



HAL
open science

Etude des marques épigénétiques pour l'identification de biomarqueurs prédictifs du portage des bactéries E. coli adhérentes et invasives et de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement personnalisé des patients atteints de maladie de Crohn

Jérémy Denizot

► **To cite this version:**

Jérémy Denizot. Etude des marques épigénétiques pour l'identification de biomarqueurs prédictifs du portage des bactéries E. coli adhérentes et invasives et de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement personnalisé des patients atteints de maladie de Crohn. Sciences du Vivant [q-bio]. université clermont auvergne, 2020. tel-04841532

HAL Id: tel-04841532

<https://hal.science/tel-04841532v1>

Submitted on 16 Dec 2024

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

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

Université Clermont Auvergne

Rapport d'activité

pour l'obtention de l'

Habilitation à Diriger les Recherches

Présentée et soutenue par

Jérémy DENIZOT

le 09 Avril 2020

Etude des marques épigénétiques pour l'identification de biomarqueurs prédictifs du portage des bactéries E. coli adhérentes et invasives et de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement personnalisé des patients atteints de maladie de Crohn

Composition du jury

Rapporteurs :

Dr. Pascale SERROR, UMR1319/INRA-AgroParisTech, Jouy en Josas

Dr. Mélanie HAMON, Institut Pasteur, G5 Chromatine et Infection, Paris

Dr. Eric CASCALES, UMR7255 CNRS/Aix-Marseille Université, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Marseille

Examineurs :

Pr. Valérie LIVRELLI, UMR 1071 Inserm/Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

Pr. Nicolas BARNICH, UMR 1071 Inserm/Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

Dr. Isabelle VAILLANT, UMR 6293, CNRS, Inserm/Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

Maître de conférences en Microbiologie/Biologie cellulaire (CNU 65)

Institut Universitaire de Technologie

Microbes intestin inflammation et Susceptibilité de l'Hôte (M2iSH)

U1071 Inserm/Université Clermont Auvergne, USC-INRA 2018

Clermont-Ferrand

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement les trois rapporteurs de mon HDR d'avoir accepté d'évaluer ce rapport d'activité ainsi que d'avoir accepté de faire le déplacement jusqu'à Clermont-Ferrand pour participer à ma soutenance.

*Un grand merci à **Pascale Serror** que j'ai rencontré il y a quelques années lors d'une soutenance de thèse au laboratoire et dont je suis le travail depuis un certain temps maintenant, toujours avec grand plaisir,*

*Merci à **Mélanie Hamon** dont j'admire le travail sur l'étude des modifications épigénétiques au cours des interactions hôte-pathogènes. Tous vos travaux m'ont beaucoup inspiré dans ma réflexion sur les projets de recherche que je souhaite mener dans le futur (et sont régulièrement utilisés pour des analyses d'articles en Master 2...),*

*Merci à **Eric Cascales** pour qui les systèmes de sécrétions n'ont (presque) plus aucun secret. Ce rapport est plus axé sur la réponse de l'hôte à l'infection que sur la bactérie elle-même, mais je suis sûr que nous pourrons tout de même échanger, lors de la soutenance, sur de passionnantes questions de microbiologie.*

*Merci à **Nicolas Barnich**, mon mentor, qui m'a formé, soutenu et fait confiance depuis plus de 10 ans maintenant et pour qui j'ai une profonde admiration. Merci pour ton aide au quotidien, pour ton enthousiasme et pour tes précieux conseils,*

*Merci à **Valérie Livrelli**, que je connais également depuis de nombreuses années maintenant. Merci d'être toujours aussi pétillante au quotidien, merci de partager ton immense culture avec nous tous, merci pour ton soutien,*

*Merci à **Isabelle Vaillant** qui a également accepté d'examiner ce travail. J'espère que j'aurai un jour le plaisir de collaborer avec toi dans le futur et que tu me feras profiter de tes grandes connaissances en matière de méthylation de l'ADN.*

*Merci à **l'ensemble de mes collègues du laboratoire M2iSH** pour leur bonne humeur, leur soutien, leurs conseils. Merci à tous d'être autant passionnés par votre travail et de tout faire pour que la vie au laboratoire soit des plus agréables pour nous tous!*

*Merci **Elodie Gimier et Mélissa Chervy** pour votre investissement et votre implication dans vos travaux de thèse. Il est clair que sans votre motivation et sans vos nombreuses (et précieuses) heures de travail, l'avancée de mes travaux de recherches serait fortement limitée,*

*Merci à **mes collègues de l'IUT** qui font de mes nombreuses heures d'enseignement toujours un plaisir,*

*Merci à **Patrick Varga-Weisz**, mon chef de post-doc du Babraham Institut à Cambridge (UK). Merci pour tout ce que tu m'as appris au cours de ces 2 années passées ensemble, et pour les jolis travaux que nous avons menés au BI.*

Merci à ma famille et à mes amis pour votre soutien sans faille, merci d'être toujours là.

Sommaire

| | |
|---|------------|
| 1-Curriculum Vitae | p2 |
| Fonctions Universitaires | p3 |
| Formation et Diplômes universitaires | p3 |
| Activités diverses | p4 |
| 2-Activités pédagogiques & Activités d'encadrement | p5 |
| Activités pédagogiques | p6 |
| Activités d'encadrement | p7 |
| 3-Thématiques de recherche | p9 |
| Stage de Master 2 et doctorat | p10 |
| Travaux de post-doctorat | p15 |
| 4-Liste des Travaux Scientifiques | p18 |
| Articles originaux | p19 |
| Revue et chapitres d'ouvrage | p20 |
| Liste des conférences sur invitation | p21 |
| Liste des communications orales pour lesquelles j'ai été l'orateur | p21 |
| Liste des communications orales pour lesquelles je n'ai pas été l'orateur | p22 |
| Liste des communications affichées | p24 |
| 5- Projets de recherche | p28 |
| Contexte des travaux de recherche | p29 |
| I- La maladie de Crohn | p29 |
| II- Facteurs étiologiques de la MC | p30 |
| 1- Facteurs génétiques dans la MC | p30 |
| 2- Facteurs environnementaux dans le MC | p30 |
| 3- Le microbiote intestinal dans la MC | p30 |
| Projets de recherche | |
| 1 : Mise en place du modèle Villin-CEACAM6 pour l'étude de l'interaction AIEC-épithélium iléal | p33 |
| 2 : Rôle des molécules donneuses de groupements méthyles dans la susceptibilité de l'hôte à héberger des bactéries AIEC | p37 |
| 3 : Étude de l'effet des bactéries AIEC sur les marques épigénétiques de la cellule hôte pour l'identification de biomarqueurs prédictifs du portage des AIEC | p42 |
| 4 : Étude du rôle des histones désacétylases de l'hôte dans la virulence des bactéries AIEC et dans la réponse de l'hôte à l'infection | p47 |
| 5 : Effet du mode de vie occidental sur la modulation épigénétique de l'expression des gènes et sur la susceptibilité des patients à héberger des pathobiontes | p52 |
| Contrats de recherche | |
| Financement des travaux de recherche | p54 |
| Collaborations en cours | p54 |
| 6-Références bibliographiques | p56 |

1-Curriculum Vitae

Jérémy Denizot

Né le 21/06/1986 à Montluçon (03), Nationalité Française

Coordonnées professionnelles

UCA-Inserm U1071, M2iSH

28 Place Henri Dunant

63000 Clermont-Ferrand

Tel : 04 73 17 83 81

E-mail : jeremy.denizot@uca.fr

Coordonnées personnelles

2 Allée Simone Weil

63430 Pont-du Château

Fonctions Universitaires

Depuis Septembre 2015 : Maître de conférences des Universités, Université Clermont Auvergne, IUT Génie Biologique/ Laboratoire INSERM U1071/UCA M2iSH USC-INRA 2018, Clermont-Ferrand

2012-2013 : ATER, 6 mois, IUT Génie Biologique, Université Clermont Auvergne (UCA). 144h de Travaux pratiques de microbiologie 1^{ère} année de DUT.

2009-2012 : Vacataire d'enseignement, IUT Génie Biologique, Université Clermont Auvergne (UCA), Travaux pratiques de biologie moléculaire, 1^{ère} année, 64h par an.

Formation et Diplômes universitaires

Février 2019 : Autorisation à la soutenance de l'HDR accordée par l'ED SVSAE, Clermont-Ferrand

Septembre 2013-Août 2015 : Stage post-doctoral

- Laboratoire : Babraham Institut, Nuclear Dynamic group, Cambridge, Royaume-Uni
- Encadrement : Dr. Patrick Varga-Weisz
- Financement : BBSRC, Biotechnologies and Biological Science Research Council
- Titre : *Étude du rôle du facteur de remodelage de la chromatine SMARCAD1 dans la mise en place des marques épigénétiques et dans la régulation de l'expression des gènes et dans la réponse à la colite induite chimiquement.*

2009-2013 : Doctorat d'Université, Spécialité Microbiologie, Thèse soutenue le 22 février 2013, à Clermont-Ferrand

- Laboratoire : M2iSH, « Microbes intestin inflammation et Susceptibilité de l'Hôte », UMR Université d'Auvergne/Inserm U1071, USC INRA-2018, dirigé par Mme le Pr. Darfeuille-Michaud, Clermont-Ferrand, France
- Encadrement : Dr. Nicolas Barnich
- Financement : Allocataire MENESR
- Titre de la thèse : *Perméabilité intestinale et régulation de l'expression du gène CEACAM6 : Implication des bactéries Escherichia coli associées à la maladie de Crohn.*

2009 : Master 2, Génétique et Physiologie, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, Mention Bien. **Stage 6 mois**.

- Laboratoire : M2iSH « Microbes intestin inflammation et Susceptibilité de l'Hôte », Dr. Nicolas Barnich
- Titre : *Influence des bactéries E. coli isolées de patients atteints de maladie de Crohn sur la perméabilité intestinale.*

2008 : Master 1, Biologie-Santé, Université Paul Sabatier, Toulouse. **Stage 8 mois**.

- Laboratoire : Stress, Chaperons et Développement, Centre de Biologie du Développement, Pr. Elisabeth Christians
- Titre : *Rôle du facteur de transcription HSF1 (Heat Shock Factor 1) dans la régulation de l'expression des gènes dans l'ovocyte murin en métaphase II.*

2007 : Licence Biologie, parcours Génétique, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand. Mention Bien

2006 : DUT Génie Biologique, Option Analyses Biologiques et Biochimiques, Université d'Auvergne. **Stage 10 semaines**.

- Laboratoire : M2iSH « Microbes intestin inflammation et Susceptibilité de l'Hôte » Dr Nicolas Barnich
- Titre : *Régulation de l'expression des pili de type 1 par le gène fliC chez les E. coli isolées de patients atteints de maladie de Crohn.*

Activités diverses

- Expertise de financements (DIM1Health-Ile de France (2018))
- Expertise d'articles pour des journaux internationaux (Plos One, European journal of nutrition, International Journal of Molecular Sciences, Nutrients, Gut, Microorganisms...)
- Guest Editor pour une « Special issue : host-pathogen interaction » de International Journal of Molecular Science (IJMS) : 2019-2020
- Animation au laboratoire M2iSH :
 - Organisation de la journée d'unité M2iSH, Septembre 2019
 - Organisation Journée accueil des patients de l'association François Aupetit (AFA) au laboratoire M2iSH, Septembre 2019
 - Participation à l'organisation du 22^{ème} congrès international CEACAM Symposium 2012, Clermont-Ferrand, Juin 2012. Demande de subventions, rédaction du livre des résumés, gestion budgétaire et logistique, secrétariat scientifique, accueil des participants.
- Membre de l'association Recherche de Bactériologie-Virologie (ARBV), Faculté de Médecine-Pharmacie, 28 Place Henri-Dunant, 63000 Clermont-Ferrand
- Président de Jury de Baccalauréat (Série Professionnelle Commerce-Octobre 2017 ; Série ES - Juillet 2018)

Répartition des enseignements

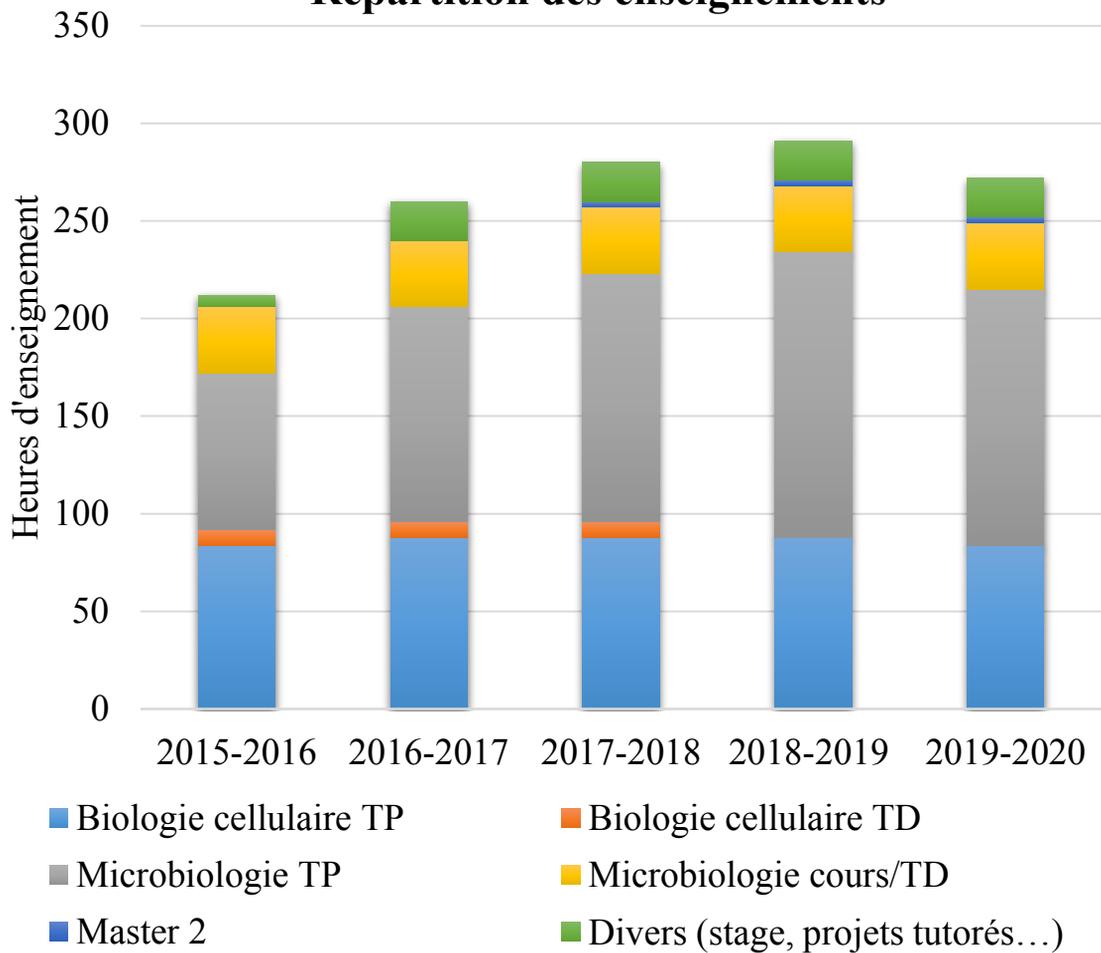


Figure 1 : Répartition des activités d'enseignement sur la période 2015-2020

Activités pédagogiques

J'ai la responsabilité des enseignements de Travaux Pratiques de Microbiologie en 1^{ère} année du département Génie Biologique à l'IUT de Clermont Ferrand et des travaux pratiques de Biologie cellulaire en 2^{ème} année. J'ai la responsabilité de l'organisation des modules, la préparation des TP, le recrutement de vacataires, la gestion des emplois du temps des différents intervenants.

Mes activités d'enseignement sont effectuées sur la base de 192h par an (**Figure 1**).

Enseignement à l'IUT de l'UCA, Département Génie Biologique

Enseignement de biologie cellulaire :

Responsable du module de TP de 2^{ème} année DUT Génie Biologique option Analyses Biologiques et Biochimiques (ABB)

Gestion des TP, recrutement d'un vacataire, organisation du planning des intervenants
Enseignement (80 à 100h/an)

TD Biologie cellulaire : signalisation cellulaire (8h/an)

Enseignements de Microbiologie :

Responsable de 2 modules de TP de 1^{ère} année

Recrutement des intervenants extérieurs

Organisation du planning des TP, préparation des supports pour les étudiants (13 TP)

Enseignement en TP de microbiologie 1^{ère} année, 2^{ème} année ABB et Diététiques (80 à 127h/an)

Enseignement en cours magistraux de microbiologie 1^{ère} année (10h/an)

Enseignement TD en 1^{ère} année (24h/an)

Activités pédagogiques annexes (6 à 15h/an) :

Encadrement de projets tutorés : 4 groupes par an en première année (ABB1), 2 ou 3 groupes/an en 2^{ème} année (ABB2)

Suivi et visite des étudiants en stage (10 par an)

Soutenances de stage ABB2 et Licence professionnelle (10-15 par an)

Étude des dossiers pour le recrutement des étudiants en première année

Animation annuelle d'un atelier de biologie cellulaire aux journées portes ouvertes de l'IUT

Enseignement collegium sciences de Biologie de l'UCA

Master 2 Biologie Santé, parcours Génétique, Physiologie, Pathologies (GPP) et Nutrition, module de microbiologie cellulaire. Analyse de publications (3h/an)

2018 : Participation au jury de soutenances de stages de Master 2 Biologie Santé, GPP et Nutrition (4 jours) et au Master 2 Microbiologie (2 soutenances)

Activités d'encadrement

DUT/Licence (5 étudiants)

- **Fanny De Clercq**, Stagiaire DUT Génie Biologique option ABB, UCA, Avril-Juin 2018 (10 semaines) : « Influence d'un régime enrichi en molécules donneuses de groupements méthyles sur l'infection par les bactéries AIEC isolées de patients atteints de maladie de Crohn ». **Encadrement 50%, Elodie Gimier 50%**.

- **Léa Laborier**, Stagiaire DUT Génie Biologique option ABB, UCA, Avril-Juin 2017 (10 semaines) : « Effets de l'infection par les *E. coli* adhérents et invasifs (AIEC) sur les modifications post-traductionnelles des histones de la cellule hôte ». **Encadrement 50%, Elodie Gimier 50%**.

- **Alexandre Fagnan**, Stagiaire 3^{ème} année Magistère Biologie, Paris-Sud 11, Mars-Août 2014. (6 mois) : « Régulation des marques épigénétiques des histones par le facteur de remodelage de la chromatine SMARCA4 ». **Encadrement 100%**

- **Justine Faure**, Stagiaire DUT Génie Biologique option ABB, Université d'Auvergne, Avril-Juin 2012 (10 semaines) : « Rôle de la méthylation du promoteur du gène *CEACAM6* dans le contrôle de son expression ». **Encadrement 100%**

- **Gwladys Sevrin**, Stagiaire DUT Génie Biologique option ABB, Université d'Auvergne, Avril-Juin 2011 (10 semaines) : « Rôle du facteur de transcription HIF-1 dans l'induction de l'expression du gène *CEACAM6* en réponse à une infection par les bactéries AIEC isolées de patients atteints de maladie de Crohn ». **Encadrement 100%**

École d'ingénieurs et Master 2 (5 étudiants)

- **Mélissa Chervy**, Stagiaire Master 2 Recherche Biologie Santé, parcours Génétique, Physiologie et Pathologies, UCA (6 mois) « Rôle des histones désacétylases dans le processus d'invasion des cellules intestinales par les *E. coli* associés à la maladie de Crohn », Janvier-Juin 2019. M2iSH. **Encadrement 100%**

- **Elodie Gimier**, Stagiaire Master 2 Recherche Génétique et Physiologie, UCA (6 mois) : « Effet d'un régime alimentaire enrichi en molécules donneuses de méthyles sur l'expression des gènes de l'intestin ». Janvier- Juin 2016. M2iSH. **Encadrement 100%**

- **Raphael Mattiuz**, Stagiaire de Master 2 Recherche, Université Pierre et Marie Curie, Paris, Février-Juillet 2015 (6 mois) « Rôle de SMARCA4 dans la mise en place d'une colite ». Babraham Institute. **Encadrement 100%**

- **Csaba Matolcsi**, Stagiaire de 4^{ème} année Polytech Clermont-Ferrand (4 mois) : « Étude des marques de crotonylation des histones dans l'épithélium intestinal de souris » Avril-Juillet 2015. Babraham Institute. **Encadrement 100%**

- **Paul Madeddu**, Stagiaire de 4^{ème} année Polytech Clermont-Ferrand (4 mois) : « Rôle de SMARCD1 dans le contrôle de l'expression des gènes dans l'intestin : étude à l'échelle du génome ». Avril-Juillet 2014. Babraham Institute. **Encadrement 100%**

Thèses (2 étudiantes)

- **Mélissa Chervy**, Étudiante en thèse 2019-2022, Financement Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) « Rôle des histones désacétylases dans le processus d'invasion des cellules épithéliales intestinales par les *E. coli* associés à la maladie de Crohn ». **Co-encadrement (80%) avec le Pr. Nicolas Barnich (20%), 100% après la soutenance de l'HDR.**

- **Elodie Gimier**, Étudiante en thèse 2016-2020, Financement Nouveau Chercheur Région Auvergne, Jérémie Denizot. « Effet d'un régime enrichi en molécules donneuses de groupements méthyles sur la sensibilité à une infection par les bactéries AIEC isolées de patients atteints de maladie de Crohn ». **Co-encadrement (80%) avec le Pr. Nicolas Barnich (20%). Soutenance le 14 janvier 2020.**

Encadrement technique d'étudiants en thèse :

- **Gwladys Sevrin**, « Adaptation des bactéries *E. coli* adhérentes-invasives à l'environnement digestif : implication des flagelles et du système de sécrétion de type VI dans la pathogénicité » thèse soutenue le 29 Mars 2018.
- **Allison Agus**, « *E. coli* adhérent-invasif et colonisation de la muqueuse intestinale : impact de la nutrition et des régulations épigénétiques » thèse soutenue le 14 Décembre 2015.

Stage de Master 2 (6 mois) et doctorat (3 ans)

Unité M2iSH « Microbes intestin inflammation et Susceptibilité de l'Hôte », UMR Inserm Université d'Auvergne U1071, USC-INRA 2018, dirigée par le Pr. Arlette Darfeuille-Michaud. Sous la direction du Professeur Nicolas Barnich.

Le projet scientifique auquel j'ai participé au cours de mon Master 2 Recherche puis au cours de ma thèse s'intéressait au rôle des bactéries AIEC « Adhérents et Invasifs *Escherichia coli* » dans l'étiologie de la Maladie de Crohn (MC). Ce pathovar particulier d'*Escherichia coli* a été isolé de lésions iléales de patients atteints de MC et a été décrit dès 1998 par le Pr. Arlette Darfeuille-Michaud. Il a été clairement démontré, que 21% à 63% des patients hébergent ce pathovar particulier d'*E. coli* et que celui-ci participe activement au déclenchement et au maintien de l'inflammation intestinale chez ces patients (Darfeuille-Michaud et al., 1998, 2004; Palmela et al., 2018). Ces bactéries possèdent des gènes de virulence leur permettant d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales ainsi que de survivre et de se multiplier en macrophages (Barnich et al., 2003; Bringer et al., 2005; Rolhion et al., 2010). Il a été observé que ces bactéries utilisaient une molécule anormalement exprimée par les cellules intestinales des patients, le récepteur glycosylé CEACAM6 (Barnich et al., 2007). Le laboratoire utilise un modèle de souris humanisées exprimant le récepteur humain CEACAM6 (souris transgéniques CEABAC10) pour étudier les interactions entre le tube digestif et les bactéries AIEC (Carvalho et al., 2009). C'est dans ce contexte de recherche que j'ai réalisé mon stage de Master 2 et ma thèse de doctorat.

Objectifs du Master 2 et du doctorat

L'objectif de mon Master 2 consistait à étudier le rôle des bactéries AIEC dans l'altération de la perméabilité intestinale fréquemment observée chez les patients atteints de MC. Au cours de ma thèse, mon travail s'est concentré sur deux autres axes de recherche : (1) étudier l'effet d'un régime de type occidental sur la composition du microbiote intestinal et sur la susceptibilité de souris à développer une inflammation en réponse à une infection par les bactéries AIEC ; et (2) comprendre les mécanismes moléculaires menant à une expression anormale du gène *CEACAM6* chez les patients atteints de MC.

✓ ***Étude de la fonction barrière de l'intestin en réponse à une infection par les AIEC***

Il a été rapporté que les patients atteints de MC présentent une augmentation anormale de la perméabilité intestinale suggérant que ce phénomène participe à la physiopathologie de la MC (Chang et al., 2017). L'altération de la fonction barrière de l'intestin permet la translocation

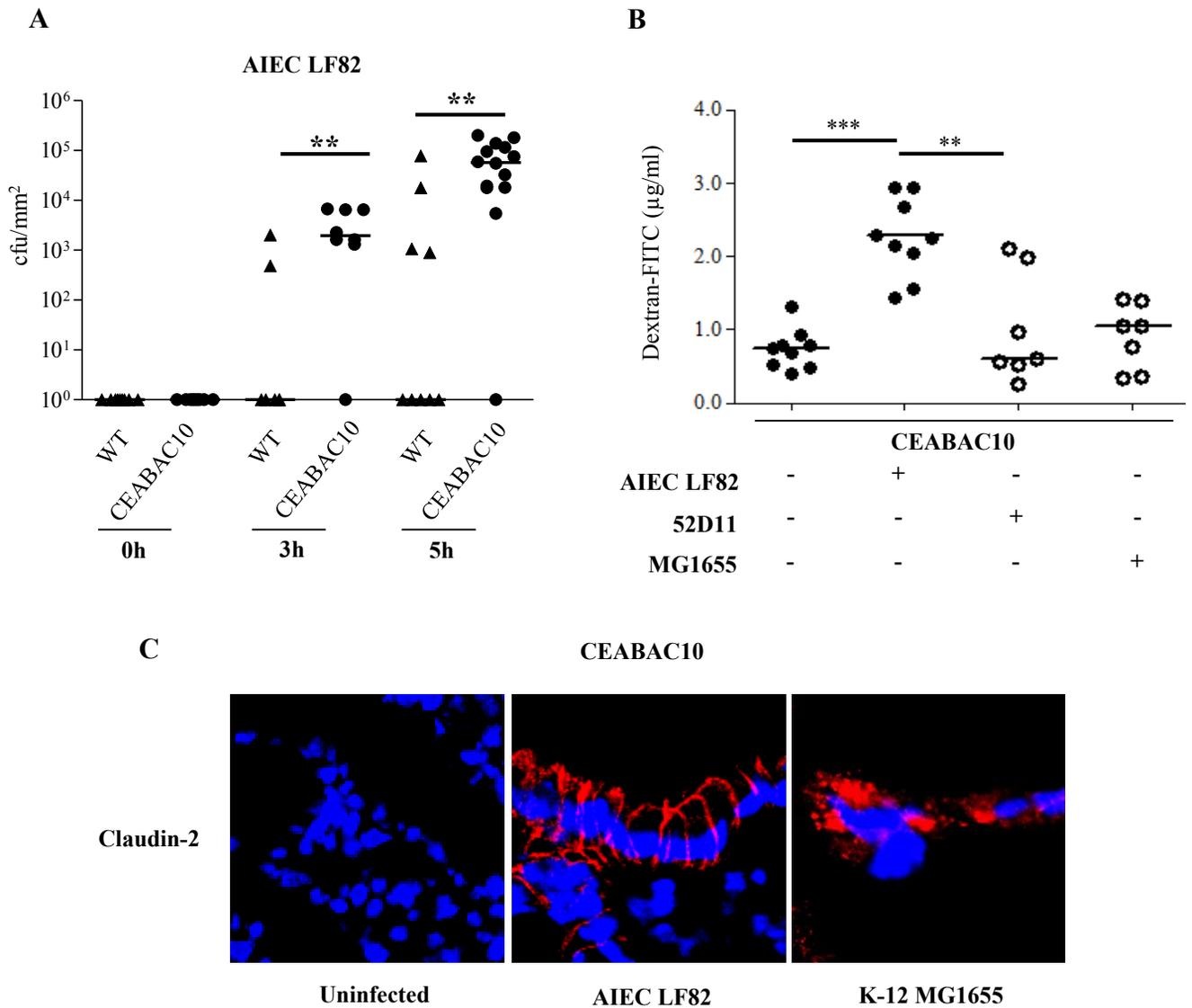


Figure 2 : La souche AIEC LF82 altère la fonction barrière de l'intestin.

A- Translocation de la souche AIEC LF82 au travers d'une muqueuse colique de souris WT et CEABAC10 en système de chambres de Ussing. **B-** Mesure de la perméabilité intestinale *in vivo* en réponse à l'infection de souris CEABAC10 par les souches AIEC LF82, 52D11 (mutant AIEC LF82 non pilié) et MG1655 (souche commensale). La perméabilité intestinale a été évaluée par administration de dextran-FITC 4kDa par voie orale 5h avant dosage de la fluorescence dans le sérum des animaux. **C-** Marquage immunofluorescent de la protéine de jonction « pore-forming » Claudine-2 sur coupe de côlon de souris CEABAC10 infectées ou non. *:p<0,05; **:p<0,01, ***:p<0,001, t-test, Mann-Whitney.

de bactéries du tube digestif ainsi que d'antigènes présents dans la lumière intestinale, entraînant une stimulation anormale des cellules immunitaires sous-jacentes. Nous avons utilisé des approches *ex vivo* et *in vivo* afin de déterminer le rôle des bactéries AIEC dans l'altération de la fonction barrière de l'intestin. Nous avons utilisé la méthode des chambres de Ussing pour l'analyse de la translocation des bactéries AIEC au travers de muqueuses intestinales isolées de souris. Ces expériences ont montré que les bactéries AIEC étaient capables de transloquer au travers de la muqueuse colique murine, uniquement lorsque celles-ci expriment la molécule CEACAM6, utilisée comme récepteur par ces bactéries (muqueuses coliques des souris CEABAC10) (**Figure 2A**). Les analyses de perméabilité intestinale *in vivo* ont également mis en évidence que les bactéries AIEC altèrent la perméabilité intestinale des souris CEABAC10, de façon dépendante de l'expression des pili de type 1 et contrairement à des souches non pathogènes comme la souche *E. coli* MG1655. Cette altération est associée à une augmentation de l'expression de la protéine de jonction Claudine-2, comme observé par immunofluorescence sur coupe de côlons (**Figures 2B-C**). Nous avons pu corrélérer, par des marquages immunohistochimiques réalisés sur des biopsies de patients atteints de MC et de sujets contrôles, que l'augmentation de la protéine de jonction Claudine-2 est fortement associée à une augmentation de l'expression de CEACAM6. Un ciblage de la protéine Claudine-2 pourrait être une stratégie alternative pour limiter le développement d'un état inflammatoire chez les patients atteints de MC. Ces résultats ont fait l'objet de la publication dans le journal **Inflammatory Bowel Disease** (Denizot et al., 2012) et de plusieurs communications orales et affichées dans différents congrès nationaux et internationaux (présentées dans la section présentations orales et affichées).

✓ *Rôle de l'alimentation dans la colonisation par les bactéries AIEC*

Il a clairement été démontré une association entre le mode de vie occidental et une forte prévalence des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) (Piovani et al., 2019). La deuxième étude menée au cours de ma thèse, en collaboration étroite avec une post-doctorante du laboratoire, a visé à déterminer les effets d'une nourriture de type occidentale (riche en sucres et en graisses) sur la composition du microbiote intestinal, sur la physiologie intestinale ainsi que sur la susceptibilité des souris à être colonisées par les bactéries AIEC. Au cours de cette étude, des souris transgéniques CEABAC10 et sauvages ont reçu une alimentation classique ou une alimentation dite « riche ». Par des approches de pyroséquencage utilisant la technologie Roche 454, nous avons mis en évidence que le régime riche altérait de façon drastique les populations bactériennes (qualitativement et

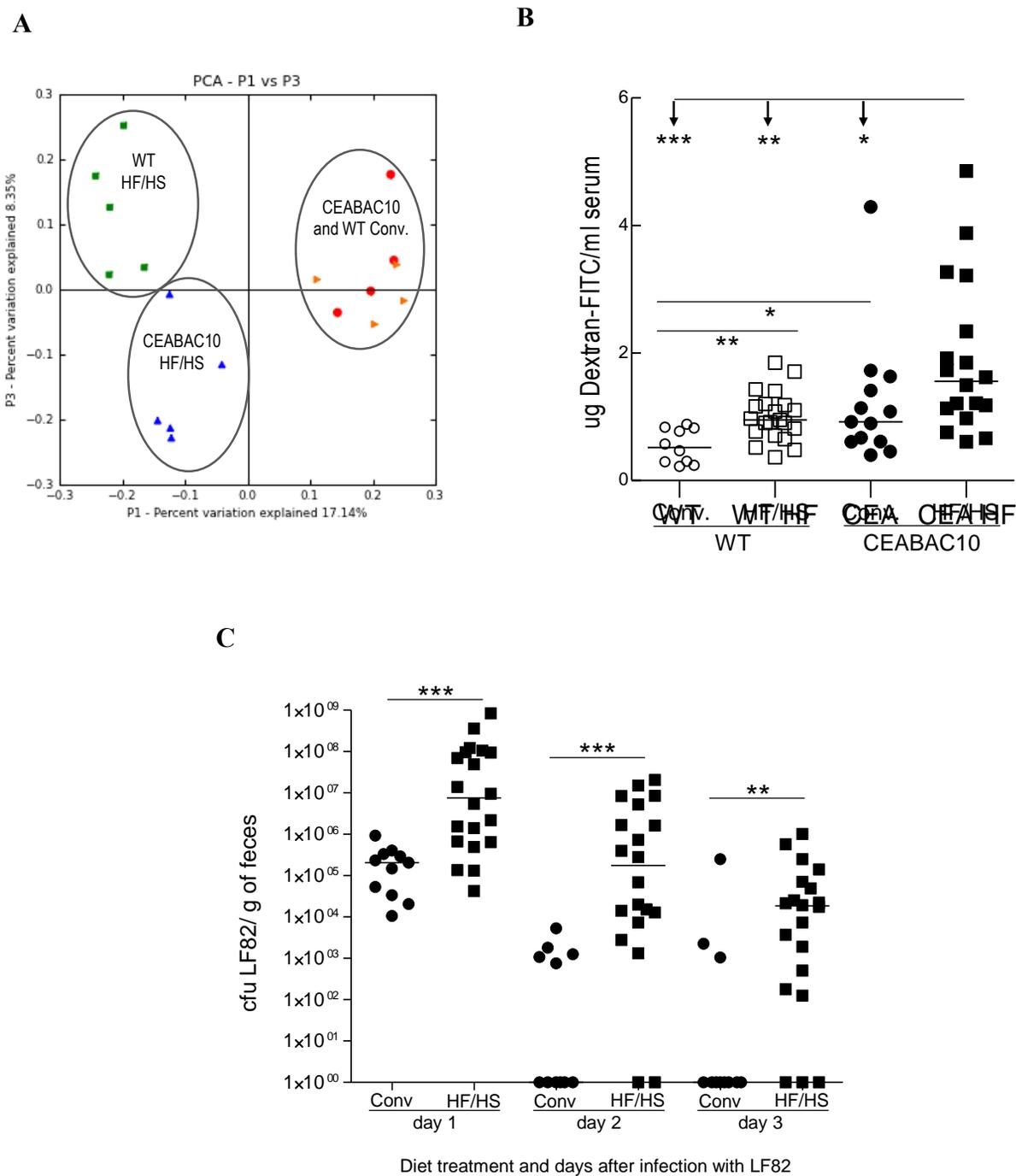


Figure 3 : Effet d'un régime alimentaire enrichi en graisses et en sucres sur la composition du microbiote intestinal, sur la perméabilité intestinale et sur la colonisation par les AIEC. Des souris WT et CEABAC10 ont reçu un régime alimentaire conventionnel (Conv) ou enrichi en graisses et en sucres (HF/HS) pendant 12 semaines. **A-** Analyse en composante principale de la composition du microbiote fécal des animaux. **B-** Mesure de la perméabilité intestinale par dosage du dextran-FITC 4kDa dans le sérum 5h après administration intra-gastrique du produit. **C-** Colonisation intestinale par la bactérie AIEC LF82 au cours du temps. Les bactéries AIEC ont été dénombrées dans les fèces des animaux aux jours 1, 2 et 3 post-infection. *:p<0,05; **:p<0,01, ***:p<0,001, T-test, Mann-Whitney.

quantitativement) présentes dans la flore intestinale des souris CEABAC10 (**Figure 3A**) avec une augmentation des bactéries connues pour avoir un effet néfaste et pro-inflammatoire sur la muqueuse intestinale. Nous avons montré que les souris nourries avec un régime riche présentaient une altération de la perméabilité intestinale *in vivo* (**Figure 3B**) et une diminution de la couche protectrice de mucus à la surface du côlon. Nous avons également observé que les bactéries AIEC persistaient beaucoup plus longtemps dans le tube digestif des souris recevant un régime riche comparativement aux souris recevant un régime conventionnel (**Figure 3C**). La présence d'un tel micro-environnement chez un patient génétiquement prédisposé à développer une MC (surexpression de CEACAM6, mutation dans certains gènes de susceptibilité...) pourrait permettre l'implantation facilitée et donc la sélection de bactéries de type AIEC capables d'induire une forte inflammation intestinale et de maintenir le caractère chronique de l'inflammation caractéristique des MICI. De plus, cette étude a permis de mieux comprendre la plus forte prévalence des MICI observée dans les pays industrialisés comparativement aux pays en développement. L'ensemble de ces résultats a été publié dans la revue **Gut**, où je figure en co-premier auteur (Martinez-Medina et al., 2014).

✓ *Régulation de l'expression du gène CEACAM6 par HIF-1 de façon dépendante de la méthylation de l'ADN*

Dans un 3^{ème} projet, j'ai réalisé une étude moléculaire de la régulation de l'expression du gène *CEACAM6*. Ce gène est anormalement surexprimé par les entérocytes des patients atteints de MC et permet aux bactéries AIEC de coloniser la muqueuse intestinale et d'induire une inflammation. Aucune étude de « Genome Wide Association Studies » (GWAS) n'a révélé de polymorphisme dans le gène *CEACAM6* associé à la maladie de Crohn (Glas et al., 2011). Nous avons cherché à identifier et à décrire les mécanismes à l'origine de cette expression anormale. À ce titre, une analyse détaillée du promoteur du gène *CEACAM6* a été conduite et il a été observé la présence de 5 dinucléotides CpG potentiellement méthylés, dont deux se trouvaient au sein des sites de fixation pour le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inductible Factor-1). Une analyse des niveaux de méthylation du promoteur dans des lignées de cellules épithéliales intestinales exprimant différents niveaux de *CEACAM6* a été réalisée par une approche de modification de l'ADN au bisulfite suivi d'un clonage et d'un séquençage par la méthode de SANGER. Cette approche a mis en évidence une corrélation inverse entre les niveaux de méthylation des sites de fixation pour HIF-1 et l'expression du gène *CEACAM6*, suggérant un rôle de la méthylation de l'ADN et du facteur HIF-1 dans le contrôle de l'expression du gène *CEACAM6* (**Figures 4A-D**). Nous avons ensuite confirmé ces hypothèses

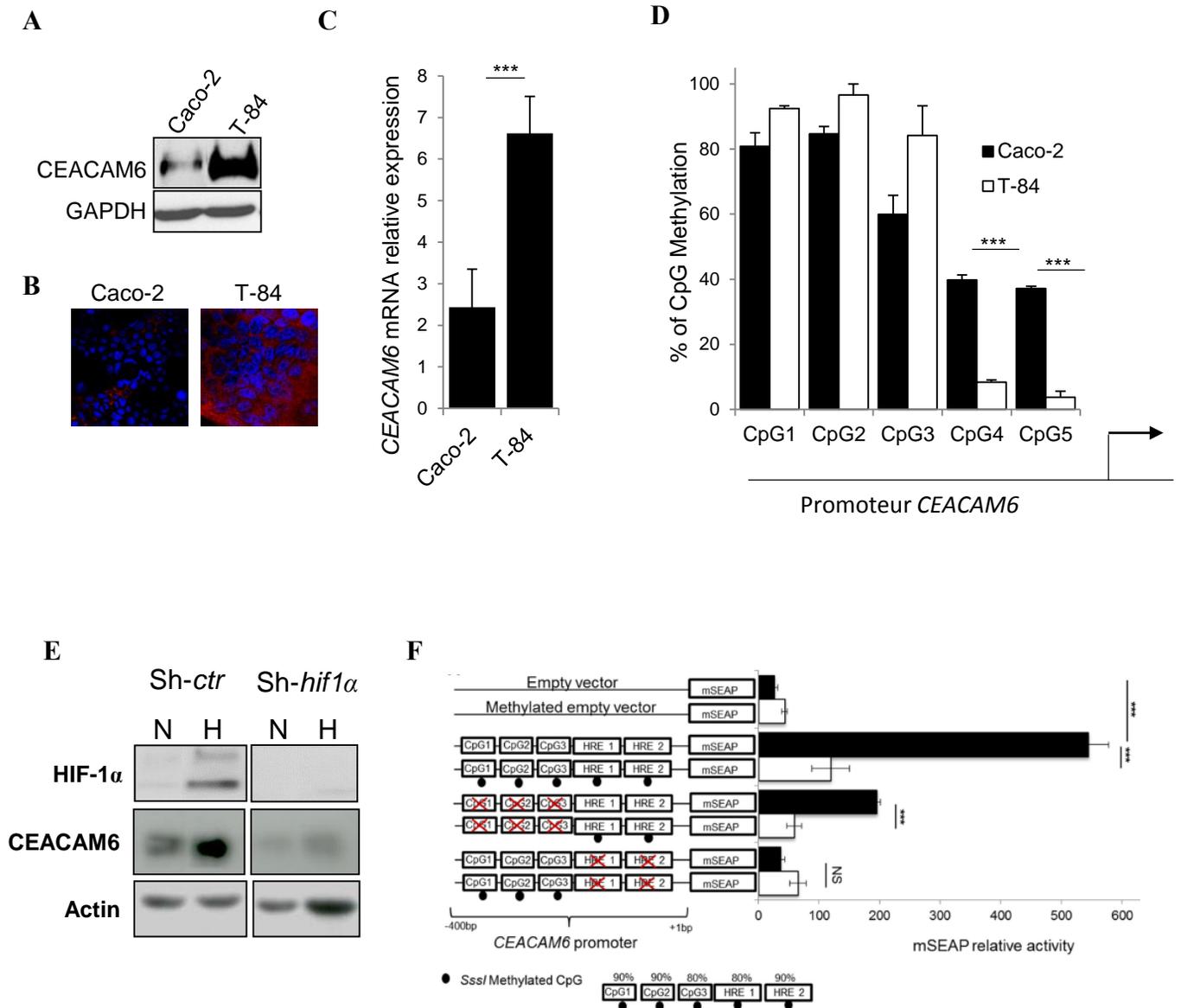


Figure 4 : HIF-1 régule l'expression de *CEACAM6* dans les cellules épithéliales intestinales de façon dépendant de la méthylation de ses sites de fixation.

A-C- Niveau d'expression de *CEACAM6* dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2 et T84 analysé par A- Western blot, B- Immunofluorescence, C- RT-qPCR. D- Niveau de méthylation, mesuré par bisulfite/SnapShot, des 5 dinucléotides CpG présents dans le promoteur du gène *CEACAM6*. E- Western blot HIF-1alpha et *CEACAM6* réalisé sur des cellules T84 contrôles et T84 exprimant un shRNA dirigé contre *hif1-alpha* (sh-hif1-alpha) en condition de normoxie (N) et d'hypoxie (H). F- Le promoteur du gène *CEACAM6* a été cloné en amont du gène rapporteur mSEAP. Les dinucléotides CpG1, 2 et 3 ainsi que les 2 sites de fixation pour HIF-1 (contenant chacun un dinucléotide CpG) ont été mutés par mutagenèse dirigée. Les constructions ont été méthylées *in vitro* (les sites méthylés sont indiqués par des points noirs) par action de l'enzyme SssI avant transfection dans des cellules HEK293. Les niveaux d'activité de l'enzyme reportrice sont présentés. *:p<0,05; **:p<0,01, ***:p<0,001, t-test, Mann-Whitney.

par l'utilisation de différentes approches de siRNA, de shRNA, par Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et par un système de gène rapporteur méthylé *in vitro* (**Figures 4E-F**). Ces expériences ont permis de confirmer que l'absence de méthylation sur le promoteur du gène *CEACAM6* favorisait la fixation de HIF-1 induisant ainsi l'expression de *CEACAM6*. Afin de confirmer ces résultats *in vivo*, nous avons induit une baisse des niveaux de méthylation de l'ADN des cellules intestinales chez des souris transgéniques CEABAC10. Pour cela, les animaux ont reçu une nourriture pauvre en donneurs de groupements méthyles ce qui a entraîné une baisse significative du niveau de méthylation du promoteur *CEACAM6*. Cette diminution a été corrélée à une augmentation de l'expression de *CEACAM6* dans le côlon des animaux, ainsi qu'à une susceptibilité augmentée à la colonisation par les bactéries AIEC. Ce travail a mis en évidence un des mécanismes de la régulation de l'expression de *CEACAM6* pouvant expliquer l'expression anormale observée chez les patients MC. Ceci pourrait permettre la colonisation de l'épithélium par les bactéries AIEC qui seraient ensuite capables d'accentuer l'expression de *CEACAM6* de par l'induction de TNF- α et d'interferon- γ (molécules pro-inflammatoires connues pour induire l'expression du gène *CEACAM6*). Cependant, d'autres mécanismes épigénétiques pourraient contribuer à l'augmentation de l'expression de *CEACAM6* chez les patients. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal **Gut** (Denizot et al., 2015).

✓ *Travaux complémentaires menés en parallèle du travail de doctorat*

En parallèle de ces 3 études de ma thèse, j'ai également été amené à collaborer étroitement avec un post-doctorant et une ingénieure d'étude sur deux autres projets.

Le premier projet a consisté en l'analyse des variants du gène *fimH* (codant l'adhésine permettant l'interaction des AIEC avec *CEACAM6*) au sein d'une collection de souches AIEC. Nous avons mis en évidence la présence de mutations pathoadaptatives favorisant une interaction entre les bactéries AIEC et *CEACAM6*, phénomène n'étant pas observé dans les souches d'*E. coli* commensales. Ce travail a montré l'évolution des souches AIEC, expliquant ainsi les raisons de leur virulence dans le contexte de la maladie de Crohn. Ces résultats ont été publiés dans le journal **Plos Pathogens**, où je figure en 2^{ème} auteur (Dreux et al., 2013).

La seconde étude a visé à montrer que des souches de levures probiotiques de type *Saccharomyces cerevisiae* avaient un rôle protecteur au niveau de la barrière intestinale en modèle murin de souris CEABAC10 consécutivement à une infection par les bactéries AIEC. Au cours de ce travail, j'ai réalisé les analyses de perméabilité intestinale sur des souris

infectées par les bactéries AIEC, traitées ou non par des levures probiotiques. Cette étude permet d'envisager une thérapie à base de probiotiques pour les patients atteints de MC et hébergeant des AIEC. Cette étude a été publiée dans le journal **Inflammatory Bowel Disease** (Sivignon et al., 2015).

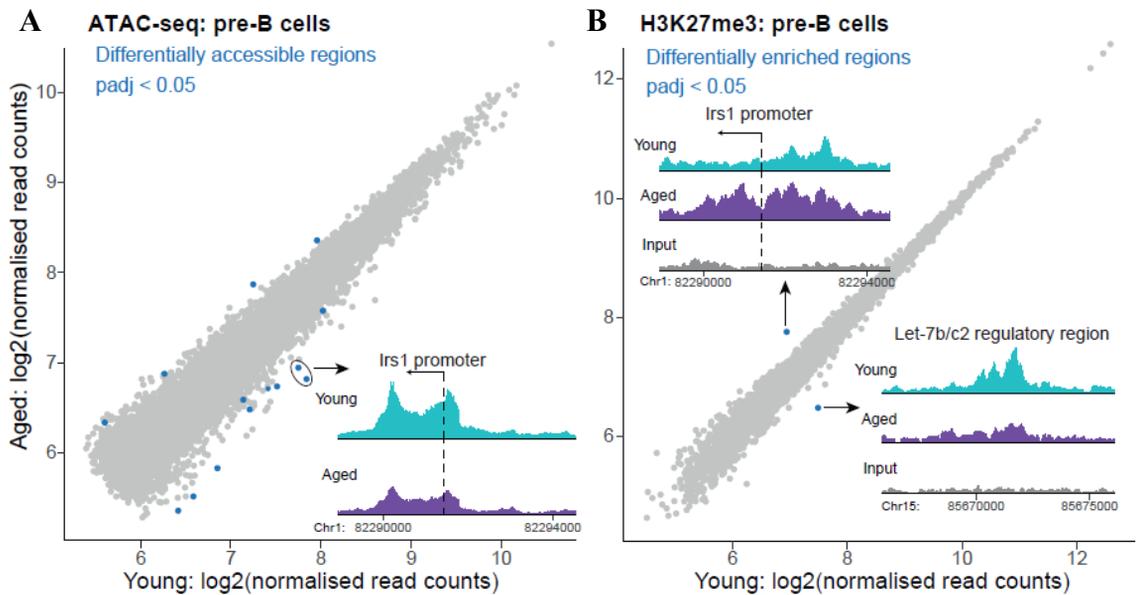


Figure 5 : Changements d'accessibilité de la chromatine et de la marque H3K27me3 dans les cellules pré-B au cours du vieillissement.

A- L'analyse des « peaks » ATAC-seq dans les cellules pré-B révèle seulement 4 régions montrant une accessibilité augmentée de la chromatine et 10 présentant une accessibilité diminuée au cours du vieillissement. Trois des régions dont l'accessibilité est diminuée sont situées dans le gène *Irs1* (insert). **B-** L'analyse ChIP-seq de la marque H3K27me3 révèle seulement 2 sites génomiques présentant une altération de l'apposition de cette marque répressive au cours du vieillissement des cellules pré-B. L'une est située dans le promoteur du gène *Irs1* (augmentation de H3K27me3) et l'autre dans une région régulatrice du miRNA *Let-7b/c2* (diminution de H3K27me3). Ces deux régions d'intérêt sont représentées dans les inserts.

Travaux de post-doctorat

Suite à mon doctorat et dans l'optique de poursuivre mon activité de recherche dans le domaine de la physiologie intestinale et de l'épigénétique, j'ai rejoint le « Babraham Institute » de Cambridge (Royaume-Uni) en septembre 2013 au sein de l'équipe du Dr. Patrick Varga-Weisz, où j'ai été amené à travailler sur trois projets en parallèle. Ce travail de post-doctorat a été financé par des fonds obtenus par le laboratoire d'accueil (BBSRC).

✓ *Effet de l'âge sur l'organisation du génome des lymphocytes B*

Ce premier projet, mené dans le cadre d'une collaboration pluri-disciplinaire entre plusieurs post-doctorants du groupe « Nuclear dynamics », a consisté à analyser l'effet de l'âge sur l'organisation du génome des lymphocytes B à différents stades de leur développement. Cette étude avait pour but de comprendre les mécanismes moléculaires menant à une altération des défenses immunitaires au cours du vieillissement. Il a été observé des altérations du mécanisme de recombinaison VDJ dans les lymphocytes au cours du vieillissement, pouvant expliquer l'immunité réduite chez les personnes âgées. Pour évaluer les effets du vieillissement sur le développement des cellules B, nous avons étudié l'expression génique et la structure de la chromatine à l'échelle du génome (modifications post-traductionnelles des histones et conformation 3D des chromosomes) dans les cellules pro-B et pré-B de la moelle osseuse de souris jeunes et âgées. Cette étude a révélé que les niveaux d'expression de la plupart des gènes sont généralement conservés dans des précurseurs de cellules B isolés de souris âgées par rapport à de jeunes souris. Néanmoins, des changements d'expression spécifiques à l'âge ont été observés au niveau de certains gènes, y compris les gènes codant pour des micro-ARN. Il est important de noter que ces changements sont associés à des altérations de la structure de la chromatine, notamment l'accessibilité à la chromatine, les modifications des histones, les interactions promoteur à longue distance et la compartimentation nucléaire. Des travaux antérieurs avaient montré que la différenciation des cellules était étroitement liée aux modifications des interactions entre les promoteurs et les « enhancers ». Nous avons constaté que le vieillissement des précurseurs des cellules B est accompagné par des altérations importantes des interactions promoteurs-enhancers, à l'échelle du génome. Nous avons identifié une diminution importante de l'expression de gènes impliqués dans des composants de la voie de signalisation du facteur de croissance analogue à l'insuline, en particulier la « down-regulation » de *Irs1* et la « up-regulation » de l'expression du micro-ARN Let-7, comme une signature du phénotype âgé. Ces changements d'expression ont été associés à des

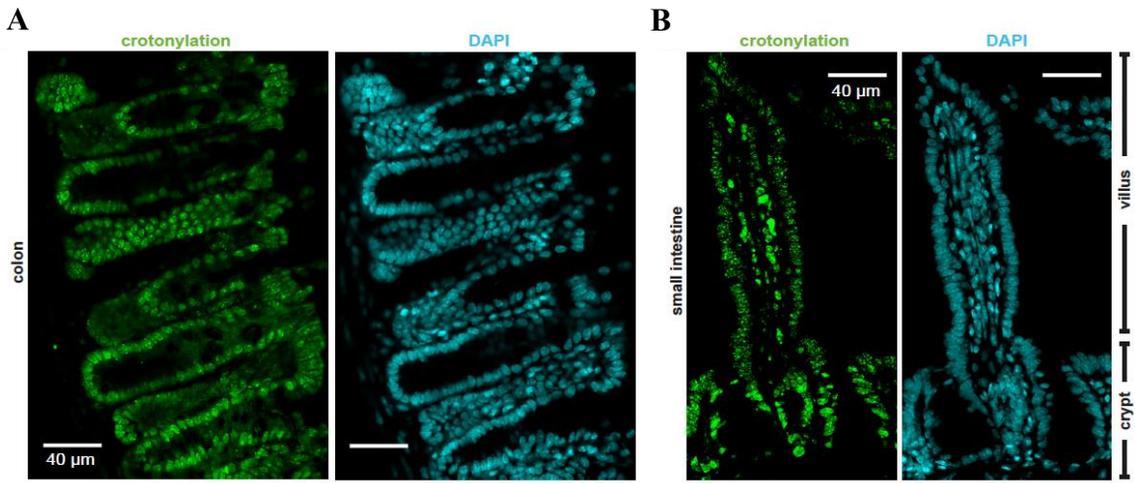


Figure 6 : La marque de crotonylation des histones est fortement présente dans l'intestin. Immunofluorescence utilisant un anticorps anti-panCrotonyllysine dans **A-** le côlon et **B-** l'intestin grêle. Échelle: 40μm.

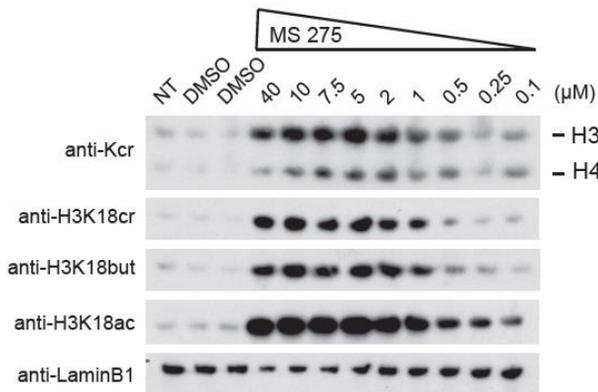


Figure 7 : Les histones désacétylases de classe 1 possèdent une activité décrotonylase.

Les cellules HCT116 ont été traitées avec un inhibiteur de HDAC de classe 1 (MS 275) pendant 18h. L'accumulation des marques crotonyl, butyryl et acétyl ont été quantifiées sur différentes lysines par western blot.

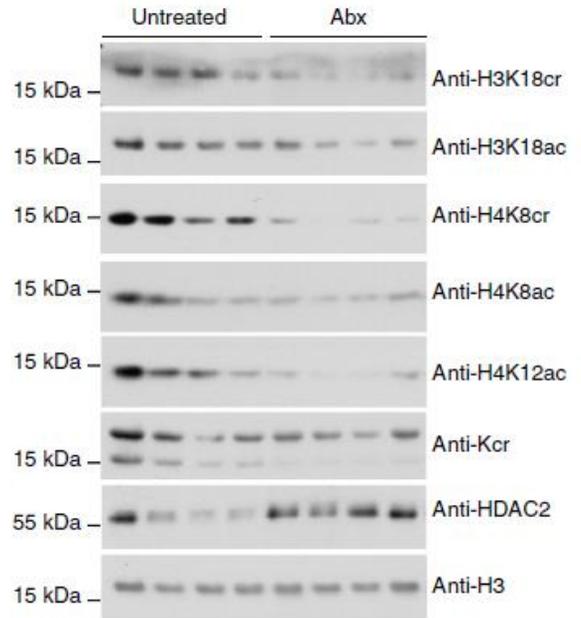


Figure 8 : La déplétion du microbiote intestinal par l'utilisation d'antibiotiques affecte la crotonylation des histones et l'expression de HDAC2.

Des souris ont reçu un traitement antibiotique (néomycine, gentamicine, ampicilline, metronidazole et vancomycine) par gavage avant extraction des protéines du tissu colique. La figure montre les niveaux de crotonylation et d'acétylation de différents résidus lysines, ainsi que l'expression de HDAC2. Le traitement antibiotique a mené à une forte diminution des marques de crotonylation sur les histones H3 et H4, associée à une augmentation de l'expression de HDAC2. abx: antibiotics.

altérations spécifiques de la compaction de la chromatine, comme observé par ATAC-seq (**Figure 5A**), et de l'occupation de H3K27me3, suggérant que la répression médiée par Polycomb joue un rôle dans le vieillissement des cellules B précurseurs (**Figure 5B**). Les changements dans l'organisation de la chromatine et de la structure 3D du génome jouent un rôle important dans la formation du profil d'expression des gènes dans les cellules B précurseurs âgées. Les composants des voies de signalisation du facteur de croissance analogue à l'insuline sont des cibles clés de la régulation épigénétique dans le vieillissement des précurseurs des cellules B de la moelle osseuse. Ce travail a été publié dans le journal **Genome Biology** (Koohy et al., 2018).

✓ *Étude de l'interaction entre le microbiote intestinal et les modifications post-traductionnelles des histones*

La crotonylation est une modification post-traductionnelle des histones récemment découverte. Cette nouvelle marque d'acylation relie le métabolisme cellulaire à la régulation des gènes (Sabari et al., 2015; Wei et al., 2017). Sa régulation et ses fonctions spécifiques au sein des tissus sont mal comprises. Nous avons caractérisé l'abondance de la crotonylation dans différents tissus par western blot et spectrométrie de masse et avons observé que la crotonylation des histones H3 au niveau de la lysine 18 est une modification étonnamment abondante dans les cryptes de l'intestin grêle et du côlon (**Figure 6**), et qu'elle est liée à la régulation de l'expression des gènes. Nous avons également identifié les histones désacétylases de classe I, HDAC1, HDAC2 et HDAC3 comme étant les principaux acteurs de la décrotonylation de l'histone H3 (**Figure 7**). Nos résultats ont permis de mettre en avant que les inhibiteurs de HDAC connus, y compris le butyrate dérivé du microbiote intestinal (inhibiteur naturel de l'activité des HDACs), affectent la décrotonylation des histones. En accord avec cela, nous avons constaté que diminuer la concentration bactérienne du microbiote, par utilisation d'antibiotique, conduit à une diminution globale de la crotonylation des histones dans le côlon, due à une activité importante des HDAC en absence de butyrate endogène (**Figure 8**). Nos résultats suggèrent que la crotonylation des histones connecte la chromatine au microbiote intestinal, au moins en partie, *via* les acides gras à chaîne courte et les HDAC. Ce travail, pour lequel je figure 2^{ème} auteur, a été publié dans **Nature Communications** (Fellows et al., 2018).

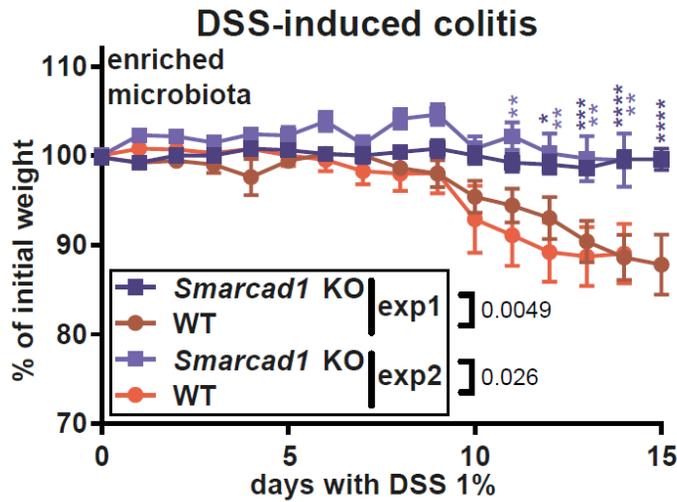


Figure 9 : SMARCAD1 orchestre la réponse inflammatoire induite par un traitement au DSS. Des souris sauvages et déficientes pour SMARCAD1 ont reçu 1% de DSS dans l'eau de boisson pendant 15 jours. Le suivi du poids des animaux, issus de deux expériences indépendantes est présenté. La délétion de SMARCAD1 empêche la mise en place de la colite chez les animaux, contrairement aux animaux WT qui présentent d'importants signes cliniques de colite (ici le poids). Two-ways ANOVA * $p < 0,05$

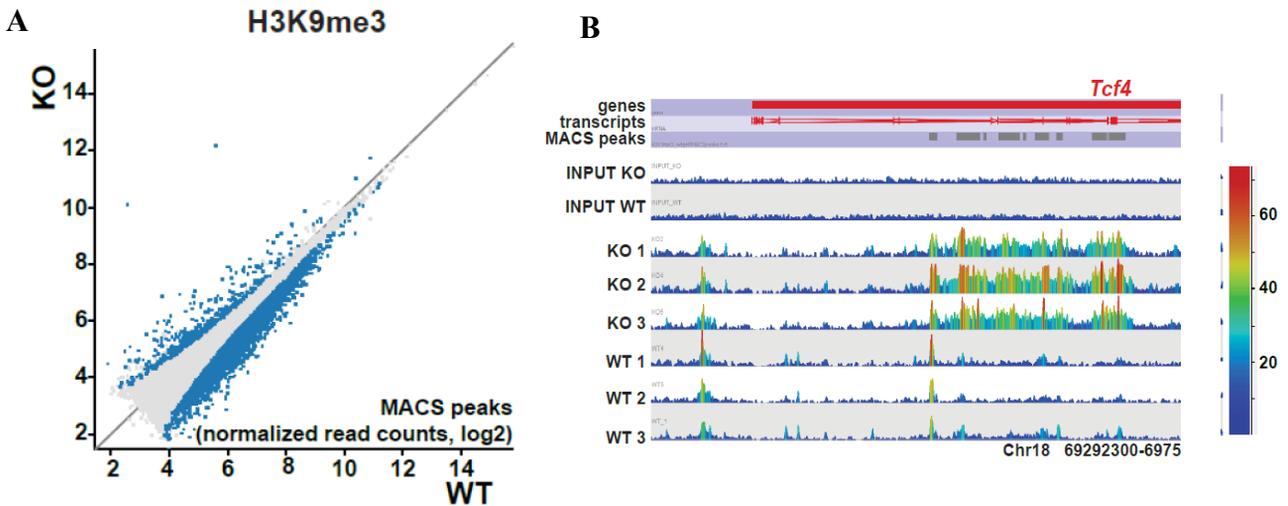


Figure 10 : La délétion de SMARCAD1 dans les cellules épithéliales intestinales altère les niveaux de triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3. A- ChIP-seq H3K9me3 réalisé à partir de cellules épithéliales intestinales isolées de souris sauvages et de souris déficientes pour le facteur de remodelage de la chromatine SMARCAD1. Les « peaks » associés à un enrichissement de la marque étudiée ont été quantifiés en utilisant le logiciel « MACS peaks calling ». Les points en bleu présentent des différences statistiquement significatives entre les deux conditions testées (présence ou non de SMARCAD1). B- ScreenShot d'un gène présentant une modification de l'accumulation de la marque H3K9me3 suite à la délétion de SMARCAD1 (KO).

✓ *Rôle du facteur de remodelage de la chromatine SMARCAD1 dans la réponse de l'épithélium intestinal à une colite induite au DSS*

L'interaction des cellules épithéliales intestinales avec le microbiote et son rôle dans la régulation de l'expression des gènes sont des questions cruciales. SMARCAD1 (SWI/SNF-related Matrix-Associated actin-dependent Regulator of Chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1) est un facteur de remodelage de la chromatine, conservé et connu pour maintenir l'hétérochromatine sous forme compacte après la réplication de l'ADN (Rowbotham et al., 2011). De ce fait, SMARCAD1 est fortement exprimé dans les tissus à fort potentiel réplicatif, parmi lesquels figure l'intestin. Ce facteur étant particulièrement exprimé dans la zone de prolifération de l'épithélium intestinal, nous avons exploré son rôle dans ce tissu.

L'utilisation de souris déficientes pour SMARCAD1, spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales (Villin-Cre/SMARCAD1), a mis en évidence le rôle de ce facteur de remodelage dans la mise en place d'une colite. En effet, les animaux déficients pour SMARCAD1 étaient résistants à la colite induite au DSS, comparativement aux animaux exprimant ce facteur de remodelage (**Figure 9**). Une étude RNA-seq a montré de nombreux gènes anormalement régulés en absence de SMARCAD1, dont plusieurs gènes sont liés à l'immunité innée (Reg, intelectin, lysozyme). L'absence de *Smarcad1* a entraîné des modifications de l'accessibilité à la chromatine et des modifications significatives de l'histone H3K9me3 sur de nombreux sites, y compris des gènes qui sont anormalement régulés lors de la suppression de SMARCAD1 (**Figure 10**). De plus, ce travail a permis d'identifier des membres du microbiote intestinal participant à la mise en place de la colite, de façon dépendante de SMARCAD1. Il a également mis en évidence le rôle des facteurs de remodelage de la chromatine dans les cellules épithéliales de l'intestin dans la réponse à la colite et montre comment un facteur de remodelage de la chromatine hautement conservé joue un rôle dans la défense antimicrobienne. Ce travail est actuellement en révision dans le journal **Genome Biology** (Kazakevych, Denizot *et al.*, accepté, sous presse).

Travaux réalisés depuis mon recrutement

Les travaux réalisés depuis mon recrutement, en septembre 2015, seront détaillés sous forme de résultats préliminaires en introduction des différents objectifs du projet de recherche proposés dans ce rapport.

4-Liste des Travaux Scientifiques



| | nombre |
|--|-----------|
| Articles originaux | 12 |
| En premier, deuxième ou dernier auteur | 8 |
| Avec un étudiant co-encadré | 6 |
| Revue, Chapitres de livres | 3 |
| Communications orales (Orateur) | 11 |
| Communication orales sur invitation, France | 3 |
| Communications orales (non orateur) | 16 |
| Communications affichées | 28 |

Articles originaux

En révision

E GIMIER, M CHERVY, A AGUS, A SIVIGNON, E BILLARD, M PRIVAT, S VIALA, A BUISSON, E VAZEILLE, N BARNICH, **J DENIZOT**. Methyl donor-enriched diet decreases Crohn's disease associated-Adherent invasive *E. coli* intestinal colonization, Under Review, *European Journal of Nutrition*.

Publiés

J KAZAKEVYCH, **J DENIZOT**, A LIEBERT, M PORTOVEDO, M MOSAVIE, P JAIN, C STELLATO, C FRASER, R OLIVEIRA CORRÊA, M CÉLESTINE, R MATTIUZ, H OKKENHAUG, JR MILLER, MA RAMIREZ VINOLO, M VELDHOEN, P VARGA-WEISZ. Smarcd1 mediates microbiota-induced inflammation by coordinating gene expression in the intestinal epithelium, In Press, *Genome Biology*.

H. KOOHY, D. J. BOLLAND, L. S. MATHESON, S. SCHOENFELDER, C. STELLATO, A. DIMOND, C. VÁRNAI, P. CHOVANEC, T. CHESSA, **J. DENIZOT**, R. MANZANO GARCIA, S. W. WINGETT, P. FREIRE-PRITCHETT, T. NAGANO, P. HAWKINS, L. STEPHENS, S. ELDERKIN, M. SPIVAKOV, P. FRASER, A. E. CORCORAN, P. D. VARGA-WEISZ, Genome organization and chromatin analysis identify transcriptional downregulation of insulin-like growth factor signaling as a hallmark of aging in developing B cells. *Genome Biol.* 19, 126 (2018).

G. SEVRIN, S. MASSIER, B. CHASSAING, A. AGUS, J. DELMAS, **J. DENIZOT**, E. BILLARD, N. BARNICH, Adaptation of adherent-invasive *E. coli* to gut environment: Impact on flagellum expression and bacterial colonization ability. *Gut Microbes*, 1–17 (2018).

R. FELLOWS, **J. DENIZOT**, C. STELLATO, A. CUOMO, P. JAIN, E. STOYANOVA, S. BALÁZSI, Z. HAJNÁDY, A. LIEBERT, J. KAZAKEVYCH, H. BLACKBURN, R. O. CORRÊA, J. L. FACHI, F. T. SATO, W. R. RIBEIRO, C. M. FERREIRA, H. PERÉE, M. SPAGNUOLO, R. MATTIUZ, C. MATOLCSI, J. GUEDES, J. CLARK, M. VELDHOEN, T. BONALDI, M. A. R. VINOLO, P. VARGA-WEISZ, Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases. *Nat Commun.* 9, 105 (2018).

A. AGUS, **J. DENIZOT**, J. THÉVENOT, M. MARTINEZ-MEDINA, S. MASSIER, P. SAUVANET, A. BERNALIER-DONADILLE, S. DENIS, P. HOFMAN, R. BONNET, E. BILLARD, N. BARNICH, Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Sci Rep.* 6, 19032 (2016).

A. SIVIGNON, A. DE VALLÉE, N. BARNICH, **J. DENIZOT**, C. DARCHA, G. PIGNÈDE, P. VANDEKERCKOVE, A. DARFEUILLE-MICHAUD, *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 prevents colitis induced by AIEC bacteria in the transgenic mouse model mimicking Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 276–286 (2015).

J. DENIZOT, A. DESRICHARD, A. AGUS, N. UHRHAMMER, N. DREUX, V. VOURET-CRAVIARI, P. HOFMAN, A. DARFEUILLE-MICHAUD, N. BARNICH, Diet-induced hypoxia responsive element demethylation increases CEACAM6 expression, favouring Crohn's disease-associated *Escherichia coli* colonisation. *Gut.* 64, 428–437 (2015).

M. MARTINEZ-MEDINA*, **J. DENIZOT***, N. DREUX, F. ROBIN, E. BILLARD, R. BONNET, A. DARFEUILLE-MICHAUD, N. BARNICH, Western diet induces dysbiosis with increased *E coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut.* 63, 116–124 (2014). *Contribution équivalente

N. DREUX, **J. DENIZOT**, M. MARTINEZ-MEDINA, A. MELLMANN, M. BILLIG, D. KISIELA, S. CHATTOPADHYAY, E. SOKURENKO, C. NEUT, C. GOWER-ROUSSEAU, J.-F. COLOMBEL, R. BONNET, A. DARFEUILLE-MICHAUD, N. BARNICH, Point mutations in FimH adhesin of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathog.* 9, e1003141 (2013).

J. DENIZOT, A. SIVIGNON, F. BARREAU, C. DARCHA, H. F. C. CHAN, C. P. STANNERS, P. HOFMAN, A. DARFEUILLE-MICHAUD, N. BARNICH, Adherent-invasive *Escherichia coli* induce claudin-2 expression and barrier defect in CEABAC10 mice and Crohn's disease patients. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 294–304 (2012).

L. ETIENNE-MESMIN, B. CHASSAING, P. SAUVANET, **J. DENIZOT**, S. BLANQUET-DIOT, A. DARFEUILLE-MICHAUD, N. PRADEL, V. LIVRELLI, Interactions with M cells and macrophages as key steps in the pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *PLoS ONE.* 6, e23594 (2011).

[Revues et chapitres d'ouvrage](#)

GIMIER E, BARNICH N, **DENIZOT J**, Diet-induced epigenetic modifications and implication for intestinal diseases. *The handbook of Nutrition, Diet and Epigenetics*, 2018.

DENIZOT J., DREUX N., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Importance of bacteria as trigger in inflammatory bowel disease. *Journal of Gastrointestinal & Digestive System*, 2012, doi:10.4172.

N. BARNICH*, **J. DENIZOT***, A. DARFEUILLE-MICHAUD, *E. coli*-mediated gut inflammation in genetically predisposed Crohn's disease patients. *Pathol. Biol.* 61, e65-69 (2013). *Contribution équivalente.

Liste des conférences sur invitation

GIMIER E, BARNICH N, **DENIZOT J.**, Influence d'un régime alimentaire enrichi en molécules donneuses de groupements méthyles sur la méthylation et l'expression des gènes dans l'intestin. Journée Helixio 2016, Macon, 23 Mars 2017.

DENIZOT J., Rôle des bactéries *Escherichia coli* dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : apports de la microscopie. Réseau des centres communs de Microscopie (RCCM), 6 Juin 2018, Clermont-Ferrand.

DENIZOT J., Utilisation de modèles *ex vivo* pour l'étude des relations hôte-pathogènes. Journée des modèles *ex vivo*, Octobre 2018, INRA, Paris

Liste des communications orales pour lesquelles j'ai été l'orateur

DENIZOT J., BARNICH N. Perméabilité intestinale et infection par des souches AIEC. 7ème Journée scientifique du groupe de Recherche sur les Maladies Inflammatoires Digestives, Lyon, 8 Octobre 2010.

DENIZOT J., SIVIGNON A., BARREAU F., STANNERS C., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* (AIEC) alter intestinal barrier integrity in transgenic mice expressing human CEACAM6. United European Gastroenterology Week, Barcelona, SP, 24-27 Octobre 2010

DENIZOT J., SIVIGNON A., BARREAU F., DARCHA C., CHAN HC., STANNERS C., HOFMAN P., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. AIEC induce claudin-2 expression and barrier defect in CEABAC10 mice and Crohn's disease patients. 15th International Congress of Mucosal Immunology, Paris, France, 5-9 Juillet 2011.

DENIZOT J., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. CEACAM6/AIEC: breaking barrier function in Crohn's disease. 21st International CEA Symposium, Konstance, 19-20 Septembre 2011.

DENIZOT J., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Folate deficiency leads to CEACAM6 abnormal expression in colonic enterocytes of CEABAC10 mice through a mechanism dependent on HIF-1 binding site methylation. 22st International CEA Symposium, Clermont-Ferrand, France, 20-22 Juin 2012.

DENIZOT J., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Interaction AIEC/CEACAM6: influence sur la fonction barrière de l'intestin, Journée des Microbiologistes Clermontois, Clermont-Ferrand, 2012.

DENIZOT J., DESRICHARD A., UHRHAMMER N., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. HIF-1 α régule l'expression de CEACAM6 en réponse aux *Escherichia coli* associés à la maladie de Crohn de façon dépendante de la méthylation de l'ADN. Journées de l'École Doctorale, Clermont-Ferrand, Mai 2012.

DENIZOT J, PORTER K, VARGA-WEISZ P. Chromatin-remodeling factor SMARCD1 is a major regulator of intestinal inflammation in mice. Lab Talk Day, Babraham Institute, Cambridge, Avril 2015.

GIMIER E, AGUS A, BARNICH N, **DENIZOT J**. A methyl donor molecules-supplemented diet eradicates *E. coli* population and methylates CEACAM6 promoter decreasing its expression in colonic epithelial cells in mice. UEGW 2016, Vienne, Octobre 2016

GIMIER E, CHERVY M, BARNICH N, **DENIZOT J**. Analyse des marques épigénétiques des cellules intestinales en réponse à une infection par les bactéries *Escherichia coli* adhérentes et invasives impliquées dans la maladie de Crohn, Journée des Microbiologistes Clermontois, Clermont-Ferrand, 2019

GIMIER E, CHERVY M, BARNICH N, **DENIZOT J**. Un régime enrichi en molécules donneuses de groupements méthyles limite la colonisation intestinale par les *E. coli* adhérents et invasifs associées à la maladie de Crohn, 4^{ème} assises régionales de Nutrition et Santé, Lyon 2019

Liste des communications orales pour lesquelles je n'ai pas été l'orateur

DREUX N., **DENIZOT J**., MELLMANN A., BONNET R., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. FimH pathoadaptative mutations in Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* enhance bonding to CEACAM6. 4nd FEMS congress of European microbiologists, Geneva, Suisse, 26-30 Juin 2011.

MARTINEZ-MEDINA M., **DENIZOT J**., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. High fat diet favours AIEC colonization and inflammation in CEABAC10 mice by modulating microflora composition. 15th International Congress of Mucosal Immunology, Paris, France, 5-9 Juillet 2011.

DREUX N., **DENIZOT J**., MELLMANN A., BONNET R., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. FimH pathoadaptative mutations ameliorate binding to CEACAM6 of Crohn's disease associated adherent-invasive *E. coli*. United European Gastroenterology Week, Stockholm, Suède, 22-26 Octobre 2011.

DREUX N., **DENIZOT J**., MELLMANN A., SOKURENKO E., BONNET R., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. FimH pathoadaptative mutations in Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* enhance intestinal inflammatory response. 8th INRA-Rowett Symposium on Gut Microbiota, Clermont-Ferrand, France, 17-20 Juin 2012.

MARTINEZ-MEDINA M., **DENIZOT J**., DREUX N., ROBIN F., BILLARD E., BONNET R., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. High fat – high sugar westernized diet on CEABAC10 mice induces a specific dysbiosis with increased *E. coli*, modulates innate immune gene expression and favors AIEC colonization promoting inflammation. 22st International CEA Symposium, Clermont-Ferrand, France, 20-22 Juin 2012.

MARTINEZ-MEDINA M., **DENIZOT J.**, DREUX N., BILLARD E., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Western diet induces dysbiosis with increased *E. coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favoring AIEC colonization. 2nd International Conference on Gastroenterology & Urology, Chicago, USA, 10-12 Juin 2013.

ETIENNE-MESMIN L, CHASSAING B, SAUVANET P, **DENIZOT J**, BLANQUET-DIOT S, DARFEUILLE-MICHAUD A, PRADEL N, LIVRELLI V. M cells : a new route for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to translocate across the human intestinal barrier, *VTEC 2012*, Amsterdam, Pays-Bas.

MARTINEZ-MEDINA M., **DENIZOT J.**, DREUX N., ROBIN F., BONNET R., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Western-diet on CEABAC10 mice induces a specific dysbiosis with increased *Escherichia coli*, modulates innate immune gene expression and favors AIEC colonization promoting inflammation. United European Gastroenterology Week, Amsterdam, Netherlands, 22-26 Octobre 2012.

AGUS A., **DENIZOT J.**, THEVENOT J., BILLARD E., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Western diet decreased short-chain fatty acids concentration in the gut, leading to exacerbation of DSS-induced colitis. United European Gastroenterology Week, Berlin, Allemagne, 12-16 Octobre 2013.

DENIZOT J., AGUS A., DESRICHARD A., UHRHAMMER N., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Hypoxia Responsive Elements methylation status governs Adherent-Invasive *Escherichia coli*-receptor CEACAM6 expression in Crohn's disease. 9th congress of ECCO, Copenhagen, Denmark, 20-22 Février 2014.

MASSIER S., MIQUEL S., DREUX N., AGUS A., **DENIZOT J.**, DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Système de sécrétion de type VI et virulence d'*Escherichia coli*. Congrès de la Société Française de Microbiologie, Institut Pasteur, Paris, 31 mars-1er avril 2014.

DENIZOT J., AGUS A., DESRICHARD A., UHRHAMMER N., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. AIEC-receptor CEACAM6 abnormal expression in Crohn's disease depends on Hypoxia Responsive Elements methylation status. Digestive Disease Week, Chicago, Illinois, 4-6 mai 2014.

SIVIGNON A., DE VALLÉE A., BARNICH N., **DENIZOT J.**, VANDEKERCKOVE P., DARFEUILLE-MICHAUD A. *Saccharomyces cerevisiae* prevents colitis induced by adherent-invasive *Escherichia coli* bacteria in CEACAM6-expressing transgenic mice. Pharmabiotics conference, Paris, 29-30 Octobre 2014.

AGUS A., **DENIZOT J.**, THEVENOT J., MASSIER S., BERNALIER-DONADILLE A., DENIS S., DARFEUILLE-MICHAUD A., BILLARD E., BARNICH N. Impact of Western diet on Short chain Fatty acids production and host susceptibility to intestinal inflammation in a context of Crohn's disease. ECCO, Barcelone, 2015.

AGUS A, **DENIZOT J**, THEVENOT J, MASSIER S SAUVANET, P, BONNET R, BILLARD, E, BARNICH, N. Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. DDW 2016, San Diego, Mai 2016

GIMIER E, AGUS A, BARNICH N, **DENIZOT J**. Methyl donor molecules supplementation impairs *E. coli* colonisation bacteria by modulating IgA pathway. UEGW 2017, Barcelone, Octobre 2017.

Liste des communications affichées

DENIZOT J., BARREAU F., STANNERS C., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Expression of human CEACAM6 in transgenic mice increases intestinal permeability and favours AIEC translocation. 5^{ème} Congress of the European Crohn's and Colitis Organization Meeting, Prague, 25-27 Février 2010.

DENIZOT J., SIVIGNON A., BARREAU F., STANNERS C., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Human CEACAM6 expression in transgenic mice increases intestinal permeability and favours translocation of Crohn's disease-associated *Escherichia coli*. Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, New Orleans, Louisiana, USA, 1-6 Mai 2010.

DENIZOT J., BARREAU F., STANNERS C., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. L'expression du récepteur CEACAM6 humain chez des souris transgéniques augmente la perméabilité intestinale et favorise la translocation des bactéries AIEC. Journées de Microbiologie INRA, Poitiers, 6-7 Mai 2010.

DENIZOT J., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Increase in CEACAM6 expression by Crohn's disease-associated *E. coli* depends on CEACAM6 promoter methylation status and HIF-1 stability. United European Gastroenterology Week, Stockholm, Suède, 22-26 Octobre 2011.

MARTINEZ-MEDINA M., **DENIZOT J.**, BILLARD E., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. High fat diet modulates gut microbiota composition, favors AIEC colonization and promotes inflammation in CEABAC10 mice. United European Gastroenterology Week, Stockholm, Suède, 22-26 Octobre 2011.

DREUX N., **DENIZOT J.**, MELLMANN A., BONNET R., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. FimH pathoadaptative mutations in Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* enhance binding to CEACAM6. ERA-NET PathoGenoMics, 2nd and 3rd Joint Calls Status Seminar, Tenerife, Espagne, 23-24 Janvier 2012

MARTINEZ-MEDINA M., **DENIZOT J.**, DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Westernised diet on CEABAC10 mice induces a specific dysbiosis with increased *Escherichia coli* and favours AIEC colonization promoting inflammation. 7^{ème} Congress of the European Crohn's and Colitis Organization Meeting, Barcelone, Espagne, 25-27 Février 2012.

DENIZOT J., DESRICHARD A., UHRHAMMER N., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. HIF-1alpha regulates CEACAM6 expression in response to Crohn's disease associated *E. coli* infection in a DNA methylation dependent manner. Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, San Diego, USA, 19-22 Mai 2012.

MARTINEZ-MEDINA M., **DENIZOT J.**, DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Westernised diet on CEABAC10 mice induces a specific dysbiosis with increased *Escherichia coli*, modulates innate immune gene expression and favors AIEC colonization promoting inflammation. Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, San Diego, USA, 19-22 Mai 2012.

MARTINEZ-MEDINA M., **DENIZOT J.**, DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. High fat – high sugar diet on CEACAM6 expressing mice induces specific dysbiosis with increased *E. coli* and promoting inflammation. 8th INRA-Rowett Symposium on Gut Microbiota, Clermont-Ferrand, France, 17-20 Juin 2012

DENIZOT J., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Folate deficiency leads to CEACAM6 abnormal expression in colonic enterocytes of CEABAC10 mice through a mechanism dependent on HIF binding site methylation. United European Gastroenterology Week, Amsterdam, Netherlands, 22-26 Octobre 2012.

SIVIGNON A., DE VALLEE A., BARNICH N., **DENIZOT J.**, VANDEKERCKOVE P., DARFEUILLE-MICHAUD A. *Saccharomyces cerevisiae* prevents adherent-invasive *E. coli*-induced increased intestinal permeability and inflammation in the transgenic mouse model expressing CEACAM6. United European Gastroenterology Week, Amsterdam, Netherlands, 22-26 Octobre 2012.

DENIZOT J., DESRICHARD A., AGUS A., ARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Folate prevents CEACAM6 abnormal expression and subsequent Adherent-Invasive *E. coli*- induced inflammation in CEABAC10 mice. Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, Orlando, USA, 18-21 Mai 2013.

AGUS A., **DENIZOT J.**, THEVENOT J., MASSIER S., BILLARD E., DENIS S., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Western diet alters gut microbiota homeostasis, increasing host susceptibility to intestinal inflammation. Digestive Disease Week, Chicago, Illinois, 4-6 mai 2014.

MASSIER S., MIQUEL S., DREUX N., AGUS A., **DENIZOT J.**, DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Involvement of type VI secretion systems in virulence of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from patients with Crohn's disease. Gut Microbiology: from sequence to function. Rowett-INRA 2014: Aberdeen, 16-19 June 2014.

AGUS A., MARTINEZ-MEDINA M., **DENIZOT J.**, MASSIER S., THEVENOT J., BILLARD E., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Impact of Western diet on gut homeostasis and Adherent-Invasive *E. coli* virulence in mice model mimicking Crohn's disease. Gut Microbiology: from sequence to function. Rowett-INRA 2014: Aberdeen, 16-19 June 2014.

AGUS A., **DENIZOT J.**, THEVENOT J., MASSIER S., BILLARD E., DENIS S., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. Western diet in CEACAM6 expressing mice: impact on short-chain fatty acids production and host susceptibility to intestinal inflammation. United European Gastroenterology Week, Vienna, Autriche, 18-22 Octobre 2014.

DENIZOT J., AGUS A., DESRICHARD A., UHRHAMMER N., DARFEUILLE-MICHAUD A., BARNICH N. AIEC-receptor CEACAM6 abnormal expression in Crohn's disease depends on hypoxia responsive elements methylation status and chromatin remodelling. United European Gastroenterology Week, Vienna, Autriche, 18-22 Octobre 2014.

AGUS A., **DENIZOT J.**, THEVENOT J., MASSIER S., BERNALIER-DONADILLE A., DENIS S., DARFEUILLE-MICHAUD A., BILLARD E., BARNICH N. Impact de la nutrition sur l'homéostasie intestinale : effet d'un régime alimentaire de type occidental sur la susceptibilité de l'hôte et l'inflammation intestinale dans un contexte de Maladie de Crohn. Journée du Centre Régional en Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France, 20 Novembre 2014.

DENIZOT J., PORTER K, VARGA-WEISZ P. Role of the SMARCD1 Chromatine Remodelling Factor in intestinal physiology, WellCome Trust Sanger Institute, Hinxton, Royaume Uni, 2014,

AGUS A, **DENIZOT J.**, SEVRIN G, Nguyen HT, Barnich N. Epigenetic mechanisms of AIEC-receptor CEACAM6 regulation in Crohn's disease, Digestive Disease Week, Washington, Mai 2015.

AGUS A., **DENIZOT J.**, THEVENOT J., MASSIER S., BERNALIER-DONADILLE A., DENIS S., DARFEUILLE-MICHAUD A., BILLARD E., BARNICH N. Western diet reduces short-chain fatty acids production and G-protein-coupled receptor GPR43 expression promoting intestinal inflammation and host susceptibility to *E. coli* infection. Digestive Disease Week, Washington, Mai 2015.

A AGUS, J. **DENIZOT, J.** THEVENOT, S. MASSIER, P. SAUVANET, A. BERNALIER-DONADILLE, S. DENIS, P. HOFMAN, R. BONNET, E. BILLARD, N. BARNICH, High-fat diet favors overgrowth of adherent *E. coli* and decreases short chain fatty acids concentration enhancing sensitivity to intestinal inflammation. Rowett INRA, Clermont-Ferrand, Juin 2016.

AGUS A, **DENIZOT J.**, SEVRIN G, THÉVÉNOT J, MASSIER S, SAUVANET P, HOFMAN P, BONNET R, BILLARD E, BARNICH N. A SCFA-receptor agonist supplementation as a new strategy to protect against intestinal inflammation in mice. DDW 2016, San Diego, Mai 2016.

AGUS A, **DENIZOT J.**, SEVRIN G, THÉVÉNOT J, MASSIER S, SAUVANET P, HOFMAN P, BONNET R, BILLARD E, BARNICH N. A SCFA-receptor agonist supplementation as a new strategy to protect against intestinal inflammation in mice. UEGW, Vienne, 2016

GIMIER E, BARNICH N, **DENIZOT J**. Class-1-Histone desacetylases as a new therapeutic target for the control of adherent-invasive *E. coli*-induced intestinal inflammation. UEGW, Vienne 2018

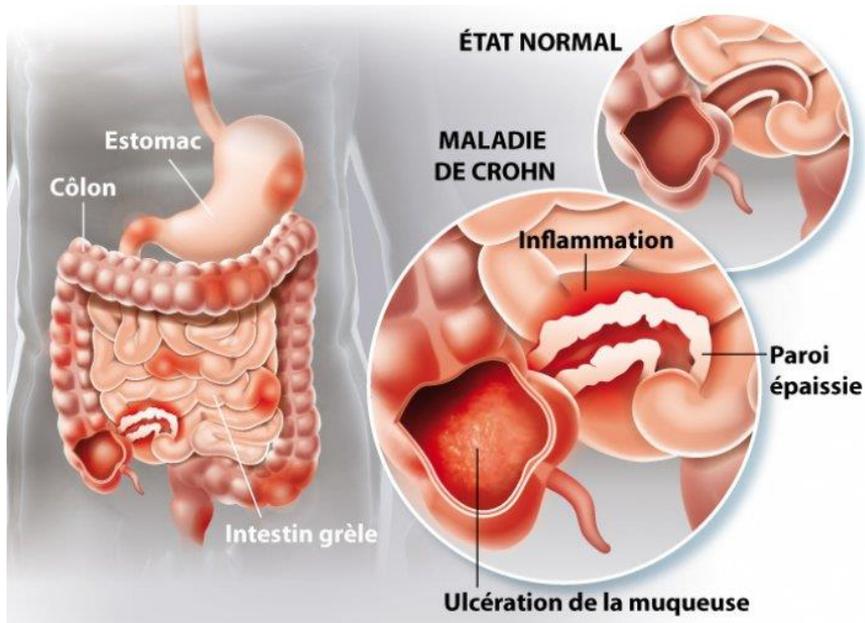
GIMIER E, AGUS A, BARNICH N, **DENIZOT J**. High methyl diet impairs *E. coli* overgrowth, limits AIEC colonization and inflammation by epigenetic regulation of genes expression. DDW, San Diego 2019

GIMIER E, BARNICH N, **DENIZOT J**. HDACs favor AIEC invasion of intestinal epithelial cells, representing a new therapeutic target for patients colonized by AIEC. DDW, San Diego 2019

5-Projets de recherche



A



B Patient atteint de la maladie de Crohn



Sujet sain



Figure 11 : Lésions observées chez les patients souffrant de la maladie de Crohn.

A- La maladie de Crohn (MC) peut affecter la totalité du tube digestif, avec une atteinte préférentielle de l'iléon terminal et du côlon. **B-** La détection d'ulcérations de la paroi intestinale par endoscopie permet de diagnostiquer la MC (d'après Inflammatory Bowel Disease, Practice Manual, 2004).

Contexte des travaux de recherche

Les travaux de recherche réalisés précédemment au laboratoire M2iSH (durant ma thèse) ont visé à comprendre le rôle que les bactéries *E. coli* adhérentes et invasives (AIEC) pouvaient avoir dans l'étiologie de la Maladie de Crohn (MC). Le but de ce travail était de mieux comprendre les facteurs favorisant l'implantation de ces bactéries dans la muqueuse iléale des patients atteints de MC et de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter les patients porteurs. Les projets de recherche qui seront proposés dans ce manuscrit découlent directement des travaux réalisés antérieurement.

I- La maladie de Crohn

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) et sont caractérisées par une inflammation chronique du système digestif. La MC fut décrite pour la première fois en 1932 par le médecin Burrill B. Crohn suite à l'étude clinique de 14 patients souffrant d'une pathologie d'origine inconnue nommée « Iléite Régionale » (Crohn et al., 2000). On estime que le nombre de patients atteints de la MC serait de 2,5 millions dans les pays occidentaux dont environ 150 000 cas en France (Ng et al., 2018). Cette pathologie peut atteindre l'ensemble des segments du tube digestif mais se localise, dans 40 à 55% des cas, au niveau de l'iléon terminal et du côlon (**Figure 11A**). La MC évolue par poussées d'intensité et de localisations variables entrecoupées de périodes de rémission clinique. L'observation de manifestations cliniques (douleurs abdominales, manifestations digestives, amaigrissement) ainsi que la caractérisation de lésions intestinales par examens endoscopiques (**Figure 11B**) et anatomo-pathologiques permettent de diagnostiquer cette maladie (Torres et al., 2017). Cette pathologie est incurable à ce jour. En effet, les traitements actuels, basés sur l'utilisation d'anti-inflammatoires, d'immuno-modulateurs, d'antibiotiques, de biothérapies (anti-IL-12/IL-23, anti-TNF α (Tumor Necrosis Factor)), d'anti-intégrines ($\alpha 4\beta 7$) et sur la réalisation d'interventions chirurgicales permettent seulement de contrôler les symptômes pendant les poussées inflammatoires et de limiter les récurrences (de Mattos et al., 2015). C'est pourquoi il est nécessaire de mieux comprendre l'étiologie de cette maladie afin de pouvoir proposer de nouveaux traitements personnalisés aux patients atteints de MC.

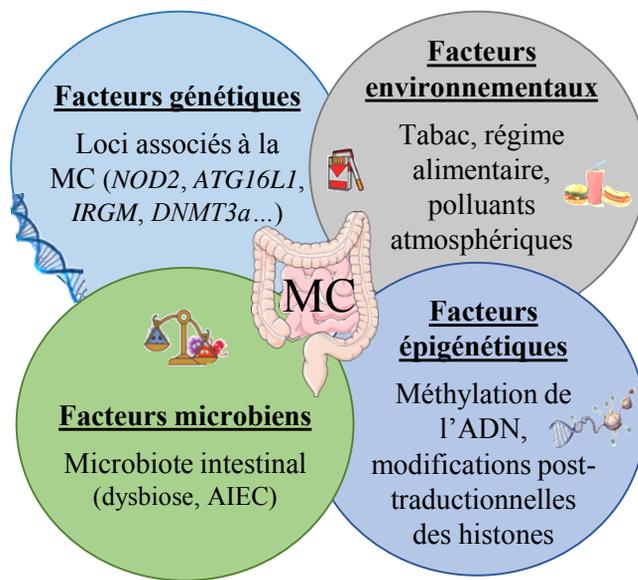


Figure 12 : Facteurs étiologiques de la maladie de Crohn.

La MC est une pathologie multifactorielle dans laquelle différents facteurs génétiques, environnementaux, microbiens et épigénétiques sont impliqués. En effet, des polymorphismes génétiques dans les gènes *NOD2*, *ATG16L1* ou encore *IRGM* et *DNMT3a* ont été identifiés comme associés à un risque augmenté de développer la MC. Des facteurs environnementaux comme le tabagisme, un régime alimentaire de type occidental ainsi que l'exposition à des polluants atmosphériques jouent également un rôle dans l'étiologie de la MC. Concernant les facteurs microbiens, des modifications au niveau de la composition du microbiote intestinal avec une augmentation d'un groupe bactérien particulier, les « *Adherent-Invasive Escherichia coli* » (AIEC), sont impliqués dans le développement de la maladie. Étudiés depuis peu, les facteurs épigénétiques comme les modifications post-traductionnelles des histones semblent également jouer un rôle dans le développement de la MC.

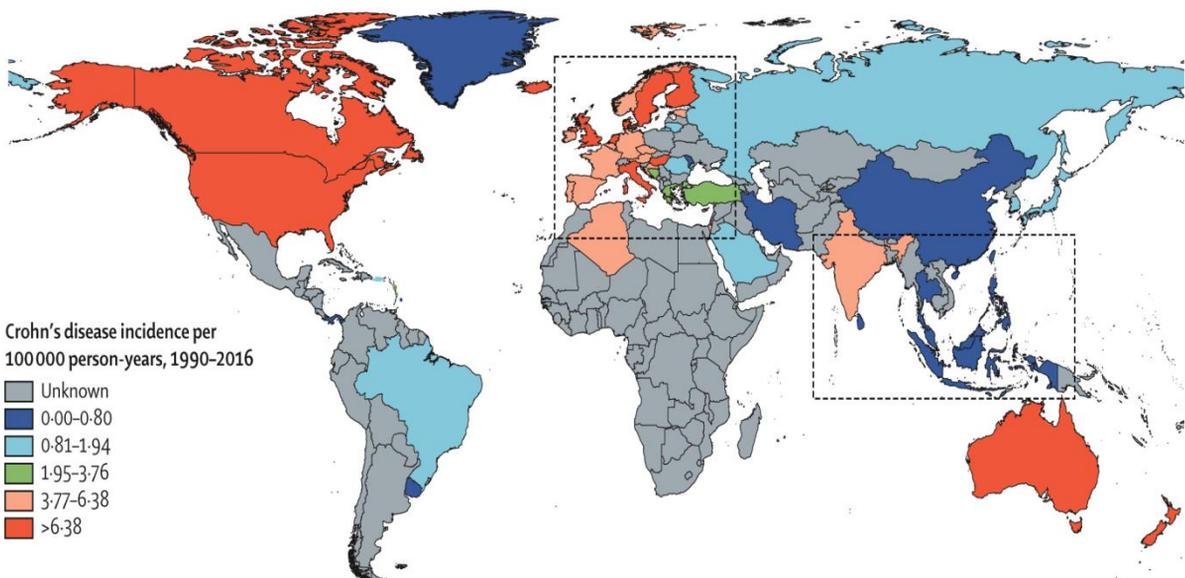


Figure 13 : Incidence et répartition géographique de la MC dans le monde.

Les incidences sont indiquées pour 100 000 habitants et par an. Les pays à mode de vie occidental (Amérique et Europe du Nord, Australie) présentent les plus fortes incidences de la MC. Un gradient de répartition Nord-Sud de la maladie existe en Europe, soulignant l'importance des facteurs environnementaux dans le développement de cette pathologie (d'après Ng et al., 2017).

II- Facteurs étiologiques de la MC

La MC est une pathologie complexe, multifactorielle impliquant des facteurs génétiques, microbiens et environnementaux (**Figure 12**).

1- Facteurs génétiques dans la MC

Des études d'association à l'échelle du génome ont mis en évidence des polymorphismes génétiques associés à un risque augmenté de développer une MICI au niveau de 201 gènes, 170 d'entre eux étant associés à la MC (Shaw et al., 2019). Parmi ces gènes, nous retrouvons le gène *NOD2*, impliqué dans la reconnaissance des bactéries intracellulaires, ainsi que les gènes *ATG16L1* et *IRGM* impliqués dans les processus d'autophagie (Henderson and Stevens, 2012). De plus, des polymorphismes dans le gène *DNMT3a*, codant pour une enzyme impliquée dans la méthylation de l'ADN, ont été identifiés comme facteurs de risque de la MC (Franke et al., 2010). Toutefois, des études menées sur des jumeaux monozygotes ont révélé que le partage d'un même patrimoine génétique n'impliquait pas obligatoirement l'apparition de la maladie chez les jumeaux (seulement 20-50% de concordance entre les jumeaux) (Halme et al., 2006). Cela démontre que la MC n'est pas une maladie génétique à proprement parler et que les polymorphismes génétiques ne permettent pas d'expliquer à eux seuls le déclenchement de la pathologie.

2- Facteurs environnementaux dans le MC

L'incidence de la MC est inégale au sein de la population mondiale : elle est significativement plus importante dans les pays à mode de vie occidental (Europe du Nord et Amérique du Nord) comparativement aux pays en voie de développement (Ng et al., 2017) (**Figure 13**). De plus, l'existence d'un gradient de répartition Nord-Sud de cette maladie aux États-Unis et en Europe suggère l'implication de l'environnement dans l'étiologie de la MC. Plusieurs facteurs environnementaux ont été montrés comme associés à un risque augmenté de développer une MICI. Une analyse récente, compilant les résultats obtenus à travers 53 méta-analyses a permis d'identifier 9 facteurs augmentant le risque de développer un MICI : le tabagisme, la vie urbaine, les appendicectomies, les amygdalectomies, l'exposition aux antibiotiques, l'utilisation de contraceptifs oraux, la consommation de sodas, les carences en vitamine D et l'infection à *Helicobacter* (autre que par l'espèce *pylori*). Au contraire, cette étude a identifié 7 facteurs réduisant le risque de développer une MICI : la pratique d'une activité physique, l'allaitement, la consommation de thé, le taux élevé de folates et de vitamine D et enfin l'infection à *Helicobacter pylori* (Piovani et al., 2019).

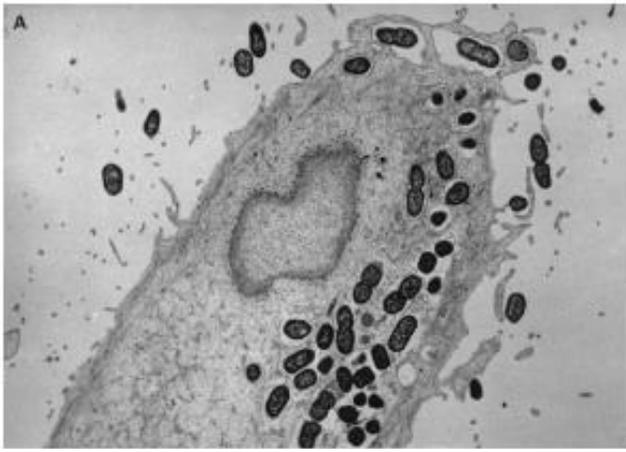


Figure 14 : Clichés de microscopie électronique à transmission de cellules épithéliales Hep-2 infectées par la souche *E. coli* LF82. Adhésion et invasion de la souche *E. coli* LF82 à la cellule hôte (x 6200) (d'après Boudeau *et al.*, 1999)

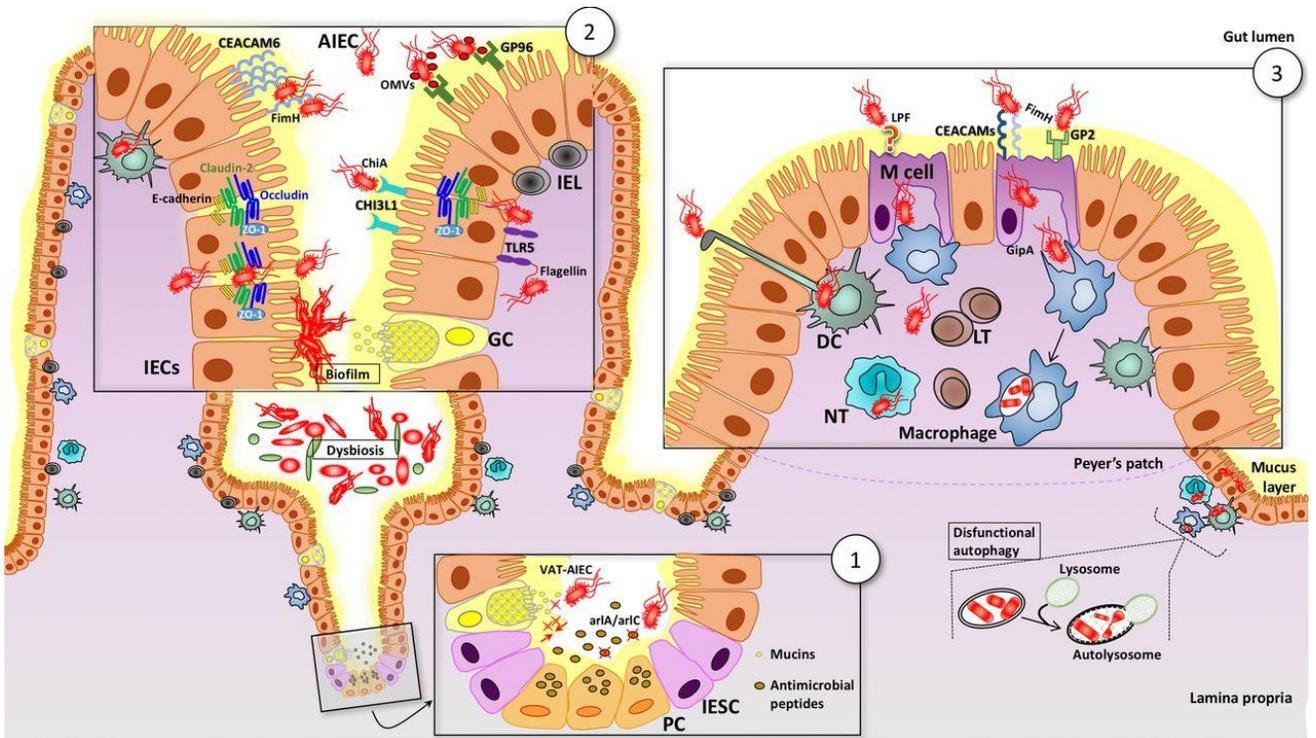


Figure 15 : Différentes stratégies et facteurs de virulence employés par les *E. coli* adhérents et invasifs isolés de patients atteints de MC pour induire une inflammation intestinale. 1- Les bactéries AIEC expriment une mucinase sécrétée appelée Vat-AIEC permettant la dégradation du mucus et l'accès aux cellules épithéliales. Elles ont également acquis la capacité à résister aux peptides anti-microbiens sécrétés principalement par les cellules de Paneth grâce aux gènes *arIa* et *arIc* leur permettant de survivre au contact de l'épithélium. 2- Les bactéries AIEC adhèrent à l'épithélium grâce à l'expression de l'adhésine FimH à l'extrémité des pili de type 1 qui interagit avec le récepteur CEACAM6 exprimé par les cellules épithéliales intestinales. La chitinase ChiA exprimée par la souche AIEC LF82 permet également cette interaction *via* une chitinase humaine CHI3L1 (chitinase 3-like 1). Les OMV sécrétées par la souche AIEC LF82 favorisent l'internalisation des bactéries *via* l'interaction de la protéine bactérienne de membrane externe OmpA (sécrétée dans les OMV) et le récepteur Gp96, glycoprotéine du stress du réticulum endoplasmique. 3- Les bactéries AIEC interagissent avec les cellules M grâce à l'expression de Long Polar Fimbriae (LPF). Ces cellules constituent une porte d'entrée vers la muqueuse où les bactéries AIEC sont capable de survivre et de se multiplier dans les cellules immunitaires. D'après Palmela *et al.*, 2018.

De plus, l'alimentation de type occidental (enrichie en sucres et en graisses et pauvres en fibres) est de plus en plus répandue dans la société et est associée à une susceptibilité accrue de développer la MC (Chapman-Kiddell et al., 2010). Les produits transformés font également partie de ce type de régime et il semblerait que les émulsifiants alimentaires qu'ils contiennent jouent également un rôle dans le développement de l'inflammation intestinale (Chassaing et al., 2015).

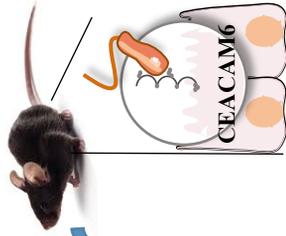
3- Le microbiote intestinal dans la MC

Chez les patients atteints de la MC, il a été décrit des modifications du microbiote intestinal, ou dysbiose, comparativement à des sujets sains (Alhagamhmad et al., 2016), le microbiote intestinal étant le terme utilisé pour caractériser la communauté complexe de micro-organismes vivant au sein du tube digestif. Cette dysbiose se caractérise par une diminution de la diversité en micro-organismes et par une modification de la richesse en certains groupes bactériens particuliers. En effet, une augmentation de groupes bactériens à effet « néfaste » est observée chez les patients atteints de la MC, comme les *Escherichia coli* qui peuvent représenter jusqu'à 100% du microbiote aéro-anaérobie facultatif associé à la muqueuse chez les patients. Particulièrement, l'identification de certaines souches d'*E. coli* présentant des propriétés importantes d'adhésion et d'invasion et étant particulièrement associées à la muqueuse intestinale des patients atteints de MC a mené à la définition d'un nouveau pathovar : les AIEC, *Adherent-Invasive Escherichia coli* (Darfeuille-Michaud et al., 1998) (**Figure 14**). Ces bactéries AIEC ont été isolées au niveau iléal chez 21 à 63% des patients contre seulement 6 à 10% des sujets contrôles (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Martinez-Medina et al., 2009; Palmela et al., 2018). Elles ont la capacité de coloniser et d'envahir la muqueuse intestinale par adhésion aux plaques de Peyer *via* les cellules M (Chassaing et al., 2013) et par adhésion aux cellules épithéliales intestinales *via* l'interaction spécifique entre leurs pili de type 1 et la protéine de surface CEACAM6 ainsi que *via* de nombreux mécanismes alternatifs (Barnich et al., 2007) (**Figure 15**). Les travaux du laboratoire M2iSH ont également démontré que les bactéries AIEC régulent finement l'expression de leurs flagelles au cours de l'infection, les exprimant davantage dans des conditions mimant l'environnement intestinal (en présence d'acides biliaires, de mucines) ce qui leur permet de pénétrer dans la couche de mucus, couche qu'elles peuvent traverser grâce à la sécrétion de la protéase Vat-AIEC, et ainsi d'atteindre les cellules épithéliales (Gibold et al., 2016; Sevrin et al., 2018). Cependant, l'ensemble de ces facteurs n'explique pas tous les cas de MC. Il semblerait que d'autres mécanismes soient impliqués dans le déclenchement et l'évolution de cette pathologie. Ainsi, une attention

Identifier les patients porteurs d'AIEC

1- Modèle Villin-CEACAM6

Etude de l'interaction CEACAM6-AIEC *in vivo*



Expression iléale de CEACAM6

Conséquences:

- Sur le microbiote intestinal?
- Sur la perméabilité intestinale?
- Sur l'inflammation basale?

Colonisation iléale par les bactéries AIEC?

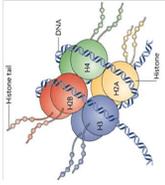
Organoides intestinaux dérivés de souris Villin-CEACAM6



- Pôle d'infection par les AIEC?
 - Tropicisme cellulaire?
- Test de molécules pour limiter l'invasion des cellules par les AIEC

3- Identification de biomarqueurs prédictifs du portage des AIEC

Analyse des marques épigénétiques



Expression des gènes



AIEC

Modification spécifique de la chromatine par les AIEC ?

Induction d'une signature transcriptomique spécifique?

Validation des candidats (marques épigénétiques/ gènes) identifiés comme prédictifs du portage des AIEC: Cohorte Remind

Stratégies thérapeutiques pour les patients porteurs de bactéries AIEC

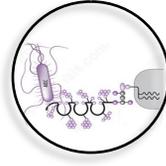
2- Molécules donneuses de méthyle: stratégie nutritionnelle pour limiter la colonisation intestinale par les AIEC

- Quelle(s) molécule(s) du MS-diet permet de limiter la colonisation par les bactéries AIEC?



Infection AIEC

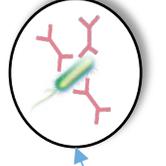
- Validation chez les patients MC (Cohorte CEALIVE) Dosage de la molécule protectrice (molécule X) contre la colonisation par les AIEC et corrélations avec:



Expression iléale et méthylation de CEACAM6?

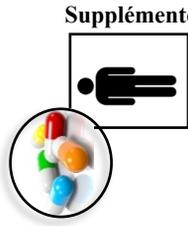


Portage de bactéries AIEC?



Bactéries coâtées IgA?

Etude clinique Patients AIEC +



Supplémenté



Placebo

4- Identification de gènes clés dans l'invasion des cellules par les AIEC: Etude des HDAC

Quelle(s) HDAC limite(nt) l'entrée des AIEC? Quels gènes cibles des HDAC sont impliqués dans l'invasion bactérienne?

Cibles thérapeutique à valider dans les modèles d'organoides et *in vivo*



Activité HDAC?

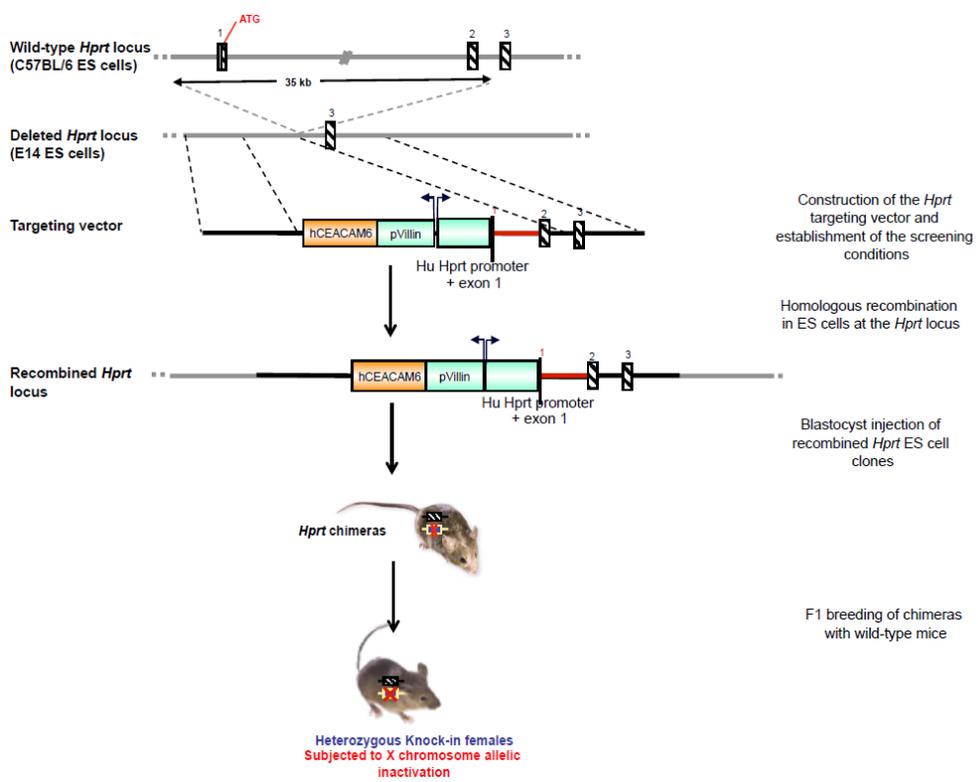
Figure 16: Objectifs principaux des projets de recherches proposés

particulière se porte désormais sur les facteurs épigénétiques et leur implication dans la MC. La meilleure compréhension des mécanismes d'adhésion et d'invasion des bactéries AIEC devrait permettre de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des patients atteints de MC. C'est dans ce contexte que s'inscrivent les projets de recherche que je propose de développer au laboratoire M2iSH.

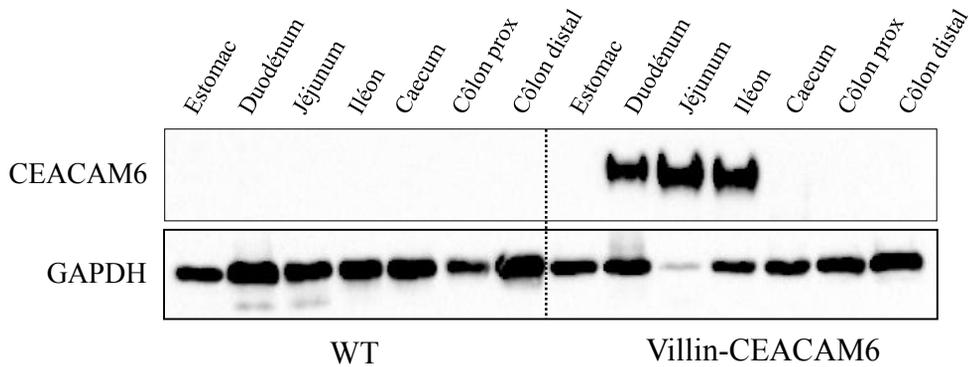
Projet de recherche

Le projet de recherche présenté ici sera principalement focalisé sur l'étude de l'interaction entre les bactéries AIEC et l'épithélium intestinal, et comportera plusieurs axes de recherche. En effet, un premier axe de ce projet de recherche visera à caractériser un nouveau modèle murin pour l'étude de l'interaction AIEC/muqueuse iléale dans un contexte d'infection chronique. De plus, ce modèle devrait permettre d'identifier et mieux caractériser les conséquences d'une surexpression de CEACAM6, comme observé chez les patients atteints de MC sur l'homéostasie intestinale et sur la composition du microbiote intestinal. Un deuxième axe de recherche, basé sur des résultats en cours de publication, s'intéressera à mieux comprendre comment un régime enrichi en molécules donneuses de groupements méthyles limite la capacité des bactéries AIEC à s'implanter dans la muqueuse intestinale, ce qui pourrait permettre de proposer une stratégie nutritionnelle permettant de limiter la colonisation intestinale par les bactéries AIEC. Le 3^{ème} axe de recherche s'intéressera à l'identification de biomarqueurs prédictifs du portage des bactéries AIEC chez les patients atteints de MC. Enfin les axes de recherche 4 et 5 s'intéresseront aux rôles que peuvent jouer les histones désacétylases dans la capacité des bactéries AIEC à envahir les cellules intestinales et devraient permettre de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter les patients hébergeant ces bactéries pathobiontes (**Figure 16**).

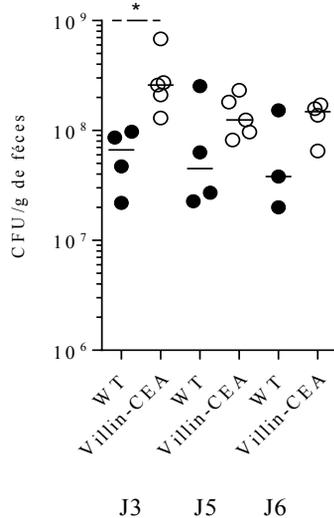
A



B



C



D

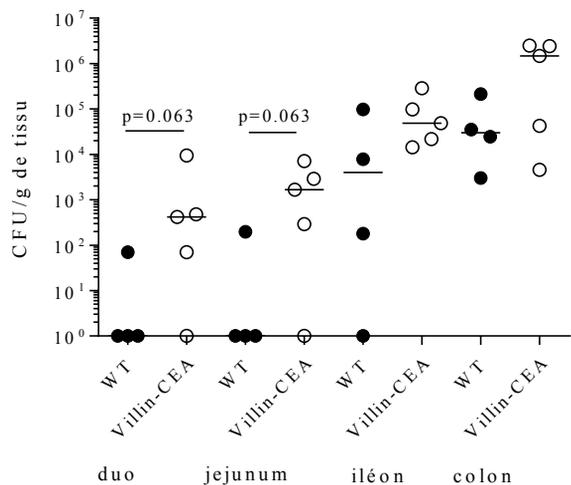


Figure 17 : Modèle murin Villin-CEACAM6. A- Stratégie de transgénèse utilisée pour l'introduction du gène humain *CEACAM6* dans le locus *HPRT*. B- Western blot *CEACAM6* réalisé à partir d'extraits protéiques de muqueuses de souris sauvages et Villin-*CEACAM6*. C- D- Des souris WT et Villin-*CEACAM6* ont été traitées par 1g/L de streptomycine dans l'eau de boisson pendant 3 jours avant infection par 10^9 AIEC LF82. La colonisation par la souche AIEC LF82 a été suivie au cours du temps C- dans les fèces et D- les bactéries associées à la muqueuse ont été dénombrées 6 j post-infection. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, t-test, Mann-Whitney.

1- Mise en place du modèle Villin-CEACAM6 pour l'étude de l'interaction AIEC-épithélium iléal in vivo

Contexte de l'étude

L'étude de l'interaction chronique entre les bactéries AIEC isolées de patients atteints de MC et l'épithélium iléal nécessite le développement d'un modèle murin adapté. Les souches AIEC ne persistent que très peu de temps dans le tube digestif de souris sauvages. En effet, ces souches adhèrent à l'épithélium intestinal *via* l'interaction entre leurs pili de type 1 variants et la glycoprotéine CEACAM6 fortement manosylée (Barnich et al., 2007; Dreux et al., 2013). Or, le gène *CEACAM6* n'est pas présent dans le génome de souris, limitant ainsi la colonisation intestinale par ces bactéries.

Jusqu'à ce jour, le modèle le plus utilisé pour l'étude des AIEC *in vivo* a été le modèle CEABAC10. Ces souris portent dans leur génome 10 copies d'un transgène codant pour les gènes humains *CEACAM3*, *CEACAM5*, *CEACAM6*, *CEACAM7* (Carvalho et al., 2009; Chan and Stanners, 2004). Ce modèle a été mis en place par Chan et Stanners dont les études visaient à étudier le rôle des protéines CEACAMs dans le cancer colorectal. Le modèle CEABAC10 a permis de mieux comprendre les conséquences d'une infection par les AIEC sur l'immunité innée, sur la fonction de barrière de l'intestin, sur l'effet d'un régime de type occidental sur la colonisation intestinale... Une limite importante de ce modèle est que l'expression de *CEACAM6* est uniquement localisée dans l'épithélium colique (Denizot et al., 2012). En effet, dans le modèle CEABAC10, le gène *CEACAM6* a été cloné en aval de son promoteur humain, guidant ainsi son expression dans les mêmes tissus que chez l'Homme en conditions physiologiques, à savoir l'épithélium intestinal colique et non iléal. Or, les bactéries AIEC colonisent préférentiellement l'épithélium iléal des patients atteints de MC. Cette limite du modèle CEABAC10 nous a amené à développer un nouveau modèle transgénique exprimant le gène *CEACAM6* dans les cellules épithéliales intestinales grâce à son clonage en aval d'un promoteur Villin. Le transgène contenant l'ADN codant pour le gène *CEACAM6* humain sous contrôle du promoteur Villin a été inséré dans le locus *HPRT* de cellules embryonnaires de souris par recombinaison homologue (**Figure 17A**). Ce modèle est disponible au laboratoire depuis juin 2018. Depuis cette date, des backcross sont réalisés afin de transférer le transgène dans le fond génétique C57Bl/6, fond génétique communément utilisé pour les études d'interactions hôte/pathogènes et les réponses immunologiques.

Résultats préliminaires

Des western blots ont été réalisés afin de déterminer si l'expression de CEACAM6 était présente dans les tissus intestinaux. Nous avons pu observer une forte expression de CEACAM6 dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon, comme attendu (**Figure 17B**). Une faible expression a été observée dans le côlon et dans l'estomac des animaux. De plus, la forme caractéristique de la bande obtenue (« en papillon ») suggère la présence de modifications post-traductionnelles, potentiellement des glycosylations, nécessaires à la colonisation intestinale par les bactéries AIEC. Ces résultats sont encourageants et ouvrent de nombreuses pistes d'étude. Cependant, il est nécessaire de mieux caractériser ce modèle murin.

1- Étude de l'effet de la surexpression de CEACAM6 sur la physiologie iléale

Trente-six pourcent des patients atteints de MC présentent une expression anormalement élevée de CEACAM6 au niveau des cellules épithéliales intestinales. L'effet de la surexpression de CEACAM6 dans l'épithélium iléal n'a pas été étudié à ce jour. Il serait intéressant de déterminer si l'expression anormale de ce gène modifie la perméabilité intestinale, ce qui pourrait altérer la fonction de barrière de l'intestin et favoriser l'inflammation intestinale. De plus, les glycosylations présentes à la surface de la protéine CEACAM6 étant reconnues par certains pili de type 1 présent à la surface de bactéries, il semble intéressant de déterminer la composition du microbiote intestinal dans un contexte de surexpression de ce gène. En effet, il est probable que cette expression anormale favorise l'implantation de certaines bactéries au dépend de certaines autres.

2- Conséquences de l'infection par les bactéries AIEC

Une étude préliminaire d'infection des souris Villin-CEACAM6 a été réalisée. Nous avons mis en évidence une persistance prolongée de la bactérie AIEC de référence LF82 dans ce modèle, comparativement aux souris sauvages. En effet, les bactéries étaient plus rapidement éliminées dans les fèces des souris sauvages que dans les fèces des souris Villin-CEACAM6 et un nombre plus important de bactéries a été retrouvé associé à la muqueuse intestinale dans le nouveau modèle (**Figures 17C-D**). Le challenge va résider dans le fait de réussir à obtenir une colonisation chronique du tube digestif (plus de 6 jours) par les bactéries AIEC dans le modèle Villin-CEACAM6. Les résultats préliminaires étant encourageants, nous allons tenter de les reproduire en augmentant la quantité de bactéries administrées aux animaux et en testant un grand nombre de souches AIEC, seules ou en combinaison, isolées de patients. Dans le cas où une colonisation chronique serait compliquée à obtenir, nous envisageons de croiser ces souris

avec des animaux porteurs de mutations dans des gènes de susceptibilité de la MC et impliqués dans le contrôle de la multiplication intracellulaire des bactéries, tels que les gènes de l'autophagie (*ATG16L1* et *Nod2*). Ces animaux génétiquement modifiés en fond génétique C57Bl/6 sont disponibles au laboratoire M2iSH.

Une fois une colonisation bactérienne iléale de type chronique par des bactéries AIEC obtenue dans ce modèle, nous envisageons d'étudier la réponse inflammatoire induite par les AIEC par des approches de dosage ELISA et de cytométrie en flux, d'étudier l'effet de l'infection sur la perméabilité intestinale (*in vivo* et *ex vivo* en utilisant les chambres de Ussing). Un point important sera également d'observer la présence des bactéries AIEC au sein des cellules intestinales et/ou dans les macrophages de la muqueuse iléale. À ce jour, les bactéries AIEC n'ont jamais été observées dans les cellules de l'hôte *in vivo*. Ceci permettrait d'identifier avec précision la porte d'entrée de ces bactéries et d'ouvrir de nouvelles pistes d'études pour limiter leur persistance.

3- Caractérisation de l'interaction bactérie-épithélium intestinal dans des modèles d'organoïdes intestinaux

Les modèles d'organoïdes intestinaux sont de plus en plus utilisés pour l'étude la physiologie de l'épithélium intestinal et représentent un modèle extrêmement intéressant pour l'étude des relations hôte-pathogènes. Les organoïdes intestinaux sont dérivés de cryptes intestinales (humaines ou murines), cultivées dans une matrice composée de protéines de la matrice extracellulaire en présence de facteurs de croissance et de différenciation. Les intérêts de ce modèle sont nombreux. Premièrement, les types cellulaires présents dans les organoïdes sont de même nature que ceux trouvés *in vivo* dans l'épithélium intestinal (Sato et al., 2009, 2011). En effet sont retrouvés des entérocytes, des cellules de Paneth, des cellules souches ainsi que des cellules caliciformes sécrétrices de mucus. Deuxièmement, les organoïdes sont dépourvus de cellules immunitaires, facilitant l'étude de l'interaction entre cellules épithéliales et microorganismes. Troisièmement, les organoïdes peuvent être dérivés de souris génétiquement modifiées (organoïdes déficients pour certains gènes ou surexprimants des gènes d'intérêts, comme *CEACAM6* dans notre contexte d'étude). Une limite importante à ce modèle est l'organisation des cellules dans l'organoïde. En effet, la lumière intestinale est localisée à l'intérieur de l'organoïde, rendant difficile l'accès du pôle apical des cellules aux bactéries. Jusqu'à ce jour, les études d'infection d'organoïdes ont été réalisées par micro-injection de bactéries dans la lumière de l'organoïde, technique particulièrement délicate à mettre en place. Un article récent a montré que la polarité des organoïdes dépendait de la

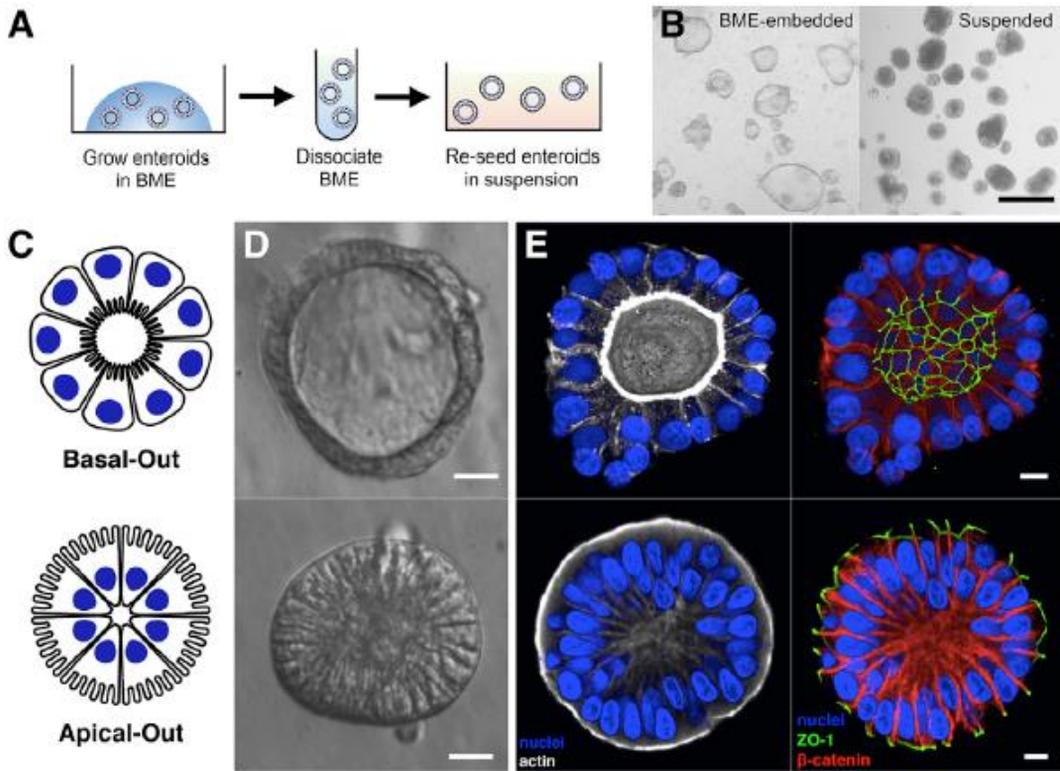


Figure 18 : La culture d'organoïdes en suspension induit une réversion de polarité. A- Génération d'organoïdes en suspension. B- Microscopie à contraste de phase montrant les organoïdes en matrigel (gauche) et en suspension (droite). C-E- Les structures des organoïdes avec le pôle basolatéral à l'extérieur ou le pôle apical à l'extérieur observés en microscopie à contraste de phase (D) et en microscopie confocale (E) Noyau: bleu, Actine: blanc, ZO-A: vert, β -caténine: rouge (d'après Co JY et al., 2019).

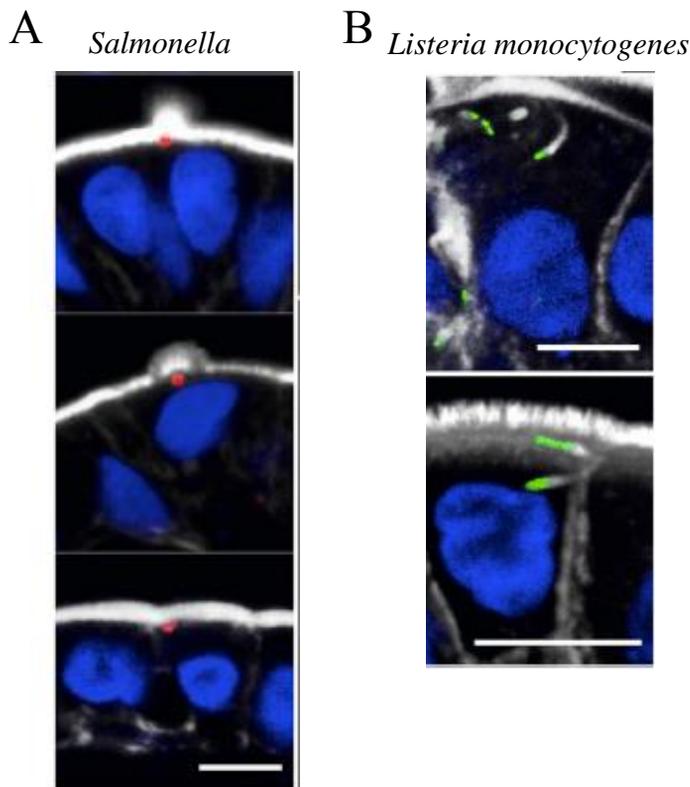


Figure 19 : Infection des organoïdes par A- *Salmonella enterica* ou B- *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* n'envahit que les organoïdes présentant le pôle apical à l'extérieur alors que *Listeria* n'envahit que les organoïdes présentant le pôle basolatéral à l'extérieur. À noter, les comètes d'actine formées par *Listeria* pour son passage de cellules en cellules. Actine: blanc, noyau: bleu, *Salmonella*: rouge, *Listeria*: vert (d'après Co JY et al., 2019).

présence de matrice extra-cellulaire. En effet, lorsque les organoïdes sont cultivés sans matrice, la polarité s'inverse, exposant le pôle apical des cellules vers l'extérieur, et facilitant ainsi l'infection bactérienne par des souches invasives ciblant préférentiellement le pôle apical des entérocytes (**Figures 18 et 19**) (Co et al., 2019). C'est cette approche que nous envisageons d'établir au laboratoire, en utilisant les souris Villin-CEACAM6, pour étudier l'interaction épithélium-bactéries AIEC. Nous chercherons à identifier, par des approches de microscopie confocale, le pôle cellulaire ainsi que les types cellulaires préférentiellement ciblés par les bactéries AIEC pour traverser l'épithélium intestinal. Nous suivrons leur multiplication en temps réel au sein des cellules par microscopie à fluorescence et nous pourrons tester différentes molécules afin de limiter l'adhésion et/ou l'invasion de l'épithélium par les bactéries AIEC.

L'ensemble de ces travaux devrait permettre d'établir un nouveau modèle mimant la susceptibilité des patients à être colonisés par les bactéries AIEC, de façon à mieux comprendre et caractériser d'un point de vue moléculaire l'interaction entre les bactéries AIEC et les cellules hôtes, ce qui permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

De plus, ce modèle devrait permettre d'ouvrir la voie à de nombreux projets de recherche, comme proposés dans la suite du projet (axes 2-5). Enfin, établir ce modèle *in vivo*, et le modèle d'organoïdes, permettra de tester de nouvelles molécules thérapeutiques visant à limiter la colonisation intestinale par les AIEC chez les patients atteints de MC.

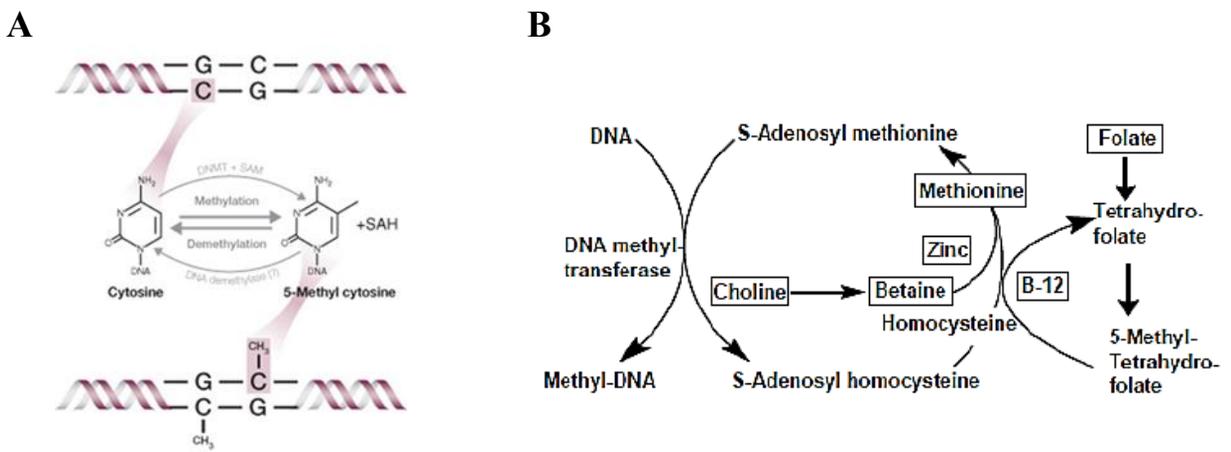


Figure 20 : Métabolisme de la méthylation de l'ADN chez les mammifères. A- Chez les mammifères, la méthylation consiste en l'ajout d'un groupement méthyle sur le carbone 5 des cytosines dans un contexte CpG. B- Le substrat principal de la méthylation de l'ADN est la S-Adénosyl Méthionine (SAM). Elle est produite lors du catabolisme de la méthionine, de la bétaine, de la choline, du folate et de la vitamine B12 qui sont des molécules dites «donneuses de groupements méthyles».

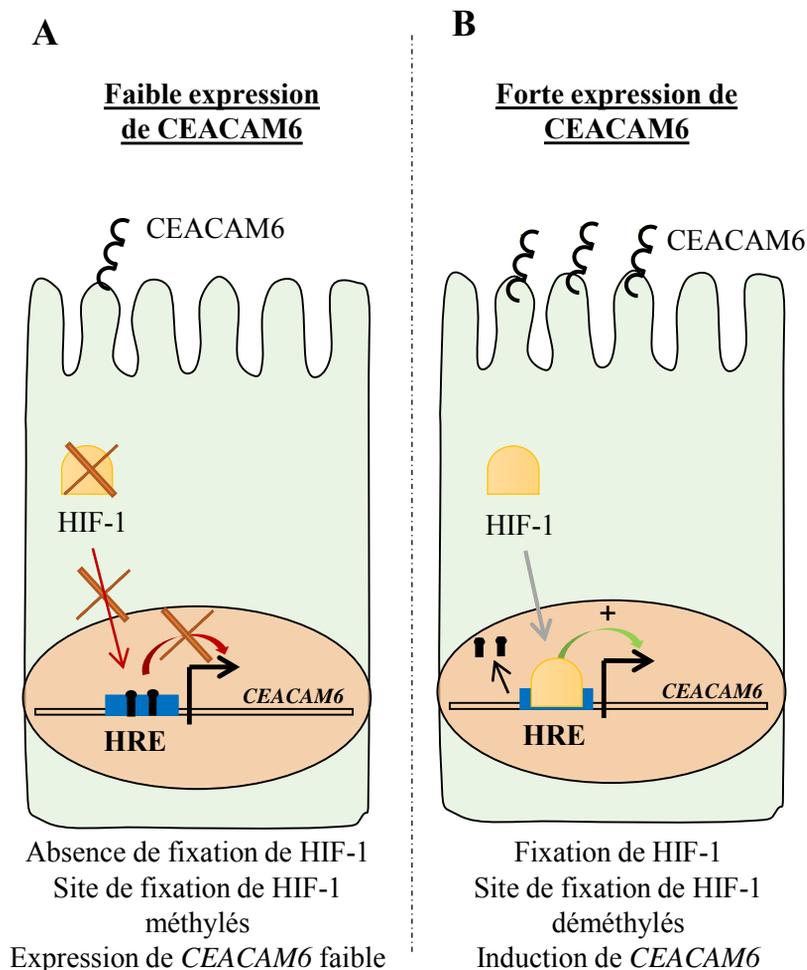


Figure 21 : Régulation de l'expression du gène CEACAM6. A- Lorsque les sites de fixation pour le facteur de transcription HIF-1 (HRE: Hypoxia Responsive Element), présents sur le promoteur du gène CEACAM6, sont méthylés, HIF-1 ne se fixe pas au niveau du promoteur du gène. La transcription n'est pas active. B- Lorsque la méthylation des sites HREs diminue sur le promoteur du gène CEACAM6, HIF-1 se fixe sur les HREs et entraîne une augmentation de l'expression de CEACAM6 (d'après Denizot et al., 2015).

2- Rôle des molécules donneuses de groupements méthyles dans la susceptibilité de l'hôte à héberger des bactéries AIEC

Contexte de l'étude

Au cours de la dernière décennie, une attention particulière a été accordée à l'étude de la méthylation de l'ADN dans les cellules sanguines et les cellules épithéliales intestinales des patients atteints de MICI, toutes montrant des sites CpG différenciellement méthylés chez les patients, par rapport aux témoins (Cooke et al., 2012; Howell et al., 2018; Li Yim et al., 2018; McDermott et al., 2016; Nimmo et al., 2012; Sominen et al., 2019; Ventham et al., 2016). La méthylation de l'ADN se produit dans la voie du métabolisme à un carbone et dépend de plusieurs enzymes et de la disponibilité des micronutriments utilisés comme cofacteurs, tels que le folate (vitamine B9), la vitamine B12, la méthionine, la choline et la bétaine (**Figure 20**). Le folate entre dans le cycle du métabolisme à un carbone où il est converti, à la suite de nombreuses réactions enzymatiques, en S-adenosyl-méthionine utilisé comme donneur de méthyles par l'enzyme DNMT pour catalyser la réaction de méthylation de l'ADN (Anderson et al., 2012; Traube and Carell, 2017). L'apport en molécules donneuses de groupements méthyles dans l'alimentation a été associé à la régulation de la méthylation de l'ADN. Il est important de noter que des carences en B12 et en folate sériques ont fréquemment été observées dans différentes cohortes de patients atteints de MICI, carences qui pourraient, en raison du rôle de ces molécules dans le métabolisme du CH₃, être liées à des profils de méthylation de l'ADN altérés et à l'expression modifiée de certains gènes (Bengi et al., 2018; Bermejo et al., 2013; Huang et al., 2017; Madanchi et al., 2018; Pan et al., 2017; Yakut et al., 2010).

La méthylation d'un CpG spécifique dans le promoteur du gène *CEACAM6* altère la fixation du facteur de transcription HIF-1, limitant ainsi la transcription du gène (**Figure 21**) (Denizot et al., 2015). Empêcher la colonisation de la muqueuse iléale par les bactéries AIEC pourrait constituer une stratégie préventive pour les patients atteints de MC afin de limiter la récurrence de la MC. Comme les patients présentent des défauts dans les molécules donneuses de méthyles et dans la méthylation de l'ADN, une stratégie pour limiter la colonisation par les bactéries AIEC pourrait consister à rétablir une méthylation correcte du promoteur du gène *CEACAM6* (et d'autres gènes anormalement régulés) afin de diminuer son expression, par le biais d'une stratégie basée sur un régime alimentaire.

Les régimes enrichis en molécules donneuses de méthyles ont été utilisés dans de nombreux contextes de recherche. Ces études ont montré que la supplémentation maternelle en donneurs de méthyles augmente la méthylation de l'ADN de la descendance (Cooney et al.,

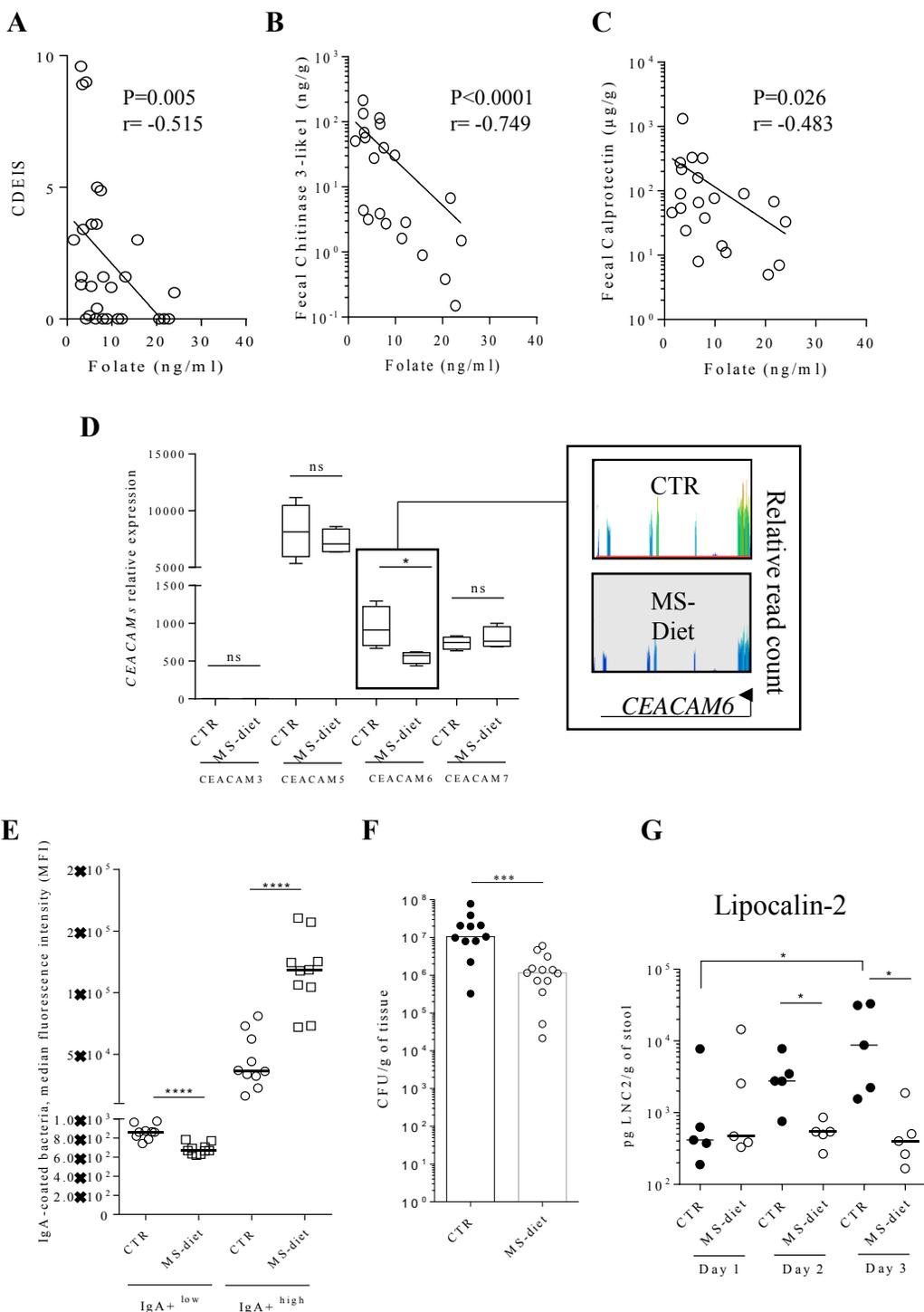


Figure 22 : Effet des molécules donneuses de groupements méthyles sur l'expression de CEACAM6 et sur la colonisation intestinale par les bactéries AIEC.

A-C- Les taux sériques de folate ont été quantifiés chez des patients atteints de MC. Corrélation inverse entre les taux de folates sériques et le CDEIS (Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity) (**A**), la chitinase fécale (**B**) et la calprotectine fécale (**C**). **D-** Des souris CEABAC10 ont reçu un régime enrichi en molécules donneuses de méthyles (MS-diet, Methyl-supplemented diet) au cours de la gestation jusqu'au sevrage. Niveaux d'expression des 4 gènes CEACAMs humains présents sur le transgène porté par les animaux, quantifié par RNA-seq. Insert: profil d'expression de CEACAM6 (RNA-seq). **E-** Médiane de fluorescence des bactéries « coatées » par les IgA au sein du microbiote fécal. Les souris ont été traitées soit par le régime MS-diet, soit le régime contrôle (CTR). Les bactéries du microbiote ont été isolées puis marquées par un anticorps dirigé contre les IgA. Les bactéries IgA⁺ ont été stratifiées en 2 populations IgA^{low} et IgA^{high}. Le graphique montre les médianes de fluorescences obtenues dans chacune des conditions. **F-G-** Les souris CEABAC10 nourries avec le régime MS-diet ou contrôle ont été infectées par la souche AIEC LF82. Les bactéries associées au côlon ont été dénombrées à 3 jours post-infection (**F**) et le marqueur d'inflammation lipocaline-2 a été quantifié dans les fèces au cours de l'infection (**G**). *:p<0,05; **:p<0,01, ***:p<0,001, t-test, Mann-Whitney.

2002; Pauwels et al., 2017; Wolff et al., 1998). Dans un contexte d'inflammation intestinale, il a été montré que les régimes enrichis en donneurs de méthyles pendant la gestation augmentaient la sensibilité à la colite induite par le DSS, de manière dépendante du microbiote (Mir et al., 2013; Nagy-Szakal et al., 2012; Schaible et al., 2011). Ces données montrent clairement l'importance des molécules donneuses de méthyles dans la régulation de la réponse inflammatoire intestinale. Cependant, aucune étude n'a analysé les effets d'un tel régime dans un contexte d'infection par les bactéries AIEC. Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur la relation existant entre le folate et l'inflammation intestinale chez les patients atteints de MC et sur l'effet de la supplémentation maternelle en méthyles sur la réponse transcriptomique au niveau de la muqueuse colique et la colonisation intestinale de bactéries AIEC dans un modèle murin mimant la susceptibilité de l'hôte à être colonisé par les AIEC.

Résultats préliminaires

Nous avons mené une étude sur une cohorte de patients atteints de MC afin de déterminer s'il existait un lien entre les taux sériques de folate et l'inflammation intestinale. Nous avons mis en évidence une corrélation inverse entre la concentration sérique en folate et le score endoscopique de sévérité de la maladie (CDEIS) ainsi que les marqueurs fécaux de l'inflammation (chitinase et calprotectine) (**Figure 22A-C**). Afin de mieux comprendre le rôle des molécules donneuses de groupements méthyles dans l'inflammation intestinale et la susceptibilité de l'hôte à être colonisé par les AIEC, le modèle murin CEABAC10 a reçu un régime alimentaire enrichi en molécules donneuses de groupements méthyles au cours de la gestation. Les travaux ont été menés sur la descendance qui a reçu le même régime alimentaire. Nous avons mis en évidence que ce régime alimentaire augmentait la méthylation du promoteur du gène *CEACAM6* dans les cellules épithéliales intestinales coliques, ce qui était associé à une diminution de l'expression de ce gène (**Figure 22D**). Une approche ARN-seq a mis en évidence d'importantes modulations de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des IgA. Nous avons quantifié les bactéries « coatées » avec des IgA dans les fèces des animaux, par cytométrie en flux. Des études ont clairement montré que les bactéries fortement « coatées » par des IgA possédaient un potentiel pro-inflammatoire important (Palm et al., 2014; Viladomiu et al., 2017). Nous avons observé que les animaux recevant un régime enrichi présentaient moins de bactéries « coatées » avec des IgA, par contre, lorsque ces bactéries étaient « coatées » avec les IgA, elles l'étaient de façon plus importante (**Figure 22E**). Dans ce contexte, les animaux ont été infectés par les bactéries AIEC. Nous avons pu observer une diminution d'un facteur 10 de la capacité des AIEC à coloniser l'épithélium intestinal des animaux recevant le régime enrichi, comparativement aux animaux contrôles, ce qui était associé à une plus faible

inflammation induite, comme montré par le dosage du marqueur fécal d'inflammation lipocaline-2 (**Figure 22F-G**). Ce travail, réalisé avec Elodie Gimier, étudiante en thèse que j'ai co-encadrée, ouvre de nouvelles perspectives de travail afin de mieux comprendre les mécanismes menant à ce phénotype et de potentiellement proposer aux patients carencés des suppléments en molécules donneuses de méthyles.

Projet de Recherche

1- Identification des molécules donneuses de méthyles menant au contrôle de la colonisation intestinale des AIEC

Au cours de l'étude détaillée ci-dessus, nous avons utilisé un régime fortement enrichi avec de nombreuses molécules donneuses de méthyles. Or, il est probable que les effets observés ne dépendent pas de toutes les molécules ajoutées au régime alimentaire. Afin d'identifier la/les molécule(s) la/les plus importante(s) dans la mise en place du phénotype observé, les souris Villin-CEACAM6 seront nourries avec différents régimes alimentaires synthétisés, enrichis seulement avec une des molécules. Dans un premier temps, la méthylation du promoteur *CEACAM6* ainsi que son expression seront quantifiées dans les cellules intestinales suite aux différents régimes. Dans un deuxième temps, les animaux seront infectés par différentes souches AIEC, isolées de protocoles cliniques incluant des patients MC, afin de déterminer quelle molécule permet de limiter la colonisation intestinale par les AIEC.

2- Étude de l'effet transgénérationnel

Lors de notre étude, les analyses ont été réalisées sur la descendance d'animaux nourris par le régime enrichi. Le choix de ce protocole s'est basé sur la littérature où il est clairement établi que les modifications de méthylation de l'ADN s'opèrent au cours de la gestation et des premières semaines de vie. Cependant, il semble important de déterminer si le même phénotype de protection contre les bactéries AIEC est retrouvé lorsque des animaux reçoivent le régime alimentaire à l'âge adulte. Pour répondre à cette question, des animaux Villin-CEACAM6 recevront le régime enrichi après sevrage pendant différents temps. La capacité des bactéries AIEC à coloniser l'épithélium intestinal de ces animaux ainsi que leur capacité à induire de l'inflammation intestinale seront évaluées.

3- Étude des IgA dans un contexte enrichi en molécules donneuses de méthyles

Notre étude a montré que la voie des IgA pouvait être impliquée dans le phénotype d'élimination des bactéries AIEC en réponse au régime enrichi en molécules donneuses de méthyles. Les IgA sont sécrétés par les lymphocytes B suite à une stimulation du système immunitaire par des antigènes bactériens. Des études ont utilisées une approche d'IgA-seq afin de mieux caractériser les bactéries « coatées » par les IgA. Afin de les identifier, les bactéries « coatées » par des IgA seront triées par une approche de FACS puis un séquençage de l'ADN codant l'ARNr 16S sera réalisé. Dans un contexte de régime alimentaire enrichi en molécules donneuses de groupements méthyles, cette approche devrait permettre d'identifier les bactéries préférentiellement ciblées par les IgA et également de déterminer si les bactéries AIEC sont préférentiellement « coatées » par les IgA suite à l'infection des souris.

4- Étude chez les patients atteints de maladie de Crohn

- Corrélation folate-expression de CEACAM6

Les données obtenues dans les modèles murins nécessitent d'être confirmés chez les patients atteints de MC. Pour cela, des biopsies iléales de patients atteints de MC inclus dans une étude clinique en cours au laboratoire (CEALIVE, 100 patients, PI : Dr. Anthony Buisson) seront analysées. Il serait, dans un premier temps, intéressant de déterminer s'il existe une corrélation inverse entre l'expression de CEACAM6 au niveau iléal, les niveaux de méthylation du promoteur du gène et la concentration sérique en folate chez les patients. L'expression iléale de CEACAM6 sera mesurée par dosage ELISA et la méthylation de son promoteur sera mesurée par Bisulfite SnapShot à partir des biopsies iléales.

- Corrélation folate-AIEC

Un autre point important sera de déterminer s'il existe une corrélation entre les taux sériques de folate et la présence de bactéries AIEC associées à la muqueuse. Le statut AIEC des patients inclus dans l'étude CEALIVE a précédemment été déterminé. Nous n'avons pas observé de lien direct entre la présence de bactéries AIEC et la concentration en folate sérique dans notre cohorte, due à un trop faible nombre de patients étudiés. Le dosage de folate sera réalisé sur l'ensemble de la cohorte (n=100) afin de déterminer s'il existe un lien entre la présence d'AIEC associés à la muqueuse, la quantité d'Entérobactéries associées à l'épithélium iléal et la concentration en folate.

- *Corrélation folate-IgA*

Enfin, il semble important de quantifier et d'identifier les bactéries « coatées » par des IgA dans la cohorte de patients afin de déterminer si une relation entre IgA et folate existe. Pour cela, les bactéries présentes dans les selles des patients seront marquées avec un anticorps anti-IgA et la proportion de bactéries IgA+ sera déterminée par cytométrie en flux et corrélée à la concentration sérique en folate. De plus, les bactéries IgA+ seront triées par cytométrie en flux et un séquençage de l'ADN codant l'ARNr 16s sera réalisé afin d'identifier les bactéries spécifiquement reconnues par les IgA. Ces analyses devraient permettre de déterminer si les taux de folate sont associés à une capacité augmentée des IgA à cibler certaines bactéries particulières.

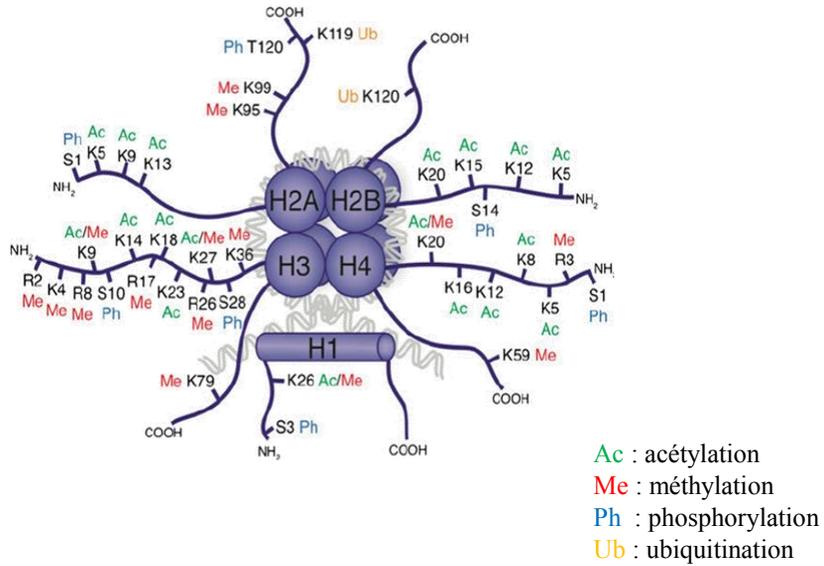
- *Étude clinique*

Dans le cas où tous les résultats obtenus sur la cohorte CEALIVE confirmeraient qu'il existe une relation inverse entre la concentration sérique en folate, la colonisation par les bactéries AIEC, l'expression de CEACAM6 et l'inflammation intestinale, il serait important de réaliser une étude clinique afin de valider nos observations.

Pour cela, des patients MC porteurs de bactéries AIEC seront inclus dans une nouvelle étude clinique. Les patients seront catégorisés aléatoirement dans deux bras, un premier bras recevant un placebo et un deuxième bras recevant la molécule donneuse de méthyles (identifiée comme impliquée dans l'élimination des bactéries AIEC). L'évolution de différents paramètres sera mesurée au cours de l'étude : la concentration en folate sérique, l'expression des marqueurs d'inflammation fécale (calprotectine, chitinase), la présence de bactéries AIEC sur biopsies iléales, le score endoscopique de la maladie, l'index de sévérité de la maladie, la composition du microbiote intestinal, la concentration en IgA fécaux et l'expression iléale de CEACAM6.

L'ensemble de ce travail devrait permettre de valider (ou non) le rôle protecteur des molécules donneuses de groupements méthyles chez les patients porteurs de bactéries AIEC. Ceci pourrait mener les médecins à prescrire des complémentations systématiques en ces molécules chez les patients carencés ainsi que chez les patients porteurs de bactéries AIEC. Cependant, il reste très compliqué d'identifier les patients porteurs de bactéries AIEC. C'est pourquoi l'axe 3 de ce projet vise à identifier de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la présence de bactéries AIEC chez les patients atteints de MC.

A



B

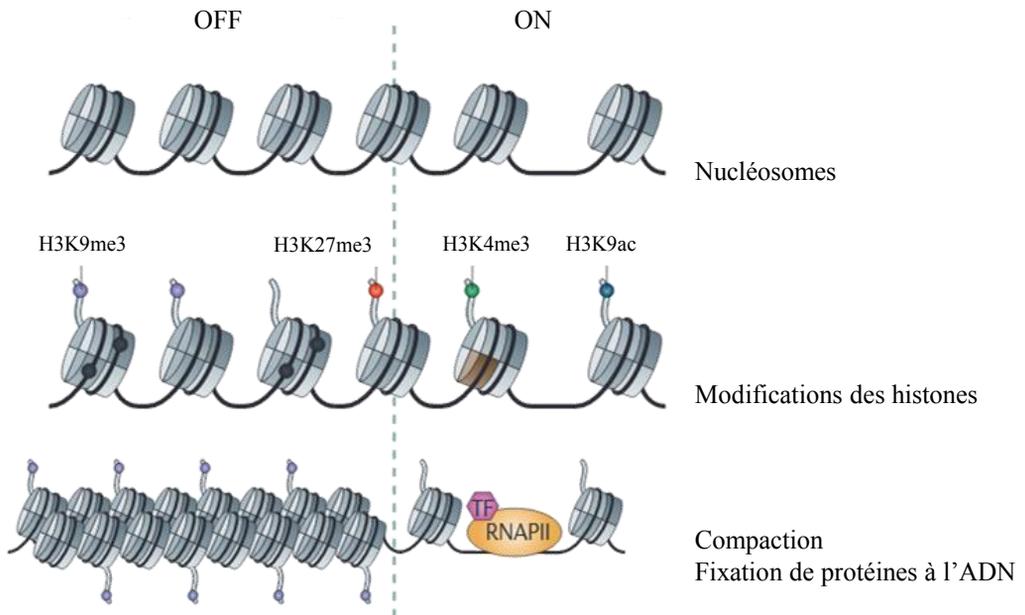


Figure 23 : Modifications post-traductionnelles des histones et organisation de la chromatine.

A- Les différentes modifications post-traductionnelles des histones composant un nucléosome ont été représentées schématiquement. B- En fonction des modifications épigénétiques, l'organisation de la chromatine peut être associée à une transcription inactive (OFF) ou active (ON). Par exemple, les modifications post-traductionnelles H3K9me3 et H3K27me3 de l'histone H3 sont présentes dans des zones de transcription inactive, tandis que les marques H3K4me3 et H3K9ac sont associées à une transcription active et présentes dans des régions où des facteurs de transcription (TF) et l'ARN polymérase II (RNAPII) ont accès à l'ADN (adapté de Zhou et al., 2011).

3- Étude de l'effet des bactéries AIEC sur les marques épigénétiques de la cellule hôte pour l'identification de biomarqueurs prédictifs du portage des bactéries AIEC.

Contexte de l'étude

Selon les cohortes étudiées, 21 à 63% des patients sont porteurs de bactéries AIEC (Palmela et al., 2018). Cependant, la mise en évidence des AIEC chez les patients atteints de MC repose sur des tests phénotypiques longs à réaliser, nécessitant un certain niveau d'expertise et donc impossible à mettre en œuvre, en routine, dans un laboratoire d'analyse médicale. En effet, il n'existe pas de déterminants génétiques spécifiques à l'ensemble des bactéries AIEC qui pourraient permettre de les identifier rapidement par une approche moléculaire simple à partir de biopsies. Afin de les mettre en évidence, une biopsie iléale de patients (biopsie réalisée au cours d'un examen endoscopique invasif) est étalée sur milieu sélectif pour les Entérobactéries, différents clones sont ensuite isolés et testés pour leur capacité d'adhésion, d'invasion des cellules épithéliales intestinales et pour leur capacité de survie en macrophages. L'ensemble de ce travail étant fastidieux, il semble nécessaire de développer de nouveaux tests diagnostiques prédictifs de la présence de bactéries AIEC chez les patients. De nombreuses bactéries invasives ont été montrées comme capables de moduler les marques épigénétiques de la cellule hôte, et plus particulièrement les modifications post-traductionnelles des histones.

Les histones (H2A, H2B, H3, H4) composant le core du nucléosome (premier niveau de compaction de l'ADN) ainsi que l'histone H1 peuvent subir des modifications post-traductionnelles comme l'ajout de groupements méthyle, phosphate, ubiquitine, crotonyle, lactyle ou encore acétyle, principalement au niveau de leur queue N-terminale (**Figure 23A**). L'ajout de ces marques par différentes enzymes peut entraîner le recrutement de divers facteurs protéiques ainsi qu'une modification de la charge des histones, conduisant à la modulation de l'état de compaction de la chromatine et de l'accessibilité des sites de fixation à des facteurs de transcription (Bannister and Kouzarides, 2011; Fellows et al., 2018; Zhang et al., 2019; Zhou et al., 2011). Ainsi, l'ensemble des modifications post-traductionnelles des histones module la compaction de la chromatine, qui en fonction de son état, relâchée ou condensée, peut être respectivement associée à un état permissif ou répressif de l'expression des gènes (**Figure 23B**).

Les pathogènes utilisent différents mécanismes pour moduler le niveau d'acétylation des histones. Il a été démontré que certaines bactéries comme *Mycobacterium tuberculosis* ou *Helicobacter pylori* entraînent une désacétylation des histones suite à l'infection,

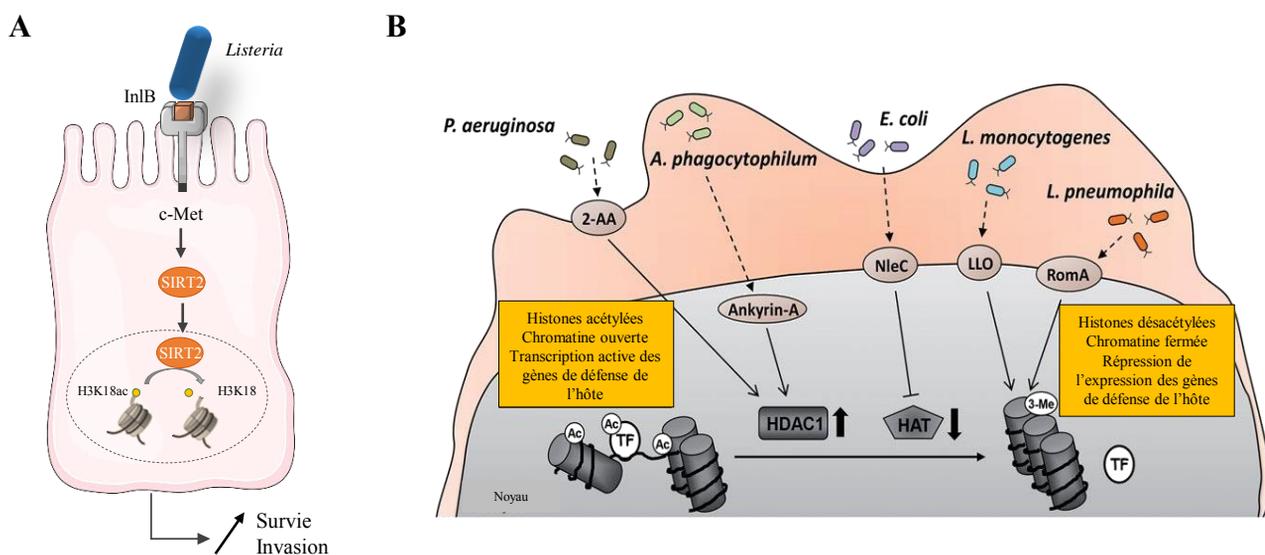


Figure 24 : Modulation des niveaux d'acétylation des histones lors d'une infection bactérienne.

A- *Listeria monocytogenes* est capable d'activer le récepteur c-Met présent à la surface des cellules épithéliales ce qui déclenche une cascade de signalisation aboutissant à la translocation nucléaire de la sirtuine 2 (Sirt2). Une fois dans le noyau, Sirt2 désacétyle H3K18 ce qui régule négativement l'expression de gènes de l'immunité et favorise la survie et l'invasion de la bactérie (adapté de Eskandarian et al., 2013). **B-** La molécule effectrice RomA produite par *Legionella pneumophila* bloque l'acétylation de H3K14 en induisant sa triméthylation. *Anaplasma phagocytophilum* induit la sur-expression de HDAC1 et produit l'ankyrin-A, qui *via* sa fixation à l'ADN, recrute HDAC1 au niveau des promoteurs des gènes. *Pseudomonas aeruginosa* produit une molécule de quorum sensing, le 2-aminoacétophénone, qui induit la sur-expression de HDAC1 dans les cellules hôtes. L'ensemble de ces modifications entraîne une hypoacétylation et une condensation de la chromatine qui se traduisent par une répression de l'expression des gènes de l'immunité (d'après Grabiec et Potempa, 2018).

respectivement, de monocytes ou de cellules épithéliales gastriques, en favorisant notamment la formation de complexes contenant des histones désacétylases (HDAC) (Grabiec and Potempa, 2018). Toutefois, le mécanisme de régulation bactérien de l'acétylation des histones le mieux décrit est celui utilisé par le pathogène intracellulaire *Listeria monocytogenes* qui, *via* sa protéine de surface InlB, active le récepteur cellulaire c-Met. Cette interaction déclenche une cascade de signalisation aboutissant à la translocation nucléaire de la sirtuine 2 (SIRT2). Au cours de l'infection par *Listeria monocytogenes*, la sérine 25 de SIRT2 subit une déphosphorylation, permettant son association à la chromatine (Pereira et al., 2018). Recrutée au niveau de régions promotrices, SIRT2 entraîne la désacétylation de H3K18 régulant ainsi négativement l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire favorisant à terme la survie et la multiplication de *Listeria* (Eskandarian et al., 2013) (**Figure 24A**). De plus, *L. monocytogenes* est capable de déphosphoryler la sérine 10 de l'histone H3 de façon dépendante de la formation de pores à efflux K⁺ induits par la Listeriolysine O. Ces modifications épigénétiques ont été associées à la diminution d'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires par la cellule hôte (Hamon and Cossart, 2011; Hamon et al., 2007). Autre exemple bien décrit, celui de *Legionella pneumophila* qui, *via* sa molécule effectrice RomA, cause la triméthylation de H3K14 bloquant ainsi l'acétylation de ce résidu (**Figure 24B**). Cette hypoacétylation inhibe l'expression de gènes de l'immunité innée tels que *TLR5* et *IL6* (codant l'interleukine-6) ce qui limite la réponse inflammatoire et favorise la persistance de l'agent pathogène dans la cellule hôte (Rolando et al., 2013, 2015).

Les objectifs principaux de cet axe de recherche sont de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de l'infection bactérienne par les bactéries AIEC, d'identifier les marques épigénétiques modifiées spécifiquement par ces dernières, ainsi que les gènes dérégulés au cours de l'infection afin de proposer de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la présence d'AIEC chez les patients.

Résultats préliminaires

Afin de déterminer si la souche AIEC de référence LF82 est capable de moduler les marques épigénétiques, comme décrit pour d'autres bactéries pathogènes, des cellules épithéliales intestinales (CEIs) Caco-2 ont été infectées durant différents temps afin d'étudier la marque permissive H3K9ac, associée à une transcription active, par western blot et immunofluorescence. Une augmentation importante de l'accumulation de H3K9ac,

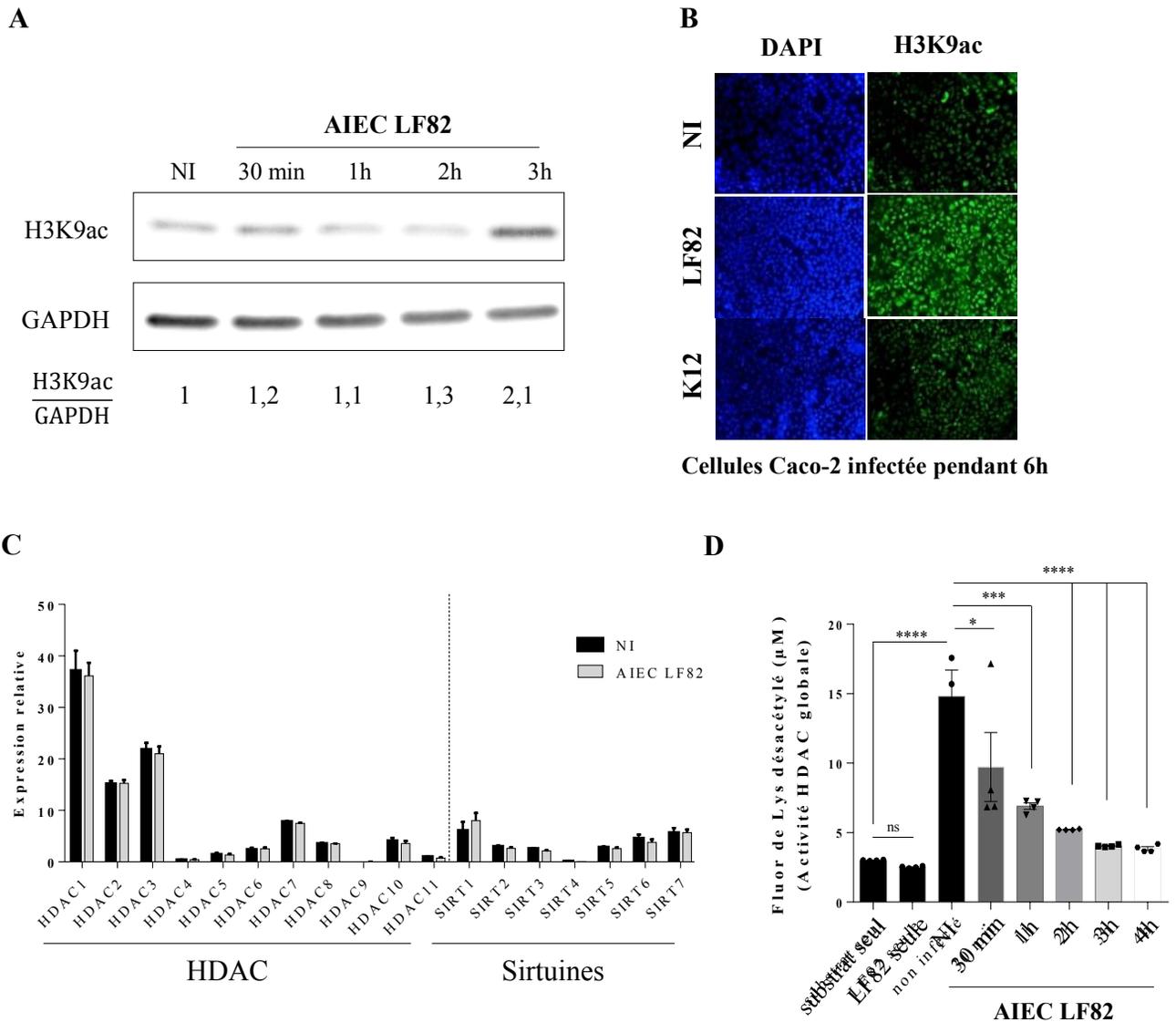


Figure 25 : Effet de la souche AIEC LF82 sur la marque H3K9ac et sur l'expression des HDAC dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2.

Les cellules Caco-2 ont été infectées par la souche AIEC LF82 à une multiplicité d'infection de 100 bactéries par cellules pendant différents temps. **A-** Western blot H3K9ac et GAPDH (contrôle de charge). **B-** Immunofluorescence H3K9ac après 6h d'infection. **C-** Niveau d'expression des HDAC et des sirtuines en conditions non infecté (NI) et suite à l'infection par la souche AIEC LF82, mesuré par ARN-seq. **D-** Mesure de l'activité HDAC totale au cours de l'infection. *:p<0,05; **:p<0,01, ***:p<0,001, ANOVA.

comparativement à la condition contrôle non infecté (NI), a été observée à 3h post-infection (**Figure 25A-B**).

Les niveaux d'acétylation du génome étant finement régulés par l'expression et l'activité des HDAC, l'expression de ces dernières en réponse à l'infection par la souche AIEC LF82 a été étudiée par analyse transcriptomique (ARNseq). Aucune variation d'expression des 11 HDAC classiques et des 7 sirtuines n'a été observée en réponse à l'infection (**Figure 25C**). De plus, les HDAC étant des enzymes, il est important d'évaluer leur activité. Dès 30 min d'infection des cellules Caco-2 par la souche AIEC LF82, une diminution significative de l'activité HDAC globale a été observée comparativement à la condition contrôle non infecté, cette diminution s'accroissant fortement au cours de l'infection jusqu'à atteindre une diminution d'un facteur 4 à 4h post-infection (**Figure 25D**). Ces résultats montrent que l'infection des cellules Caco-2 par la souche AIEC LF82 entraîne une diminution de l'activité HDAC globale des cellules, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'acétylation de H3K9 observée en contexte infectieux.

Projet de recherche

1- Identification des marques épigénétiques spécifiquement altérées au cours de l'infection par les bactéries AIEC

Des cellules épithéliales intestinales Caco-2, T84 et HT29 seront infectées par différentes souches AIEC et non AIEC isolées de patients atteints de MC. Une approche par spectrométrie de masse sera utilisée afin d'identifier les marques épigénétiques modifiées. Cette étude sans *a priori* devrait permettre de couvrir la totalité des modifications post-traductionnelles connues à ce jour. En effet, de nouvelles modifications des histones sont régulièrement identifiées, telles que la crotonylation, la sérotonylation et la lactylation (Farrelly et al., 2019; Fellows et al., 2018; Zhang et al., 2019), rendant l'étude de la régulation de l'expression des gènes de plus en plus complexe. Cette étude de caractérisation des profils de modifications post-traductionnelles des histones sera réalisée en prestation de service. Une fois une série de marques identifiées comme modulées spécifiquement au cours de l'infection par les bactéries AIEC, celles-ci seront confirmées par des techniques de western blot et d'immunofluorescence. De plus, une approche de ChIP-seq sera utilisée pour localiser précisément les modifications induites par les bactéries AIEC à l'échelle du génome. Une validation *in vivo* sera réalisée dans le modèle Villin-CEACAM6 décrit précédemment. Les animaux seront infectés par les différentes souches AIEC identifiées comme colonisant

fortement la muqueuse iléale des animaux et les marques identifiées par spectrométrie de masse seront analysées sur entérocytes purifiés par cytométrie en flux. Cette partie du projet de recherche devrait donc permettre d'identifier des marques épigénétiques spécifiquement modulées par les bactéries AIEC.

2- Identification de la signature transcriptomique induite par les bactéries AIEC : recherche de biomarqueurs prédictifs

Les résultats préliminaires ont montré que l'infection par les AIEC modulait certaines marques épigénétiques de la cellule hôte. Les modifications post-traductionnelles des histones étant fortement impliquées dans la régulation du niveau de compaction de la chromatine, il est fort probable que les bactéries AIEC modulent l'expression des gènes de la cellule hôte. Une approche RNA-seq sera utilisée afin d'identifier les gènes spécifiquement dérégulés par les bactéries AIEC, comparativement à des souches d'*E. coli* non AIEC. Ceci sera réalisé dans un premier temps dans des modèles de cellules en culture et sera confirmé dans le modèle *in vivo* Villin-CEACAM6. Ce travail devrait permettre d'identifier des gènes comme spécifiquement induits/réprimés au cours de l'infection par les bactéries AIEC.

3- Confirmation des biomarqueurs sur tissus de patients atteints de MC

Le laboratoire M2iSH est impliqué, depuis plusieurs années, dans la mise en place d'une bio-banque de tissus iléaux de patients atteints de MC. Cette bio-banque est gérée par le groupe REMIND (Groupe de REcherche sur les Maladies Inflammatoires Digestives) qui inclut des patients dans une dizaine de centres hospitaliers en France. Les patients porteurs de bactéries AIEC ont été identifiés et des tissus ont été inclus en paraffine permettant de réaliser des marquages immunohistochimiques. Les deux objectifs précédents auront identifiés des marques épigénétiques comme modulées et des gènes comme étant dérégulés par les bactéries AIEC. L'accumulation des marques candidates et des protéines codées par les gènes dérégulés seront recherchées sur les tissus de patients issus de la cohorte REMIND par immunohistochimie. La cohorte étant composée de patients porteurs d'AIEC et de patients non-porteurs, nous chercherons à déterminer quelle combinaison de biomarqueurs est la plus prédictive de la présence de bactéries AIEC associées au tissu.

4- Identification des facteurs de virulence bactériens responsables des modulations épigénétiques identifiées

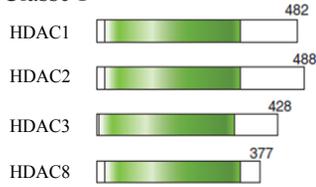
Les facteurs de virulence des bactéries AIEC impliqués dans les mécanismes de modulation des marques épigénétiques ne sont pas connus à ce jour. Les souches AIEC possèdent différents moyen d'injecter des effecteurs dans la cellule hôte. Ces bactéries sécrètent des vésicules de membranes externes (OMVs, Outer Membrane Vesicles) et codent pour des systèmes de sécrétions tel que le système de sécrétion de type 6 (Boysen et al., 2015; Miquel et al., 2010; Rolhion et al., 2010). Ces mécanismes, et d'autres non encore identifiés pourraient participer à la modification des marques épigénétiques de l'hôte. Afin d'identifier les gènes importants pour la modulation de l'épigénome de l'hôte, une banque d'insertion du transposon *Tn5* sera créée dans la souche AIEC LF82. Environ 5000 clones présentant un site d'insertion unique du transposon seront repiqués puis testés pour leur capacité à moduler les marques histones. Pour cela, des cellules Caco-2 seront cultivées en plaques 96 puits et seront infectées par les différents mutants d'insertion. La modification post-traductionnelle identifiée comme modifiée par les bactéries AIEC (au début de ce projet) sera utilisée pour le crible des mutants. Un marquage immunofluorescent sera réalisé pour quantifier la marque dans chacun des puits suite à l'infection par les différents mutants. Les mutants ayant perdu leur capacité à moduler la marque étudiée seront plus amplement analysés. Le site d'insertion du transposon sera localisé par séquençage afin d'identifier le/les gène(s) invalidé(s) par l'insertion du transposon ce qui permettra d'identifier les gènes potentiellement responsables du phénotype étudié.

L'ensemble de ce projet de recherche devrait permettre de proposer de nouveaux marqueurs prédictifs de la présence de bactéries AIEC chez les patients atteints de MC afin de stratifier les patients pour leur proposer le traitement le plus adapté à leur pathologie. De plus, cette étude devrait permettre d'identifier un ou plusieurs nouveaux facteurs de virulence chez la souche AIEC LF82, lui permettant de manipuler le génome de l'hôte (nucléomoduline). Si tel est le cas, ceci pourrait permettre de proposer une nouvelle protéine bactérienne qui pourrait être la cible de molécules d'anti-virulence.

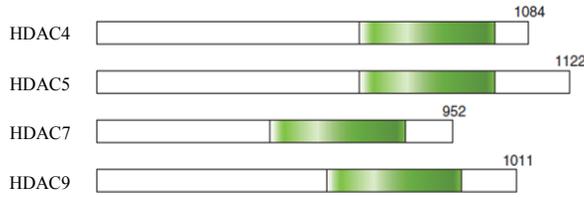
HDAC classiques (famille des histones déacétylases)

Sirtuines (famille Sir2 régulateur)

Classe I



Classe IIa



Classe IIb



Classe IV



Classe III

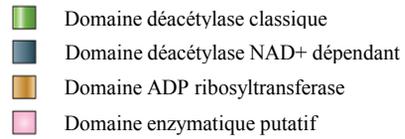
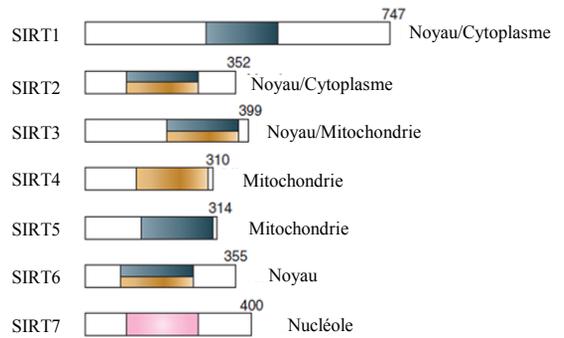


Figure 26 : Représentation schématique des différentes classes de HDAC.

Les HDAC existent au nombre de 18 chez l'Homme et sont organisées en 4 classes : la classe I, II et IV présentent des similarités de séquence et leur activité enzymatique est dépendante du Zn^{2+} tandis que les sirtuines, classe III des HDAC, ont une activité enzymatique dépendante du NAD^+ (d'après Seto and Yoshida, 2014).

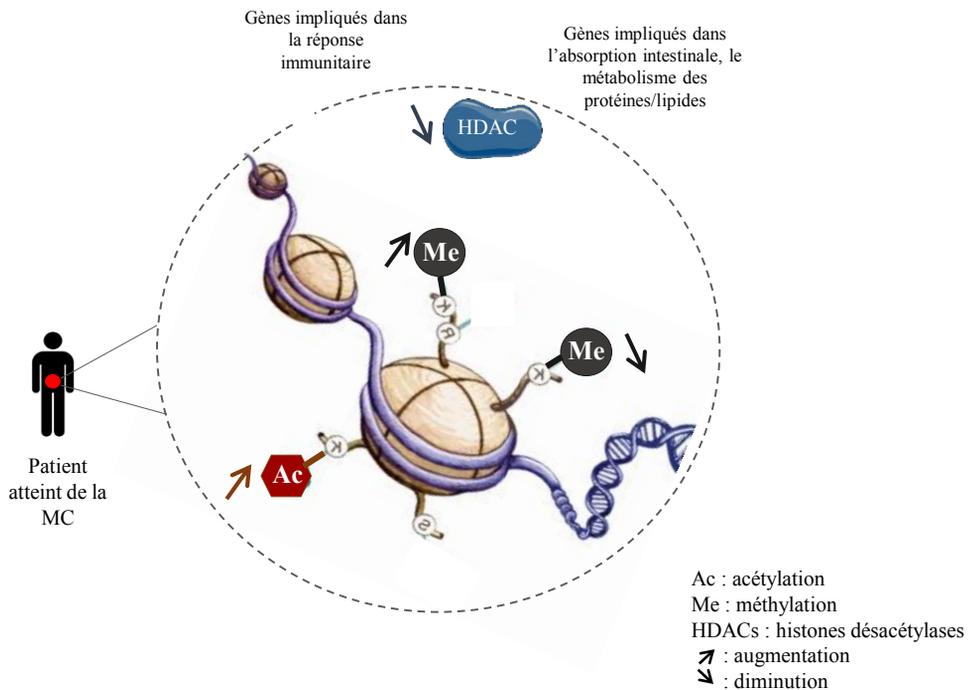


Figure 27 : Représentation schématique des altérations de l'épigénome chez les patients atteints de la MC. Chez les patients, des gènes présentant un enrichissement ou un appauvrissement en la marque permissive H3K4me3 ont été détectés. Un niveau d'acétylation global plus important de l'histone H4 a également été constaté dans des biopsies de patients enflammées tout comme une diminution de l'expression de la plupart des HDAC.

4- Étude du rôle des histones désacétylases de l'hôte dans la virulence des bactéries AIEC et dans la réponse de l'hôte à l'infection

Contexte de l'étude

Chez l'Homme, 18 histones désacétylases (HDACs) différentes ont été identifiées sur la base d'analyses phylogénétiques et d'homologies de séquence avec des protéines de levures. Elles sont regroupées dans 4 classes distinctes (classe I à IV) (Seto and Yoshida, 2014) (**Figure 26**). Les HDAC ont des rôles clés dans l'immunité innée, en modulant les voies de signalisation des Toll-like receptors (TLR) et de l'interféron, et dans l'immunité adaptative en modulant les voies de présentation des antigènes, le développement et la polarisation des lymphocytes (Shakespeare et al., 2011).

Certaines altérations de l'épigénome ont été observées chez les patients atteints de la MC (**Figure 27**). En effet, l'étude des modifications post-traductionnelles des histones a mis en évidence une signature particulière H3K4me3 (marque permissive) dans des cellules épithéliales intestinales isolées de l'iléon terminal de patients nouvellement diagnostiqués (Kelly et al., 2018). Les gènes présentant un enrichissement en cette marque permissive ont été identifiés comme impliqués dans la réponse immunitaire de la cellule face à des facteurs bactériens tandis que les gènes présentant un appauvrissement en cette marque sont principalement impliqués dans l'absorption intestinale et le métabolisme des protéines et des lipides. Un niveau d'acétylation global significativement plus élevé de l'histone H4 a également été observé dans des biopsies enflammées et des plaques de Peyer de patients atteints de la MC comparativement à des tissus contrôles issus d'individus sains et des tissus contrôles non enflammés issus de patients, les résidus lysine 8 et 12 étant ceux présentant l'acétylation la plus forte (Tsaprouni et al., 2011). Cela suggère une association entre acétylation des histones et inflammation *in vivo*. Enfin, une diminution globale de l'expression de 8 HDAC classiques (sur 11) a été observée dans des cellules épithéliales intestinales (CEIs) isolées de biopsies coliques de patients en situation de poussées inflammatoires comparativement à des sujets sains (Friedrich et al., 2019). Ces variations d'expression pourraient expliquer les modifications d'acétylation observées au niveau intestinal chez les patients. De plus, elles pourraient être dues aux bactéries du microbiote intestinal puisqu'il est connu que certaines bactéries ont la capacité de réguler les modifications épigénétiques de l'hôte *via* la synthèse de métabolites actifs sur les enzymes impliquées dans la régulation des marques d'acylation des histones (Bhat and Kapila, 2017; Ye et al., 2017).

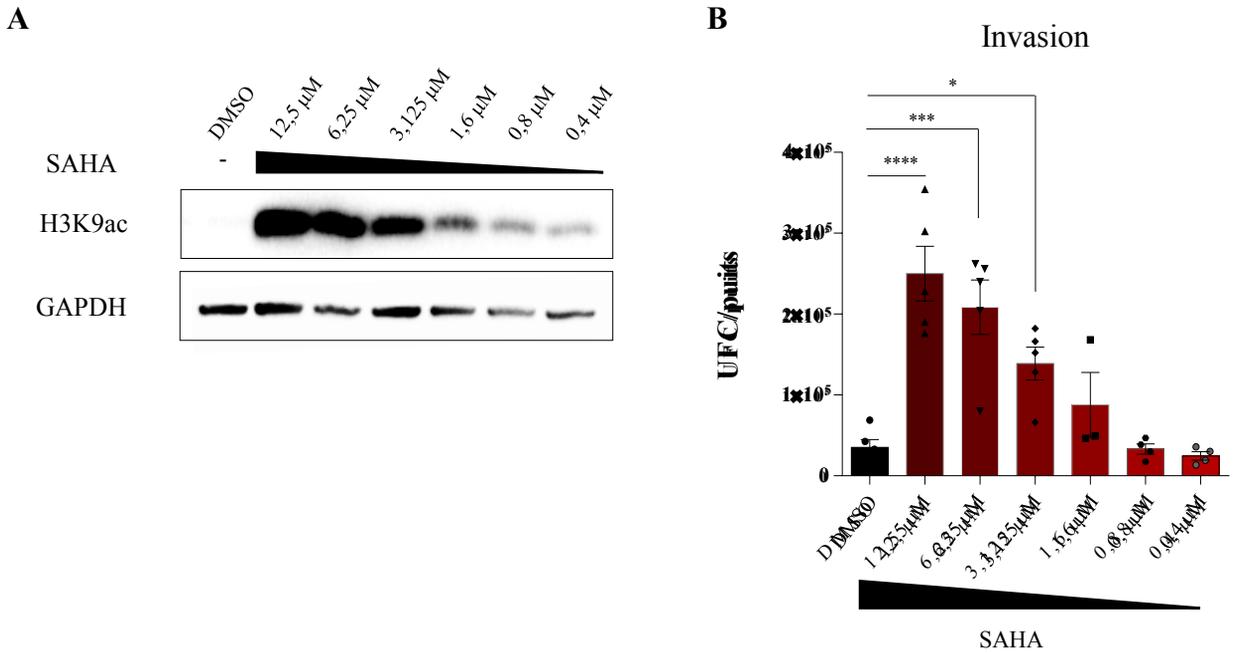


Figure 28 : Effet de l'inhibition des HDAC sur la capacité d'invasion des AIEC.

Les cellules Caco-2 ont été traitées par différentes concentrations de SAHA (inhibiteur pan-HDAC) pendant 24h. **A-** Western blot H3K9ac réalisé à partir d'extraits protéiques des cellules traitées. **B-** Capacité d'invasion de la souche AIEC LF82, déterminée par un test de protection à la gentamicine, suite au traitement des cellules par différentes concentrations de SAHA.

*:p<0,05; **:p<0,01, ***:p<0,001, ANOVA.

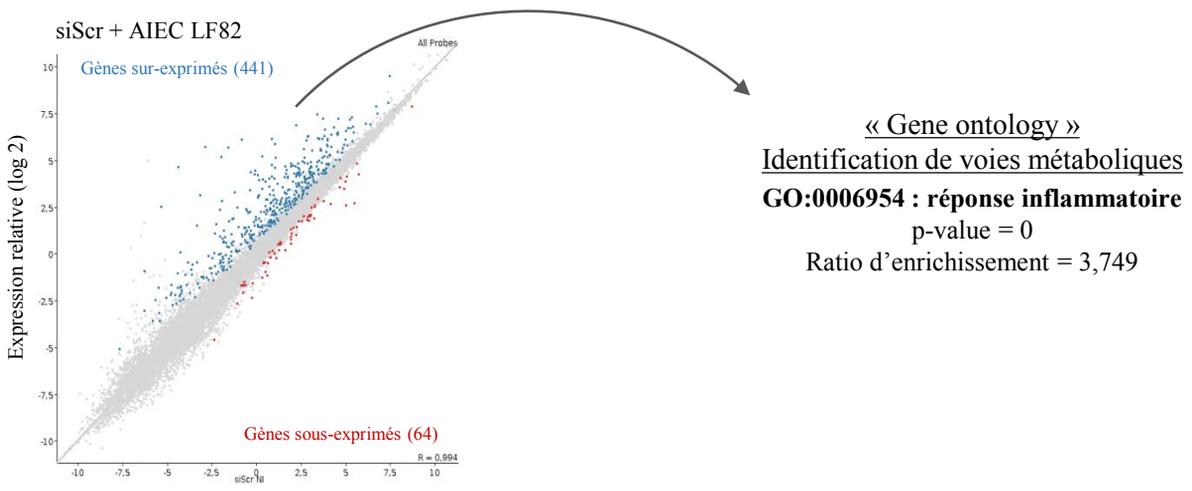
Ainsi, des modifications épigénétiques telles que des modulations des niveaux d'acétylation de certaines histones tout comme des diminutions d'expression des HDAC ont été démontrées chez les patients atteints de MC. Toutefois, à ce jour, les mécanismes moléculaires menant à une colonisation augmentée de la muqueuse intestinale par les bactéries pathobiontes AIEC chez les patients atteints de la MC n'ont pas été clairement identifiés.

Résultats préliminaires

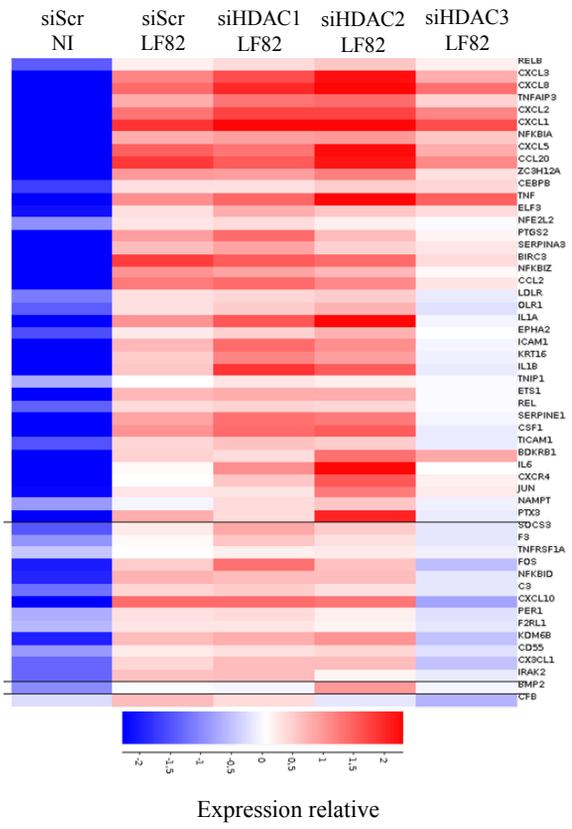
La forte diminution de l'activité des HDAC induite par la souche AIEC LF82 suggère un rôle central de ces enzymes dans le processus d'adhésion et/ou d'invasion des CEIs par les AIEC (**Figure 25D**). Un inhibiteur global des HDAC, le SAHA, a été utilisé afin de déterminer le rôle des HDAC au cours de l'infection. Des cellules Caco-2 pré-traitées avec l'inhibiteur ou le DMSO durant 24h ont été infectées par la souche AIEC LF82. L'accumulation importante de la marque H3K9Ac de façon dose-dépendante valide l'effet de l'inhibiteur (**Figure 28A**). La mesure du pouvoir invasif de la souche AIEC LF82 sur les cellules Caco-2 montre que la bactérie envahit plus efficacement les cellules, de manière significative et dose-dépendante lorsqu'elles ont été pré-traitées avec les plus fortes doses de SAHA comparativement à la condition contrôle DMSO (**Figure 28B**). Ces résultats montrent que l'activité HDAC des CEIs permet de limiter l'invasion cellulaire par la souche AIEC LF82.

Une analyse transcriptomique des cellules Caco-2 transfectées par différents siARN ciblant les ARNm HDAC 1, 2 et 3 et infectées par la souche AIEC LF82 a été réalisée afin d'identifier le rôle des HDAC au cours de l'infection. Cette analyse a révélé la sur-expression significative de 441 gènes suite à l'infection des cellules tandis que 64 gènes ont vu leur expression significativement réprimée (siScramble NI (Non Infecté) vs siScr + LF82) (**Figure 29A**). Suite à une analyse de « Gene Ontology », 55 des gènes significativement sur-exprimés ont été identifiés comme étant impliqués dans la réponse inflammatoire, la majorité étant des médiateurs pro-inflammatoires. Afin de mieux comprendre la fonction des HDAC lors de l'infection, une « Heatmap » représentant l'expression relative de ces 55 gènes dans les différentes conditions d'infection (siScr vs siHDAC1/siHDAC2/siHDAC3) a ensuite été réalisée (**Figure 29B**). Ces résultats ont permis de mettre en évidence le rôle des différentes HDAC dans la régulation des gènes de l'inflammation en réponse à l'infection. En effet, il a été observé que de nombreux gènes induits par la souche AIEC LF82 étaient exprimés de façon plus importante dans un contexte de cellules déficientes pour HDAC1 ou HDAC2. À titre d'exemple, en contexte infectieux, *CXCL8* et *TNF*, deux gènes codant pour des cytokines clés

A



B



C

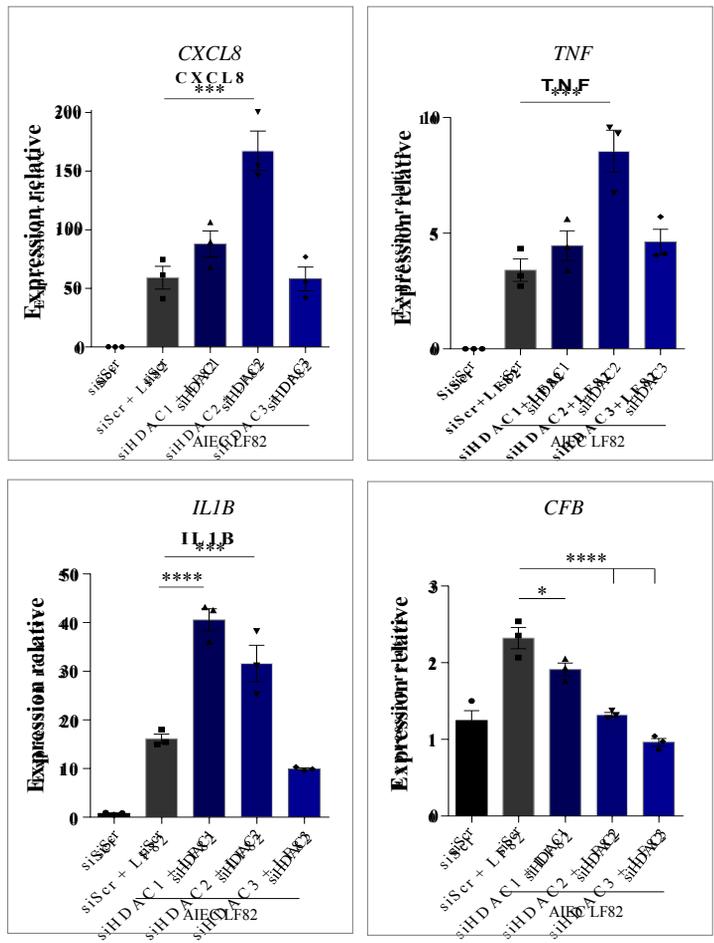


Figure 29 : Rôle des HDAC de classe 1 dans la réponse inflammatoire au cours de l'infection par la souche AIEC LF82.

A- Analyse transcriptomique (ARN-seq) de cellules infectées par la souche AIEC LF82. Analyse statistique DeSeq2 ($p < 0,05$). Bleu : gènes sur-exprimés en condition d'infection, rouge : gènes sous-exprimés en condition d'infection. Résultats de l'analyse « Gene ontology » réalisée sur les gènes induits au cours de l'infection. B- « Heatmap » des gènes inflammatoires induits par l'infection dans les conditions déficitaires pour les différentes HDAC de classe 1 (cellules transfectées avec différents siARN). C- Quantification de l'expression de 4 gènes représentatifs. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$, ANOVA.

dans la MC, sont significativement plus exprimés suite à l'inhibition de HDAC2 comparativement à la condition siScr + LF82 (**Figure 29C**). Un autre exemple concerne le gène IL1B codant pour la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β , impliquée dans l'altération de la fonction barrière de l'intestin chez les patients. Son expression, induite en contexte infectieux, est encore plus importante quand l'expression de HDAC1 et HDAC2 est réprimée. Au contraire, la « Heatmap » démontre clairement que diminuer l'expression de HDAC3 permet de contrôler la réponse inflammatoire suite à l'infection (colonne siHDAC3 + LF82) (**Figure 29B-C**). Ces résultats démontrent qu'au cours d'une infection par la souche AIEC LF82, HDAC1 et HDAC2 limiteraient l'expression de gènes pro-inflammatoires tandis que HDAC3 favoriserait leur expression, faisant de HDAC3 une cible thérapeutique potentiellement intéressante pour limiter l'inflammation induite par les bactéries AIEC.

Ces résultats ont été obtenus au cours du travail de Master 2 de Mélissa Chervy que j'ai encadré sur la période Janvier-Juin 2019. Suite à ce Master 2, Mélissa Chervy a obtenu un financement de thèse de la Fondation pour la Recherche Médicale afin de continuer ce projet, sous ma direction.

Projet de recherche

1- Identifier les HDAC humaines et leurs gènes cibles impliqués dans le processus d'invasion des bactéries AIEC

Les données préliminaires obtenues par une étudiante de Master 2 que j'ai supervisé ont montré que l'inhibition de l'activité des HDAC dans les CEIs Caco-2, en utilisant l'inhibiteur de pan-HDAC SAHA, conduit à une augmentation de la capacité invasive de la souche AIEC LF82 de 7,1 fois (**Figure 28B**). Ces données montrent clairement que les bactéries AIEC pourraient tirer profit d'une activité HDAC altérée pour entrer dans les CEI. Cependant, les mécanismes impliqués dans ce phénotype ne sont pas encore connus. Notre hypothèse est que l'inhibition des HDAC entraîne une réponse transcriptomique altérée suite au remodelage de la chromatine, permettant ainsi l'expression de gènes importants pour l'invasion par les bactéries AIEC. Cibler les HDAC pour traiter les patients atteints de MC ne semble pas être une stratégie viable dans le sens où les HDAC régulent l'expression de nombreux gènes et une telle thérapie pourrait entraîner de profonds effets secondaires. C'est la raison pour laquelle nous allons concentrer notre étude sur les gènes cibles des HDAC, qui pourraient représenter des cibles thérapeutiques plus prometteuses dans le traitement de la MC.

Afin d'identifier les HDAC responsables du phénotype observé suite au traitement avec le SAHA, l'expression de chacune des HDAC sera individuellement diminuée à l'aide de

siARN. La capacité d'invasion de la souche AIEC LF82 sera mesurée. La/Les HDAC identifiée(s) comme limitant l'invasion feront l'objet d'études plus approfondies. Les HDAC d'intérêts seront alors sur-exprimées en cellules épithéliales intestinales (CEIs) afin de confirmer leur rôle dans l'invasion bactérienne. Afin d'identifier les gènes régulés par ces HDAC qui sont importants pour limiter l'invasion bactérienne, une approche transcriptomique par ARN-seq sera réalisée. Les gènes dérégulés suite au traitement siARN seront étudiés par « Gene ontology ». L'expression des gènes identifiés (cibles des HDAC et potentiellement impliqués dans l'invasion par les bactéries AIEC) dans les CEIs Caco-2 sera diminuée par une approche siARN ou augmentée à l'aide de plasmides d'expression et des tests d'invasion seront réalisés à l'aide de différentes souches AIEC, confirmant ainsi l'implication de ces gènes dans le processus d'invasion des AIEC. Cette approche devrait permettre d'identifier des gènes de l'hôte, régulés par les HDAC, comme impliqués dans le contrôle de l'invasion par les AIEC dans des conditions non pathologiques. Ces gènes pourraient représenter des cibles thérapeutiques intéressantes pour limiter l'invasion des bactéries AIEC dans les CEIs.

2- *Validation in vivo*

Les souris Villin-CEACAM6 traitées ou non traitées par un inhibiteur de HDAC seront infectées par des souches AIEC et la colonisation bactérienne sera suivie quotidiennement dans les selles et les bactéries AIEC associées aux muqueuses seront dénombrées au moment du sacrifice (6 jours après l'infection ou plus). De plus, les effets de l'inhibiteur des HDAC sur des paramètres intestinaux importants tels que la sécrétion et l'épaisseur de mucus, la composition du microbiote et la sécrétion de cytokines seront étudiés. Toutes ces données devraient permettre de mieux comprendre en quoi la susceptibilité de l'hôte (ici, les défauts de l'activité HDAC) peut favoriser la colonisation intestinale par les bactéries AIEC et quels sont les gènes les plus importants pour la colonisation par les AIEC (expression augmentée ou diminuée). En fonction des gènes identifiés, ces gènes seront inhibés *in vivo* en utilisant des inhibiteurs, si disponibles, ou des souris KO conditionnelles dans les cellules épithéliales seront utilisées afin de valider le rôle de ces gènes dans la colonisation intestinale par les AIEC. Le but de ce travail est d'utiliser les inhibiteurs des HDAC comme un outil permettant d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin de prévenir la colonisation par les bactéries AIEC chez les patients atteints de MC.

3- Validation de la relation existante entre les HDAC, l'expression de gènes candidats, et la colonisation intestinale par les AIEC

Les expériences décrites ci-dessus devraient identifier les HDAC et leurs gènes cibles impliqués dans le contrôle de l'invasion des CEIs par les AIEC. Pour confirmer ces observations sur des échantillons humains, les expressions des HDAC et des gènes candidats seront analysées sur des biopsies iléales de patients atteints de MC par des techniques d'immunohistochimie, par RT-qPCR et par western blot. Nous utiliserons la bio-banque existante créée par le groupe REMIND qui comprend au moins 150 patients pour lesquels le statut AIEC a été préalablement déterminé et les données cliniques disponibles. Les corrélations entre la présence d'AIEC sur la biopsie et le niveau d'expression des gènes candidats seront étudiées sur toutes les biopsies de la cohorte.

Les travaux proposés dans cet axe ont pour objectif majeur de décortiquer les mécanismes moléculaires favorisant l'invasion des CEIs par les bactéries AIEC afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour proposer de nouvelles thérapies ciblées aux patients porteurs de ces bactéries. D'un point de vue plus fondamental, ce travail devrait permettre de mettre en évidence de nouveaux mécanismes impliqués dans l'entrée de bactéries invasives dans les CEIs, mécanismes qui pourraient potentiellement être partagés par d'autres bactéries invasives.

5- Effet du mode de vie occidental sur la modulation épigénétique de l'expression des gènes et sur la susceptibilité des patients à héberger des bactéries pathobiontes.

Contexte de l'étude

Nos données préliminaires montrent clairement que l'activité HDAC est nécessaire pour limiter l'entrée des bactéries AIEC dans la cellule hôte. Il a été démontré que de nombreux facteurs environnementaux augmentaient le risque de développer la MC et que certains facilitaient la colonisation intestinale par AIEC (Chassaing et al., 2015; Martinez-Medina et al., 2014). Notre hypothèse est que certains des facteurs environnementaux associés à un risque augmenté de développer la MC pourraient diminuer l'activité des HDAC dans l'intestin, facilitant ainsi la colonisation par les bactéries AIEC. Cependant, les facteurs environnementaux participant à la régulation de l'activité de ces enzymes *in vivo* ne sont pas clairement identifiés à ce jour.

1- Quel est l'effet du régime HF / HS, des antibiotiques et des émulsifiants sur l'activité des HDAC?

Étant donné que les émulsifiants, les antibiotiques et le régime alimentaire riche en graisses et en sucres (HF/HS : high fat/high sugar) sont des facteurs environnementaux connus pour favoriser la colonisation intestinale par les bactéries AIEC dans différents modèles murins, nous proposons que ces facteurs pourraient moduler l'activité/l'expression des HDAC et, par conséquent favoriser l'implantation des bactéries AIEC (Agus et al., 2016; Chassaing et al., 2015; Martinez-Medina et al., 2014). Une étude de Fellows et al., à laquelle j'ai activement participé, a mis en évidence l'effet des antibiotiques sur l'expression de HDAC2 chez la souris (Fellows et al., 2018). Ces données montrent que les antibiotiques peuvent profondément moduler l'expression de HDAC2 et l'expression de ses gènes cibles dans l'intestin. À ce jour, aucune donnée n'a été rapportée concernant l'effet d'un régime HF/HS et des émulsifiants sur l'expression et l'activité des HDAC. Des souris sauvages seront exposées de manière chronique à différents antibiotiques couramment utilisés, ou à un régime HF/HS ou à des émulsifiants tels que le CMC et le P80. L'activité globale des HDAC sera quantifiée dans les entérocytes intestinaux purifiés par FACS et l'expression de chaque HDAC sera déterminée dans les tissus intestinaux par western blot et par immunohistochimie (IHC). Enfin, les niveaux d'expression des gènes cibles des HDAC et importants dans l'invasion par les bactéries AIEC, seront

mesurés par RT-qPCR, western blot et IHC. Ces travaux devraient mettre en évidence l'effet des facteurs environnementaux sur l'expression des gènes de l'hôte, par le biais de la modulation des HDAC, et devraient permettre de mieux comprendre comment les facteurs environnementaux contribuent à favoriser la colonisation par les bactéries AIEC dans les pays développés.

2- L'effet observé dépend-il du microbiote intestinal?

Les antibiotiques, le régime HF/HS et les émulsifiants sont connus pour modifier radicalement la composition du microbiote intestinal. L'implication du microbiote dans la régulation de l'activité des HDAC sera étudiée. Une transplantation de microbiote sera réalisée à partir de souris traitées (par des antibiotiques ou recevant le régime HF/HS ou bien des émulsifiants) vers des souris axéniques receveuses. L'expression et l'activité des HDAC dans les CEI des souris receveuses seront analysées. Dans le cas où l'activité des HDAC est modifiée par un effet dépendant du microbiote, le phénotype devrait être transférable par le microbiote à la souris receveuse. Dans le cas où le phénotype n'est pas transférable par le microbiote, les souris axéniques seront traitées avec des antibiotiques, un régime HF/HS ou des émulsifiants afin de déterminer les effets de ces traitements sur l'activité des HDAC et l'expression des gènes cibles dans un contexte dépourvu de microbiote. Cela montrerait également que les antibiotiques, le régime alimentaire occidental et/ou les additifs alimentaires régulent directement l'activité des HDAC, indépendamment du microbiote.

Ce dernier axe de recherche proposé ici devrait permettre de mieux comprendre en quoi le mode de vie occidental est associé à un risque élevé d'être colonisé par les bactéries AIEC et à développer une maladie de Crohn.

Pour conclure, les travaux de recherche que je propose de développer visent à mieux comprendre les mécanismes moléculaires d'interaction entre les bactéries AIEC de façon à identifier des biomarqueurs prédictifs de la présence de bactéries AIEC et de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter les patients atteints de MC. Pour cela, de nombreux modèles d'étude seront utilisés tels que des lignées de cellules épithéliales intestinales, des modèles d'organoïdes intestinaux infectés ou non, des modèles *in vivo* (souris transgéniques Villin-CEACAM6 et autres)... Enfin, des cohortes de patients atteints de MC disponibles au laboratoire vont permettre de valider les résultats obtenus.

Financement des travaux de recherche

Contrats de Recherche obtenus

2016 : Programme « Nouveau chercheur région Auvergne », 100 000€.

« Analyse des marques épigénétiques des cellules intestinales en réponse à un régime occidental et à une infection par les bactéries AIEC ».

Ce financement a permis de financer la thèse d'Elodie Gimier, que j'ai co-encadré avec le Pr. Nicolas Barnich, ainsi que du fonctionnement pour réaliser les manipulations.

2018 : AAP CAP20-25, I-site Clermont, Challenge 3, 30 000€.

« Identification de biomarqueurs prédictifs de la présence de bactéries AIEC associées à la muqueuse iléale de patients atteints de maladie de Crohn ».

Ce financement a permis de réaliser des analyses transcriptomiques et d'acheter des réactifs lors du stage de Master 2 de Mélissa Chervy que j'ai encadré.

Financement en attente de résultat : **ANR JCJC: HTagCrohn** "Identification of Histone deacetylases TArGet genes as involved in intestinal colonization by pathobionts in CROHN's disease patients"

Collaborations en cours

Dr Catherine Texier/ Dr. Jean-Luc Bailly: « *Mise au point des modèles d'organoïdes intestinaux pour l'étude des relations hôte-pathogènes : infection virale, bactérienne et parasitaire* ». Cette collaboration en cours, entre 3 équipes de recherches du site clermontois, fait actuellement l'objet de demandes de financements et vise à mettre en place le modèle d'organoïdes intestinaux et d'organoïdes intestinaux inversés afin d'étudier les mécanismes d'invasion de différents pathogènes (Microsporidies, Enterovirus et bactéries AIEC). À ce jour, la technique de culture des organoïdes est maîtrisée au laboratoire. Les infections et les marquages immunofluorescents sont en cours de mise au point.

Dr. Emmanuelle Lainé U454 INRA-MEDIS : « *Étude de l'effet anti-inflammatoire du Baobab dans un modèle de colite induite au DSS* ». Le Dr. Emmanuelle Lainé est une spécialiste de la formulation de molécules pharmaceutiques à potentiel anti-inflammatoire. Dans le cadre d'une étude sur le Baobab, elle a cherché à connaître l'effet anti-inflammatoire de ce composé, *in vivo*. Les résultats préliminaires, non publiés, sont très encourageants.

Dr. Ayhan Kocer : « *Effet de l'infection par les bactéries AIEC sur les marques de méthylation de l'ADN* ». Ce projet de recherche vise à déterminer si les bactéries AIEC sont capables de moduler les niveaux de méthylation de l'ADN ou de moduler des intermédiaires impliqués dans le processus de déméthylation active de l'ADN (hydroxyméthylcytosine, carboxyméthylcytosine...). Le Dr. Ayhan Kocer apporte son expertise dans la mise en place des marques de méthylation de l'ADN à ce projet. Ce projet, non détaillé dans ce rapport, n'en est qu'à ses prémices. Des résultats préliminaires devraient permettre de valider, ou non, l'intérêt de développer cet axe de recherche.

6-Références **bibliographiques**

- Agus, A., Massier, S., Darfeuille-Michaud, A., Billard, E., and Barnich, N. (2014). Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease: opening up new therapeutic strategies. *Biomed Res Int* 2014, 567929.
- Agus, A., Denizot, J., Thévenot, J., Martinez-Medina, M., Massier, S., Sauvanet, P., Bernalier-Donadille, A., Denis, S., Hofman, P., Bonnet, R., et al. (2016). Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Sci Rep* 6, 19032.
- Alhagamhmad, M.H., Day, A.S., Lemberg, D.A., and Leach, S.T. (2016). An overview of the bacterial contribution to Crohn disease pathogenesis. *Journal of Medical Microbiology* 65, 1049–1059.
- Anderson, O.S., Sant, K.E., and Dolinoy, D.C. (2012). Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J. Nutr. Biochem.* 23, 853–859.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21, 381–395.
- Barnich, N., Boudeau, J., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2003). Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol. Microbiol.* 48, 781–794.
- Barnich, N., Carvalho, F.A., Glasser, A.-L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., Peeters, H., Bommelaer, G., Desreumaux, P., Colombel, J.-F., et al. (2007). CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* 117, 1566–1574.
- Bhat, M.I., and Kapila, R. (2017). Dietary metabolites derived from gut microbiota: critical modulators of epigenetic changes in mammals. *Nutr. Rev.* 75, 374–389.
- Boudeau, J., Glasser, A.L., Masseret, E., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. (1999). Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect. Immun.* 67, 4499–4509.
- Boysen, A., Borch, J., Krogh, T.J., Hjernø, K., and Møller-Jensen, J. (2015). SILAC-based comparative analysis of pathogenic *Escherichia coli* secretomes. *J. Microbiol. Methods* 116, 66–79.
- Bringer, M.-A., Barnich, N., Glasser, A.-L., Bardot, O., and Darfeuille-Michaud, A. (2005). HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Infect. Immun.* 73, 712–721.
- Carvalho, F.A., Barnich, N., Sivignon, A., Darcha, C., Chan, C.H.F., Stanners, C.P., and Darfeuille-Michaud, A. (2009). Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J. Exp. Med.* 206, 2179–2189.
- Chan, C.H.F., and Stanners, C.P. (2004). Novel mouse model for carcinoembryonic antigen-based therapy. *Mol. Ther.* 9, 775–785.

- Chang, J., Leong, R.W., Wasinger, V.C., Ip, M., Yang, M., and Phan, T.G. (2017). Impaired Intestinal Permeability Contributes to Ongoing Bowel Symptoms in Patients With Inflammatory Bowel Disease and Mucosal Healing. *Gastroenterology* *153*, 723-731.e1.
- Chapman-Kiddell, C.A., Davies, P.S.W., Gillen, L., and Radford-Smith, G.L. (2010). Role of diet in the development of inflammatory bowel disease: *Inflammatory Bowel Diseases* *16*, 137–151.
- Chassaing, B., Etienne-Mesmin, L., Bonnet, R., and Darfeuille-Michaud, A. (2013). Bile salts induce long polar fimbriae expression favouring Crohn’s disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* interaction with Peyer’s patches. *Environ. Microbiol.* *15*, 355–371.
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J.K., Poole, A.C., Srinivasan, S., Ley, R.E., and Gewirtz, A.T. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* *519*, 92–96.
- Co, J.Y., Margalef-Català, M., Li, X., Mah, A.T., Kuo, C.J., Monack, D.M., and Amieva, M.R. (2019). Controlling Epithelial Polarity: A Human Enteroid Model for Host-Pathogen Interactions. *Cell Rep* *26*, 2509-2520.e4.
- Cooke, J., Zhang, H., Greger, L., Silva, A.-L., Massey, D., Dawson, C., Metz, A., Ibrahim, A., and Parkes, M. (2012). Mucosal genome-wide methylation changes in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *18*, 2128–2137.
- Cooney, C.A., Dave, A.A., and Wolff, G.L. (2002). Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J. Nutr.* *132*, 2393S-2400S.
- Crohn, B.B., Ginzburg, L., and Oppenheimer, G.D. (2000). Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. *Mt. Sinai J. Med.* *67*, 263–268.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J.F. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn’s disease. *Gastroenterology* *115*, 1405–1413.
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn’s disease. *Gastroenterology* *127*, 412–421.
- Denizot, J., Sivignon, A., Barreau, F., Darcha, C., Chan, H.F.C., Stanners, C.P., Hofman, P., Darfeuille-Michaud, A., and Barnich, N. (2012). Adherent-invasive *Escherichia coli* induce claudin-2 expression and barrier defect in CEABAC10 mice and Crohn’s disease patients. *Inflamm. Bowel Dis.* *18*, 294–304.
- Denizot, J., Desrichard, A., Agus, A., Uhrhammer, N., Dreux, N., Vouret-Craviari, V., Hofman, P., Darfeuille-Michaud, A., and Barnich, N. (2015). Diet-induced hypoxia responsive element demethylation increases CEACAM6 expression, favouring Crohn’s disease-associated *Escherichia coli* colonisation. *Gut* *64*, 428–437.

- Dreux, N., Denizot, J., Martinez-Medina, M., Mellmann, A., Billig, M., Kisiela, D., Chattopadhyay, S., Sokurenko, E., Neut, C., Gower-Rousseau, C., et al. (2013). Point mutations in FimH adhesin of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathog.* *9*, e1003141.
- Eskandarian, H.A., Impens, F., Nahori, M.-A., Soubigou, G., Coppee, J.-Y., Cossart, P., and Hamon, M.A. (2013). A Role for SIRT2-Dependent Histone H3K18 Deacetylation in Bacterial Infection. *Science* *341*, 1238858–1238858.
- Farrelly, L.A., Thompson, R.E., Zhao, S., Lepack, A.E., Lyu, Y., Bhanu, N.V., Zhang, B., Loh, Y.-H.E., Ramakrishnan, A., Vadodaria, K.C., et al. (2019). Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3. *Nature* *567*, 535–539.
- Fellows, R., Denizot, J., Stellato, C., Cuomo, A., Jain, P., Stoyanova, E., Balázsi, S., Hajnády, Z., Liebert, A., Kazakevych, J., et al. (2018). Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases. *Nat Commun* *9*, 105.
- Franke, A., McGovern, D.P.B., Barrett, J.C., Wang, K., Radford-Smith, G.L., Ahmad, T., Lees, C.W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., et al. (2010). Meta-Analysis Increases to 71 the Tally of Confirmed Crohn's Disease Susceptibility Loci. *Nat Genet* *42*, 1118–1125.
- Friedrich, M., Gerbeth, L., Gerling, M., Rosenthal, R., Steiger, K., Weidinger, C., Keye, J., Wu, H., Schmidt, F., Weichert, W., et al. (2019). HDAC inhibitors promote intestinal epithelial regeneration via autocrine TGFβ1 signalling in inflammation. *Mucosal Immunol* *12*, 656–667.
- Gibold, L., Garenaux, E., Dalmasso, G., Gallucci, C., Cia, D., Mottet-Auselo, B., Faïs, T., Darfeuille-Michaud, A., Nguyen, H.T.T., Barnich, N., et al. (2016). The Vat-AIEC protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* *18*, 617–631.
- Glas, J., Seiderer, J., Fries, C., Tillack, C., Pfennig, S., Weidinger, M., Beigel, F., Olszak, T., Lass, U., Göke, B., et al. (2011). CEACAM6 gene variants in inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* *6*, e19319.
- Grabiec, A.M., and Potempa, J. (2018). Epigenetic regulation in bacterial infections: targeting histone deacetylases. *Crit. Rev. Microbiol.* *44*, 336–350.
- Halme, L., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Lappalainen, M., Färkkilä, M., and Kontula, K. (2006). Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* *12*, 3668–3672.
- Hamon, M.A., and Cossart, P. (2011). K⁺ efflux is required for histone H3 dephosphorylation by *Listeria monocytogenes* listeriolysin O and other pore-forming toxins. *Infect. Immun.* *79*, 2839–2846.
- Hamon, M.A., Batsché, E., Régnault, B., Tham, T.N., Seveau, S., Muchardt, C., and Cossart, P. (2007). Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 13467–13472.
- Henderson, P., and Stevens, C. (2012). The Role of Autophagy in Crohn's Disease. *Cells* *1*, 492–519.

- Howell, K.J., Kraiczy, J., Nayak, K.M., Gasparetto, M., Ross, A., Lee, C., Mak, T.N., Koo, B.-K., Kumar, N., Lawley, T., et al. (2018). DNA Methylation and Transcription Patterns in Intestinal Epithelial Cells From Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Diseases Differentiate Disease Subtypes and Associate With Outcome. *Gastroenterology* *154*, 585–598.
- Kelly, D., Kotliar, M., Woo, V., Jagannathan, S., Whitt, J., Moncivaiz, J., Aronow, B.J., Dubinsky, M.C., Hyams, J.S., Markowitz, J.F., et al. (2018). Microbiota-sensitive epigenetic signature predicts inflammation in Crohn’s disease. *JCI Insight* *3*.
- Koohy, H., Bolland, D.J., Matheson, L.S., Schoenfelder, S., Stellato, C., Dimond, A., Várnai, C., Chovanec, P., Chessa, T., Denizot, J., et al. (2018). Genome organization and chromatin analysis identify transcriptional downregulation of insulin-like growth factor signaling as a hallmark of aging in developing B cells. *Genome Biol.* *19*, 126.
- Li Yim, A.Y.F., de Bruyn, J.R., Duijvis, N.W., Sharp, C., Ferrero, E., de Jonge, W.J., Wildenberg, M.E., Mannens, M.M.A.M., Buskens, C.J., D’Haens, G.R., et al. (2018). A distinct epigenetic profile distinguishes stenotic from non-inflamed fibroblasts in the ileal mucosa of Crohn’s disease patients. *PLoS ONE* *13*, e0209656.
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., González-Huix, F., López-Oliu, C., Dahbi, G., Blanco, J.E., Blanco, J., Garcia-Gil, L.J., and Darfeuille-Michaud, A. (2009). Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn’s disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *15*, 872–882.
- Martinez-Medina, M., Denizot, J., Dreux, N., Robin, F., Billard, E., Bonnet, R., Darfeuille-Michaud, A., and Barnich, N. (2014). Western diet induces dysbiosis with increased *E coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut* *63*, 116–124.
- de Mattos, B.R.R., Garcia, M.P.G., Nogueira, J.B., Paiatto, L.N., Albuquerque, C.G., Souza, C.L., Fernandes, L.G.R., Tamashiro, W.M. da S.C., and Simioni, P.U. (2015). Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments. *Mediators of Inflammation* *2015*, 1–11.
- McDermott, E., Ryan, E.J., Tosetto, M., Gibson, D., Burrage, J., Keegan, D., Byrne, K., Crowe, E., Sexton, G., Malone, K., et al. (2016). DNA Methylation Profiling in Inflammatory Bowel Disease Provides New Insights into Disease Pathogenesis. *J Crohns Colitis* *10*, 77–86.
- Miquel, S., Peyretailade, E., Claret, L., de Vallée, A., Dossat, C., Vacherie, B., Zineb, E.H., Segurens, B., Barbe, V., Sauvanet, P., et al. (2010). Complete genome sequence of Crohn’s disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS ONE* *5*.
- Mir, S.A., Nagy-Szakal, D., Dowd, S.E., Szigeti, R.G., Smith, C.W., and Kellermayer, R. (2013). Prenatal methyl-donor supplementation augments colitis in young adult mice. *PLoS ONE* *8*, e73162.
- Nagy-Szakal, D., Ross, M.C., Dowd, S.E., Mir, S.A.V., Schaible, T.D., Petrosino, J.F., and Kellermayer, R. (2012). Maternal micronutrients can modify colonic mucosal microbiota maturation in murine offspring. *Gut Microbes* *3*, 426–433.
- Ng, S.C., Shi, H.Y., Hamidi, N., Underwood, F.E., Tang, W., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., et al. (2017). Worldwide incidence and prevalence of

inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet* 390, 2769–2778.

Ng, S.C., Shi, H.Y., Hamidi, N., Underwood, F.E., Tang, W., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., et al. (2018). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet* 390, 2769–2778.

Nimmo, E.R., Prendergast, J.G., Aldhous, M.C., Kennedy, N.A., Henderson, P., Drummond, H.E., Ramsahoye, B.H., Wilson, D.C., Semple, C.A., and Satsangi, J. (2012). Genome-wide methylation profiling in Crohn's disease identifies altered epigenetic regulation of key host defense mechanisms including the Th17 pathway. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 889–899.

Palm, N.W., de Zoete, M.R., Cullen, T.W., Barry, N.A., Stefanowski, J., Hao, L., Degnan, P.H., Hu, J., Peter, I., Zhang, W., et al. (2014). Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* 158, 1000–1010.

Palmela, C., Chevarin, C., Xu, Z., Torres, J., Sevrin, G., Hirten, R., Barnich, N., Ng, S.C., and Colombel, J.-F. (2018). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut* 67, 574–587.

Pauwels, S., Ghosh, M., Duca, R.C., Bekaert, B., Freson, K., Huybrechts, I., A S Langie, S., Koppen, G., Devlieger, R., and Godderis, L. (2017). Dietary and supplemental maternal methyl-group donor intake and cord blood DNA methylation. *Epigenetics* 12, 1–10.

Pereira, J.M., Chevalier, C., Chaze, T., Gianetto, Q., Impens, F., Matondo, M., Cossart, P., and Hamon, M.A. (2018). Infection Reveals a Modification of SIRT2 Critical for Chromatin Association. *Cell Rep* 23, 1124–1137.

Piovani, D., Danese, S., Peyrin-Biroulet, L., Nikolopoulos, G.K., Lytras, T., and Bonovas, S. (2019). Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology* 157, 647-659.e4.

Rolando, M., Sanulli, S., Rusniok, C., Gomez-Valero, L., Bertholet, C., Sahr, T., Margueron, R., and Buchrieser, C. (2013). *Legionella pneumophila* effector RomA uniquely modifies host chromatin to repress gene expression and promote intracellular bacterial replication. *Cell Host Microbe* 13, 395–405.

Rolando, M., Gomez-Valero, L., and Buchrieser, C. (2015). Bacterial remodelling of the host epigenome: functional role and evolution of effectors methylating host histones. *Cell. Microbiol.* 17, 1098–1107.

Rolhion, N., Barnich, N., Bringer, M.-A., Glasser, A.-L., Ranc, J., Hébuterne, X., Hofman, P., and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive *Escherichia coli* invasion. *Gut* 59, 1355–1362.

Rowbotham, S.P., Barki, L., Neves-Costa, A., Santos, F., Dean, W., Hawkes, N., Choudhary, P., Will, W.R., Webster, J., Oxley, D., et al. (2011). Maintenance of silent chromatin through replication requires SWI/SNF-like chromatin remodeler SMARCD1. *Mol. Cell* 42, 285–296.

- Sabari, B.R., Tang, Z., Huang, H., Yong-Gonzalez, V., Molina, H., Kong, H.E., Dai, L., Shimada, M., Cross, J.R., Zhao, Y., et al. (2015). Intracellular crotonyl-CoA stimulates transcription through p300-catalyzed histone crotonylation. *Mol. Cell* 58, 203–215.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265.
- Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415–418.
- Schaible, T.D., Harris, R.A., Dowd, S.E., Smith, C.W., and Kellermayer, R. (2011). Maternal methyl-donor supplementation induces prolonged murine offspring colitis susceptibility in association with mucosal epigenetic and microbiomic changes. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1687–1696.
- Seto, E., and Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a018713.
- Sevrin, G., Massier, S., Chassaing, B., Agus, A., Delmas, J., Denizot, J., Billard, E., and Barnich, N. (2018). Adaptation of adherent-invasive *E. coli* to gut environment: Impact on flagellum expression and bacterial colonization ability. *Gut Microbes* 1–17.
- Shakespeare, M.R., Halili, M.A., Irvine, K.M., Fairlie, D.P., and Sweet, M.J. (2011). Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity. *Trends Immunol.* 32, 335–343.
- Shaw, K.A., Cutler, D.J., Okou, D., Dodd, A., Aronow, B.J., Haberman, Y., Stevens, C., Walters, T.D., Griffiths, A., Baldassano, R.N., et al. (2019). Genetic variants and pathways implicated in a pediatric inflammatory bowel disease cohort. *Genes Immun* 20, 131–142.
- Sivignon, A., de Vallée, A., Barnich, N., Denizot, J., Darcha, C., Pignède, G., Vandekerckove, P., and Darfeuille-Michaud, A. (2015). *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 prevents colitis induced by AIEC bacteria in the transgenic mouse model mimicking Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 276–286.
- Somineni, H.K., Venkateswaran, S., Kilaru, V., Marigorta, U.M., Mo, A., Okou, D.T., Kellermayer, R., Mondal, K., Cobb, D., Walters, T.D., et al. (2019). Blood-Derived DNA Methylation Signatures of Crohn's Disease and Severity of Intestinal Inflammation. *Gastroenterology* 156, 2254-2265.e3.
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F., and Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *The Lancet* 389, 1741–1755.
- Traube, F.R., and Carell, T. (2017). The chemistries and consequences of DNA and RNA methylation and demethylation. *RNA Biol* 14, 1099–1107.
- Tsaprouni, L.G., Ito, K., Powell, J.J., Adcock, I.M., and Punchard, N. (2011). Differential patterns of histone acetylation in inflammatory bowel diseases. *J Inflamm (Lond)* 8, 1.

Ventham, N.T., Kennedy, N.A., Adams, A.T., Kalla, R., Heath, S., O’Leary, K.R., Drummond, H., IBD BIOM consortium, IBD CHARACTER consortium, Wilson, D.C., et al. (2016). Integrative epigenome-wide analysis demonstrates that DNA methylation may mediate genetic risk in inflammatory bowel disease. *Nat Commun* 7, 13507.

Viladomiu, M., Kivolowitz, C., Abdulhamid, A., Dogan, B., Victorio, D., Castellanos, J.G., Woo, V., Teng, F., Tran, N.L., Sczesnak, A., et al. (2017). IgA-coated *E. coli* enriched in Crohn’s disease spondyloarthritis promote TH17-dependent inflammation. *Sci Transl Med* 9.

Wei, W., Liu, X., Chen, J., Gao, S., Lu, L., Zhang, H., Ding, G., Wang, Z., Chen, Z., Shi, T., et al. (2017). Class I histone deacetylases are major histone decrotonylases: evidence for critical and broad function of histone crotonylation in transcription. *Cell Res.* 27, 898–915.

Wolff, G.L., Kodell, R.L., Moore, S.R., and Cooney, C.A. (1998). Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB J.* 12, 949–957.

Ye, J., Wu, W., Li, Y., and Li, L. (2017). Influences of the Gut Microbiota on DNA Methylation and Histone Modification. *Dig. Dis. Sci.* 62, 1155–1164.

Zhang, D., Tang, Z., Huang, H., Zhou, G., Cui, C., Weng, Y., Liu, W., Kim, S., Lee, S., Perez-Neut, M., et al. (2019). Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature* 574, 575–580.

Zhou, V.W., Goren, A., and Bernstein, B.E. (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature Reviews Genetics* 12, 7–18.

