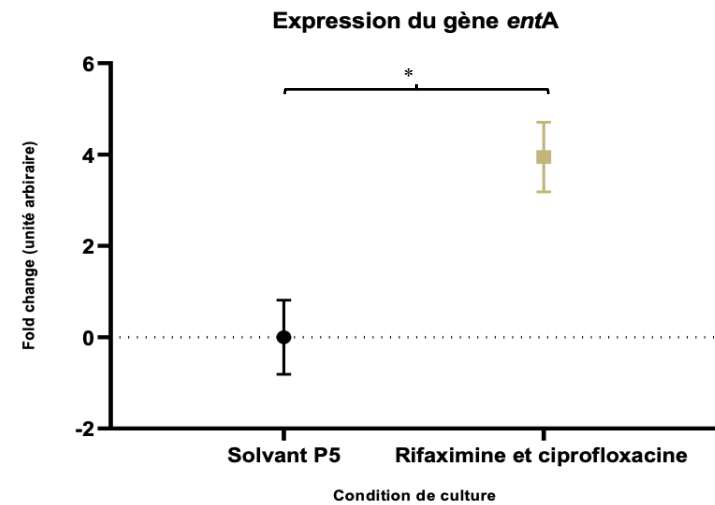
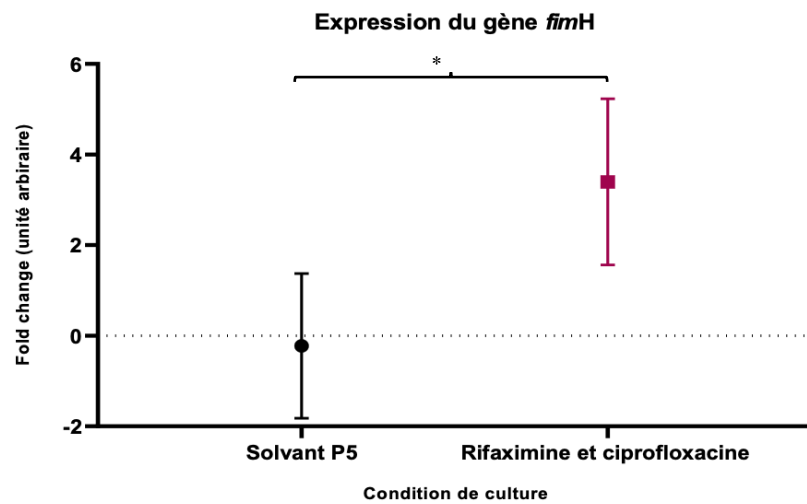






**Figure 22 :** Représentation graphique sous forme d’histogramme de l’expression des gènes *fliC*, *prpC*, *citC*, *arnC*, et *gadC* sous l’effet de l’association rifaximine ciprofloxacine. \**p value* <0,05.





**Figure 23 :** Représentation graphique sous forme d’histogramme de l’expression des gènes *fimH*, et *entA* sous l’effet de l’association rifaximine ciprofloxacine. \**p value* <0,05.

## V. Discussion

Au vu de l'implication des AIEC dans la MC et l'inflammation chronique qu'elles entretiennent, une antibiothérapie à visée anti-virulence pourrait être une solution intéressante afin de limiter les effets pro-inflammatoires de ces souches. Ce travail de recherche a permis de confirmer l'effet des différents antibiotiques (rifaximine, clarithromycine et ciprofloxacine) ainsi que les deux associations testées (rifaximine-clarithromycine et rifaximine-ciprofloxacine) sur l'expression de certains gènes de virulence à des doses sub-inhibitrices.

Une des caractéristiques majeures des AIEC est leur capacité d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales ; les précédents travaux réalisés dans le laboratoire avaient permis de mettre en évidence qu'un traitement préalable de souches AIEC par la rifaximine et la clarithromycine ainsi que leurs associations (rifaximine-clarithromycine et rifaximine-ciprofloxacine) entraînait une réduction significative de l'adhésion et l'invasion des AIEC sur différentes lignées cellulaires et indépendamment de leur activité antimicrobienne. Cependant, les résultats obtenus au cours de notre étude concernant l'expression génique du gène *fliC* impliqué dans la mobilité et du gène *fimH* nécessaire à l'adhésion pour l'ensemble des souches AIEC n'ont pas présenté de différence significative sous l'effet des antibiotiques seuls. Néanmoins, sous l'effet de la clarithromycine, il a été observé une tendance vers la sous-expression du gène *fliC* (figure 24), ce qui concorde avec les résultats obtenus dans les tests réalisés sur le modèle cellulaire. Cependant, sous l'effet de l'association rifaximine-ciprofloxacine, les gènes *fliC* et *fimH* ont été surexprimés et sous l'effet de l'association rifaximine-clarithromycine seule *fliC* a été surexprimé. Une augmentation de l'expression de *fliC* avait également été observée pour ces 2 associations lors de l'étude par RNAseq sur la souche CEA614S, mais en ce qui concerne *fimH* celui-ci était sous-exprimé. Les associations d'antibiotiques semblent donc avoir eu un effet inverse à celui attendu sur l'expression des gènes *fliC* et *fimH* en comparaison avec les résultats obtenus sur les modèles cellulaires. Des analyses fonctionnelles (mobilité, agglutination) ou protéomiques seraient utiles pour confirmer ces résultats.



Une des autres caractéristiques principales des AIEC est leur capacité à entrer et survivre dans les macrophages. L'analyse du séquençage de l'ARN bactérien (RNAseq) de la souche CEA614S, avait mis en évidence une diminution de l'expression du gène *gadC*, gène de résistance à l'acidité, lorsque la souche est exposée à la clarithromycine ou la rifaximine. Les résultats obtenus pour l'ensemble des souches au cours de cette étude ont montré une sous expression du gène *gadC* uniquement sous l'effet de la ciprofloxacine, et une surexpression associée à la rifaximine sans différence significative pour les autres antibiotiques. Cependant l'analyse du gène du RNAseq a été réalisée uniquement sur une seule souche, la souche CEA614S. Il serait intéressant d'élargir la collection de souches testées, afin de vérifier si les variations de l'expression de *gadC* sont homogènes parmi les souches AIEC. L'implication d'autres gènes dans la survie intra-macrophagique des AIEC a déjà été mises en évidence tels que *htrA*, *dsbA* ou encore *gipA* (99–101), cependant, le gène *gadC* n'a pas été étudié chez les AIEC. Certains travaux ont permis de mettre en évidence l'importance de ce gène pour la survie de certains pathogènes au sein des macrophages (102). La diminution de l'expression de ce gène pourrait expliquer la diminution des capacités d'entrée et de survie en macrophages des AIEC traités. En effet, les AIEC se retrouvent au sein d'une vacuole macrophagique qui est un environnement acide. La construction de souches d'AIEC mutantes pour le gène *gadC* serait une perspective intéressante pour déterminer l'importance de ce gène dans la survie des AIEC au sein des macrophages.

Plusieurs autres gènes ont vu leur expression modifiée sous l'effet des antibiotiques. Le gène *prpC*, impliqué dans le métabolisme du propionate, a été surexprimé en présence de l'association rifaximine-ciprofloxacine. Le gène *citC* impliqué dans le métabolisme du citrate et indirectement dans le métabolisme du propionate a également été surexprimé sous l'effet de la rifaximine, la ciprofloxacine et les deux associations d'antibiotiques. A l'inverse, sous l'effet de la clarithromycine les gènes *prpC* et *citC* ont été sous exprimés. Une analyse du métabolisme du propionate dans un milieu minimum pourrait permettre de clarifier l'effet de ces différents antibiotiques sur cette voie métabolique. De même, le gène *arnT* impliqué dans les modifications du lipopolysaccharide a été surexprimé sous l'effet de la rifaximine, et de l'association rifaximine-ciprofloxacine. Cette surexpression pourrait expliquer une baisse de la virulence des AIEC comme observée pour le gène *mcr-1*. Enfin, le gène *entA* nécessaire à la chélation et la captation du fer a été surexprimé sous l'effet de l'association rifaximine-ciprofloxacine. L'effet réel de cette surexpression sur la virulence reste peu clair et il est discordant avec ce qui avait été observé sur la souche CEA614S par analyse RNAseq.



Enfin, plusieurs gènes sans différence significative ont eu une tendance à la sous expression sous l'effet de la clarithromycine seule ou associé à la rifaximine tels que *fliC*, *prpC*, *arnT*, *entA*, un élargissement de la collection testées pourrait permettre de confirmer ces tendances (figure 24).

Pour conclure, nous avons pu confirmer que la clarithromycine, la rifaximine, la ciprofloxacine ainsi que les associations rifaximine-clarithromycine et rifaximine ciprofloxacine ont présenté un effet sur des gènes potentiellement impliqués dans la virulence des AIEC. Cependant pour la plupart, les effets restent peu clairs et nécessiteraient d'être précisés par l'élargissement de la collection testée ou par le recours à des tests complémentaires (analyses protéomique, étude de métabolisme, tests fonctionnels), voire par la construction de mutants. Bien que cette étude suggère un effet de certains antibiotiques sur la virulence des souches AIEC qui pourrait participer à l'efficacité d'une antibiothérapie pour la prise en charge des patients atteints de la MC, les conséquences d'un tel traitement en termes d'émergence de résistance et d'efficacité à moyen terme sont à considérer. Des études cliniques, comme l'étude TEOREM, seront nécessaires pour valider ce type de stratégies et définir leur place dans la prise en charge des patients atteints de la MC, notamment en lien avec les autres traitements liés à la modulation de la flore digestive, ainsi que les posologies, durées et surveillance nécessaire à une possible utilisation thérapeutique.





# CONCLUSION



## VI. Conclusion

La maladie de Crohn est une pathologie inflammatoire de l'intestin qui évolue de manière chronique. L'impact de cette pathologie et le handicap qu'elle entraîne pour les patients atteints est considérable. L'arsenal thérapeutique existant permet uniquement la prise en charge des poussées et l'absence de traitements curatifs fait de cette pathologie un réel problème de santé publique. Devant les multiples arguments sur l'implication des *Escherichia coli* adhérentes invasifs (AIEC) dans la maladie de Crohn, plusieurs essais thérapeutiques ont étudié l'efficacité des antibiotiques dans cette maladie qui pourraient avoir un effet bénéfique sur son évolution, voire sa guérison.

Afin d'évaluer les apports d'une telle antibiothérapie, nous avons choisi de tester les effets anti- virulence de trois antibiotiques déjà utilisés dans cette pathologie : la clarithromycine, la ciprofloxacine et la rifaximine, ces deux dernières sont actuellement testées dans un essai thérapeutique. Des premiers résultats *in vitro* sur différents modèles cellulaires ont montré un effet de la rifaximine et de la clarithromycine sur les capacités d'adhésion, d'invasion et de survie en macrophages des AIEC. Une étude transcriptomique menée sur une souche AIEC a suggéré un effet de ces 2 antibiotiques sur l'expression de plusieurs gènes pouvant être impliqués dans la virulence des AIEC.

L'objectif de notre travail était de comparer le niveau d'expression de différents gènes impliqués potentiellement dans la virulence de 10 souches AIEC sous l'effet de la clarithromycine, de la rifaximine et de la ciprofloxacine ainsi que de deux associations (rifaximine-ciprofloxacine et rifaximine-clarithromycine) à des doses sub-inhibitrices par une technique de RT qPCR. Les 10 souches d'AIEC testées étaient issues d'une collection de souches isolées de biopsies iléales de patients atteints de la MC.

Nous avons pu observer un effet significatif de la rifaximine sur l'expression des gènes *citC* et *arnT*, impliqués respectivement dans le métabolisme du citrate et dans des modifications du

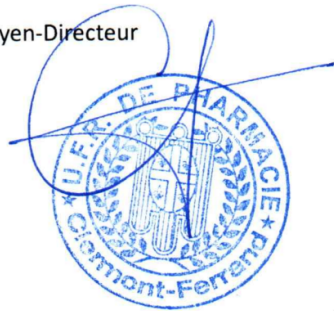


lipopolysaccharide. Dans les 2 cas, la rifaximine entraînait une surexpression. La ciprofloxacine entraînait quant à elle une surexpression de *citC* et une sous expression de *gadC*, gène impliqué dans la résistance à l'acidité. La clarithromycine entraînait une sous expression des gènes *citC* et *prpC*, impliqué dans le métabolisme du propionate. L'association rifaximine-clarithromycine entraînait une surexpression de *citC* et *fliC*, gène codant pour la flagelline.

Enfin, les plus fortes modifications ont été observées avec l'association rifaximine-ciprofloxacine pour laquelle tous les gènes étudiés étaient surexprimés.


Ces résultats sont encourageants, mais ils sont partiellement discordants avec les résultats des études sur modèles cellulaires (adhésion, invasion, survie en macrophage), en particulier pour la ciprofloxacine, pour laquelle aucun effet n'avait été observé, alors que la diminution de l'expression de *gadC* pourrait faire espérer un effet sur la survie en macrophage. Le faible nombre de souches incluses et la forte dispersion des résultats encouragent à élargir la collection. Par ailleurs, une étude protéomique pourrait permettre d'avoir une réponse plus précise sur l'effet de ces différents facteurs de virulence. Il sera intéressant de confronter ces résultats à ceux de l'étude clinique TEOREM actuellement en cours, afin de mieux évaluer la place d'une telle antibiothérapie dans la prise en charge des patients atteints de la Maladie de Crohn.

Clermont-Ferrand, le  
Christiane FORESTIER  
Doyen-Directeur



Clermont-Ferrand, le 7 septembre 2021

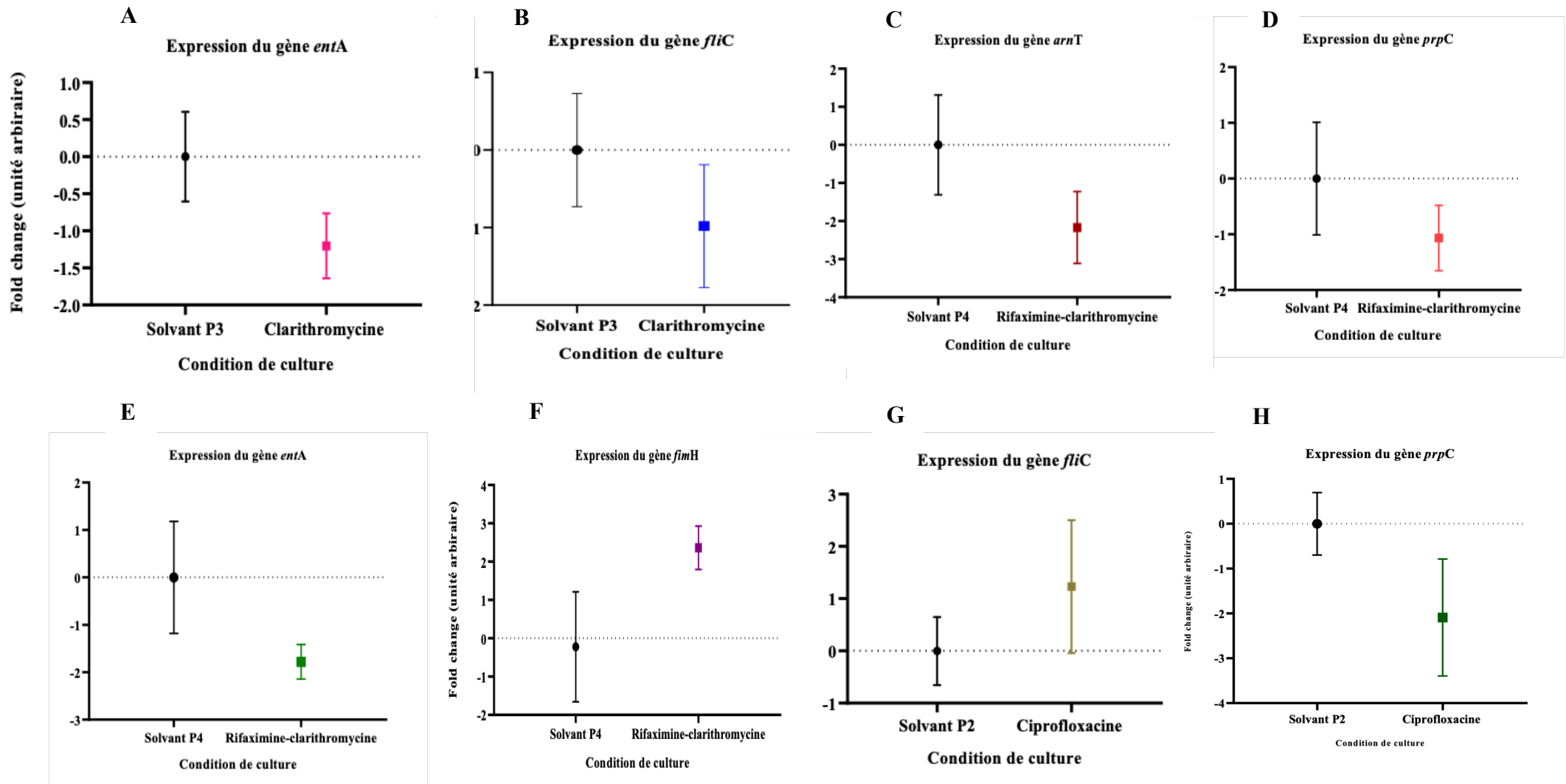
Le Président du Jury,



Pr V. Livrelli

UFR de Pharmacie  
Service de la formation – Pôle 4  
TSA 50400  
28, Place Henri-Dunant  
63001 Clermont-Ferrand Cedex 1

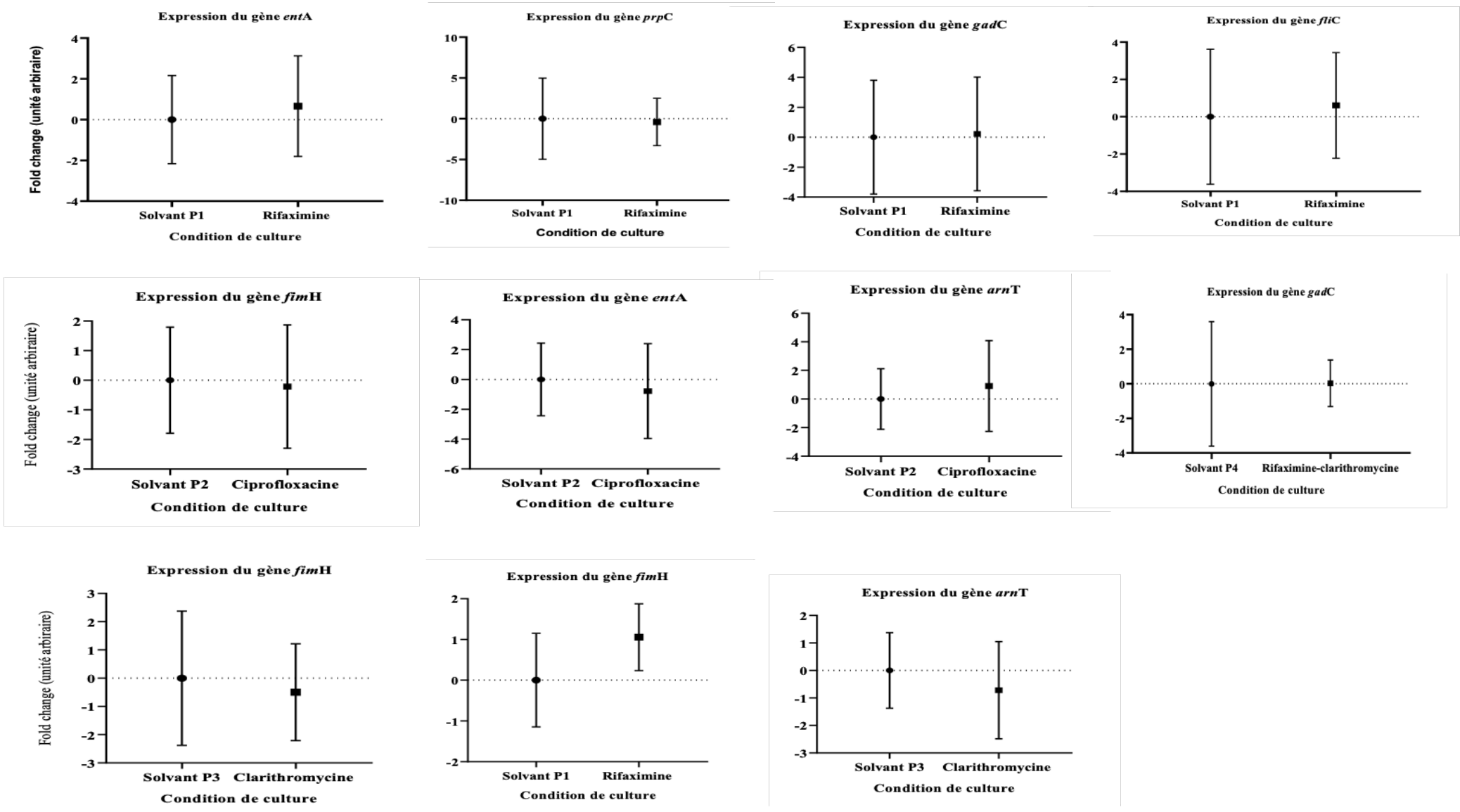
## VII. Annexes



**Figure 24 : Annexe 1 :** Ce graphique sous forme d'historgramme représente tous les gènes ayant une tendance vers la sous expression (A, B, C, D, E, H) ou sur expressions (F, G) sans différence significative.







**Figure 25 : Annexe 2 :** Ce graphique sous forme d'histogramme représente l'expression à tous les gènes sous l'effet d'antibiotiques sans différence significative.



Échantillon	Condition de culture	DO260/DO280		Condition de culture	DO260/DO280		Échantillon	Condition de culture	DO260/DO280		Condition de culture	DO260/DO280	
		Avant	Après		Avant	Après			Avant	Après		Avant	Après
CEA218U	P0 (Groupe placebo)	1,59	1,866	Rifaximine	1,785	2,079	CEA218U	P2 (Eau et de la soude)	1,924	1,823	Clarithromycine	1,582	1,951
CEA501U		1,92	1,92		1,854	1,922	CEA501U		1,869	1,987		1,55	3,222
CEA816S		1,664	1,993		2,034	2,129	CEA816S		1,927	2,093		1,586	1,865
CEA224S		1,775	1,926		1,701	1,911	CEA224S		1,693	2,63		1,407	1,931
CEA814S		1,701	2,096		1,72	2,014	CEA814S		1,948	2,085		1,603	1,014
CEA218S		1,661	2,039		1,876	1,884	CEA218S		1,921	1,988		1,615	2,023
CEA501S		1,878	2,037		1,751	2,007	CEA501S		1,965	1,823		1,648	2,077
CEA813S		1,737	1,916		1,727	1,985	CEA813S		1,632	1,839		1,71	2,026
CEA303S		1,571	1,743		1,73	1,88	CEA303S		1,571	1,891		1,607	2,036
CEA614S		1,881	2,048		1,788	1,91	CEA614S		1,895	2,007		1,523	1,982
CEA218U	P1 (Méthanol et soude)	1,833	2,084	Ciprofloxacine	1,624	2,012	CEA218U	P3 (Acétone et soude)	1,723	1,957	Rifaximine et clarithromycine	1,544	1,021
CEA501U		1,907	2,053		1,849	2,03	CEA501U		1,725	1,941		1,555	1,964
CEA816S		1,81	2,05		1,838	1,923	CEA816S		1,575	1,823		0,557	1,839
CEA224S		1,458	1,801		1,913	2,104	CEA224S		1,568	1,929		1,464	1,926
CEA814S		1,89	2,09		1,785	2,067	CEA814S		1,577	1,894		1,645	2,036
CEA218S		1,883	1,937		1,846	1,866	CEA218S		1,628	1,888		1,564	1,976
CEA501S		1,817	2,098		1,609	1,977	CEA501S		1,587	1,837		1,603	1,988
CEA813S		1,604	1,85		1,585	1,857	CEA813S		1,583	1,851		1,521	1,926
CEA303S		1,811	2,074		1,548	1,806	CEA303S		1,569	1,777		1,491	1,919
CEA614S		1,693	1,996		1,532	1,842	CEA614S		1,56	1,995		1,552	1,881

Tableau 6 : Annexe 3 : DO260/DO280 des différentes condition de culture avant et après la concentration et purification



**Tableau 7 : Annexe 4 : DO260/DO280 des différentes condition de culture avant et après la concentration et purification**

Echantillon	Condition de culture	DO260/DO280		Condition de culture	DO260/DO280	
		Avant	Après		Avant	Après
CEA218U	P4 (Méthanol, acétone, soude)	1,955	1,974	Rifaximine et ciprofloxacine	1,514	2,055
CEA501U		1,965	1,846		1,618	2,111
CEA816S		2,044	1,96		1,67	1,908
CEA224S		1,799	1,959		1,491	1,89
CEA814S		1,874	1,985		1,573	1,958
CEA218S		1,846	1,984		1,75	2,048
CEA501S		1,885	2,046		1,838	1,765
CEA813S		1,857	2,018		1,714	1,921
CEA303S		1,816	2,066		1,549	1,884
CEA614S		1,738	2,042		1,628	1,936
CEA218U	P5 (Eau, méthanol et soude)	1,594	1,954			
CEA501U		1,681	1,972			
CEA816S		1,72	2,042			
CEA224S		1,672	2,03			
CEA814S		1,892	1,947			
CEA218S		1,737	2,031			
CEA501S		1,704	2,067			
CEA813S		1,498	1,971			
CEA303S		1,504	2,121			
CEA614S		1,465	2,015			

## VII. Références bibliographiques

1. Leiper K, Martin K, Ellis A, Watson AJM, Morris AI, Rhodes JM. Clinical trial: randomized study of clarithromycin versus placebo in active Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2008;27(12):1233-9.
2. Inoue S, Nakase H, Matsuura M, Ueno S, Uza N, Kitamura H, et al. Open label trial of clarithromycin therapy in Japanese patients with Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2007;22(7):984-8.
3. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: A pathologic and clinical entity. *The American Journal of Medicine*. 1 nov 1952;13(5):583-90.
4. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet*. 12 mai 2007;369(9573):1641-57.
5. Peyrin-Biroulet L, Cieza A, Sandborn WJ, Coenen M, Chowers Y, Hibi T, et al. Development of the first disability index for inflammatory bowel disease based on the international classification of functioning, disability and health. *Gut*. févr 2012;61(2):241-7.
6. Hold GL, Smith M, Grange C, Watt ER, El-Omar EM, Mukhopadhyaya I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years? *World J Gastroenterol*. 7 févr 2014;20(5):1192-210.
7. Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. déc 1989;34(12):1841-54.
8. Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 1 juin 2004;18(3):481-96.
9. Predictors of response to infliximab in patients with Crohn's disease - *Gastroenterology* [Internet]. [cité 27 avr 2021]. Disponible sur: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(02\)00161-0/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(02)00161-0/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F)
10. Lunney PC, Kariyawasam VC, Wang RR, Middleton KL, Huang T, Selinger CP, et al. Smoking prevalence and its influence on disease course and surgery in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2015;42(1):61-70.
11. Buisson A, Chevaux J-B, Bommelaer G, Peyrin-Biroulet L. Diagnosis, prevention and treatment of postoperative Crohn's disease recurrence. *Digestive and Liver Disease*. 1 juin 2012;44(6):453-60.



12. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, de Silva P, Korzenik JR, et al. A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology*. nov 2013;145(5):970-7.
13. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease - Galvez - 2005 - *Molecular Nutrition & Food Research* - Wiley Online Library [Internet]. [cité 28 avr 2021]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mnfr.200500013>
14. Roberts CL, Keita AV, Duncan SH, O'Kennedy N, Söderholm JD, Rhodes JM, et al. Translocation of Crohn's disease *Escherichia coli* across M-cells: contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers. *Gut*. oct 2010;59(10):1331-9.
15. Chapman-Kiddell CA, Davies PSW, Gillen L, Radford-Smith GL. Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. janv 2010;16(1):137-51.
16. Martinez-Medina M, Denizot J, Dreux N, Robin F, Billard E, Bonnet R, et al. Western diet induces dysbiosis with increased *E coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut*. 1 janv 2014;63(1):116-24.
17. Agus A, Denizot J, Thévenot J, Martinez-Medina M, Massier S, Sauvanet P, et al. Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Sci Rep*. 8 janv 2016;6:19032.
18. Pineton de Chambrun G, Body-Malapel M, Frey-Wagner I, Djouina M, Deknuydt F, Atrott K, et al. Aluminum enhances inflammation and decreases mucosal healing in experimental colitis in mice. *Mucosal Immunol*. mai 2014;7(3):589-601.
19. Chua ACG, Klopčič BRS, Ho DS, Fu SK, Forrest CH, Croft KD, et al. Dietary Iron Enhances Colonic Inflammation and IL-6/IL-11-Stat3 Signaling Promoting Colonic Tumor Development in Mice. *PLoS One*. 6 nov 2013;8(11):e78850.
20. Calcium and  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> target the TNF- $\alpha$  pathway to suppress experimental inflammatory bowel disease - Zhu - 2005 - *European Journal of Immunology* - Wiley Online Library [Internet]. [cité 1 mai 2021]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.200425491>
21. Hviid A, Svansson H, Frisch M. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. *Gut*. 1 janv 2011;60(1):49-54.
22. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 15 juin 2011;474(7351):307-17.
23. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 1 nov 2012;491(7422):119-24.





24. Moller FT, Andersen V, Wohlfahrt J, Jess T. Familial risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study 1977-2011. *Am J Gastroenterol.* avr 2015;110(4):564-71.
25. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 30 oct 2009;388(4):621-5.
26. Advances in IBD genetics | Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology [Internet]. [cité 7 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.27>
27. Hugot J-P, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard J-P, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* mai 2001;411(6837):599-603.
28. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 31 mai 2001;411(6837):603-6.
29. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection \*. *Journal of Biological Chemistry.* 14 mars 2003;278(11):8869-72.
30. Travassos LH, Carneiro LAM, Ramjeet M, Hussey S, Kim Y-G, Magalhães JG, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol.* janv 2010;11(1):55-62.
31. Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med.* janv 2010;16(1):90-7.
32. Nguyen HTT, Lapaquette P, Bringer M-A, Darfeuille-Michaud A. Autophagy and Crohn's Disease. *J Innate Immun.* juill 2013;5(5):434-43.
33. Salem M, Ammitzboell M, Nys K, Seidelin JB, Nielsen OH. ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease. *Autophagy.* 23 avr 2015;11(4):585-94.
34. Glas J, Konrad A, Schmechel S, Dambacher J, Seiderer J, Schroff F, et al. The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am J Gastroenterol.* mars 2008;103(3):682-91.
35. Parkes M, Barrett JC, Prescott N, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn disease susceptibility. *Nat Genet.* juill 2007;39(7):830-2.
36. Henckaerts L, Cleynen I, Brinar M, John JM, Van Steen K, Rutgeerts P, et al. Genetic



variation in the autophagy gene ULK1 and risk of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* juin 2011;17(6):1392-7.

37. Hoefkens E, Nys K, John JM, Steen KV, Arijs I, Goten JV der, et al. Genetic association and functional role of Crohn disease risk alleles involved in microbial sensing, autophagy, and endoplasmic reticulum (ER) stress. *Autophagy.* 5 déc 2013;9(12):2046-55.

38. Wu J, Kaufman RJ. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ.* mars 2006;13(3):374-84.

39. Demartino GN, Gillette TG. Proteasomes: machines for all reasons. *Cell.* 18 mai 2007;129(4):659-62.

40. Cleynen I, Vazeille E, Artieda M, Verspaget HW, Szczypiorska M, Bringer M-A, et al. Genetic and microbial factors modulating the ubiquitin proteasome system in inflammatory bowel disease. *Gut.* 1 août 2014;63(8):1265-74.

41. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* juill 2006;7(7):688-93.

42. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biology.* 2012;13(9):R79.

43. Pascal V, Pozuelo M, Borrueal N, Casellas F, Campos D, Santiago A, et al. A microbial signature for Crohn's disease. *Gut.* mai 2017;66(5):813-22.

44. Lopez-Siles M, Martinez-Medina M, Busquets D, Sabat-Mir M, Duncan SH, Flint HJ, et al. Mucosa-associated *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli* co-abundance can distinguish Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease phenotypes. *International Journal of Medical Microbiology.* 1 mai 2014;304(3):464-75.

45. Giaffer MH, Holdsworth CD, Duerden BI. The assessment of faecal flora in patients with inflammatory bowel disease by a simplified bacteriological technique. *Journal of Medical Microbiology.* 1 oct 1991;35(4):238-43.

46. Pascal V, Pozuelo M, Borrueal N, Casellas F, Campos D, Santiago A, et al. A microbial signature for Crohn's disease. *Gut.* mai 2017;66(5):813-22.

47. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* déc 1998;115(6):1405-13.

48. Sasaki M, Sitaraman SV, Babbitt BA, Gerner-Smidt P, Ribot EM, Garrett N, et al. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Laboratory Investigation.* oct 2007;87(10):1042-54.



49. Meconi S, Vercellone A, Levillain F, Payré B, Saati TA, Capilla F, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro. *Cellular Microbiology*. 2007;9(5):1252-61.
50. Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells - Boudeau - 2001 - *Molecular Microbiology* - Wiley Online Library [Internet]. [cité 5 mai 2021]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2958.2001.02315.x?sid=nlm%3Apubmed>
51. JCI - CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease [Internet]. [cité 5 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.jci.org/articles/view/30504>
52. Barnich N, Boudeau J, Claret L, Darfeuille-Michaud A. Regulatory and functional cooperation 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*. 2003;48(3):781-94.
53. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser A-L, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. août 2004;127(2):412-21.
54. Palmela C, Chevarin C, Xu Z, Torres J, Sevrin G, Hirten R, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1 mars 2018;67(3):574-87.
55. Elliott TR, Hudspith BN, Wu G, Cooley M, Parkes G, Quiñones B, et al. Quantification and characterization of mucosa-associated and intracellular *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. oct 2013;19(11):2326-38.
56. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. mai 2011;140(6):1785-94.
57. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. avr 2015;12(4):205-17.
58. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut*. nov 1996;39(5):690-7.
59. Nerich V, Monnet E, Etienne A, Louafi S, Ramée C, Rican S, et al. Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data. *Inflamm Bowel Dis*. mars 2006;12(3):218-26.
60. Pariente B, Cosnes J, Danese S, Sandborn WJ, Lewin M, Fletcher JG, et al.



Development of the Crohn's disease digestive damage score, the Lémann score. *Inflamm Bowel Dis.* juin 2011;17(6):1415-22.

61. The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota - *Gastroenterology* [Internet]. [cité 27 mai 2021]. Disponible sur: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(02\)12641-2/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(02)12641-2/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F)

62. Crohn's disease - *The Lancet* [Internet]. [cité 27 mai 2021]. Disponible sur: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(12\)60026-9/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(12)60026-9/fulltext)

63. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *The Lancet.* 3 nov 2012;380(9853):1590-605.

64. Mosli MH, Zou G, Garg SK, Feagan SG, MacDonald JK, Chande N, et al. 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. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG.* juin 2015;110(6):802-19.

65. Mici2008.pdf [Internet]. [cité 27 mai 2021]. Disponible sur: [https://www.ketterthill.lu/\\_Resources/Persistent/482f15cc18638742f19c9abd79a2edfc04a0e86e/Mici2008.pdf](https://www.ketterthill.lu/_Resources/Persistent/482f15cc18638742f19c9abd79a2edfc04a0e86e/Mici2008.pdf)

66. Roblin X. Intérêt des marqueurs sérologiques au cours des maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin. *Hépto-Gastro & Oncologie Digestive.* 1 janv 2006;13(1):33-7.

67. Beau P, Gay G, Arpurt J-P, Boustiere C, Boyer J, Canard J-M, et al. Place de l'endoscopie dans le bilan de la maladie de Crohn. *Acta Endosc.* oct 2004;34(S1):439-40.

68. inflammatory-bowel-disease-french-2009.pdf [Internet]. [cité 27 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/inflammatory-bowel-disease-french-2009.pdf>

69. guide\_medecin\_crohn\_web.pdf [Internet]. [cité 27 mai 2021]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2008-06/guide\\_medecin\\_crohn\\_web.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2008-06/guide_medecin_crohn_web.pdf)

70. Yumpu.com. Examens morphologiques au cours des MICI - SNFGE [Internet]. yumpu.com. [cité 27 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.yumpu.com/fr/document/read/26362155/examens-morphologiques-au-cours-des-mici-snfge>

71. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management | *Journal of Crohn's and Colitis | Oxford Academic* [Internet]. [cité 31 mai 2021]. Disponible sur: <https://academic.oup.com/ecco-jcc/article/11/1/3/2456546>





72. Berrebi D, Bruscoli S, Cohen N, Foussat A, Migliorati G, Bouchet-Delbos L, et al. Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood*. 15 janv 2003;101(2):729-38.
73. Peyrin-Biroulet L, Harmsen SW, Tremaine WJ, Zinsmeister AR, Sandborn WJ, Loftus EV. Surgery in a Population-Based Cohort of Crohn's Disease From Olmsted County, Minnesota (1970–2004): *American Journal of Gastroenterology*. nov 2012;107(11):1693-701.
74. *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 Prevents Colitis Induced by AIEC Bacteria in the Transgenic Mouse Model Mimicking Crohn's Disease | *Inflammatory Bowel Diseases* | Oxford Academic [Internet]. [cité 1 juin 2021]. Disponible sur: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/21/2/276/4602881>
75. Nitzan O, Elias M, Peretz A, Saliba W. Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 21 janv 2016;22(3):1078-87.
76. Zusso M, Lunardi V, Franceschini D, Pagetta A, Lo R, Stifani S, et al. Ciprofloxacin and levofloxacin attenuate microglia inflammatory response via TLR4/NF- $\kappa$ B pathway. *J Neuroinflammation*. 18 juill 2019;16(1):148.
77. Arnold GL, Beaves MR, Pryjdun VO, Mook WJ. Preliminary study of ciprofloxacin in active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. janv 2002;8(1):10-5.
78. Su JW, Ma JJ, Zhang HJ. Use of antibiotics in patients with Crohn's disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Digestive Diseases*. 2015;16(2):58-66.
79. Résumé des Caractéristiques du Produit [Internet]. [cité 2 sept 2021]. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0214683.htm>
80. Rivkin A, Gim S. Rifaximin: New Therapeutic Indication and Future Directions. *Clinical Therapeutics*. 1 juill 2011;33(7):812-27.
81. Lopetuso LR, Napoli M, Rizzatti G, Gasbarrini A. The intriguing role of Rifaximin in gut barrier chronic inflammation and in the treatment of Crohn's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 3 juin 2018;27(6):543-51.
82. Sartor RB. Review article: the potential mechanisms of action of rifaximin in the management of inflammatory bowel diseases. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2016;43(S1):27-36.
83. Dogan B, Fu J, Zhang S, Scherl EJ, Simpson KW. Rifaximin decreases virulence of Crohn's disease-associated *Escherichia coli* and epithelial inflammatory responses. *The Journal of Antibiotics*. mai 2018;71(5):485-94.
84. Oberc AM, Fiebig-Comyn AA, Tsai CN, Elhenawy W, Coombes BK. Antibiotics



Potentiate Adherent-Invasive *E. coli* Infection and Expansion. *Inflammatory Bowel Diseases*. 14 mars 2019;25(4):711-21.

85. Dogan B, Scherl E, Bosworth B, Yantiss R, Altier C, McDonough PL, et al. Multidrug resistance is common in *Escherichia coli* associated with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. janv 2013;19(1):141-50.

86. Kothary V, Scherl EJ, Bosworth B, Jiang Z-D, DuPont HL, Harel J, et al. Rifaximin Resistance in *Escherichia coli* Associated with Inflammatory Bowel Disease Correlates with Prior Rifaximin Use, Mutations in *rpoB*, and Activity of Phe-Arg- $\beta$ -Naphthylamide-Inhibitible Efflux Pumps. *Antimicrob Agents Chemother*. févr 2013;57(2):811-7.

87. Metabolic adaptation of adherent-invasive *Escherichia coli* to exposure to bile salts [Internet]. [cité 21 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6379400/>

88. Agus A, Richard D, Faïs T, Vazeille E, Chervy M, Bonnin V, et al. Propionate catabolism by CD-associated adherent-invasive *E. coli* counteracts its anti-inflammatory effect. *Gut Microbes*. 13(1):1839318.

89. Pennacchiotti E, D'Alonzo C, Freddi L, Occhialini A, De Biase D. The Glutaminase-Dependent Acid Resistance System: Qualitative and Quantitative Assays and Analysis of Its Distribution in Enteric Bacteria. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 [cité 11 août 2021];0. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02869/full>

90. Pos KM, Dimroth P, Bott M. The *Escherichia coli* Citrate Carrier CitT: a Member of a Novel Eubacterial Transporter Family Related to the 2-Oxoglutarate/Malate Translocator from Spinach Chloroplasts. *J Bacteriol*. août 1998;180(16):4160-5.

91. Freddi L, Damiano MA, Chaloin L, Pennacchiotti E, Al Dahouk S, Köhler S, et al. The Glutaminase-Dependent System Confers Extreme Acid Resistance to New Species and Atypical Strains of *Brucella*. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:2236.

92. Jennison AV, Verma NKY 2007. The acid-resistance pathways of *Shigella flexneri* 2457T. *Microbiology*. 153(8):2593-602.

93. Peralta DR, Adler C, Corbalán NS, García ECP, Pomares MF, Vincent PA. Enterobactin as Part of the Oxidative Stress Response Repertoire. *PLOS ONE*. 16 juin 2016;11(6):e0157799.

94. Chervy M, Barnich N, Denizot J. Adherent-Invasive *E. coli*: Update on the Lifestyle of a Troublemaker in Crohn's Disease. *Int J Mol Sci*. 25 mai 2020;21(10):3734.

95. Adler C, Corbalan NS, Peralta DR, Pomares MF, Cristóbal RE de, Vincent PA. The Alternative Role of Enterobactin as an Oxidative Stress Protector Allows *Escherichia coli* Colony Development. *PLOS ONE*. 2 janv 2014;9(1):e84734.



96. Yang Q, Li M, Spiller OB, Andrey DO, Hinchliffe P, Li H, et al. Balancing *mcr-1* expression and bacterial survival is a delicate equilibrium between essential cellular defence mechanisms. *Nat Commun.* 12 déc 2017;8(1):2054.
97. Delwiche CF, Kuhsel M, Palmer JD. Phylogenetic analysis of *tufA* sequences indicates a cyanobacterial origin of all plastids. *Mol Phylogenet Evol.* juin 1995;4(2):110-28.
98. Tavares-Carreón F, Fathy Mohamed Y, Andrade A, Valvano MA. ArnT proteins that catalyze the glycosylation of lipopolysaccharide share common features with bacterial N-oligosaccharyltransferases. *Glycobiology.* mars 2016;26(3):286-300.
99. Bringer M-A, Barnich N, Glasser A-L, Bardot O, Darfeuille-Michaud A. HtrA Stress Protein Is Involved in Intramacrophagic Replication of Adherent and Invasive *Escherichia coli* Strain LF82 Isolated from a Patient with Crohn's Disease. *Infection and Immunity.* 1 févr 2005;73(2):712-21.
100. Bringer M-A, Rolhion N, Glasser A-L, Darfeuille-Michaud A. The Oxidoreductase DsbA Plays a Key Role in the Ability of the Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Strain LF82 To Resist Macrophage Killing. *Journal of Bacteriology.* 1 juill 2007;189(13):4860-71.
101. Vazeille E, Chassaing B, Buisson A, Dubois A, De Vallée A, Billard E, et al. GipA Factor Supports Colonization of Peyer's Patches by Crohn's Disease-associated *Escherichia Coli*. *Inflammatory Bowel Diseases.* janv 2016;22(1):68-81.
102. Ramond E, Gesbert G, Rigard M, Dairou J, Dupuis M, Dubail I, et al. Glutamate utilization couples oxidative stress defense and the tricarboxylic acid cycle in *Francisella* phagosomal escape. *PLoS Pathog.* janv 2014;10(1):e1003893.



## SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession.

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens

De coopérer avec les autres professionnels de santé.

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.







## Résumé :

La maladie de Crohn (MC) est une pathologie inflammatoire de l'intestin qui évolue de manière chronique (MICI) d'étiologie mal connue et dont les conséquences sur la qualité de vie des patients sont considérables. La maladie de Crohn (MC) est enjeu majeur de santé publique du fait de l'absence de thérapeutique curative.

La muqueuse intestinale de certains patients atteints de la MC est anormalement colonisée par des *Escherichia coli* adhérents invasifs (AIEC) qui semblent jouer un rôle dans l'évolution de cette pathologie. Au vu de leur implication dans la maladie de Crohn, les AIEC semblent être une cible thérapeutique intéressante. Des études préliminaires sur des modèles cellulaires ont mis en évidence un effet de certains antibiotiques sur les capacités d'adhésion, d'invasion et de survie en macrophage des AIEC. Au cours de cette étude, nous avons étudié l'effet de trois antibiotiques, la rifaximine, la ciprofloxacine et la clarithromycine ainsi que deux associations, rifaximine plus ciprofloxacine et rifaximine plus clarithromycine à des doses sub inhibitrices sur le niveau d'expression de différents gènes impliqués potentiellement dans la virulence des AIEC.

Nous avons pu confirmer l'activité de ces antibiotiques sur l'expression de ces gènes, mais ce travail doit être poursuivi sur une collection plus importante et à l'aide d'autres stratégies notamment protéomiques. Les résultats obtenus permettront de mieux préciser le rôle des antibiotiques dans la prise en charge des patients colonisés par des souches d'AIEC.

## Mots-clés :

- Maladie de Crohn.
- *Escherichia coli* Adhérent Invasif.
- Rifaximine.
- Ciprofloxacine.
- Gènes de Virulence.
- Résistance.