



HAL
open science

Etude du dialogue système entéro-endocrinien/microbiote intestinal

Kelly Biaggini

► **To cite this version:**

Kelly Biaggini. Etude du dialogue système entéro-endocrinien/microbiote intestinal. Interactions cellulaires [q-bio.CB]. Université de Rouen, 2015. Français. NNT: . tel-02366432

HAL Id: tel-02366432

<https://normandie-univ.hal.science/tel-02366432>

Submitted on 15 Nov 2019

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.

THESE

Pour obtenir le grade de Docteur

opéré par l'Université de Rouen

Discipline : Biologie, Spécialité : Microbiologie

Etude du dialogue système entéro-endocrinien/microbiote intestinal

**Présentée et soutenue publiquement par
Kelly Biaggini**

**Thèse soutenue publiquement le 14 Décembre 2015
devant le jury composé de**

Monsieur Laurent PICOT	Maître de Conférence/Université de La Rochelle	Rapporteur
Monsieur Lionel RIGOTTIER-GOIS	Chargé de recherche/ INRA Jouy en Josas	Rapporteur
Monsieur Djamel DRIDER	Professeur / Université de Lille	Examineur
Madame Nathalie CONNIL	Maître de Conférence/Université de Rouen	Examineur
Monsieur Pierre DECHELOTTE	Professeur/ Université de Rouen	Examineur
Monsieur Marc FEUILLOLEY	Professeur/ Université de Rouen	Président

Thèse co-dirigée par Nathalie CONNIL (LMSM EA4312) et Pierre DECHELOTTE (INSERM UMR1073)

**A Ma famille, à Ma Provence Chérie,
au Soleil de mon Pays...**

Remerciements

Mes travaux de thèse ont été réalisés en collaboration entre le laboratoire LMSM dirigé par le **Pr Marc Feuilloley** et le laboratoire ADEN UMR1073 dirigé par le **Pr Pierre Déchelotte** sous la co-direction du **Dr Nathalie Connil** et du **Pr Pierre Déchelotte**.

Je tiens à remercier très cordialement l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté de m'accorder de leur temps et de leur attention pour considérer mon manuscrit, analyser le sujet, les résultats, les discussions de mes travaux ainsi que d'être présents le jour de ma soutenance. **Dr Laurent Picot** et **Dr Lionel Riggotier-Gois**, merci à vous d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse. Je conçois que ce rôle est lourd d'implications, je vous exprime toute ma gratitude pour avoir examiné en détail les recherches que j'effectue depuis 3 ans. **Pr Djamel Drider**, je vous suis très reconnaissante d'avoir travaillé avec l'équipe du LMSM pour mener à bien des études ainsi que d'avoir consenti à être examinateur de mes travaux de thèse.

Tous mes plus chaleureux remerciements au **Pr Marc Feuilloley** qui a su me faire confiance quand tout juste sorti du Master, je l'ai contacté en lui parlant de mes projets, rendant possible un premier entretien. A l'issue de quoi, il m'a donné la chance de me former au sein du laboratoire LMSM avant de passer le concours qui m'a permis d'obtenir mon financement de thèse. Tes responsabilités font de toi quelqu'un de très occupé mais je te suis très reconnaissante de m'avoir toujours accordé du temps quand j'eus pu en avoir tant besoin. Si ton soutien professionnel a été très important Marc, ton soutien moral et ta compréhension face à différentes épreuves que j'ai pu traverser resteront très importants à mes yeux. **Nathalie**, je te remercie sincèrement pour ton aide, ton soutien, tes conseils, tout ce que tu as pu m'apprendre et pour tout le temps que tu as pu m'accorder. Cette thèse aura été une sacrée aventure...nous avons partagé tellement d'expériences diverses et variées ! Tu m'auras en partie soigné de mon style littéraire dans la rédaction scientifique et dans ce contexte j'espère continuer à progresser. Je garderai mes proses et mes vers pour mes correspondances personnelles ; aucun acquis n'est jamais perdu.

Pr Pierre Déchelotte, je vous suis très reconnaissante et vous remercie sincèrement de m'avoir fait confiance pendant 3 ans et de m'avoir accordé de votre temps si précieux. Je suis très heureuse d'avoir eu l'opportunité de travailler avec vous et de m'enrichir de tout ce que vous avez pu m'enseigner. Un grand merci au **Dr Ziad Alnabhani** que je suis très heureuse d'avoir proposé comme membre invité de ma soutenance de thèse. Ziad, j'ai eu la chance de connaître

grâce à Nathalie Connil, ce fut un plaisir de travailler avec et pour toi, je suis très heureuse que tu fasses partie de mon jury. De plus les conseils pour la poursuite de ma carrière ont été très précieux, ce sont ce type d'informations qui sont difficiles à obtenir et toi tu n'as pas hésité à me les communiquer et je trouve ça fabuleux. Bonne route à toi, tu es talentueux, tu as de l'avenir dans notre domaine.

Un grand merci à l'ensemble des enseignants chercheurs du laboratoire LMSM, je pense notamment au **Pr Sylvie Chevalier** et au **Pr Nicole Orange** mais aussi aux maitres de conférence et docteurs **Xavier Latour, Emeline Bouffartigues-Maillot, Anne Groboillot, Annabelle Mériaux, Olivier Le Souhaitier et Cécile Poc**. Merci à mon deuxième laboratoire en particulier au **Pr Moise Coffier** pour son accueil, ses conseils et son aide mais aussi au **Pr Serguei Fetisov** dont j'ai été enchantée de faire la connaissance et pour qui j'aurais été très heureuse de travailler également. Merci enfin à toute l'équipe et en particulier **Jonathan et Nicolas** avec qui j'ai bien travaillé. Merci au **Dr Naouel Tennoune** et bonne route à toi . Je tiens à noter ma reconnaissance sincère à la **Région Haute Normandie** qui m'a accordé la bourse m'ayant permis de réaliser cette thèse.

Pour en revenir au site d'Evreux, je ne peux écrire ses remerciements sans citer bien sûr tous mes stagiaires **Alexis, Siham, Rikki, Valérie et Constant** avec qui j'aurais passé au minimum 15 des 32 mois de ma thèse. Parmi les gens que j'ai croisés au laboratoire, même si leurs passages n'ont été qu'éclair, je tiens également à dire merci à **Hervé, Justine, Maud...** Certaines personnes auront particulièrement marqué mon passage au LMSM je pense au **Dr Victorien Decoin** dont l'humour et la gentillesse m'auront bien manqués lors de ma fin de thèse et à remercier : **Awa, Pierre-Jean, Jeremy, Lucille, Mathias, Andrea, Dorian, Tatiana, Thibault, Coco, Mélanie, Audrey D., Rachel, Charlène, Camille** au soutien administratif et technique : **Cathy, Olivier et Magalie**. Merci à **Sylvie Valentin** pour la formation pratique de l'anglais à l'oral ce sera toujours un plaisir de vous recroiser. Je tiens également à remercier **Bruno Querré** dont les échanges professionnels ont été très intéressants et son soutien très précieux. Merci à **Florian et Maggy** pour leur aide en tout genre technique et amicale, pour les mots échangés à la croisée de nos couloirs... Merci à **mes étudiants de l'IUT d'Evreux** à qui j'ai été ravie de faire cours, je savais que j'aimais enseigner et leur accueil et les échanges que nous avons eus m'ont conforté dans cette optique.

Je remercie maintenant très sincèrement et avant tout ma famille: mon **Père**, ma **Mère**, **Papy** et **Mamy**, **Parrain** mais également **Marraine Jeanne** et **Anne-Flo, Tonton Vincent** et **Tata Maryline Patrice ses enfants sa femme et ...Sylvain !** Je vais forcément manquer de mots

pour vous dire la gratitude et l'amour que j'ai pour vous mais rien n'aurait été possible si vous n'aviez pas été là. Je n'écrirai pas un roman car même si ce sont des remerciements qui me tiennent tout particulièrement à cœur, la famille c'est très personnel... **Tonton Vincent, Tata Maryline, Patrice ses enfants sa femme**, je suis très heureuse de vous avoir retrouvés et j'espère passer encore beaucoup de temps auprès de vous, vous avez un cœur grand comme tout et je sais qu'il y a de la place pour moi tout comme vous avez une place toute particulière dans le mien. **Mamy**, je te remercie d'avoir fait TOUT ce que tu as pu faire pour moi. **Mes parents** ont toujours beaucoup travaillé et toi et Papy, vous étiez toujours là, toujours prêts pour venir me chercher à l'école, pour veiller à ce que je ne manque de rien...Ma petite Mamy qui me faisait faire des dictées, réciter mes leçons même les langues étrangères! Je regrette de t'avoir grondée quand je trouvais que ton accent n'était pas assez allemand à mon goût^^ Mamy, je n'ai qu'un seul regret c'est que tu ne sois plus là pour voir ce que je suis devenue aujourd'hui...je sais cependant que tu n'es pas si loin que tu veilles sur moi; toi qui me chantait souvent *un jour j'irai revoir ma Normandie...*

Papy, merci! Merci pour tout...De m'avoir toujours et de toujours me soutenir dans mes projets. Nous partageons le même goût pour la musique classique et ça c'est merveilleux. Je n'oublierai jamais rien, quand tu prenais le temps de démêler les anglaises de mes cheveux, quand tu couvrais mes sorties pour aller croquer les framboises du jardin, quand tu prenais le temps de m'accompagner à l'école et de venir me chercher entre midi et deux pour éviter que je mange à la cantine, quand tu venais applaudir à mes concerts, quand tu me réservais tout particulièrement tes rares poires et les meilleurs abricots de ton jardin et enfin quand tu cuisines encore ton excellente daube. Enfin je te suis reconnaissante d'avoir partagé avec moi l'un de tes plus grands secrets, un jour je le donnerai à mon tour à l'un de mes enfants ou l'un de mes petits-enfants. Merci Papy, tu n'imagines même pas combien je tiens à toi.

Mimi, je te décerne une médaille d'or!!!! Avec une mention spéciale pour ses 4 dernières années où je pense ne pas avoir été tous les jours facile à vivre. Nous savons toutes les deux ce que je suis au fond mais c'est une épreuve d'être séparée de sa famille et de ses proches. Nous avons partagé d'innombrables aventures ensemble, des concerts Rubettes, des balades au Cœur de notre Provence chérie, des escapades en France et à l'étranger, tellement de musique, de loisirs créatifs, de photos, de littérature, de culture, de rire et d'amour...

Papa, j'ai toujours été une grande admiratrice de toutes qualités, ici j'en souligne une en particulier, tu es formidablement courageux et travailleur, tu ne t'es jamais laissé abattre malgré toutes les difficultés que la vie peut compter. Comment occulter nos innombrables moments de partage, des randonnées, de la natation, du grand écran, de la conduite... Merci d'avoir toujours

été ce que tu as été pour moi. **Parrain**, dit le **Carin**, merci de m'avoir toujours suivi et d'avoir fait tout ce que tu as pu faire pour moi. Ça a commencé avec ton arrivée sur ta petite mobylette à la clinique Pasteur (un signe?) le 8 janvier 1988. C'est ce jour-là que nous avons fait connaissance et depuis on ne s'est jamais plus quitté: match de foot, cinéma, tour en vélo et dans tes jolies bolides, concerts géniaux dans les arènes de Nîmes par exemple, lèche vitrine et shopping...J'ai besoin de toi, prends soin de toi au mieux je t'en conjure. **Sylvain**, quel bonheur d'avoir croisé ton chemin un jour...**S'il vint** ce fut pour recueillir pour cueillir, ce Coeur...et la suite je te l'ai écrite, je te l'ai murmuré... Palme d'or à toi Mon Bien Aimé, musicien et poète qui illumine ma vie...

Je tiens également à remercier ma famille de cœur. **Cathy (Eric, Sophie, Romu, Lucas et Nathan)**, je te suis reconnaissante d'avoir toujours été auprès de moi. Nous avons pu échanger sur tout sans tabou, nous avons partagé et nous partageons souvent la même façon de voir les choses, une manière simple et pleine d'amour, réfléchie. Le lien qui nous unit est très spécial. **Renaud**, c'est un honneur d'avoir fait un jour ta rencontre, ça n'aurait jamais pu arriver sans **HouPy** et **Kaline**, ça nous le savons. Je suis contente d'avoir pu partager avec toi, tous ces bons moments, nos balades (Evreux, Laon, Reims, Château de Pierrefond, Paris, Compiègne Reims), nos discussions, tu es quelqu'un de très cultivé avec qui il est impossible de s'ennuyer! Renaud tu es un ami précieux pour moi tu sais, tu fais partie de ceux que l'on compte sur les doigts d'une main et ça, ne l'oublie jamais.

Dr Gilles Merlin, je te remercie pour tout! Pour le savoir que tu m'as transmis, pour le goût de la recherche que tu m'as communiqué, pour tout le temps que tu m'as consacré, à m'enseigner, me corriger pendant le stage que j'ai fait au labo de Parasito et aussi d'avoir continué à m'encourager depuis lors. Ne te tracasse pas, je n'oublie pas la musique, comment pourrais-je tirer un trait sur presque 15 ans de conservatoire. J'en profite pour faire un petit clin d'œil à **Michèle**, **Lucien** qui ont toujours été là pour me seconder pendant cette formation ; aussi et bien entendu à **Michel** et au **Pr Patrick Bastien**. Cet environnement de travail était pour moi tout ce que j'ai toujours souhaité, une ambiance chaleureuse, de l'investissement, du perfectionnisme et des moments pour rire ...En somme, merci au labo de Parasito de Lapeyronnie.

Merci au **Docteur Claire Villeveille** qui après avoir été une de mes enseignantes à la faculté des Sciences de Nîmes est devenue une amie, m'ayant toujours coachée que ce soit pour la chimie ou pour les relations humaines. Jusqu'à preuve du contraire, tu avais raison pour tout ce que tu m'as dit sur la thèse, sur la recherche et sur le reste... Sur ce manuscrit restera la mémoire

de la Féria que nous avons partagée ensemble, bon courage pour la poursuite de ta carrière et surtout n'oublie jamais d'être heureuse. Parmi les enseignants chercheurs du Sud par qui j'ai eu la chance d'être formée et qui m'ont totalement communiqué l'amour du métier, je pense au **Dr Helene Terzian**, à **Mr Calafell**, **Mr Levasseur** et au **Dr Sylvia Campagna**.

Merci bien évidemment à **Nathalie** et **Laurent Musine**, j'ai l'impression qu'on se connaît depuis toujours! En même temps, c'est presque comme si nous nous étions toujours connu...Un jour on s'est croisé dans un conservatoire et depuis on ne s'est jamais vraiment quittés. Je n'oublierai jamais la minie Nathalie avec son violon et le petit Laurent avec son caractère bien affirmé déjà à l'époque, et c'est pour ça que je vous aime tous les deux car vous êtes toujours les mêmes, vous vous êtes tous les deux épanouis et vous avez muris, ce n'est que l'accomplissement de ce que vous étiez très jeunes. Quant à toi Laurent, je te présente mes excuses pour les misères qu'on te faisait Sophie et moi au collège mais comme on dit qui aime bien châtie bien! Bonne route à toi, tu atteins le but et je suis certaine tu excelleras dans ton domaine.

Maintenant un petit mot spécial à ceux qui ont su m'accueillir avec gentillesse en Normandie dans cette région loin de chez moi. Merci à **Cristel**, **Pascal L.** et **leurs filles** qui n'ont pas seulement été les propriétaires de mon petit appartement mais surtout des personnes dévouées, gentilles, toujours là pour me soutenir et m'aider pour tout et n'importe quoi. Merci à **Sophie Joncour**, ma prof de danse qui a accepté de m'intégrer dans son cours de classique alors que j'ai décidé de commencer cet exercice qui peut être complexe quand on débute à 25 ans! En tout cas ce petit RDV hebdomadaire est mon plaisir, plaisir de voir que lorsque l'on veut, on peut, l'équilibre physique est indispensable au mental, à l'intellect. Merci à **Xavier**, pour son sourire, chacun très occupés dans nos domaines, même si ce n'était que quelques mots échangés par-ci par-là, ce sont ces mots qui donnent le sourire le matin avant d'aller travailler. Merci à **Moustache**, mon papy normand préféré, pour sa joie de vivre, pour les pommes bio de son verger, qui m'ont régalingées et qui ont régalingé ma famille! (un gâteau garni de pommes normandes, bien emballé, ça arrive deux jours après dans le sud).

Maintenant remerciement à la musique qui me porte depuis si longtemps parmi les professeurs qui m'auront le plus marquée, **Jean Claude Relave** et **Manuel Colombert**, deux trompettistes de talent, merci également à **Stéphanie Sacelini** et **Romain Thorel** mes deux cornistes préférés à ma très chère collègue et éternelle amie **Carlyne Terendij**. Merci à **Eric Sombret** qui m'a tout appris au cor d'harmonie cet instrument de musique magnifique dont je suis si fière de pouvoir jouer. Merci à **Jean-Claude** (sax) dont je n'oublierai jamais l'accueil si chaleureux qu'il m'a accordé lorsque je suis rentrée dans l'harmonie cheminote de Nîmes. Merci à mes professeurs de musique **Mr Mouret**, **Ania**, **Mr Marty**, **Mme Stroll** et enfin à **Mr Placide** qui

m'a invité à participer à une tournée d'orchestre et à l'enregistrement d'un CD un été, sur le thème des valses de Viennes.

En dehors de la famille, du travail, des amis d'enfance, des enseignants, des normands pure souche, il y a aussi **ma famille Rubettes** à remercier. Suivre ce groupe, entourée de mes ami(e)s **Early Birds** ça a toujours été et c'est encore magnifique depuis 7 ans maintenant. Ainsi pour commencer merci **au groupe des Rubettes** me berçant depuis ma plus tendre enfance, qui eut pu croire que j'aurais le plaisir de les voir sur scène un jour et encore de pouvoir parler avec eux, de les embrasser! Les Rubettes, c'est grâce à vous, que j'ai recommencé à pratiquer l'anglais oralement et par écrit aussi, merci! En plus d'adorer votre musique, la rythmique, le dancing, le swing, j'adore vos concerts et l'ambiance. Maintenant en terme plus individuel je tenais à remercier **Alan Williams** le leader du groupe qui a toujours suscité une profonde admiration de ma part, admiration engendrée par ma mère dès mon plus jeune âge. Alan, pour moi tu es toujours le même que dans les années 70, un homme charmant et plein de charisme dont j'apprécie énormément le caractère. Tu es quelqu'un de sincère, d'entier, quand tu dois dire quelque chose tu le dis, très professionnel et perfectionniste...très accueillant pour tous tes fans. Un immense merci à **Mick** aussi qui connaît à peu près toute ma vie lol. Quelle tendresse, quelle chaleureux accueil quand nous nous rencontrons. Au sein du groupe des fans, il y a aussi une atmosphère très sympathique, au milieu de ce catalogue de mes amies aux 5 nationalités: française, belge, anglaise, écossaise, suisse, le point de ralliement, les Rubettes, la musique et l'anglais comme langue internationale de la communication. Merci à **Cathy** encore, à **Betty, Vicky, Estelle** et **Pierre-Marie, Stéphanie** et **Fifi, Eric D., Véronique, Laurence, Lily, Thierry B., Marie Aymard, Eric D., Jean-Claude D., Guy P.** et le **Petit Marcel** et surtout que l'aventure continue longtemps. Petit clin d'œil à **Charles et Stéphane** que j'adore. Sinon merci à **Claudine** notre fidèle amie et correspondante belge de Namur qui m'a connu avec des couches et qui m'a vue évoluer tout au long de ma vie jusqu'à lors. Merci à l'ensemble de mes amis de la Réunion! Je souhaite mettre une touche spéciale à **Harry, Delphine, Matthias** et **Antoine, Chantal** et **Jerôme, Marie-Luce**. Je pense aussi à **Virginie**. Quel chaleureux accueil! Mon séjour auprès de vous a été si intense en émotions, qu'aurais-je fait si vous n'aviez pas été là?

Merci à **Baudelaire, Rachmaninov, Beethoven, Debussy, Chopin, Denis Brain, Marcel Pagnol, Alphonse Daudet**, d'accompagner ma vie depuis ma plus tendre enfance et **Amélie Nothomb** depuis plus récemment...

SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	1
Etude Bibliographique.....	5
<u>Chapitre I : Le microbiote intestinal, équilibre et dysbiose.....</u>	7
1. Etablissement du microbiote intestinal.....	7
2. Composition du microbiote intestinal.....	8
2.1 Phyla bactériens et répartition topographique.....	9
2.2 Noyau phylogénétique et entérotypes.....	10
2.3 Evolution du microbiote intestinal au cours de la vie.....	10
3. Fonctions du microbiote intestinal.....	12
Production de molécules eucaryotes par le microbiote intestinal.....	14
4. Pathologies liées au microbiote intestinal.....	14
4.1 Pathologies intestinales.....	15
4.11 Microbiote et maladies chroniques inflammatoires de l'intestin (MICI).....	16
4.12 Microbiote et syndrome de l'intestin irritable (SII).....	17
4.13 Microbiote et syndrome du grêle court.....	17
4.14 Microbiote et cancers digestifs.....	18
4.2 Pathologies extra-intestinales.....	19
4.21 Microbiote et syndromes métaboliques.....	19
- Diabète de type II	19
- Stéatose hépatique alcoolique.....	20
- Obésité.....	20

4.22 Autres pathologies.....	22
- Microbiote et troubles cardiovasculaires.....	22
- Microbiote et eczéma/asthme.....	23
- Pathologies cérébrales.....	23
- Microbiote et dépression/anxiété/troubles comportementaux.....	23
- Microbiote et anorexie.....	25
- Microbiote et autisme.....	26
5. Notion de pathobionte intestinal.....	26

Chapitre II : Focus sur une bactérie à Gram négatif du microbiote

<u>intestinal : <i>Pseudomonas</i></u>	28
1. Taxonomie.....	30
2. L'espèce <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et pathologies associées.....	32
3. L'espèce <i>Pseudomonas fluorescens</i> et pathologies associées.....	34
4. Facteurs de virulence chez <i>Pseudomonas</i>	38
4.1 Facteurs de virulence membranaires.....	38
4.11 Le lipopolysaccharide (LPS).....	38
4.12 Les systèmes de sécrétions.....	40
4.13 Les adhésines.....	43
4.2 Facteurs de virulence sécrétés.....	44
4.21 Les phospholipases C.....	44
4.22 Le cyanure d'hydrogène (HCN)	45
4.23 Les exotoxines.....	45
4.24 La pyoverdine et la pyochéline.....	46

4.25 Les biosurfactants.....	47
4.26 Les exopolysaccharides.....	48
4.27 Les protéases.....	48
4.28 La pyocyanine.....	49
5. Résistance aux antibiotiques chez <i>Pseudomonas</i>	50

Chapitre III Focus sur une bactérie à Gram positif du microbiote

<u>intestinal : <i>Enterococcus</i></u>	52
1. Taxonomie et niches écologiques des entérocoques.....	52
2. Les Entérocoques dans l'alimentation.....	53
3. Production d'amines biogènes.....	54
4. Les entérocoques, des bactéries pathogènes opportunistes.....	55
5. L'espèce <i>Enterococcus faecalis</i>	56
5.1 Généralités	57
5.2 Facteurs de virulence d' <i>Enterococcus faecalis</i>	58
5.21 Les acides téichoïques.....	60
5.22 Pili Ebp.....	61
5.23 Les adhésines.....	62
- Ace	
- Esp	
- EfaA	
5.24 Substance d'agrégation (agg)	63
5.25 Exopolysaccharides.....	63
5.26 Protéases.....	63
5.27 Les molécules de communication.....	64

5.28 Facteurs sécrétés	64
5.29 L'anion Superoxide extra-cellulaire.....	65
6. Résistance aux antibiotiques chez les entérocoques.....	65
<u>Chapitre IV Communication bactérienne</u>	67
1. Le quorum sensing.....	67
2. Quorum sensing chez les bactéries à Gram positif.....	70
2.1 Généralités.....	70
2.2 Quorum sensing chez <i>Enterococcus faecalis</i>	72
3. Quorum sensing chez les bactéries à Gram négatif.....	74
3.1 Quorum sensing chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74
3.2 Quorum sensing chez <i>Pseudomonas fluorescens</i>	75
4. Endocrinologie microbienne.....	76
5. Dialogue inter-règne et effet des molécules eucaryotes sur les bactéries.....	77
5.1 Bactéries et molécules délivrées par le système immunitaire.....	78
5.2 Bactéries et hormones peptidiques.....	79
5.3 Bactéries et neurotransmetteurs.....	85
- Bactéries et catécholamines	
- Impact de l'épinephrine et de la norepinephrine sur les bactéries	
- Récepteurs adrénergiques bactériens	
- Le système de quorum sensing AI-3/Epi/NE	
Objectifs du travail	96
Résultats	97

Chapitre I Effet des facteurs neuroendocriniens intestinaux sur la virulence de *Pseudomonas fluorescens*

I.	Introduction.....	101
II.	Article 1: The pathogenic potential of <i>Pseudomonas fluorescens</i> MFN1032 on enterocytes can be modulated by serotonin, substance P and epinephrine	
III.	Résultats complémentaires.....	103
IV.	Discussion.....	107

Chapitre II Effet de l'épinéphrine sur la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 et *Enterococcus faecalis* V583

I.	Introduction.....	113
II.	Résultats.....	115
III.	Discussion.....	123

Chapitre III La substance P stimule la production d'acide lactique et la virulence chez *Enterococcus faecalis* V583

I.	Introduction.....	129
II.	Article 2 Substance P promotes acid lactic production and virulence in <i>Enterococcus faecalis</i> V583	
III.	Discussion.....	131

Chapitre IV Analyse du microbiote intestinal aérobie d'un modèle murin d'anorexie (souris ABA)

I.	Introduction	137
II.	Résultats.....	138
III.	Discussion.....	143

Conclusion générale et perspectives.....	147
Matériels et méthodes.....	157
1. Cultures et tests sur les bactéries.....	159
1.1 Cultures bactériennes	159
1.2 Prétraitement des bactéries avec les molécules.....	160
1.3 Effets des molécules sélectionnées sur la croissance bactérienne.....	161
1.4 Analyses de CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)	161
1.5 Production de pyoverdine chez <i>Pseudomonas</i>	161
1.6 Etude de la formation des biofilms en microplaques 96 puits.....	162
1.7 Mobilité bactérienne.....	162
1.8 Hydrophobicité.....	163
1.9 Quantification d'acide lactique et de tyramine.....	163
1.10 Analyse LIVE/DEAD par microscopie confocale.....	164
1.11 Microscopie électronique à balayage (MEB)	165
2. Cultures et tests sur cellules eucaryotes.....	165
2.1 Culture cellulaire.....	165
2.2 Infection des cellules eucaryotes.....	166
2.3 Analyse de cytotoxicité par dosage de la lactate déshydrogénase (test LDH).....	167
2.4 Analyse de cytotoxicité par test au rouge neutre.....	168
2.5 Dosage de l'interleukine 8 (IL8)	168
2.6 Résistance transépithéliale (TER)	169
2.7 Translocation bactérienne	169
2.8 Adhésion/Invasion bactérienne.....	169

2.9 Marquage de l'actine-F	170
3. Etude du microbiote intestinal de souris.....	171
3.1 Modèles d'étude : souris C, RA et ABA.....	171
3.2 Mise en culture.....	172
3.3 Identification bactérienne par MALDI/Biotyper.....	172
3.3.1 Dépôt direct.....	173
3.3.2 Extraction rapide.....	173
3.3.3 Extraction dans un mélange éthanol / acide formique.....	173
4. Statistiques.....	174
Références.....	175
Travaux en collaboration.....	211
I. <u>Article 3</u>	215
Cytotoxicity and inflammatory potential of two <i>Pseudomonas mosselii</i> strains isolated from clinical samples of hospitalized patients.	
II. <u>Article 4</u>	217
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Alters the Intestinal Barrier Function by Modulating IL-1 β Expression Through Hematopoietic NOD2 Signaling	
Curriculum Vitae.....	219
Abstract	
Résumé	

Liste des abréviations

3OH-PAME	3-hydroxy palmitate ester méthylique
3oxo-HSL	N-(3-oxododecanoyl)-l-homoserine lactone
5HT	Sérotonine
αMSH	Alpha-Melanocyte-Stimulating-Hormone
AB	Amine Biogène
ABA	Activity-Based Anorexia
acyl-HSL	Homosérines lactones acylées
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHL	Acyl homoserine lactone
AI	Autoinducteur
AIEC	<i>Escherichia coli</i> Adherent-invasive
AMPc	Adenosine monophosphate cyclique
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
BHI	Brain Heart Infusion
BNO	Bouillon Nutritif Ordinaire
BNP	Brain Natriuretic Peptide
BSA	Bovine Serum Albumin
CSP	Competence-stimulating-peptides
CDT	Cytolethal Distending Toxin
CFS	Facteurs de croissance hématopoïétique
CLP	Cyclolipopeptide
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CNP	Peptide C

CRF	Corticotropin-releasing factor
Da	Dalton
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium
DO	Densité Optique
DSF	Difusible Factor
EfTU	Thermo unstable ribosomal elongation factor
EHEC	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragique
ETEC	<i>Escherichia coli</i> entérotoxiques
Epi	Epinephrine
ERV	Entérocoque vancomycine résistant
GABA	Acide gamma amino-butérique
GBAP	Gelatinase Biosynthesis-Activating Pheromone
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
HBD-2	β -defensine 2 humaine
HCN	Cyanure d'hydrogène
His	Histamine
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobuline
IL-x	Interleukine-x
IP	Iodure de propidium
LB	Luria Bertani
LDH	Lactate déshydrogénase
LD50	Dose létale 50
LPS	Lipopolysaccharide
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of flight
Mpb	Mega paires de bases

MC	Maladie de Crohn
MICI	Maladies Chroniques Inflammatoires de l'Intestin
MLCK	Myosin light-chain kinase
NE	Norepinephrine
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain 2
ORF	Open Reading Frame
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potentiel hydrogène
PLC	Phospholipase
PYY	Peptide YY
PQS	<i>Pseudomonas</i> quinolone signal
QS	Quorum Sensing
qRT-PCR	Real time reverse transcription
RCH	Rectocolique Hémorragique
ROS	Reactive Oxygen Species
RR	Régulateur de réponse
RT	Reverse Transcription
SAH	S-adénosine homocystéine
SFB	Bactéries Filamenteuses Segmentées
SIDA	Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
SII	Syndrome de l'Intestin Irritable
SK	Kinase Senseur
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
SP	Substance P
SVF	Sérum de Veau Fœtal

TLR	Toll-like receptor
TMA	Triméthylamine
TMAO	N-oxyde de triméthylamine
TNF	Facteur de nécrose des tumeurs
TSA	Trypticase soy agar
TSS	Système de sécrétion
UFC	Unité formant colonie
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropathogènes
UV	Ultra-Violet

Etude Bibliographique

Chapitre I

Le microbiote intestinal, équilibre et dysbiose

Le microbiote intestinal forme un écosystème complexe composé de virus, parasites, champignons et bactéries réparties en plus de 1000 espèces (Clemente *et al.*, 2012). La majorité des bactéries résidentes de l'intestin sont de type anaérobie strict. Le nombre de micro-organismes constituant ce microbiote est estimé à environ 10^{14} entités, ce qui représente 10 fois le nombre total de cellules du corps humain et une masse de plus de 1 kg (Savage 1977, Whitman *et al.*, 1998, Ley *et al.*, 2006).

1. Etablissement du microbiote intestinal

L'établissement du microbiote intestinal est un processus long et dynamique qui prend place dès la naissance et évolue fortement au cours des premiers mois de la vie. Ce processus s'effectue en plusieurs étapes au cours desquelles différentes populations bactériennes se succèdent en fonction des facteurs internes et externes. Avant la naissance, le tractus intestinal est stérile. Ce sont les premiers contacts avec l'environnement qui vont permettre la colonisation de l'intestin et l'implantation du microbiote. On sait aujourd'hui que le microbiote des enfants nés par voie naturelle est différent de celui des enfants nés par césarienne et que le mode d'alimentation du nouveau-né : allaitement ou non joue un rôle dans l'établissement du microbiote (Vallès *et al.*, 2012 ; Palmer *et al.*, 2007). Par la suite, l'alimentation, les conditions environnementales et d'hygiène pourront aussi influencer l'acquisition du microbiote intestinal. Pendant les deux premiers jours suivant la naissance, le potentiel redox de l'environnement colique favorise l'installation de bactéries aérobies, principalement des streptocoques et des entérobactéries (Favier *et al.*, 2002). Ces bactéries pionnières vont consommer l'oxygène et modifier le potentiel redox, favorisant ainsi

l'implantation des bactéries anaérobies qui composeront par la suite la partie dominante du microbiote intestinal (Zetterström *et al.*, 1994).

2. Composition du microbiote intestinal

2.1 Phyla bactériens et répartition topographique

Un peu plus de 1000 espèces bactériennes sont retrouvées dans le tractus digestif mais 5 phyla bactériens (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria et Verrucomicrobia) forment à eux seuls 95% du microbiote intestinal connu (Tremaroli & Bäckhed, 2012). Toutefois, compte tenu du faible nombre de germes cultivables (< 1 à 5% du microbiote total), de nombreux germes intestinaux restent encore à être identifiés. Chez un individu «sain», la population du microbiote intestinal se répartit en moyenne en 60 à 75% de Firmicutes, 30 à 40% de Bacteroidetes, 1 à 5% d'Actinobacteria ainsi qu'une petite part de Proteobacteria, de Fusobacteria et de Cyanobacteria (<1%) (Eckburg *et al.*, 2005). Ainsi les deux phyla majeurs sont les Firmicutes et les Bacteroidetes. Les Firmicutes regroupent surtout les espèces anaérobies à Gram positif très sensibles à l'oxygène, tandis que les Bacteroidetes correspondent aux bactéries à Gram négatif. Les mêmes phyla sont présents tout le long du tractus gastro-intestinal avec des variations de proportion en fonction du compartiment de ce tractus : on observe un gradient de concentration croissant dans le sens oral-anal. En effet, tout au long du tractus intestinal, les communautés bactériennes varient et ceci en fonction des facteurs de l'hôte (pH, transit, acide biliaire, enzymes digestives, mucus, système immunitaire...), et des facteurs bactériens (capacité métabolique et d'adhésion, coévolution, interactions et compétitions microbiennes), **Figure 1** (Costello *et al.*, 2013).

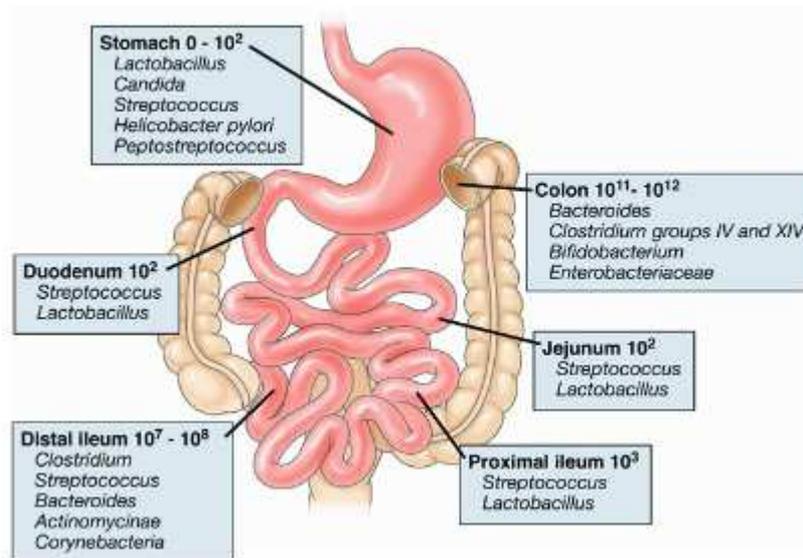


Figure 1 Répartition des différentes espèces bactériennes dans le tube digestif (Sartor, 2008)

L'œsophage contient un microbiote principalement transitoire mais une étude révèle l'existence d'un microbiote résident dans sa partie distale avec une majorité de bactéries appartenant aux phyla Firmicutes (*Streptococcus* et *Veillonella*) et Bacteroidetes (*Prevotella*) (Pei *et al.*, 2004). L'acidité gastrique et la présence d'acides biliaires dans le duodénum créent une pression de sélection environnementale qui s'exerce sur les micro-organismes. Dans l'intestin, deux grands types de flore sont identifiables, la flore résidente et la flore transitoire (ou flore de passage). La flore résidente, de composition stable au cours du temps est constituée de micro-organismes commensaux normalement présents dans le tube digestif. La flore transitoire désigne les micro-organismes en transit, en faible proportion par rapport à la flore résidente, qui ne seront en principe pas capables de s'implanter de manière stable et permanente. Si la flore transitoire est le plus souvent inoffensive, dans des conditions particulières, certains germes peuvent développer un potentiel pathogène de type opportuniste. En effet, si la flore résidente est perturbée certains micro-organismes de la flore transitoire peuvent alors se développer et causer des pathologies. Parmi cette flore transitoire,

on a pu identifier des levures ainsi que des bactéries telles que *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Markou & Apidianakis 2014).

2.2 Noyau phylogénétique et entérotypes

Chaque individu possède sa propre signature bactérienne intestinale pouvant varier avec l'âge, l'alimentation, son origine géographique ou bien l'environnement. Cependant, des études métagénomiques récentes ont mis en évidence l'existence d'un nombre restreint d'espèces bactériennes partagées par tous incluant notamment *Bacteroides vulgatus*, *Roseburia intestinalis*, *Ruminococcus bromii*, *Eubacterium rectale*, *Coprobacillus* sp., *Bifidobacterium longum* et *Faecalibacterium prausnitzii*. Ces espèces constitueraient : le noyau (ou core phylogénétique) du microbiote intestinal humain et seraient réparties en 3 catégories principales appelées entérotypes, tout comme il existe différents groupes sanguins (Tap *et al.*, 2009). Il a pu être montré qu'au sein d'une même famille certains traits de ce microbiote sont conservés.

2.3 Evolution du microbiote intestinal au cours de la vie

Si la composition au cours de la vie est généralement assez stable, l'hygiène alimentaire, la qualité de vie mais aussi les pathologies ou traitements médicamenteux, la prise de probiotique, peuvent faire varier la composition du microbiote de manière plus ou moins durable (**Figure 2**). L'antibiothérapie est le principal facteur de risque associé à l'altération du microbiote intestinal. Le manque de spécificité attribué à certains antibiotiques peut être responsable de désordres, notamment au niveau des différents microbiotes d'un organisme. Une étude a permis d'observer que les traitements à base d'antibiotiques réduisent la diversité du microbiote fécal des nouveau-nés et retardent la colonisation par des espèces considérées comme ayant des effets bénéfiques, telles que les lactobacilles et les bifidobactéries. De plus, ces traitements pendant les premiers mois de la vie favorisent la colonisation par des

pathogènes opportunistes résistants aux antibiotiques (Bonnemaison *et al.*, 2003). Une étude chez le rat a montré qu'un traitement à base d'amoxicilline pendant la période du sevrage affecte la maturation de 10 à 30% des gènes impliqués dans la fonction de barrière intestinale, ces effets étant dus à l'altération du microbiote intestinal (Schumann *et al.*, 2005). D'autres médicaments comme les anti-acides, les inhibiteurs des pompes à protons, ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent modifier l'environnement intestinal et donc perturber l'équilibre au sein du microbiote (Huffnagle 2010).

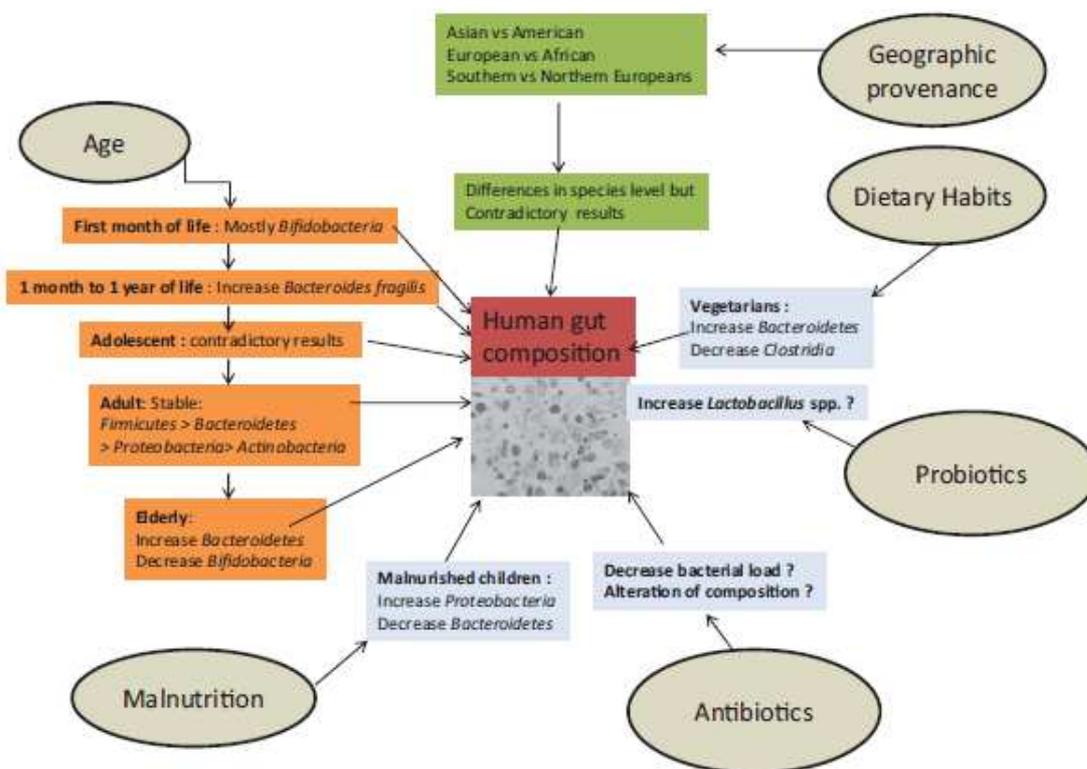


Figure 2 Influence des facteurs extérieurs sur la composition du microbiote intestinal (Lagier *et al.*, 2012)

Les pratiques culturelles, les styles de vie, les modes alimentaires influencent aussi la composition du microbiote et peuvent impacter le rôle du microbiote dans la santé humaine. Dès la diversification alimentaire, les espèces appartenant aux phyla Bacteroidetes et Firmicutes surpassent en nombre les populations bactériennes de départ. Chez l'adulte en bonne santé, la composition du microbiote intestinal reste stable. En revanche, chez les personnes âgées, l'écosystème intestinal contient une proportion plus importante de Protéobactéries, dont l'espèce *Escherichia coli*. En parallèle, la population de Bifidobactéries décline et leur diversité s'affaiblit. La malnutrition des personnes âgées semble être à l'origine de modifications du microbiote intestinal et d'une altération partielle du tractus intestinal (Claesson *et al.*, 2012).

3. Fonctions du microbiote intestinal

Participant à de nombreuses fonctions essentielles pour l'organisme, telles que la digestion, l'éducation du système immunitaire, le rôle de barrière, le microbiote intestinal est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière (O'Hara & Shanahan 2006). Il est à l'origine de la production de certaines enzymes absentes chez l'homme, utiles pour la digestion, il fermente également des substrats énergétiques non dégradés. En outre, il produit aussi des vitamines comme la biotine, appelée également B8 ou H, les vitamines K, B12, des acides biliaires secondaires et tertiaires ainsi que des hormones jouant un rôle dans le stockage des graisses (Walter & Ley 2011). L'ensemble des travaux conduits ces 15 dernières années comme par exemple, des expériences sur animaux axéniques (dépourvus de microbiote intestinal), a permis d'établir que le microbiote intestinal exerçait un rôle de première importance sur l'organisme entier et qu'il est indispensable à son bon fonctionnement (Smith *et al.*, 2007). Le microbiote intestinal possède à la fois des fonctions métabolique, trophique et protectrice (**Figure 3**).

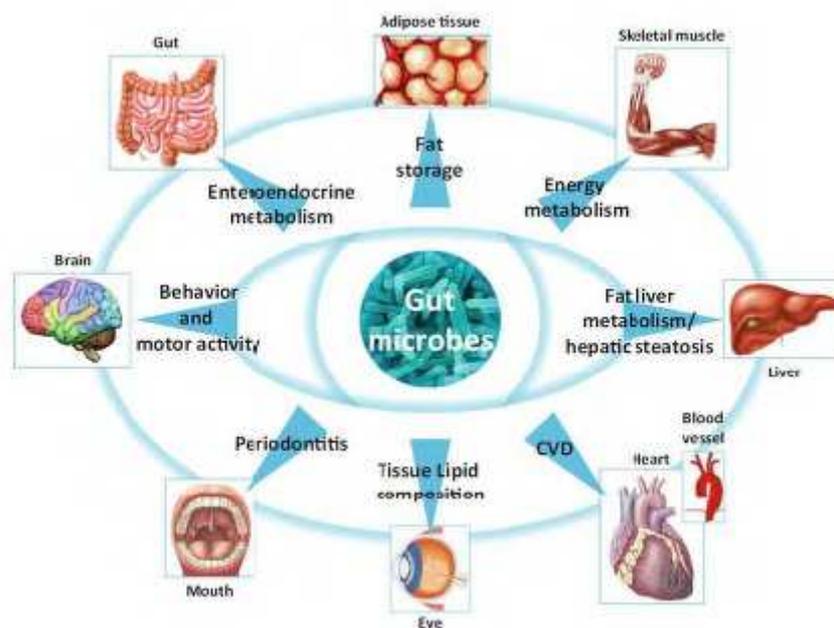


Figure 3 Fonctions physiologiques du microbiote intestinal (Burcelin *et al.*, 2011)

Au niveau métabolique, le microbiote participe à la dégradation de composés d'origine alimentaire comme les fibres que l'organisme est incapable de digérer lui-même, au développement du tube digestif ou encore l'absorption d'ions. Son rôle trophique se traduit par l'implication du microbiote dans la prolifération des cellules épithéliales, leur différenciation mais également dans le développement et l'homéostasie du système immunitaire (Guarner & Malagelada, 2003). Enfin, son rôle de protection est d'empêcher la colonisation et le développement de pathogènes au sein de l'intestin en produisant par exemple des bactériocines qui inhibent directement la croissance des pathogènes ou en consommant les nutriments qui ne seront plus disponibles pour les autres bactéries. Il stimule aussi les fonctions de barrière de défense de l'épithélium intestinal en exerçant une régulation positive de la couche de mucus, en induisant la production de molécules antimicrobiennes et

en régulant la sécrétion d'immunoglobulines A (IgA) par les cellules de l'hôte (Kamada *et al.*, 2013).

Production de molécules eucaryotes par le microbiote intestinal

Certaines bactéries intestinales sont aussi capables de produire des molécules eucaryotes telles que des neurotransmetteurs, comme la sérotonine (5HT) ou l'acide gamma amino-butyrrique (GABA), mais aussi des substances comme l'histamine et la tyramine (Fransioi *et al.*, 2015, Dhakal *et al.*, 2012). Ainsi ces micro-organismes participent à la variation locale de certaines molécules au niveau intestinal. Par exemple, au niveau du tube digestif, de nombreuses bactéries comme *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia spp.* et même des levures comme *Candida spp* produisent de la sérotonine. Qui plus est, le microbiote intestinal régule aussi directement la synthèse de cette substance au niveau des cellules eucaryotes (Yano *et al.*, 2015). La majorité des micro-organismes produisant du GABA sont des bactéries lactiques (LAB) parmi lesquelles *Enterococcus durans* (Siragusa *et al.*, 2007) mais le GABA peut également être produit par d'autres bactéries comme les *Pseudomonas* (Noe & Nickerson 1958). L'histamine, amine naturelle et molécule de signalisation du système immunitaire, de la peau, de l'estomac et du cerveau, est elle aussi, produite par des micro-organismes comme *Pseudomonas fluorescens*, *Enterococcus faecalis*, *Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* et *Clostridium perfringens* (Lonvaud-Funel 2001 ; Moon *et al.*, 2013).

4. Pathologies liées au microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est composé d'une population en équilibre dynamique s'autorégulant en permanence. Cet équilibre peut être fragile et affecté par les habitudes alimentaires, la

présence de germes infectieux, les antibiothérapies, un déficit immunitaire, le stress ou des facteurs environnementaux. Un déséquilibre peut alors se créer, on parle de dysbiose. La dysbiose est un déséquilibre du microbiote associé à des conséquences néfastes pour l'hôte, elle peut résulter de l'excès de micro-organismes délétères et/ou l'insuffisance relative de micro-organismes bénéfiques à l'hôte. Les phénomènes de résistance et de résilience permettent de s'opposer à la dysbiose et d'essayer de conserver l'écosystème en équilibre. Les maladies intestinales liées au microbiote sont pour la plupart caractérisées par une dysbiose et des réactions immunitaires non contrôlées. Les bactéries intestinales sont aujourd'hui suspectées d'être impliquées dans un certain nombre de pathologies intestinales comme les MICI (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin), le SII (syndrome de l'intestin irritable) et certains cancers digestifs, mais aussi des pathologies extra-intestinales comme l'autisme ou des affections cutanées (Sekirov *et al.*, 2010).

4.1 Pathologies intestinales

4.11 Microbiote et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent un certain nombre de pathologies. Elles sont toutes caractérisées par une réaction inflammatoire exacerbée contre les micro-organismes de l'intestin chez des sujets prédisposés génétiquement. Parmi ces pathologies, on répertorie la maladie de Crohn (MC), la rectocolite hémorragique (RCH) et le syndrome de l'intestin irritable (SII). Bien que les facteurs environnementaux à l'origine du déclenchement de ces pathologies soient indéniables, les facteurs génétiques et bactériens semblent aussi être très importants. Les analyses pangénomiques aux MICI ont donné lieu à l'identification d'un grand nombre de polymorphismes associées à ces maladies (Yau *et al.*, 2013). Parmi eux, des gènes impliqués dans la reconnaissance et l'élimination des micro-

organismes tels que *nod2/card15* (Olivares *et al.*, 2013 ;Li C & Kuemmerle, 2014). En termes de microbiote, dans les MICI, il a été mis en évidence une augmentation de la concentration bactérienne dans l'intestin par rapport aux personnes saines (Butel 2014 ; Guarner & Malagelada 2003). Ensuite, les caractéristiques de la dysbiose sont fonction de la pathologie concernée. Par exemple chez les patients Crohn, on note une baisse de la biodiversité globale des espèces qui composent leur microbiote ainsi qu'une réduction de la proportion du phylum des Firmicutes par rapport à des personnes saines. Finalement, une modification de la composition, de la quantité et de la biodiversité du microbiote est largement observée et étudiée au cours des MICI. Néanmoins, l'état des connaissances actuelles ne nous permet pas d'établir un lien de causalité direct entre l'inflammation intestinale caractéristique des MICI et la dysbiose. En effet, aucune corrélation n'a pu être établie entre dysbiose et survenue de l'inflammation intestinale et inversement. D'autre part, les études du microbiote intestinal des patients se heurtent à de nombreuses limites notamment en termes de facteurs de variations extrinsèques et intrinsèques qui peuvent eux-mêmes influencer transitoirement la flore des échantillons étudiés. Hormis les dysbioses observées, dans le contexte de la MC, l'isolement d'un certain nombre d'agents infectieux spécifiques et à priori responsables de la pathologie, a pu être réalisé (Danese *et al.*, 2004). Parmi les micro-organismes suspectés on retrouve : *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis*, *Cytomegalovirus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* Adherent-invasive (AIEC), *Pseudomonas maltophilia* et *Pseudomonas fluorescens* (Giaffer *et al.*, 1992 ; Swarbrick *et al.*, 1979 ; Mårdh *et al.*, 1980 ; Chiba *et al.*, 1998 ; Wei *et al.*, 2002 ; Rolhion N & Darfeuille-Michaud 2007 ; Xiong *et al.*, 2014 ; Brown *et al.*, 2015 ; Whorwell *et al.*, 1978).

4.12 Microbiote et syndrome de l'intestin irritable (SII)

L'implication du microbiote intestinal dans le syndrome de l'intestin irritable a été suspectée étant donné que cette pathologie advient souvent de manière brutale à la suite d'une gastroentérite ou d'une antibiothérapie. En effet, le microbiote semble lié aux caractéristiques physiopathologiques de cette maladie que sont : une forte colonisation bactérienne du grêle, des anomalies de fermentation, la présence importante de protéases bactériennes (El-Salhy 2015). D'autre part, l'hypothèse est soutenue par l'efficacité des probiotiques et de certains antibiotiques contre cette maladie. Des études métagénomiques ont également mis en évidence une dysbiose chez les patients avec une diminution des lactobacilles, une augmentation de *Veillonella spp*, et de *Ruminococcus productus* (Joly *et al.*, 2007; Salonen *et al.*, 2010).

4.13 Microbiote et syndrome du grêle court

C'est le syndrome de la complication de la résection intestinale. Il conduit à une diminution du transit intestinal et une baisse de l'absorption des nutriments. L'absence d'une partie de l'intestin perturbe le microbiote intestinal, entraînant une dysbiose et la métabolisation des lipides, des protéines et des glucides, se trouve alors limitée. Ce syndrome est caractérisé par une pullulation bactérienne au niveau de l'intestin grêle (Goulet & Joly 2010). Il a été montré que le microbiote des patients atteints du syndrome du grêle court est principalement composé de lactobacilles (Kaneko *et al.*, 1997). Citons également la présence notable de *Lactobacillus mucosa* chez les malades contrairement aux personnes saines (Bartholome *et al.* 2004). Par conséquent, des encéphalopathies lactiques peuvent alors survenir suite à une trop grande production d'acide lactique généré par l'élévation de micro-organismes acidorésistants (Bartholome *et al.* 2004).

4.14 Microbiote et cancers digestifs

Certains liens entre microbiote intestinal et cancer ont également pu être établis. Tout d'abord, dans le cadre de certains cancers coliques, on a pu constater qu'il existait des différences de composition du microbiote intestinal entre les personnes malades et les sujets sains (Marteau, 2013). D'autre part, certaines bactéries sont capables de produire des substances toxiques pour l'épithélium colique et potentiellement carcinogènes (Rajilic-Stojanovic, 2013). De nombreuses données montrent le rôle que peut jouer le microbiote intestinal dans la cancérogenèse. Citons par exemple, la toxine CDT (Cytolethal distending toxin) produite par de nombreuses espèces bactériennes à Gram négatif : *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Helicobacter pylori*. Guidi *et al.*, (2013) ont ainsi pu montrer que cette toxine est capable d'entraîner des dommages à l'ADN, participer à l'inflammation locale chronique et probablement être responsable de la survenue de cancers colorectaux et hépatiques. Il a également été démontré que la colibactine, une toxine produite par certaines souches d'*E. coli*, une fois en contact avec les cellules de la tumeur, induisait des dommages de l'ADN pouvant contribuer au cancer de deux façons : soit par l'accumulation de mutations, soit par l'induction d'une sénescence cellulaire. Si les cellules sénescents ne se multiplient plus, elles sécrètent des facteurs de croissance qui favorisent la multiplication des cellules cancéreuses n'ayant pas subies l'action toxique de la bactérie. Aujourd'hui au niveau médical, de petites molécules inhibitrices sont à l'étude et seraient capables de prévenir les effets génotoxiques et protumoraux de cette toxine bactérienne (Cougnoux *et al.*, 2015).

4.2 Pathologies extra-intestinales

4.21 Microbiote et syndromes métaboliques

Diabète de type II, stéatose hépatique, obésité sont des syndromes métaboliques caractérisés par une dysbiose et une inflammation à bas niveau. De nombreuses données sur l'animal font le lien entre endotoxémie et maladies métaboliques. En effet, des souris soumises à un régime riche en graisse, ou à une consommation d'alcool voient leur concentration plasmatique de lipopolysaccharide (LPS) augmenter (Tilg & Adolph 2015). Cette concentration élevée en LPS conduit à une inflammation des tissus adipeux, hépatiques et musculaires. L'inflammation tissulaire peut être réduite par une prise d'antibiotique ou ineffective dans les modèles de souris délétées du Toll like receptor 4 (TLR4). De plus, les patients obèses ont une concentration plasmatique de LPS plus élevée que les personnes contrôle. Cette concentration en LPS est directement corrélée au volume de graisse intra-abdominale et aux valeurs de l'hémoglobine glyquée (Hb1ac) (Burcelin *et al.*, 2011; Troseid *et al.*, 2013).

Diabète de type II

Chez les personnes diabétiques, le microbiote montre une réduction quantitative du phylum Firmicutes et du genre *Clostridium* ainsi qu'un déséquilibre du ratio Bacteroidetes/Firmicutes corrélé à la concentration plasmatique de glucose. (Burcelin *et al.*, 2011 ; Hartmann *et al.*, 2012). S'ajoutant à cette dysbiose, les bactéries peuvent aussi contribuer aux complications du diabète. En effet, les infections bactériennes concourent à la médiocre cicatrisation de l'ulcère du pied diabétique, qui est lié à une neuropathie diabétique et à des complications microvasculaires affectant un grand nombre de patients (Gardner *et al.*, 2008). De plus, des épisodes récidivants de diarrhée aqueuse sont l'une des complications digestives les plus fréquentes du diabète. Une étude a montré qu'une hyperprolifération bactérienne due à une

réduction de la motilité intestinale secondaire à une neuropathie diabétique est à l'origine de cette complication et qu'une antibiothérapie en améliorerait les manifestations cliniques (Beebe *et al.*, 1992).

Stéatose hépatique alcoolique

La stéatose hépatique alcoolique est caractérisée par la pénétration de cellules lipidiques à l'intérieur de la glande hépatique, la présence de ces lipides au niveau hépatique étant liée à une consommation excessive d'alcool. La dysbiose qui qualifie la stéatose hépatique alcoolique se traduit par une réduction importante de la variété et du nombre de *Lactobacilli* et d'une baisse quantitative des Bacteroidetes, Proteobacteria et Fusobacteria (Burcelin *et al.*, 2011; Hartmann *et al.*, 2012).

Obésité

Le microbiote des sujets obèses est peu diversifié et présente une baisse du ratio Bacteroidetes/Firmicutes, et une diminution du nombre de bactéries anti-inflammatoires telle que *Faecalibacterium prausnitzii*. Ceci suggère donc un rôle potentiel du microbiote intestinal dans l'obésité. Alors que le rapport Firmicutes/Bacteroidetes est de 10 Firmicutes pour 1 Bacteroidetes (10/1) chez un adulte sain, il est de (100/1) chez une personne obèse. De plus, lors d'étude chez l'homme, il a été constaté que lorsque des sujets obèses perdaient du poids sur une période de 12 mois, la proportion des Firmicutes se rapprochait de celle observée chez des sujets minces. Il reste cependant à déterminer si ces modifications de la composition du microbiote associées à l'obésité sont une cause ou une conséquence de la surcharge pondérale (Ley *et al.*, 2006, Tsai & Coyle 2009). Le microbiote intestinal joue cependant un rôle dans la prise de poids (Bäckhed *et al.*, 2004). En effet, il a été montré que des souris axéniques

soumises au même régime alimentaire que des souris conventionnelles ont une masse moins importante. Les souris conventionnelles grâce à leur microbiote seraient capables de digérer au moins en partie les fibres alimentaires et d'en extraire plus d'énergie que les souris axéniques. Une comparaison métagénomique des microbiotes «obèse» et «mince» a montré que les bactéries provenant des souris ob/ob contenaient des gènes codant pour des enzymes spécialisées dans la dégradation de polysaccharides non digestibles, par exemple : glucosidases, galactosidases, ainsi que pyruvate formate-lyase. Comparativement aux souris minces, la concentration des acides gras à chaînes courtes dans le contenu cæcal est plus élevée et la teneur en calories des fèces est plus basse chez les souris obèses, ce qui suggère que l'extraction de l'énergie à partir de l'alimentation est plus élevée chez ces animaux. La contribution quantitative des acides gras à chaînes courtes aux apports totaux en énergie nécessite cependant des évaluations supplémentaires avant de pouvoir conclure que le microbiote intestinal associé à l'obésité est une cause de celle-ci. Néanmoins, le microbiote intestinal aurait une influence sur le stockage des graisses que ce soit chez les animaux modèles ou chez l'homme (Keiman *et al.*, 2015). Il a été démontré que la population bactérienne intestinale des souris obèses est plus efficace en terme d'extraction des calories à partir de l'alimentation et de stimulation pour l'accumulation des graisses que le microbiote des souris minces (Turnbaugh *et al.*, 2006). Le transfert du microbiote de souris obèses (dont l'obésité a été induite par un régime spécifique ou bien par modification génétique) vers des souris axéniques a été suffisant pour stimuler des dysfonctionnements métaboliques ainsi qu'une augmentation de leurs tissus adipeux. De manière similaire, des échantillons fécaux de souris obèses adultes transplantés ont pu induire des phénotypes associés à l'obésité chez les souris receveuses via le microbiote intestinal. Turnbaugh *et al.*, (2008) ont aussi montré que l'alimentation de souris ex-axéniques ou conventionnelles mises à un régime de type occidental riche en lipides et en glucides induit une augmentation du rapport cæcal

Firmicutes/Bacteroidetes, qui devient alors similaire à celui déterminé chez la souris ob/ob. Cependant, contrairement au modèle ob/ob, l'augmentation des Firmicutes est due à la prolifération d'un seul clade bactérien, les Mollicutes. Il est intéressant de noter que le microbiote cœcal induit par le régime alimentaire occidental a d'avantage favorisé la survenue d'une obésité que celui retrouvé suite à un régime témoin après leur inoculation chez la souris axénique (Turnbaugh *et al.*, 2008)

4.22 Autres pathologies

Microbiote et troubles cardiovasculaires

Le microbiote intestinal serait impliqué dans la survenue de désordres cardiovasculaires. D'une part, une endotoxémie au LPS élevée serait liée à la survenue de problèmes vasculaires (Burcelin *et al.*, 2011). D'autre part, une signature microbienne est observée dans 50% des plaques d'athérosclérose des sujets. Les complications liées aux plaques d'athérosclérose sont fréquemment corrélées à une augmentation de triméthylamine N-oxyde produit par le métabolisme du microbiote. En fait, il s'avère que l'équilibre alimentaire est lié à ces phénomènes car la L-carnitine (présente dans la viande rouge), la choline et la phosphatidylcholine (présente dans les œufs) peuvent être transformées en triméthylamine (TMA) par le microbiote intestinal. Le TMA peut lui-même être oxydé secondairement par le foie en N-oxyde de triméthylamine (TMAO) qui affecterait alors le métabolisme du cholestérol et favoriserait le développement de l'athérosclérose.

Microbiote et eczéma/asthme

Le microbiote intestinal pourrait aussi participer aux affections de type eczéma et asthme. En effet, le microbiote intestinal des personnes souffrant d'allergie est caractérisé par une baisse des Bacteroidetes, lactobacilles et bifidobacteries, tandis que la proportion de *Clostridium difficile* augmente. De plus, la recrudescence de ces problèmes semblent liée à une baisse de l'exposition aux micro-organismes notamment à des stades précoces de la vie (Ly *et al.*, 2011). En effet, Abrahamsson *et al.*, (2013) ont pu mettre en évidence que la faible diversité du microbiote intestinal dans la petite enfance précédait l'asthme à l'âge scolaire.

Pathologies cérébrales

De manière surprenante et intéressante, des maladies affectant le comportement et donc les fonctions cérébrales ont pu être considérées comme impactées par le microbiote intestinal. La recherche dans ce domaine en est encore aux étapes préliminaires, où des dysbioses ont pu être constatées mais les mécanismes conduisant à celles-ci ainsi qu'à la pathologie elle-même n'ont pas encore été élucidés.

Microbiote et dépression/anxiété/troubles comportementaux

Plusieurs études chez l'animal ont contribué à renforcer le concept d'un axe intestin-cerveau (De Palma *et al.*, 2014) qui permettrait d'établir un lien potentiel entre bactéries intestinales et fonctions cognitives (**Figure 4**). En effet, au niveau intestinal une myriade de neurotransmetteurs et neuropeptides sont délivrés par le système entéro-endocrinien, le plus grand système endocrinien de l'organisme. Ainsi ces substances sont en contact avec le microbiote intestinal mais leurs effets sur les micro-organismes est peu connu. Des

expériences ont pu montrer que le transfert du microbiote intestinal de souches de souris « agressives » à des souris dites « pacifistes », engendre chez ces dernières, un comportement agressif.

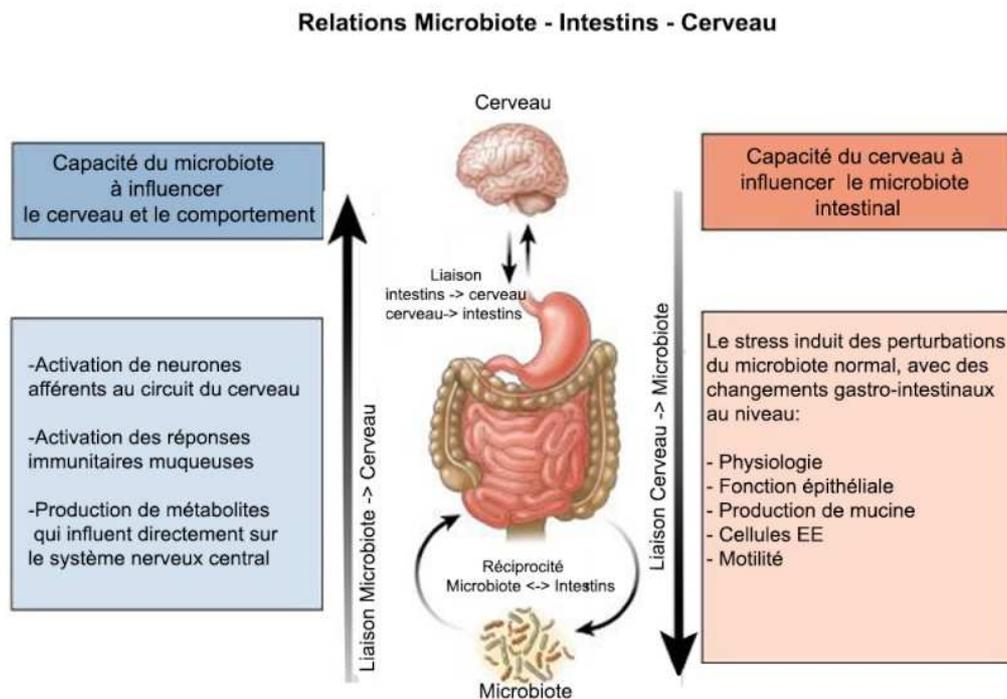


Figure 4 Relations microbiote-intestins-cerveau (D'après crohn.superforum.fr)

Inversement, le cerveau peut aussi moduler le microbiote intestinal. Park *et al.*, (2013) ont utilisé un modèle de dépression chez la souris par ablation chirurgicale des bulbes olfactifs. Chez ces souris rendues anxieuses et très sensibles au stress, ils ont pu observer une altération du microbiote intestinal de même qu'une augmentation du taux intracérébral de CRF (Corticotropin-releasing factor), un neuromédiateur du stress libéré par l'hypothalamus. Il a été démontré que l'infection de souris axéniques par des bactéries pathogènes entraînait des comportements anxieux des souris et que ces mêmes souris récupéraient un comportement moins anxieux lorsque leur flore est reconstituée. Des études ont également été menées chez l'homme. Des volontaires en bonne santé ont ingéré des probiotiques à la suite de quoi on a pu constater une diminution de leur anxiété et de leur dépression en comparaison avec un

placebo. Les mécanismes liés à cet effet n'ont pas encore été élucidés mais Bravo *et al.*, (2011) suggèrent que les micro-organismes pourraient avoir un impact sur le comportement via le nerf vague et l'expression du GABA dans le cerveau.

Microbiote et anorexie

L'anorexie mentale est un trouble du comportement alimentaire essentiellement féminin, qui entraîne une privation alimentaire stricte et volontaire pendant plusieurs mois, voire plusieurs années, et une perte de poids sévère en conséquence d'un apport énergétique insuffisant (Reyes-Haro *et al.*, 2015). L'anorexie est très souvent associée à des troubles psychologiques. Très peu d'informations sont disponibles concernant la composition du microbiote intestinal des patients anorexiques. Cependant, des éléments mettent en évidence que le microbiote intestinal régule certains points clefs liés à l'anorexie tels que le métabolisme énergétique, la régulation de la masse corporelle comme cité précédemment, ainsi que l'anxiété et la dépression (Kleiman *et al.*, 2015). Armougom *et al.*, (2009) ont réalisé une étude moléculaire sur le microbiote intestinal de patients anorexiques et ont pu montrer que ces personnes présentent un profil similaire au groupe contrôle de patients minces concernant les Firmicutes et les Bacteroidetes mais ils ont constaté une augmentation significative de *Methanobrevibacter smithii* chez les patients anorexiques. Une autre étude a permis d'identifier 11 nouvelles espèces bactériennes chez des patients anorexiques, grâce à la mise au point de façon empirique, de milieux de culture constitués à partir de produits issus des habitudes alimentaires du patient : la banane, le camembert et le yaourt (Pfleiderer *et al.*, 2013).

Microbiote et autisme

Selon la classification internationale des maladies de l'OMS (CIM 10), l'autisme est un trouble envahissant du développement qui affecte les fonctions cérébrales, il a été décrit pour la première fois par Kanner en 1943. L'autisme affecte le fonctionnement du cerveau, du système immunitaire et altère les capacités de reconnaissance des expressions, des codes sociaux et affectifs et génère hypersensibilité émotionnelle et troubles du comportement. L'autisme est aussi caractérisé par des troubles gastro-intestinaux. En 75 ans la prévalence de ce trouble est passée de 1 sur 5000 individus à 1 sur 68 individus. Bien que la piste des facteurs génétiques ait été étudiée, la cause de cette affection n'est pas encore clairement définie (Buie *et al.*, 2010). Récemment, des études ont mis en évidence l'implication potentielle du microbiote intestinal dans l'autisme. Des anomalies dans la composition du microbiote de personnes autistes ont pu être constatées (Williams *et al.*, 2012; Finegold *et al.*, 2010). Un bilan sur le sujet a été fait par Buie *et al.*, (2010), qui a pu mettre en évidence une augmentation des bactéries du genre *Clostridium* chez les personnes atteintes par rapport aux personnes non affectées (Ekiel *et al.*, 2010 ; Keşli *et al.*, 2014). Ainsi les altérations du microbiote intestinal pourraient contribuer au développement de l'autisme. Aujourd'hui, il est donc envisagé d'utiliser des antibiotiques pour soigner ces troubles (Sandler *et al.*, 2000).

5. Notion de pathobionte intestinal

L'intestin est aussi considéré comme un réservoir de bactéries pathogènes opportunistes appelées pathobiontes. Ces bactéries commensales d'origine humaine sont présentes à un niveau sous-dominant dans le microbiote intestinal et peuvent devenir pathogènes dans des conditions particulières impliquant une déficience immunitaire de l'hôte et une dysbiose sous l'influence de facteurs environnementaux tels que stress, alimentation, antibiotiques,

mauvaise hygiène... Parmi les pathobiontes identifiés et étudiés ces dernières années, *C. difficile*, les bactéries filamenteuses segmentées (SFB), *E. faecalis* et *E faecium*, en particulier les souches résistantes à la vancomycine (ERV) ont été impliquées dans des pathologies humaines (Ivanov *et al.*, 2009; Rupnik *et al.*, 2009 ; Ubeda *et al.*, 2013 ; Kamada *et al.*, 2013). La virulence de ces pathobiontes se traduit par exemple par l'induction exacerbée de réponse proinflammatoire de l'organisme et/ou par la traversée de la barrière intestinale par ces bactéries. Les mécanismes moléculaires et cellulaires des infections par les pathobiontes sont encore mal compris (Kamada *et al.*, 2013). D'autre part, des bactéries comme *Pseudomonas*, également retrouvée à bas niveau dans l'intestin, ont pu démontrer leurs potentiels de virulence à l'encontre des entérocytes (Madi *et al.*, 2010) et leurs réponses pro-virulentes face à certaines molécules immunitaires présentes au niveau intestinal (Madi *et al.*, 2013).

Chapitre II

Focus sur une bactérie à Gram négatif du microbiote intestinal :

Pseudomonas

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, droits ou légèrement incurvés. Le plus souvent mobiles, elles possèdent un ou plusieurs flagelles polaires (**Figure 5**).

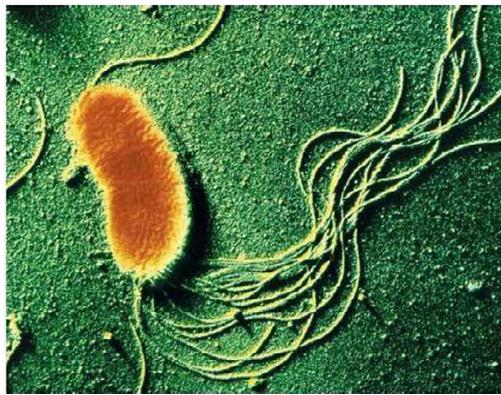


Figure 5 *P. fluorescens* observée en microscopie électronique (D'après web.mst.edu)

Les *Pseudomonas* ont un grand génome dont la plasticité leur donne une importante capacité d'adaptation, comme c'est le cas pour *P. aeruginosa* PAO1 avec 6,3 Mpb (Stover *et al.*, 2000). Ces bactéries appartiennent au phylum des Protéobactéria, la classe des gammaproteobacteria et l'ordre des *Pseudomonadales*. Les *Pseudomonas* possèdent un type respiratoire aérobie, un métabolisme chimio-organotrophe, oxydatif et sont capables d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme source de carbone et d'énergie, notamment des composés aromatiques, halogénés et des résidus organiques toxiques (Palleroni *et al.*, 1984). Elles peuvent aussi se développer en utilisant une voie respiratoire anaérobie (nitrates) (Arat *et al.*, 2015). Les *Pseudomonas* sont donc considérées comme des bactéries peu exigeantes, ce qui explique au moins en partie leur capacité d'adaptation à des niches écologiques très diverses et donc leur caractère ubiquitaire. Certaines souches sont associées à la protection de

la sphère végétale alors que d'autres causent des maladies aux plantes. Parmi les *Pseudomonas*, alors que certaines bactéries sont utilisées en bioremédiation, d'autres s'avèrent être des pathogènes pour l'homme dont certaines développent des résistances aux antibiotiques (Figure 6).

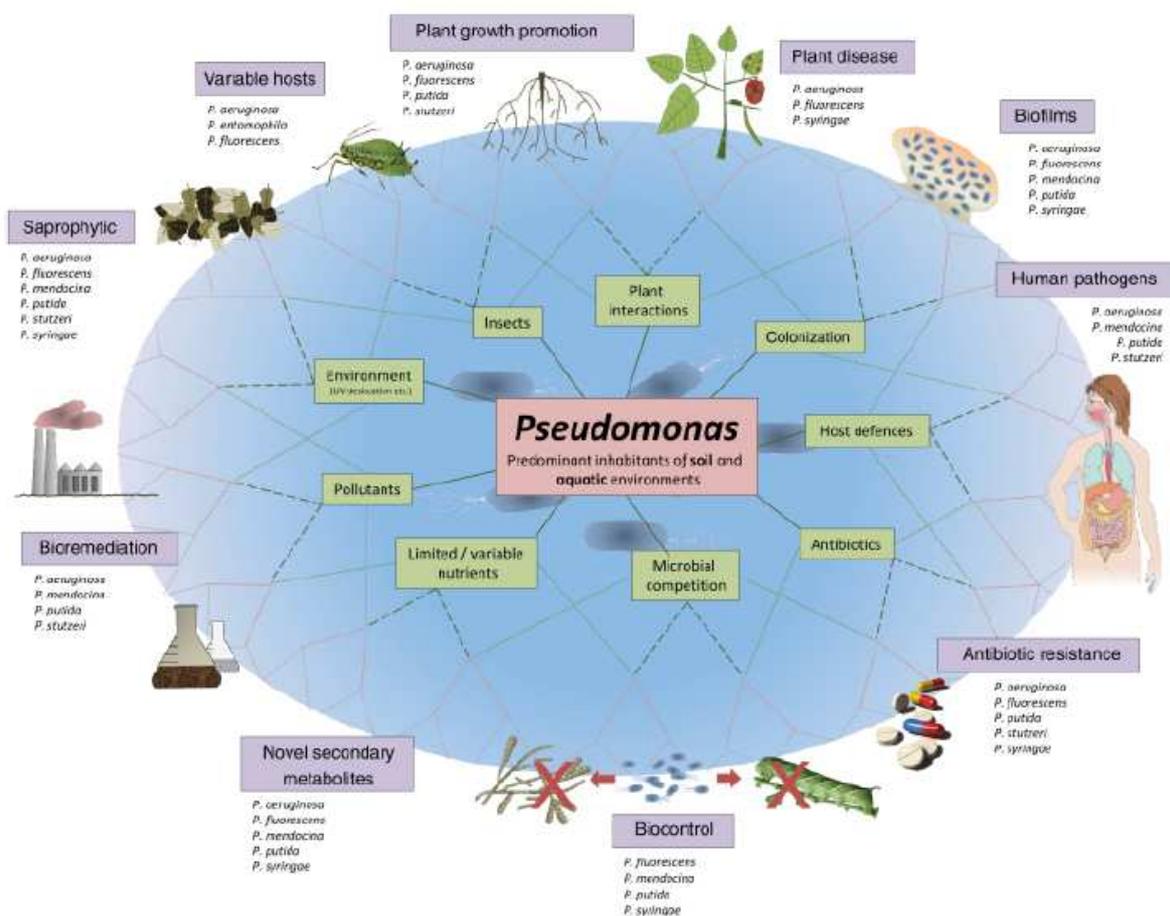


Figure 6 *Pseudomonas* : des bactéries ubiquitaires (Silby *et al.*, 2011)

1. Taxonomie

Avec l'émergence des techniques d'analyse moléculaire, le genre *Pseudomonas* a fait l'objet de nombreux remaniements. Des recherches d'homologies de séquences génomiques par techniques d'hybridations ADN-ADN et ADN-ARN, ainsi que le séquençage de marqueurs taxonomiques tel que l'ARNr 16S ont conduit à une réorganisation de la taxonomie au sein du groupe des *Pseudomonas* et genres apparentés (Anzai *et al.*, 2000, Bodilis *et al.*, 2012) (Figure 7). Ces reclassements ont mis en évidence un groupe génétiquement hétérogène et divisible en cinq sous-groupes d'ARN distincts. On distingue donc le genre *Pseudomonas sensu stricto* appartenant au groupe ARN I, comprenant plus d'une centaine d'espèces différentes, des autres genres *Pseudomonas sensu lato* comprenant les groupes ARN II à V, regroupant les genres apparentés comme *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Brevundimonas*, ou *Burkholderia*. Le genre *Pseudomonas sensu stricto* est lui-même sous divisé en deux groupes: les *Pseudomonas spp.* fluorescents (tels que *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. mosselii*, *P. putida* ou *P. syringae*), et les *Pseudomonas spp.* non fluorescents (comme *P. alcaligenes*, *P. fragi* ou *P. stutzeri*). Cette distinction, qui n'a pas officiellement de valeur taxonomique, se base sur la capacité du germe à produire ou non un pigment spécifique fluorescent sous UV, la pyoverdine (Meyer *et al.*, 1996). Malgré l'hétérogénéité au sein des *Pseudomonas*, ces bactéries possèdent un certain nombre de traits phénotypiques communs qui permettent leur identification par des caractères biochimiques, l'aspect macroscopique des colonies, l'observation microscopique, et leurs activités enzymatiques intervenant dans le métabolisme glucidique et protéique. D'autre part, on classe aussi ces bactéries en fonction de leur tolérance thermique en distinguant les souches psychrotrophes des souches mésophiles, ce qui reflète leurs capacités à se développer ou non à certaines températures.

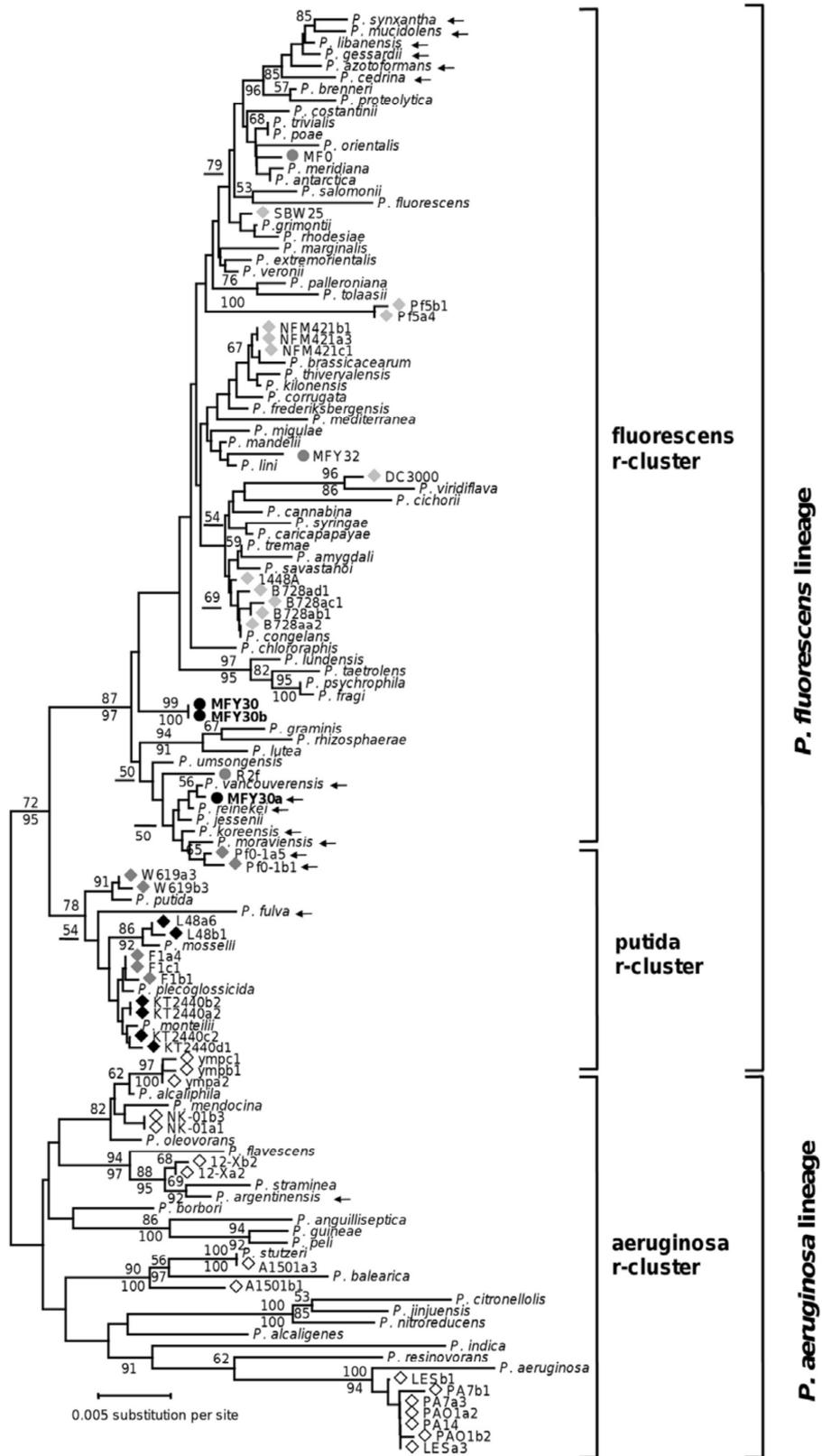


Figure 7 Arbre phylogénétique des *Pseudomonas* basé sur la comparaison de leurs ARNr16S

(Bodilis *et al.*, 2012)

2. L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* et pathologies associées

P. aeruginosa ou bacille pyocyanique (Byng *et al.*, 1979) est l'espèce type du genre *Pseudomonas*. Retrouvée notamment dans l'intestin parmi les bactéries commensales, *P. aeruginosa* possède un caractère pathogène opportuniste non négligeable lié à son arsenal de facteurs de virulence et sa grande capacité d'adaptation. C'est une bactérie mésophile dont la température optimale de croissance est de 37°C mais reste capable de croître jusqu'à 41°C. Retrouvée dans la rhizosphère, certaines souches possèdent parfois des vertus de protection phytosanitaire en inhibant la croissance de pathogènes de végétaux et en favorisant ainsi le développement des plantes (Bano & Musarrat, 2003; Ayyadurai *et al.*, 2006; Minaxi & Saxena, 2010). En France, *P. aeruginosa* est la troisième cause de la survenue de maladies nosocomiales après *E. coli* et *S. aureus* (InVS 2007) et cette bactérie est résistante à de nombreux antibiotiques. Son pouvoir de résistance aux antimicrobiens est notamment lié à sa capacité à former des biofilms sur les matériels médicaux par exemple. Bactérie très étudiée dans le cadre de la mucoviscidose et des maladies nosocomiales, le potentiel pathogène de *P. aeruginosa* ne s'arrête cependant pas à l'homme mais peut également toucher les animaux ainsi que les plantes (El-Sukhon, 2002; Sela *et al.*, 2007). *P. aeruginosa* possède un pouvoir pathogène envers un large spectre d'hôtes allant des végétaux, aux modèles animaux comme *Caenorhabditis elegans* (Feinbaum *et al.*, 2012), *Drosophila melanogaster* (Mulcahy *et al.*, 2011), *Galleria mellonella* (Miyata *et al.*, 2003) mais aussi *Dictyostelium discoideum* (Cosson *et al.*, 2002). Cette bactérie peut également toucher les vertébrés supérieurs tels que moutons, chèvres ou bovins (El-Sukhon, 2002; Sela *et al.*, 2007). Chez l'homme, c'est auprès de personnes ayant un système immunitaire affaibli suite à une pathologie, qu'elle sera capable de provoquer et d'exprimer son pouvoir pathogène. En effet, les personnes atteintes de SIDA, de cancers, de diabète et de mucoviscidose sont des cibles privilégiées de ce germe. *P. aeruginosa* est une bactérie qui sévit souvent au niveau pulmonaire comme c'est le cas

chez les personnes atteintes de mucoviscidose chez qui elle participe à l'aggravation de l'état respiratoire des patients. En effet, de par son importante capacité d'adaptation, d'adhérence et de communication elle est en mesure de coloniser précocement les nourrissons et enfants atteints de mucoviscidose. Ces facteurs de virulence jouent un rôle majeur dans l'adhérence aux cellules épithéliales respiratoires et dans la survenue d'épisodes infectieux. Parmi ces facteurs, ceux responsables du passage de la colonisation à l'infection chronique ne sont pas encore tous élucidés. Pourtant on sait aujourd'hui que le système de sécrétion du type III (T3SS) et le quorum sensing (QS) ont un rôle indéniable. Le QS interviendrait dans la maturation du biofilm, responsable du phénotype « muqueux » associé à une dégradation de la fonction respiratoire (Lavery *et al.*, 2014). Bien que l'activité de ce germe au niveau pulmonaire soit la mieux documentée, on sait aussi que cette bactérie est parfois impliquée dans des maladies liées au niveau cutané (Mull *et al.*, 2000; Silvestre & Betloch, 1999), oculaire, de la sphère ORL mais aussi dans certaines endocardites (Reinsch *et al.*, 2008) méningites, bactériémies ou septicémies (Bodey *et al.*, 1983; Van Delden, 2007). Son spectre d'action ne s'arrête pas là et on la retrouve même parfois dans des infections au niveau des systèmes nerveux central (Chuang *et al.*, 1999), urinaire, voire gastro-intestinale. D'autre part des études récentes suggèrent une corrélation entre des souches de *P. aeruginosa* intestinales et cancer. Ainsi Markou *et al.*, (2014) ont proposé un modèle dans lequel ils mettent en évidence la prévalence de *P. aeruginosa* chez certaines personnes atteintes de cancer digestif. Les conditions de stress pourraient favoriser la croissance, la dissémination et la virulence de la bactérie. Qui plus est, ils constatent également que *P. aeruginosa* promeut les phénotypes relatifs au cancer de l'épithélium intestinal (Okuda *et al.*, 2011). En effet, il est connu que *P. aeruginosa* est capable de transloquer de manière extra-luminale. Lors de cette translocation, les bactéries et les produits qu'elles secrètent traversent la barrière intestinale en passant entre ou au travers des cellules de l'épithélium intestinal causant une infection ainsi

qu'une inflammation massive (Alexander *et al.*, 1990 ; Papoff *et al.*, 2012). Les septicémies et la mortalité chez les personnes immuno-compromises peuvent être le résultat de la présence de souches de *P. aeruginosa* hautement virulentes dans le tractus intestinal. La gravité de la pathologie pourrait être dépendante de la capacité des pathogènes à adhérer à la barrière intestinale (Marshall *et al.*, 1993 ; Alverdy *et al.*, 2000 ; Osmon *et al.*, 2004 ; Okuda *et al.*, 2010).

3. L'espèce *Pseudomonas fluorescens* et pathologies associées

P. fluorescens a été décrite par Migula en 1895. Elle est généralement considérée comme une bactérie appartenant à la rhizosphère et pouvant être isolée des sols et des environnements aquatiques (Palleroni *et al.*, 1984). Bien que *P. fluorescens* soit une bactérie majoritairement saprophyte, elle a pu être récemment isolée de l'intestin chez l'homme et peut donc être considérée comme appartenant au microbiote intestinal des mammifères (Scales *et al.*, 2014). Ses relations avec l'eucaryote peuvent être bénéfiques dans certains cas. En effet, de nombreuses souches de *P. fluorescens* sont connues pour améliorer la croissance des plantes en luttant contre les micro-organismes pathogènes (Haas & Defago, 2005). Cependant, quelques souches de *P. fluorescens* ont montré un potentiel pathogène envers des animaux, tels que les oiseaux et les poissons (Cornelis & Matthijs 2002; Hinz *et al.*, 1992; Jackson & Phillips, 1996; Sakai *et al.*, 1989). Récemment il a été démontré que chez *P. fluorescens* TSS est un pathogène causant une forte mortalité chez les poissons, les conditions en fer affectant l'expression de ces gènes en particulier ceux intervenant dans sa capacité à infecter son hôte (Sun YY & Sun L, 2015). De plus, son implication dans plusieurs pathologies humaines est fortement suspectée, notamment dans la MC (Wei *et al.*, 2002). Considérée comme une bactérie psychrotrophe avec une température optimale de croissance entre 25 et 30°C, des souches cliniques de *P. fluorescens*, capables de se multiplier à 37°C, ont pourtant pu être

isolées comme *P. fluorescens* MFN1032 (Rossignol *et al.*, 2008, 2009). *P. fluorescens* possède une grande capacité d'adaptation, et au même titre qu'*Helicobacter pylori*, sa présence dans l'estomac a récemment pu être rapportée (Patel *et al.*, 2013), ce qui montre bien le potentiel d'adaptation de cette bactérie en fonction de son environnement et de son hôte. *P. fluorescens* est considérée comme l'espèce la moins virulente du groupe des *Pseudomonas* fluorescents. Certaines souches ont même été brevetées à des fins de protection phytosanitaire dans la mesure où cette bactérie est capable d'inhiber la croissance de nombreux micro-organismes pathogènes (Haas & Defago, 2005). Malgré des cas de pathogénie envers les plantes (Rudrappa *et al.*, 2008) et les animaux (Hinz *et al.*, 1992; Jackson & Phillips, 1996; Sakai *et al.*, 1989), *P. fluorescens* n'est généralement pas considérée comme un pathogène eucaryote potentiel. Cependant, tout comme *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* peut se comporter comme une bactérie opportuniste et être à l'origine d'infection au niveau de différents organes chez des personnes ayant un système immunitaire affaibli (Burgos *et al.*, 1996; Pasargiklian *et al.*, 1996 ; Yamamoto *et al.*, 1991). Qui plus est, les contacts entre *P. fluorescens* et l'Homme sont susceptibles d'être particulièrement nombreux. En effet, la bactérie est retrouvée dans l'eau destinée à la consommation (Payment *et al.*, 1994), dans l'eau de mer (Thavasi *et al.*, 2007) et même dans les piscines hydrothermales fréquentées par l'Homme (Papadopoulou *et al.*, 2008). D'autre part, *P. fluorescens* a pu être associée à des infections urinaires (Osawa *et al.*, 2002). Cette bactérie appartient aussi à la flore d'altération des aliments (Bornert, 2000), les températures de conservation des denrées convenant à sa nature psychrotrophe. Une raison qui conduit souvent à ne pas considérer cette espèce comme potentiellement pathogène est son caractère typiquement psychrotrophe avec une température maximale de croissance de l'ordre de 32°C. Il a donc longtemps été admis que *P. fluorescens* est incapable de se développer à température physiologique humaine. Cependant, un grand nombre d'accidents transfusionnels dus à l'injection de culots sanguins contaminés par *P. fluorescens* ont été

rapportés, et ces accidents ont été à l'origine de bactériémies mortelles (Puckett *et al.*, 1992). Les origines des contaminations sont des bactéries présentes sur la peau insuffisamment désinfectée des donneurs (Puckett *et al.*, 1992) ou du matériel contaminé. La bactérie ayant alors pu se développer à la température de conservation des culots et provoquer ainsi l'incident transfusionnel. De très nombreux cas d'infections dues à l'utilisation de matériel médical contaminé par *P. fluorescens* ont aussi été rapportés (Hsueh *et al.*, 1998), (CDC 2005, CDC 2006). On peut noter en particulier le cas des seringues héparinées contaminées par *P. fluorescens* qui ayant servies à injecter des produits au travers des chambres d'injections sous-cutanées de patients atteints de cancers. Les bactéries ainsi injectées avaient formé un biofilm à l'intérieur de ces chambres et au fil de la croissance de ce dernier, une partie de ces bactéries avaient été libérées dans la circulation sanguine provoquant des bactériémies (Hsueh *et al.*, 1998), (CDC 2005, CDC 2006). Ce cas indique donc clairement que *P. fluorescens* est capable de survivre à 37°C et même de s'organiser en biofilm. En dehors de ces cas cliniques, des études rapportent l'implication de *P. fluorescens* dans des maladies pulmonaires professionnelles. Des ouvriers travaillant dans le milieu métallurgique utilisant de l'eau à haute pression pour la découpe de matériaux ont déclaré des symptômes respiratoires. Les analyses réalisées sur les ouvriers ont montré l'implication d'une bactérie appartenant au genre *Pseudomonas*, et les prélèvements de l'air environnant ont permis d'identifier une souche de *P. fluorescens* (Fishwick *et al.*, 2005). Des cas similaires dans le même milieu professionnel avaient déjà été rapportés en 1995 (Bernstein *et al.*, 1995) et des études réalisées en 2005 sur l'air intérieur ont montré un fort pouvoir inflammatoire et cytotoxique de cette bactérie lorsqu'elle est inhalée régulièrement (Hirvonen *et al.*, 2005; Huttunen *et al.*, 2003). Si *P. fluorescens* a pu être à l'origine d'infections pulmonaires et systémiques, elle possède également des propriétés lui permettant de se lier aux cellules nerveuses et d'affecter leur physiologie (Picot *et al.*, 2001). Au niveau intestinal, Madi *et al.*, (2010) ont montré que

P. fluorescens est capable d'adhérer aux cellules épithéliales, et qu'elle possède un pouvoir cytotoxique et proinflammatoire envers ces cellules. Par ailleurs, des anticorps anti I2, antigène microbien hautement spécifique à *P. fluorescens*, ont été retrouvés dans les sérums de 54% des cas de patients atteints de la MC contre 5% des personnes saines (Nakamura *et al.*, 2003 ; Wei *et al.*, 2002). L'antigène I2 a été associé aux lésions du colon dans la MC (Sutton *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2002, Xiong *et al.*, 2014). De plus, des études immunologiques chez la souris ont montré que la protéine recombinante I2 possède une activité superantigénique vis à vis des cellules T (Wei *et al.*, 2002). L'implication de *P. fluorescens* dans la MC est aussi argumentée par des travaux épidémiologiques qui associent l'augmentation du nombre de patients atteints de cette maladie aux changements des pratiques alimentaires passant par un stockage au froid des aliments, suggérant ainsi un rôle déterminant d'un germe capable de se développer à basse température et de s'adapter par la suite à la température physiologique de l'Homme (Forbes & Kalantzis, 2006; Hugot *et al.*, 2003). Ainsi aujourd'hui on sait que les *Pseudomonas* sont des bactéries ayant de grandes capacités d'adaptation et qu'elles sont ubiquitaires ; retrouvées également au niveau intestinal.

4. Facteurs de virulence chez *Pseudomonas*

Les facteurs de virulence peuvent être classés en deux grands groupes : les facteurs de virulence membranaires et les facteurs de virulence sécrétés. *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* partagent un certain nombre de facteurs de virulence en commun bien que leurs formes puissent varier entre ces deux espèces (Figure 8).

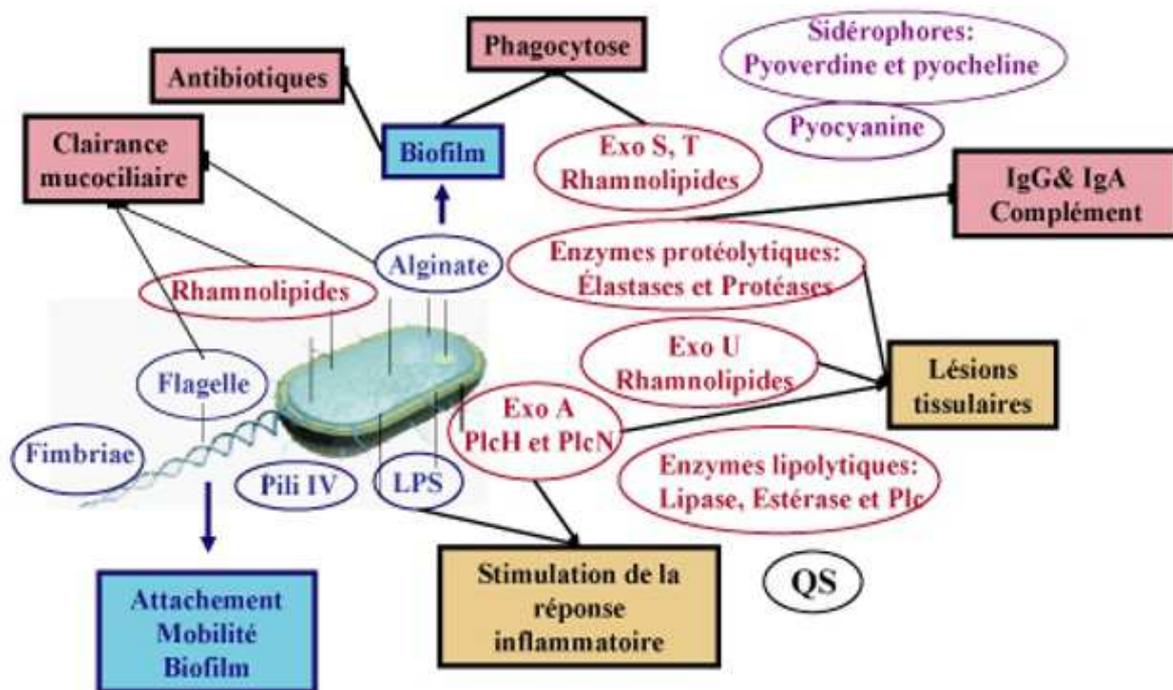


Figure 8 Facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*

4.1 Facteurs de virulence membranaires

4.1.1 Le lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS est une endotoxine majeure dont sont dotées les bactéries à Gram négatif. Il joue un rôle important dans le pouvoir pathogène des bactéries et possède des propriétés antigéniques. Le LPS est composé de trois parties : une région polysaccharidique très variable (l'antigène O), un coeur oligosaccharidique peu variable (core) qui possède un sucre spécifique le 3-

Deoxy-d-manno-octulosonic acid ou KDO et une région lipidique : le lipide A qui est ancré dans le cœur hydrophobe de la membrane (Figure 9) Cette dernière région est aussi la moins variable au sein d'une même espèce bactérienne. L'antigène O quant à lui, est en contact direct avec les cellules hôtes et joue donc un rôle clef dans la réponse inflammatoire. Il est également impliqué dans l'échappement au système immunitaire, en particulier à la phagocytose chez les bactéries à Gram négatif (Saldias *et al.*, 2009).

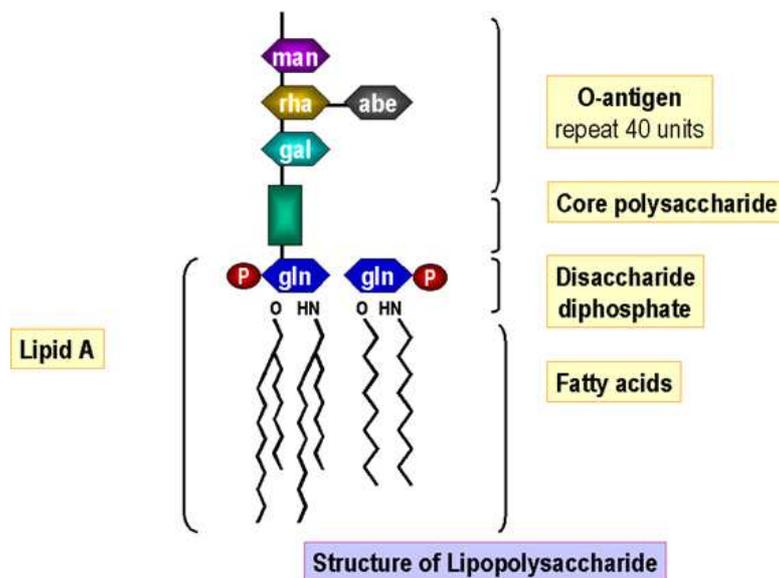


Figure 9 Structure du lipopolysaccharide (d'après microbeonline.com)

L'action toxique du LPS peut advenir suite à sa libération après une autolyse bactérienne ou à l'action d'antibiotiques. De plus, il peut également être libéré dans le microenvironnement via des vésicules sécrétées (Nakamura *et al.*, 2008). S'il est relargué en très grande quantité il peut entraîner des chocs septiques (Rosenfeld & Shai 2006). Si on compare les propriétés physico-chimiques (polarité, fragmentation, masse) du LPS de *P. fluorescens* avec celui de *P. aeruginosa*, elles diffèrent remarquablement (Picot *et al.*, 2003). Cependant la cytotoxicité du LPS chez *P. fluorescens* a pu être comparée à celle des cyanobactéries ainsi qu'à celle de *P. aeruginosa* (Barthe *et al.*, 1988, Mezghani-Abdelmoula *et al.*, 2004 ; Picot *et al.*, 2004 ; Veron *et al.*, 2008). Picot *et al.*, (2004) ont démontré que *P. fluorescens* exprime

simultanément plusieurs formes de LPS et que leurs compositions ainsi que leurs pouvoirs cytotoxiques varient fortement en fonction de la température de croissance d'origine de la souche. Ils ont également pu mettre en évidence que le LPS de *P. fluorescens* est capable de provoquer la mort des cellules nerveuses par apoptose et nécrose. Le LPS de *P. aeruginosa* a pu être relié à l'agressivité de cette bactérie envers des patients atteints de mucoviscidose. En effet, la protéine CFTR, située au niveau de la membrane plasmique des cellules épithéliales, constitue un site de liaison pour le LPS. Chez un individu sain, le LPS lié à la protéine est internalisé au sein de l'épithélium respiratoire afin d'y être détruit par le système immunitaire. Cependant, chez une personne atteinte de mucoviscidose, l'organisme présente une grande difficulté à éradiquer l'infection causée par *P. aeruginosa*. Par ailleurs, *P. aeruginosa* posséderait deux types de LPS impliqués dans l'adhésion de la bactérie à des surfaces hydrophiles ou hydrophobes et dont l'expression relative serait sous contrôle environnemental (Goldberg *et al.*, 1996).

4.12 Les systèmes de sécrétions

Les systèmes de sécrétions (SST) bactériens sont des ultrastructures ayant pour rôle le transport de toxines et d'effecteurs du cytoplasme bactérien vers le milieu extérieur ou vers le cytoplasme d'une cellule cible. Six types de systèmes de sécrétion ont pu être identifiés chez les bactéries (Figure 10). La présence de chacun d'entre eux a pu être mise en évidence chez des souches de *P. aeruginosa* mis à part le système de sécrétion de type IV (T4SS).

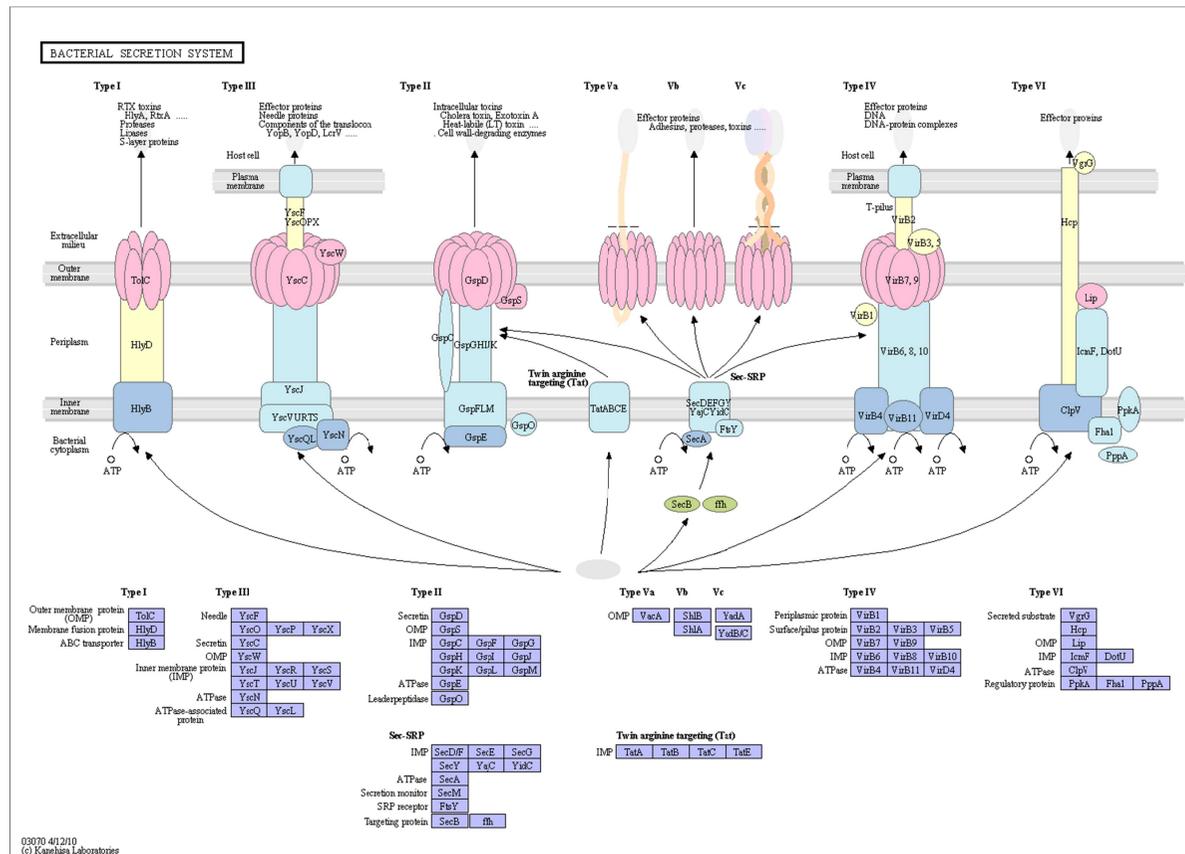


Figure 10 Les 6 systèmes de sécrétion bactériens

(D'après http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko03070)

En revanche, la plupart des souches de *P. fluorescens* ne posséderaient pas de SST comme c'est le cas pour PfO-1, bactérie isolée de la rhizosphère, qui a un mode de vie saprophyte. Cependant des souches de *P. fluorescens* telles que KD et SBW25 participant à la protection de certaines plantes contre les parasites fongiques, ont un SST (Preston *et al.*, 2001; Rezzonico *et al.*, 2005). *P. fluorescens* MFE01 est une bactérie environnementale mucoïde et possède un système de sécrétion de type VI (T6SS), Decoin *et al.*, (2015) ont pu établir un lien entre le T6SS et deux caractères de cette souche : sa mobilité et son profil mucoïde. Ces données appuient sur l'importance des systèmes de sécrétion dans l'adaptation bactérienne et son fitness (Decoin *et al.*, 2014). Ainsi sous les pressions générées par l'environnement, certaines bactéries peuvent acquérir un SST et certains facteurs de virulence afin de pouvoir passer d'un état saprophyte à un état pathogène. *P. fluorescens* MFN1032 est une souche clinique possédant un T3SS dont la présence a pu être rattaché à sa capacité à inhiber la croissance de l'amibe *Dictyostelium discoideum* et à induire la nécrose des macrophages (Sperandio *et al.*, 2012). Chez *P. aeruginosa*, les systèmes de sécrétion de type II (SST2) et de type III (SST3) jouent un rôle très important dans sa pathogénicité. Le SST2 permet à *P. aeruginosa* de sécréter des toxines ainsi que des enzymes bactériennes dans le milieu extracellulaire proche des cellules de l'hôte infecté. Ce SST permet à *P. aeruginosa* de libérer des toxines telles que l'exotoxine A, la phospholipase C ou encore l'élastase et participe à la cytotoxicité de la bactérie ainsi qu'à l'invasion des tissus de l'hôte. En effet, ce SST2 est associé à une mort cellulaire au niveau pulmonaire lorsqu'il y a infection par *P. aeruginosa* (Jyot *et al.*, 2011).

4.13 Les adhésines

Parmi les adhésines que possèdent les *Pseudomonas*, on peut citer les flagelles, les pili ainsi que les porines. Les adhésines sont des composantes indispensables à la colonisation bactérienne. L'adhésion des bactéries à une surface peut être spécifique : médiée par un récepteur membranaire bactérien ou bien non spécifique, via des interactions physico-chimiques. Les *Pseudomonas* possèdent plusieurs flagelles polaires qui rendent possible leur mobilité, ils sont constitués de l'assemblage d'une protéine appelé la flagelline. Ces bactéries peuvent utiliser différents modes de nage pour se déplacer en fonction de la composition du milieu dans lequel elles évoluent. En milieu aqueux, on parlera de swimming, en milieu semi-solide on parlera de swarming. Ces organelles participant à la formation de biofilms (Fedman *et al.*, 1998 ; Diaz *et al.*, 2011) et intervenant dans les déplacements bactériens, jouent donc un rôle dans la dissémination des bactéries et sont alors rattachés à leurs pathogénicités. Chez *P. aeruginosa*, le flagelle participe à l'internalisation de la bactérie dans les cellules (Fleiszig *et al.*, 2001).

Les pili (ou fimbriae) de type IV ont également un rôle dans la mobilité en particulier dans le mode de déplacement de type twitching. En plus de cette fonction ces structures participent aussi à l'adhésion comme c'est le cas pour l'attachement de *P. aeruginosa* aux cellules buccales des mammifères (Woods *et al.*, 1980), et à la virulence (Comolli *et al.*, 1999). Pour *P. fluorescens*, les pili favorisent l'adhésion au niveau de nombreux types cellulaires et sont impliqués dans les premières étapes de formation des biofilms (Vesper 1987 ; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2007).

Les porines quant à elles sont des protéines transmembranaires formant des canaux à travers la membrane et rendant possible le transport de petites molécules. Cependant, les porines sont également considérées comme des adhésines car elles peuvent aussi participer à l'adhésion des bactéries aux cellules comme c'est le cas pour OprF, porine majoritaire chez les

Pseudomonas. Pour *P. aeruginosa*, elle participe à l'adhésion de la bactérie aux cellules humaines alvéolaires (Azhganui *et al.*, 2002). OprF joue également un rôle dans la virulence car elle est liée à la capacité de la bactérie à induire l'apoptose chez une lignée cellulaire dérivée des vésicules séminales de rat (Buommino *et al.*, 1999, Fitoboncompte *et al.*, 2011). Chez *P. aeruginosa*, cette porine est un senseur capable de moduler le QS et nécessaire à la formation de biofilms en anaérobiose (Hassett *et al.*, 2002 ; De Lima Pimenta *et al.*, 2003). C'est grâce à OprF que *P. fluorescens* peut se lier de façon spécifique à la fibronectine (De Mot *et al.*, 1994 ; Rebiere-Huet *et al.*, 2002). Récemment Bruzaud *et al.*, (2015) ont montré que les flagelles de *P. aeruginosa* PAO1 interviennent dans l'étape initiale d'adhésion de cette bactérie aux surfaces hydrophobes mais que les pili de type IV n'interviennent pas dans ce phénomène.

4.2 Facteurs de virulence sécrétés

4.21 Les phospholipases C

Les phospholipases (PLC) sont des enzymes hydrolytiques extracellulaires, capables d'hydrolyser les phospholipides. Chez *P. aeruginosa* deux PLC ont été identifiées, l'une responsable de la dégradation des phosphatidylcholines et des shingomyélines, composants majoritaires des feuilletts externes des membranes eucaryotes ; cette enzyme possède également une activité hémolytique. Une autre enzyme est quant à elle capable d'affecter les phosphatidylsérines mais ne possède pas de caractère hémolytique (Ostroff *et al.*, 1990). Chez *P. fluorescens*, plusieurs PLC ont également été identifiées. L'une d'entre elle présente des propriétés biochimiques différentes de celles synthétisées par *Bacillus cereus* et *C. perfringens* mais possède une homologie avec une PLC de *Legionella* (Preuss *et al.*, 2001).

La souche clinique *P. fluorescens* MFN1032 a une PLC hémolytique qui possède une activité cytotoxique *in vitro* comparable à celle de *P. aeruginosa* (Rossignol *et al.*, 2008).

4.22 Le cyanure d'hydrogène (HCN)

Le cyanure d'hydrogène (HCN) est connu comme étant le plus puissant des poisons de la chaîne respiratoire mitochondriale des cellules humaines. Cependant, il est également produit par un grand nombre de souches de *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* (Freeman *et al.*, 1975). Il a été démontré que HCN produit par *Pseudomonas* possède une forte cytotoxicité envers *C. elegans* (Gallagher & Manoil 2001 ; Neidig *et al.*, 2011). Par ailleurs, HCN retrouvé dans les expectorations des personnes atteintes par la mucoviscidose, a également été reconnu comme jouant un rôle dans la pathogénie de *P. aeruginosa* envers les malades (Sanderson *et al.*, 2008 ; Ryall *et al.*, 2008). En ce qui concerne *P. fluorescens*, l'implication du HCN qu'elle produit a particulièrement été étudiée au niveau de la rhizosphère, révélant son pouvoir cytotoxique envers les champignons ainsi que certaines plantes (Nagarajkumar *et al.* 2004, Rudrappa *et al.* 2008).

4.23 Les exotoxines

L'exotoxine A de *P. aeruginosa* est une toxine sécrétée par l'intermédiaire du SST2 et apparaît comme l'un des facteurs de virulence les plus cytotoxiques produits par cette bactérie (Miyazaki *et al.*, 1995). C'est une toxine de type A-B comparable à la toxine diphtérique (Pillar & Hobden, 2002). *P. aeruginosa* produit également les toxines S (ExoS), T (ExoT), U (ExoU) et Y (ExoY), qui sont délivrées directement dans le cytoplasme de la cellule cible par le SST3. L'action de ces toxines peut toucher l'hôte à différents niveaux : en impactant le métabolisme cellulaire entier comme c'est le cas pour ExoS possédant une activité Rho-GTPasique (Wurtele *et al.*, 2001), en modifiant le cytosquelette de la cellule comme c'est le cas pour ExoT (Sundin *et al.*, 2004) et enfin en désorganisant la membrane plasmique comme

le fait ExoU qui a une activité phospholipase (Finck-Barbancon *et al.* 1997). ExoY est quant à elle une adénylate cyclase induisant une accumulation d'AMPc dans les cellules infectées par *P. aeruginosa* (Yahr *et al.*, 1998). Ceci conduit à la formation de pores dans les membranes (Sayner *et al.*, 2004) et à la désorganisation du cytosquelette d'actine des cellules épithéliales corrélée à l'internalisation de *P. aeruginosa* (Cowell *et al.*, 2005). Le potentiel des exotoxines produites par *P. fluorescens* a été peu investigué jusqu'alors. Il a cependant été démontré que certaines de ses toxines sont nocives pour des larves, des pupes de moustiques et de mouches, sans pour autant présenter un profil cytotoxique envers les rats (Padmanabhan *et al.*, 2005).

4.24 La pyoverdine et la pyochéline

La pyoverdine est un sidérophore produit par les bactéries du genre *Pseudomonas*. C'est un chélateur de fer, microélément indispensable à la croissance des bactéries. Si elle joue un rôle important pour la survie et la prolifération de ces micro-organismes, elle a également un véritable rôle de facteur de virulence. En effet, ce sidérophore régule l'expression d'autres facteurs de virulence tels que l'exotoxine A (Lamont *et al.*, 2002) et entre aussi en compétition avec la transferrine chez l'homme (Meyer *et al.*, 1996). D'autre part, après excitation sous UV, la pyoverdine présente une forte cytotoxicité envers les leucocytes humains en stimulant chez eux la production de ROS (reactive oxygen species) responsables de la mort cellulaire et des dommages tissulaires (Bacerra *et al.*, 2001). La pyochéline, un sidérophore secondaire à faible affinité est également produit par *P. aeruginosa* (Cornelis 2010).

4.25 Les biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules tensioactives synthétisées par certains micro-organismes. *P. fluorescens* synthétise majoritairement des cyclolipopeptides (CLP) alors que *P. aeruginosa* produit des biosurfactants rhamnolipidiques thermostables. Les CLP sont des macromolécules composées d'une chaîne carbonée (hydrophobe) reliée à un peptide cyclique de nature hydrophile dont le nombre et la nature des acides aminés est variable. Les rhamnolipides sont des molécules amphiphiles constituées d'un sucre hydrophile (le rhamnose) rattaché à un corps lipidique hydrophobe. Les CLP synthétisés par *P. fluorescens* confèrent différents avantages à cette bactérie : des facilités pour se mouvoir, adhérer et former des biofilms, une protection contre la prédation, ainsi qu'un avantage compétitif face à d'autres micro-organismes tels que des champignons, des virus et d'autres bactéries. Chez *P. fluorescens* le premier CLP identifié a été la viscosine possédant des caractéristiques communes à de puissants biosurfactants comme la surfactine de *Bacillus subtilis* ou la tolaasine de *P. tolaasi* (Meylheuc *et al.*, 2001). Chez *P. aeruginosa* les biosurfactants rhamnolipidiques interviennent dans la virulence à différents niveaux, soit en direct par activité cytolytique sur les cellules, soit indirectement en favorisant la colonisation bactérienne (Soberon-Chavez *et al.*, 2005). Récemment, il a été mis en évidence que *P. fluorescens* (VCRC B426) est capable de produire un di-rhamnolipide possédant des propriétés hautement toxiques envers certains moustiques. Cette molécule pourrait être utilisée dans le cadre d'un biocontrôle des vecteurs de la dengue, du chikungunya, de la fièvre jaune ainsi que du paludisme (Prabakaran *et al.*, 2015)

4.26 Les exopolysaccharides

L'alginate est un exopolysaccharide, il est composé de l'union d'un acide β -D-mannuronique et d'un acide α -L-guluronique. Lors des infections pulmonaires chez des patients atteints de mucoviscidose, *P. aeruginosa* surproduit de l'alginate, important facteur de virulence de cette bactérie impliqué dans sa mucoïdie (Wang *et al.*, 2015). En effet, lorsque *P. aeruginosa* colonise et adhère à une surface, elle sécrète une matrice d'exopolysaccharides. *P. fluorescens* synthétise également des exopolysaccharides contribuant à son adhésion à des surfaces solides et cette synthèse est dépendante de la présence d'une source de carbone dans le milieu (Read & Costerton 1987). Au niveau de la matrice d'exopolysaccharides recouvrant le biofilm bactérien de *P. aeruginosa* on retrouve de l'alginate. Celui-ci participe donc à entraver les voies respiratoires des patients ainsi qu'à la protection du pathogène envers les réponses immunitaires de l'hôte ainsi que les antibiotiques (Cohen & Prince 2012 ; Hoiby *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'alginate empêche la phagocytose de *P. aeruginosa* médiée par l'INF- γ et par les leucocytes humains (Leid *et al.*, 2005).

4.27 Les protéases

P. fluorescens produit un certain nombre de protéases dont l'activité a pu être reliée à la virulence de cette bactérie. L'une des protéases de *P. fluorescens* présente une grande similitude d'activité enzymatique avec la protéase alcaline de *P. aeruginosa* (Liao & McCallus 1998). *P. fluorescens* CY091 produit une métalloprotéase extracellulaire AprX, il a été démontré que chez des vertébrés poïkilothermes, cette protéase avait une activité cytotoxique et facilite l'adhésion de la bactérie aux cellules ainsi qu'au mucus en dégradant les protéines présentes en surface (Zhang *et al.*, 2009). *P. aeruginosa* synthétise plusieurs types de protéases parmi lesquelles : la protéase alcaline, la protéase IV (une sérine protéase) ainsi que deux élastases : l'élastase A et l'élastase B qui dégradent l'élastine, ces protéases

permettent notamment à la bactérie d'échapper au système immunitaire. La protéase alcaline, en interférant avec la voie classique du complément et la voie des lectines permet à la bactérie d'échapper à la phagocytose par les neutrophiles (Laarman *et al.*, 2012). Le second rôle de ces protéases est d'agir en synergie avec d'autres facteurs de virulence comme le LPS et de faciliter la colonisation et l'invasion de l'épithélium (Azghani *et al.*, 2000).

4.28 La pyocyanine

La pyocyanine est un composé phénazique synthétisé par *P. aeruginosa*, considéré à la fois comme un facteur de virulence et comme une molécule de signalisation du QS. La pyocyanine est un métabolite actif électrochimiquement, intervenant dans de nombreux processus biologiques tels que : l'expression des gènes, la fitness des cellules bactériennes ainsi que la formation de biofilms. La pyocyanine est un transporteur d'électron intervenant dans la respiration bactérienne mais également comme un agent antifongique. (Jayaseelan *et al.*, 2014). Sous sa forme réduite, elle est capable d'interagir avec l'oxygène et former des ROS à l'origine de dommages aux tissus avoisinants (Price-Whelan *et al.*, 2006). La production des ROS entraîne une diminution de l'AMPc chez les neutrophiles présents au niveau respiratoire ce qui conduit à leurs apoptoses. Ce mécanisme permet donc à la bactérie de persister dans les tissus humains (Usher *et al.*, 2002). Dernièrement, des bactéries *P. aeruginosa* produisant des metallo- β -lactamases à caractère multirésistant aux antibiotiques ont été étudiées pour leur capacité à produire de la pyocyanine. Il a été démontré que ces bactéries produisent moins de pyocyanine et possèdent un pouvoir pathogène moins important que les souches metallo- β -lactamase négatives. Cependant, ces souches restent surveillées dans le cadre des hôpitaux car elles présentent un risque d'infection non négligeable pour les personnes hospitalisées telles que les patients atteints de mucoviscidose, pour qui l'infection pourrait être fatale (Fuse *et al.*, 2013).

5. Résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas*

Un nombre important de bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* possèdent des résistances naturelles aux antibiotiques. Celles-ci ont été plus particulièrement étudiées chez *P. aeruginosa* qui est impliquée dans 10% des infections nosocomiales en France (Mérens *et al.*, 2011). En plus de sa résistance naturelle, *P. aeruginosa* est capable d'acquérir de nouvelles résistances aux antibiotiques grâce à différents mécanismes. Ils peuvent être classés en deux grandes catégories : liés à des mutations chromosomiques ou bien à l'acquisition de gènes transférables (Mérens *et al.*, 2011). Concrètement des mutations entraînant une surproduction de la céphalosporinase constitutive AmpC, une surexpression des systèmes d'efflux actif, une diminution de la perméabilité membranaire et l'acquisition de gènes exogènes ont pu être reliées à l'acquisition de résistance aux β -lactamines chez *P. aeruginosa*. D'autre part aujourd'hui, la dissémination de β -lactamases à spectre étendu, de métallo-carbapénémases et d'oxocillinases à spectre élargi est un phénomène émergent au sein de ses populations de pathogènes qui reste sous étroite surveillance. En effet, *P. aeruginosa* est aussi capable de produire des enzymes inactivatrices d'antibiotiques telles que les β -lactamases (Bonomo & Szabo, 2006). En outre la résistance de *P. aeruginosa* aux aminosides est également constatée, elle est liée à l'acquisition d'enzymes modificatrices ou de méthylases et parfois d'une surexpression des pompes à efflux. En ce qui concerne la résistance aux fluoroquinolones, elle est le plus souvent due aux mutations de la sous-unité GyrA de l'ADN gyrase (Mérens *et al.*, 2011). Il a également été démontré qu'une résistance de *P. aeruginosa* aux carbapénèmes est liée à des régulations de l'expression de la porine OprD (Lister *et al.*, 2009). Enfin sa capacité importante à former des biofilms participe souvent à son aptitude à résister à de nombreux antimicrobiens. Igbinoza *et al.*, (2012) ont mis en évidence que des bactéries commensales du genre *Pseudomonas* isolées d'eaux usées sont de véritables réservoirs de gènes de résistance aux antibiotiques. D'autres espèces de *Pseudomonas*

possèdent également des résistances naturelles aux antibiotiques comme par exemple des souches de *P. mosseli* ATCC BAA-99 et MFY161 qui sont résistantes aux antibiotiques suivant : cefsulodine, trimethoprim-sulphamethoxazole, fosfomycine, ticarcilline ainsi qu'au mélange ticarcilline+acide clavulanique (Leneveu *et al.*, 2013) et pourrait donc agir comme vecteurs pour le transfert de gènes de résistance (Giani *et al.*, 2012).

Chapitre III

Focus sur une bactérie à Gram positif du microbiote intestinal :

Enterococcus

1. Taxonomie et niches écologiques des entérocoques

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif, non sporulantes, non mobiles et capables de fermenter le glucose. Ces bactéries se présentent sous forme de coques isolés ou organisés en paires ou en chaînettes. Les bactéries du genre *Enterococcus* appartiennent à la division des Firmicutes, la classe des bacilli, l'ordre des lactobacillales et la famille des enterococcaceae. Un faible pourcentage en G+C (37,5 à 44 %) est retrouvé dans leurs génomes. Les bactéries du genre *Enterococcus* sont des organismes anaérobies, aérotolestants, oxydase et catalase négatives bien que le gène codant cette dernière enzyme de détoxification existe dans leur génome (Paulsen *et al.*, 2003). A ce jour, 33 espèces forment le genre *Enterococcus* (Köhler, 2007). La température de croissance optimale des entérocoques est de 35 °C cependant la plupart des espèces de ce genre peuvent croître à des températures allant de 10 à 45 °C. Les entérocoques appartiennent également au groupe des bactéries lactiques, ils sont capables de métaboliser les sucres en produisant (majoritairement) de l'acide lactique. La plupart des entérocoques appartiennent au groupe sérologique D de la classification de Lancefield (Lancefield, 1933).

Les entérocoques sont des bactéries ubiquitaires, retrouvées dans différentes niches écologiques telles que l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud (10^5 - 10^8 CFU/g de matière fécale), plus rarement dans le vagin (Beargie, 1975) ou la cavité buccale (Kurrie, *et al.*, 1981). Ils sont présents également dans la rhizosphère (eaux usées, eau douce, eau de mer,

dans le sol, sur les végétaux) mais aussi chez les insectes (Deibel *et al.*, 1963, Mundt, 1986). De manière plus exceptionnelle, leur présence est signalée dans le tractus intestinal des animaux à sang froid (batraciens, reptiles et insectes) (Flahaut *et al.*, 1997).

2. Les Entérocoques dans l'alimentation

La présence d'entérocoques peut-être détectée dans de nombreux aliments comme certains fromages, dans des produits fermentés tels que des légumes ou des saucisses. Il a été démontré que cette présence n'est pas toujours due à une contamination fécale (Mundt, 1986). La résistance des entérocoques aux températures de pasteurisation et leur adaptabilité aux différents substrats et aux conditions de culture (basses et hautes températures, pH extrêmes et salinité) justifient qu'ils soient retrouvés, aussi bien dans les aliments à base de produits crus (lait, viande...), que dans ceux élaborés suite à des traitements technologiques. Les entérocoques possèdent certaines caractéristiques les rendant intéressants et justifiant leur utilisation dans le domaine des biotechnologies : aptitude à produire des bactériocines et capacité à participer au développement d'arômes alimentaires : propriétés organoleptiques (López-Díaz *et al.*, 1995, Thompson *et al.*, 1986). Les entérocoques sont capables de produire diverses molécules antimicrobiennes : bactériocines, acide lactique ou encore peroxyde d'hydrogène. Ces propriétés les rendent indispensables à l'industrie agro-alimentaire. En revanche, les entérocoques présents dans le tractus gastro-intestinal des animaux peuvent conduire à la contamination de la viande durant l'abatage et provoquer des phénomènes d'altération (Magnus *et al.*, 1988). Les entérocoques sont parfois aussi utilisés comme probiotiques (Franz *et al.*, 1999 ; Franz *et al.*, 2003). Cependant, les souches d'*E. faecium* et d'*E. faecalis* entrent rarement dans la composition de probiotiques à usage humain mais sont plus largement utilisées comme complément alimentaire pour animaux (Franz *et al.*, 1999). Bien que l'effet probiotique de certaines souches soit clairement établi, l'utilisation

d'entérocoques dans l'alimentation reste controversée au vue de l'émergence et l'augmentation des maladies humaines corrélées aux entérocoques et à leur multirésistance aux antibiotiques (Franz *et al.*, 2003).

3. Production d'amines biogènes

Les amines biogènes sont des bases azotées de faible poids moléculaire, constituant de nombreux aliments (Burdychova & Komprada, 2007). Parmi les amines biogènes on retrouve l'histamine et la tyramine qui peuvent affecter le système vasculaire et conduire à une constriction des vaisseaux sanguins puis à une augmentation de la pression artérielle (Omaye, 2004). Les intoxications par l'histamine peuvent provoquer des symptômes de type allergique tels que les éternuements, maux de tête/migraines ou essoufflement (Holzapfel *et al.*, 2008). À des concentrations supérieures à $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, l'histamine et la tyramine peuvent causer une intoxication alimentaire et une crise hypertensive (Shalaby, 1996 ; Hammes *et al.*, 2008). Les amines biogènes peuvent être d'origine endogène à de faibles concentrations dans les aliments non fermentés comme les fruits, les légumes, la viande, le lait et le poisson (Leuschner *et al.*, 1999 ; McCabe-Sellers *et al.*, 2006). Elles sont aussi formées par la décarboxylation des acides aminés ou par l'amination et la transamination des aldéhydes et des cétones (Karovičová *et al.*, 2005) lors de la détérioration des aliments ou au cours de la fermentation microbienne contrôlée ou spontanée (Karovičová *et al.*, 2005 ; McCabe-Sellers *et al.*, 2006). La production d'amines biogènes par les entérocoques est favorisée lors de la fermentation, en raison de l'acidification et de la protéolyse. À partir de deux fromages à pâte mi-dure, Burdychova *et al.*, (2007) ont isolé 14 souches capables d'en produire : *E. durans* (7 souches), *E. faecalis* (3 souches), *E. casseliflavus* (3 souches) et *E. faecium* (1 souche). Kučerová *et al.*, (2009) ont trouvé des espèces d'*E. faecium* et d'*E. faecalis* avec des activités décarboxylases dans des échantillons de lait cru de vache, de fromages frais et de fromages semi durs.

Leuschner *et al.*, (1999) ont détecté la tyramine ($477 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) dans des fromages de type Gouda produits avec deux souches d'*E. faecalis*, ayant 12 jours de maturation. Gardini *et al.*, (2008) ont montré l'influence du chlorure de sodium sur l'augmentation de la concentration finale en tyramine et l'accumulation de 2-phényléthylamine produite par *E. faecalis* EF37 pendant la fermentation et la maturation de saucisses sèches (Gardini *et al.*, 2008).

4. Les entérocoques, des bactéries pathogènes opportunistes

Considérés comme anodins il y a une vingtaine d'années, les entérocoques sont maintenant clairement identifiés comme une des causes majeures d'infections nosocomiales. Ils font partie des pathogènes nosocomiaux les plus communs et peuvent être responsables d'infections urinaires ou intra-abdominales, d'abcès viscéraux, de pneumonies, de septicémies, d'endocardites et de méningites (Jett *et al.*, 1993 ; Megran, 1992). Les deux espèces les plus communément isolées et associées avec les infections nosocomiales sont *E. faecium* et *E. faecalis*. Aux Etats-Unis, les entérocoques sont le troisième genre bactérien isolé lors de bactériémies (Jones *et al.*, 1997) et la seconde cause d'infections nosocomiales (Richards *et al.*, 1999). C'est aussi le genre le plus souvent cité lors d'infections de plaies chirurgicales dans les unités de soins intensifs (Richards *et al.*, 2000). En France, d'après une étude publiée récemment portant sur 15803 cas d'infections nosocomiales, les entérocoques ont été identifiés comme responsables de 6,4 % des cas, ce qui leur confère le cinquième rang (Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales 2007). Leur capacité de survie dans l'environnement et d'acquisition de résistance aux antibiotiques les rend tout particulièrement adaptés à devenir des pathogènes opportunistes. L'accroissement des populations sensibles, l'augmentation de la durée d'hospitalisation et la large utilisation des antibiotiques participent aussi à ce phénomène. Les infections à entérocoques peuvent provenir de nombreuses sources, comme les cathéters intra-veineux, urinaire ou biliaire, les

corps étrangers, les plaies chirurgicales ou encore via la cavité buccale (Jett *et al.*, 1993, Murray 1990). Certaines études ont aussi montré que les entérocoques peuvent être transmis par les mains du personnel soignant, le matériel clinique (Porwancher *et al.*, 1997) ou encore de patient à patient (Chenoweth *et al.*, 1990).

Les entérocoques sont responsables de 5 à 20 % des endocardites, ce qui en fait la 3ème cause après les streptocoques (le plus souvent *Streptococcus bovis*) et *S. aureus* (Megran 1992; McDonald *et al.*, 2005). D'autres infections à entérocoques, plus sporadiques, ont également été décrites. Il s'agit d'abcès, d'infections néonatales, intra-abdominales, pelviennes ou encore du système nerveux central (Franz *et al.*, 1999; Ogier & Serror 2008).

Ainsi aujourd'hui, bien qu'*E. faecalis* ne soit pas considérée comme une bactérie pathogène au sens premier du terme, elle se classe cependant comme une bactérie opportuniste, un pathobionte émergent. En effet, elle possède de nombreux facteurs de virulence et une capacité naturelle à acquérir des résistances aux antibiotiques. Les mécanismes conduisant à son émergence en tant que pathobionte ne sont pas bien connus. Cette bactérie est un colonisateur naturel de l'intestin et est donc soumise à un certain nombre de signaux, notamment entéro-endocriniens eucaryotes. L'impact de ces molécules sur la virulence d'*E. faecalis* n'a pas encore été étudié.

5. L'espèce *Enterococcus faecalis*

5.1 Généralités

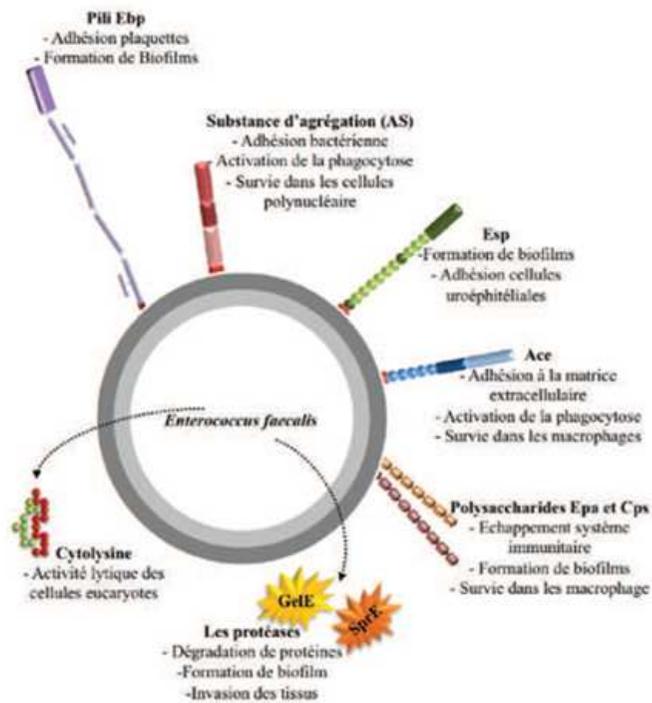
E. faecalis est une bactérie retrouvée au niveau de l'intestin humain et de certains mammifères. En 1984, des expériences d'hybridation ADN-ADN et l'analyse des séquences des ARNr16S ont permis de montrer que les espèces *Streptococcus faecium* et *Streptococcus faecalis* sont suffisamment distinctes des autres streptocoques pour justifier leur transfert dans

le genre *Enterococcus* (Schleifer & Kilpper-Bälz, 1984). *E. faecalis* est l'espèce représentative avec *E. faecium* du genre *Enterococcus*, genre-type de la famille des *Enterococcaceae* qui comporte 32 espèces ayant des caractéristiques communes (Ogier & Serror, 2008). Chez l'Homme, *E. faecalis* est l'une des premières bactéries à coloniser le tractus gastro-intestinal dans les heures qui suivent la naissance et demeure dans l'intestin à un niveau sous-dominant ($< 10^8$ bactéries/g de matières fécales) le restant de notre vie (Adlerberth & Wold, 2009). Inoffensive chez l'homme sain, *E. faecalis* est aussi considérée comme un agent pathogène opportuniste. De nombreuses études ont établi que *faecalis* est l'espèce la plus communément retrouvée parmi les entérocoques (Benno *et al.*, 1986 ; Enzensberger *et al.*, 1985 ; Noble, 1978). Ainsi, disséminé avec les excréments humains, les déjections animales et les déchets domestiques, *E. faecalis* se retrouve dans l'environnement immédiat de l'homme. En raison de ses capacités de résistance, cette bactérie est communément utilisée comme indicateur de contamination fécale afin de tester la qualité hygiénique des échantillons environnementaux (Wheeler *et al.*, 2002). Le caractère ubiquitaire de cette bactérie est lié à sa grande résistance aux stress. En effet, *E. faecalis* peut résister au stress oxydatif, à la dessiccation, à des températures et pH extrêmes, à de fortes concentrations en NaCl ou encore en présence de sels biliaires, détergents et agents antimicrobiens (Flahaut *et al.*, 1997). *E. faecalis* se caractérise par une grande robustesse. Elle peut survivre une demi-heure à 60°C, mais aussi dans des milieux pouvant atteindre des pH de 9,6, contenant jusqu'à 6,5% de chlorure de sodium ou en présence de sels biliaires. La robustesse d'*E. faecalis* lui permet de coloniser de nombreux biotopes (Fisher & Phillips, 2009). Bien qu'étant une bactérie commensale du tube digestif, *E. faecalis* est également un pathogène opportuniste qui émerge en tant que cause majeure d'infections nosocomiales (Murray *et al.*, 1999; Pillar *et al.*, 2004; Ogier & Serror 2008; Sood *et al.*, 2008). En France, environ 75 % des souches d'entérocoques identifiées lors d'infections nosocomiales

appartiennent à l'espèce *faecalis*. Par conséquent, la majorité des études sur les mécanismes d'infection des entérocoques est menée sur cette espèce. Néanmoins, ces micro-organismes sont souvent associés à d'autres pathogènes dans des multi-infections de la cavité abdominale. Il a été établi qu'ils sont responsables d'infections urinaires, de bactériémies, d'endocardites ou encore de complications post-opératoires (Ogier & Serror 2008). En Europe et aux États-Unis, les entérocoques représentent la seconde cause d'infections urinaires (Huycke *et al.*, 1998; Bouza *et al.*, 2001). La plupart du temps, l'origine de la contamination est endogène par translocation du germe à travers la barrière intestinale causant ainsi des septicémies (Wells *et al.*, 1990). D'autres sources de bactériémies ont également été identifiées comme, par exemple, la présence d'abcès ou d'infection du tractus urinaire ou encore les contaminations liées aux techniques médicales invasives telles que la pose de perfusions intraveineuses (Jett *et al.*, 1994). Ces septicémies peuvent conduire à des infections plus graves telles que les endocardites. Ceci constitue un challenge thérapeutique important car la mortalité liée à ces infections est supérieure à celle d'autres maladies nosocomiales.

5.2 Facteurs de virulence d'*Enterococcus faecalis*

Récemment, un nombre important de gènes pouvant contribuer à la virulence d'*E. faecalis* ont été identifiés à partir des analyses du génome d'*E. faecalis* V583, de l'îlot de pathogénicité de la souche MMH594 ainsi qu'à l'aide d'études de virulence sur différents modèles animaux (Ogier & Serror, 2008) **Figure 11**.



gène	facteur de virulence correspondant	rôle putatif
Adhésines		
<i>agg</i>	substance d'aggrégation	adhésion et colonisation résistance aux défenses de l'hôte
<i>efaA</i>	antigène A d' <i>E. faecalis</i>	colonisation
<i>esp</i>	protéine de surface des entérocoques	adhésion et colonisation
<i>ace</i>	adhésine au collagène d' <i>E. faecalis</i>	adhésion à la matrice extracellulaire
Protéases		
<i>gelE</i>	gélatinase	dommages tissulaires
<i>sprE</i>	protéase de la sérine	dommages tissulaires
Facteurs sécrétés		
<i>cyIA-M</i>	cytolysine/hémolysine	dommages tissulaires
<i>gls24</i>	protéine induite lors d'une carence en glucose	persistance chez l'hôte
Exopolysaccharides		
<i>cpsA-K</i>	polysaccharide capsulaire	résistance aux défenses de l'hôte
<i>epa</i>	polysaccharide capsulaire	non déterminé
Régulateurs transcriptionnels		
<i>cyIR1-R2</i>	système peptidique à deux composants	régulation de <i>cyIA-M</i>
<i>fsrA-C</i>	système de régulation agr-like	régulation de <i>gelE</i> et <i>sprE</i>
<i>etaRS</i>	système à deux composants OmpR-like	non déterminé
<i>hypR</i>	régulateur du peroxyde d'hydrogène	résistance aux défenses de l'hôte
<i>perR</i>	régulateur du peroxyde	non déterminé

Figure 11 Les facteurs de virulence chez *E. faecalis*

Ainsi, une douzaine de facteurs de virulence putatifs ont donc été identifiés chez *E. faecalis*. Les gènes correspondants codent pour des adhésines et invasines, des exoenzymes, des protéases, des protéines de surface et des protéines extracellulaires putatives. La large proportion (jusqu'à 25%) des éléments génétiques mobiles dans le génome d'isolats cliniques multi-résistants aux antibiotiques reflète la très grande capacité d'évolution de cette espèce par transfert horizontal (Ogier & Serror, 2008). Le séquençage du génome d'*E. faecalis* V583 a mis en évidence que sur les 1760 ORFs identifiés, 221 codent pour des protéines dont la fonction reste encore inconnue suggérant l'existence de mécanismes de virulence et/ou de résistance encore non identifiés (Giridhara Upadhyaya *et al.*, 2009).

Ces facteurs de virulence jouent un rôle dans la capacité d'*E. faecalis* à adhérer aux cellules hôtes et à la matrice extracellulaire, ils potentialisent également sa capacité d'invasion des tissus, de modulation de la réponse immunitaire et inflammatoire. Selon Ogier & Serror (2008) aucun facteur de virulence n'a pu être caractérisé chez d'autres espèces d'entérocoques en dehors d'*E. faecalis* et *E. faecium*.

5.21 L'acide lipotéichoïque

L'acide lipotéichoïque est l'un des constituants majoritaire de la paroi des bactéries à Gram positif. Au niveau structural, il est constitué d'un acide téichoïque lié à un diglycéride par une liaison ester. Cet acide possède des propriétés antigéniques capables de stimuler une réponse immunitaire et se trouve libéré par les cellules bactériennes après bactériolyse induite par des lysozymes, des peptides cationiques des leucocytes ou des antibiotiques β -lactame. Les acides téichoïques d'*E. faecalis* sont des récepteurs de la substance d'agrégation. Ils jouent un rôle dans l'adhésion aux cellules eucaryotes mais également dans l'apoptose des macrophages (Kayaoglu & Orstavik, 2004)

5.22 Pili Ebp

Les pili retrouvés à la surface des bactéries à Gram positif sont formés de fibres multimériques de protéines de surface LPxTG polymérisées par une sortase de classe C dédiée aux pilus et fixés ensuite de manière covalente au peptidoglycane de la membrane cellulaire par une sortase de classe A. Les gènes requis pour l'assemblage de ses pili sont regroupés en structure opéronique. Deux types de structures de pili hétérotrimériques différentes sont retrouvés chez *E. faecalis* (Hendrickx *et al.*, 2009). Les sous unités protéiques de pili majeures EbpC, PilA et PilB d'*Enterococcus* possèdent une séquence signal en N terminal, un HLPK-like pili motif avec une lysine (K) conservée qui conduit la polymérisation des pili, un motif ETxA-PExY-like E box avec un acide glutamique E conservé (probablement requis pour l'incorporation aux sous-unités de pili mineures) et un C-terminal portant un motif LPxTG substrat sortase. L'adhésion bactérienne aux tissus de leur hôte, médié par les pili et les protéines de surface suivant la colonisation des surfaces muqueuses est à priori, une étape initiale et nécessaire lors des infections mais aussi un prérequis dans la pathogenèse d'*Enterococcus* (Mandlik *et al.*, 2008). De plus, il a été démontré que les Pili Ebp permettent l'adhésion de la bactérie aux plaquettes et participent à la formation de biofilms (Upadhyaya *et al.*, 2009).

5.23 Les adhésines

Parmi les gènes codant pour des adhésines identifiées chez *E. faecalis* on retrouve : ace, esp efaA et agg.

Ace

Ace est une adhésine produite par les entérocoques et exprimée en condition de stress. Elle est considérée comme une « collagen binding » MSCRAMM (Microbiobalk surface component recognizing adhesive matrix molecule adhesin of collagen from Enterococci). Elle permet l'adhésion de la bactérie à la matrice extracellulaire, l'activation de la phagocytose et rend possible la survie de la bactérie dans les macrophages. Cette adhésine est apparemment exprimée *in vivo* en particulier chez l'homme lors des infections (Nallapareddy *et al.*, 2000).

Esp

Esp est une protéine de surface des entérocoques connue pour jouer un rôle dans la formation de biofilms, dans l'adhésion de la bactérie aux cellules uroépithéliales, dans le contournement du système immunitaire et plus globalement dans la colonisation (Shankar N *et al.*, 2001). Il a été mis en évidence que le gène codant pour cette protéine est plus fréquemment retrouvé chez des isolats cliniques que chez des isolats commensaux (Hass W *et al.*, 2002).

EfaA

EfaA est un antigène de surface qui intervient lors d'endocardite (Lowe *et al.*, 1995). Lowe *et al.*, (1995) ont montré que la séquence en acides aminés d'EfaA présente 55 à 60% d'homologie avec un groupe de protéines de type adhésine retrouvé chez les Streptocoques,

les protéines FimA de *Streptococcus parasanguis*, SsaB de *Streptococcus sanguis*, ScaA de *Streptococcus gordonii*, ainsi que PsaA de *Streptococcus pneumoniae*.

5.24 Substance d'agrégation (agg)

La substance d'agrégation est une protéine de surface inductible par les molécules du quorum sensing et jouant de nombreux rôles dans la pathogénicité d'*E. faecalis* (Clewell, 1993). Elle participe notamment à l'adhésion bactérienne et entraîne une augmentation de l'hydrophobicité de la surface cellulaire bactérienne. Au niveau du système immunitaire, la substance d'agrégation participe à l'activation de la phagocytose et permet la survie de la bactérie dans les cellules polynucléaires. Qui plus est, la substance d'agrégation promeut la formation d'agrégat permettant la conjugaison bactérienne facilitant ainsi le transfert de matériel génétique (Upadhyaya *et al.*, 2009).

5.25 Exopolysaccharides

Epa et Cps sont des polysaccharides capsulaires qui participent à l'échappement au système immunitaire et jouent un rôle dans la formation de biofilms et dans la survie dans des bactéries dans les macrophages (Teng *et al.*, 2002).

5.26 Protéases

Les gènes gelE et sprE codent respectivement pour la gélatinase et une protéase de la sérine. Le système à 2 composants FsraC contrôle l'expression de ces deux gènes qui sont co-transcrits (Qin, X *et al.*, 2000). GelE et SprE sont deux protéases jouant un rôle dans la dégradation des protéines de l'hôte, dans la formation de biofilms et dans l'invasion en causant des dommages tissulaires.

La gélatinase est une endopeptidase extracellulaire, produite par les entérocoques et capable d'hydrolyser la gélatine, le collagène, la caséine, l'hémoglobine ainsi que d'autres peptides (Kreft *et al.*, 1999). Il a été démontré que cette protéase contribuait à la virulence d'*Enterococcus* dans les endocardites chez un animal modèle : le lapin (Gutschik *et al.*, 1979). Cependant, toutes les souches d'*E. faecalis* ne sont pas productrices de gélatinase (Vergis *et al.*, 2002), certains isolats possédant le gène codant pour la gélatinase ne la produisent pas (Roberts *et al.*, 2004).

5.27 Les molécules de communication

Les molécules de communication chez *E. faecalis* sont des peptides signaux hydrophobes de 7 à 8 acides aminés (Clewell & Weaver, 1989). Ces peptides sont ainsi connus comme favorisant la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques et ceux codant pour des facteurs de virulence (Kayaoglu & Orstavik 2003 ; Clewell, 1993) en augmentant la fréquence de transfert de certains plasmides conjugatifs (Kayaoglu & Orstavik, 2003).

5.28 Facteurs sécrétés

Le gène *cylA-M* code pour une cytolysine/hémolysine à l'origine de dommages tissulaires. L'hémolysine est une protéine capable de lyser les érythrocytes de l'homme, du cheval et du lapin et possède également une activité envers les macrophages et les bactéries à Gram positif. La production de cette enzyme a pu être associée avec une augmentation de la sévérité de certaines infections (Johnson, 1994). La cytolysine d'*E. faecalis* possède une activité lytique envers les cellules eucaryotes (Hendrickx *et al.*, 2009). L'expression de l'hémolysine ainsi que de la cytolysine est régulée par un système à deux composants via des mécanismes dépendants du QS. *Gls24* est un autre gène à l'origine de la production d'un facteur sécrété,

une protéine induite lors d'une carence en glucose et qui participe à la persistance de la bactérie chez l'hôte. C'est une protéine de stress général (Nannini *et al.*, 2005 ; Teng *et al.*, 2005).

5.29 Anion superoxide extra-cellulaire

L'anion superoxide est un radical de l'oxygène hautement réactif impliqué dans les dommages aux cellules et aux tissus dans une grande variété d'infections, incluant les maladies inflammatoires. L'anion superoxide et d'autres radicaux de l'oxygène exercent un effet destructeur sur une grande variété de composés biologiques tels que les lipides, les protéines et les acides nucléiques (Cross 1987). L'ion superoxide est produit par les neutrophiles et autres cellules phagocytaires. En plus d'être produit par les cellules de l'hôte, les bactéries peuvent également générer cet anion. Seuls certains isolats d'*E. faecalis* issus de la circulation sanguine sont capables de le synthétiser (Huycke *et al.*, 2001). Sa production a pu être corrélée *in vivo* à la survie d'*E. faecalis* lors d'une infection sous-cutanée mixte avec *Bacteroides fragilis* (Huycke & Gilmore, 1997).

6. Résistance aux antibiotiques chez les entérocoques

La remarquable capacité des entérocoques à résister aux antibiotiques leur confère un avantage sélectif important pour survivre dans un environnement où l'utilisation de ceux-ci est massive. La vancomycine est l'antibiotique de dernier recours lors de nombreuses infections causées par des bactéries à Gram positif. Les entérocoques résistant à la vancomycine (ERV) ont été identifiés pour la première fois en Europe en 1987 (Leclercq *et al.*, 1988 ; Uttley *et al.*, 1988) et 15 ans après ils représentaient 25 % des isolats d'entérocoques issus de patients américains. Toutefois, l'épidémiologie des infections à ERV diffère en fonction des pays. En

effet, leur proportion en France est restée assez faible avec une prévalence de 3 % sur l'ensemble des entérocoques (Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales. 2007). La démonstration récente de la transmission, chez l'homme, de cette résistance d'un entérocoque à une souche de *S. aureus* résistante à la méthicilline chez deux patients américains souligne le danger potentiel de la coexistence dans le même réservoir de ces deux pathogènes (Willems *et al.*, 2005). Lors d'infections sévères à entérocoques, les traitements usuels consistent en la combinaison d'ampicilline et de gentamicine qui sont connus pour avoir un effet synergique. Dans les cas causés par des ERV, de fortes doses d'ampicilline et de sulbactam, de chloramphénicol ou de doxycycline avec un nouvel antibiotique comme la quinupristine-dalfopristine ou le linézolide peuvent être utilisés. Toutefois, des souches résistantes pour chacun de ces antibiotiques ont déjà été identifiées (Ang, J., *et al.*, 2004 ; Kainer *et al.*, 2007).

Chapitre IV

Communication bactérienne

1 Le quorum sensing

Les bactéries sont capables de communiquer entre elles par l'intermédiaire de molécules diffusant à travers les membranes bactériennes. La communication bactérienne est appelée quorum sensing (QS) et permet à ces micro-organismes d'adopter des modes de vie adaptés aux conditions environnementales. En effet, lorsque ces signaux chimiques atteignent une concentration donnée, un seuil critique, elles sont capables d'induire ou de réprimer l'expression de certains gènes, permettant à la population bactérienne de s'adapter aux conditions locales de manière coordonnée. Le QS bactérien a été pour la première fois identifié et caractérisé chez *Vibrio fischeri* en 1970 (Nealson 1977). C'est en 1985 que la notion d'autoinducteurs (petites molécules diffusibles induisant en fonction de leur concentration qui reflètent la concentration bactérienne, l'expression de certains gènes) a été introduite par Kaplan et Greenberg dans le modèle de régulation de la luminescence chez *V. fischeri* (Kaplan & Greenberg, 1985). Le terme QS a été introduit par la suite en 1994 par Fuqua & Winans devant la découverte d'un système régulateur de type LuxR-LuxI contrôlant le transfert conjugatif du plasmide Ti chez *Agrobacterium* en présence d'un métabolite produit par la tumeur de la plante cible (Fuqua & Winans, 1994). Plusieurs systèmes de quorum ont été ensuite mis en évidence, notamment les systèmes retrouvés chez les bactéries à Gram négatif et d'autre part ceux retrouvés chez les bactéries à Gram positif qui sont généralement de natures différentes. En effet, il est très vite apparu qu'il existe deux grandes familles d'autoinducteurs: les uns dérivés de petits peptides pour les bactéries à Gram positif et les autres dérivés d'acides gras pour les bactéries à Gram négatif. Parmi les bactéries à Gram positif soumises au QS on répertorie : *Enterococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*,

Streptococcus, *Streptomyces* (Podbielski & Kreikemeyer, 2004) et pour les bactéries à Gram négatif : *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Brucella*, *Bukholderia*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Ralstonia*, *Serratia*, *Vibrio*, *Yersinia* (Parker & Sperandio, 2009).

Parmi les systèmes de QS identifiés jusqu' alors, on répertorie : les systèmes de type 1 utilisant les N-acyle homosérine lactones (autoinducteur 1) comme molécules de communication (Waidmann *et al.*, 2011), les systèmes de type 2 mettant en jeu les autoinducteurs 2 et 3 et impliquant une détection via des senseurs histidines kinases membranaires (Guo *et al.*, 2014 ; Walters & Sperandio 2006) et enfin les systèmes de type 3 qui utilisent des peptides en tant que signal chimique (Castillo-Juárez *et al.*, 2015). A notre connaissance les systèmes de type 1 sont retrouvés chez les bactéries à Gram négatif, les systèmes de type 3 chez les bactéries à Gram positif tandis que les systèmes de type 2 peuvent être retrouvés chez les bactéries à Gram négatif aussi bien que chez les bactéries à Gram positif (Castillo-Juárez *et al.*, 2015 ; Winzer *et al.*, 2003 ; Bassler 1999).

Concernant les systèmes de quorum de type 3 on retrouve deux familles de molécules signal distinctes, les autoinducteurs 2 ou diester de furanosylborate ainsi que les autoinducteurs de type 3. Chez *Vibrio fischeri*, l'autoinducteur 2 (AI-2) est synthétisé par une enzyme dite « Lux S » à partir de S-adénosine homocystéine (SAH), composé toxique pour la cellule. Le diester de furanosyl borate est libéré dans le milieu, avant d'être reconnu par un senseur membranaire Lux P. La fixation d'AI-2 sur son récepteur « Lux P » entraîne son autophosphorylation. Lux P transfère alors son phosphate sur l'intermédiaire, « Lux Q », puis sur « Lux U » et enfin sur le régulateur de réponse « Lux O », qui, lorsqu'il est phosphorylé, entraîne la transcription de petits ARN régulateurs. Ces petits ARN non codants vont inhiber le répresseur Lux R et donc conduire à la levée de l'inhibition de certains gènes cibles (Winzer *et al.*, 2003). Pour ce qui est des autoinducteurs de type 3 (AI-3), le système les mettant en jeu est encore mal connu, l'AI-3 ainsi que ces précurseurs n'ayant pas encore été purifiés et donc leurs structures n'étant

pas encore déterminées (Hughes & Sperandio 2008). On sait cependant que l'AI-3 est perçu par des senseurs histidines kinases permettant ainsi l'activation d'une cascade intra-cellulaire conduisant à la régulation de gènes. Ce système de quorum existe chez certaines bactéries entéropathogènes qui peuvent alors capter epinéphrine (Epi) et norepinéphrine (NE) de l'hôte, ce qui peut alors conduire à l'activation de gènes de virulence chez ces bactéries. Le système AI-3/Epi/NE joue ainsi un rôle très important dans le dialogue inter-règne (Karavolos *et al.*, 2013 ; Hugues & Sperandio 2008).

En dehors de ces systèmes on connaît également le DSF (difusible factor) présent chez le phytopatogène *Xyllela* (Scarpari *et al.*, 2013 ; Ionescu *et al.*, 2013) , l'ester méthylique du 3-hydroxy palmitate (3OH-PAME) chez *Ralstonia solanacearum* (Achari *et al.*, 2015) ainsi que le PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal) chez les bactéries du genre *Pseudomonas* (Baig *et al.*, 2015).

Si la communication bactérienne s'avère être possible entre bactéries de la même espèce elle peut également l'être parfois entre bactéries d'espèces différentes. Citons par exemple *P. aeruginosa* et *Burkholderia cepacia* qui utilisent un système de coopération inter-espèces médié par le QS. Toutes deux pathogènes opportunistes à Gram négatif, elles sont capables de former des biofilms mixtes au niveau des poumons de patients atteints de mucoviscidose. Il a été démontré que *B. cepacia* est capable d'utiliser les acyl homosérine lactones (AHL) produites par *P. aeruginosa* et vice versa ; cette coordination permettrait aux deux bactéries de réguler leurs facteurs de virulence ce qui influencerait la progression de l'infection dans les poumons du patient (Lewenza *et al.*, 2002).

Si l'on parle de QS, il existe aussi le quorum quenching qui est un mécanisme permettant la compétition entre bactéries. Il repose sur la capacité de certains micro-organismes à produire des lactonases et des acylases pouvant dégrader les AHL coupant le circuit de régulation et

atténuant ainsi le phénotype induit par le QS (Kalia *et al.*, 2014). Ce processus pourrait être utilisé afin de mettre en place des stratégies visant à éradiquer certains agents pathogènes.

2. Quorum sensing chez les bactéries à Gram positif

2.1 Généralités

Les autoinducteurs des bactéries à Gram positif sont des oligopeptides de 5 à 17 acides aminés qui sont le plus souvent modifiés post-traductionnellement par l'ajout de cycles lactone ou thiolactone, lanthionine et isoprényl. Chez les bactéries à Gram positif possédant un génome avec un faible pourcentage de G+C, le QS serait lié à ces courts peptides qui interagissent soit avec des systèmes à deux composants, soit par internalisation et liaison à des facteurs de transcription de réponse aux peptides (Bassler & Losick, 2006), **Figure 12**. Chez les bactéries à Gram positif, les molécules du QS interviennent dans la transcription et la traduction de précurseurs qui subiront ensuite maturation et sécrétion. En effet, dans le milieu extracellulaire, les peptides sont modifiés avant d'interagir avec les cellules environnantes. Pour exercer leur effet sur les cellules voisines, les peptides sont soit importés directement dans la cellule où ils interagissent avec leur récepteur soit ils interagissent avec un senseur kinase (SK). Suite à l'interaction avec celle-ci, un signal intracellulaire est transmis sous forme de phosphorylation à un régulateur de réponse (RR). Le régulateur de réponse phosphorylé ou le complexe peptide/récepteur peuvent alors modifier l'expression de gènes soit en se fixant directement à l'ADN soit en interagissant avec des régulateurs transcriptionnels tels que des facteurs sigma et l'ARN polymérase (**Figure 12**).

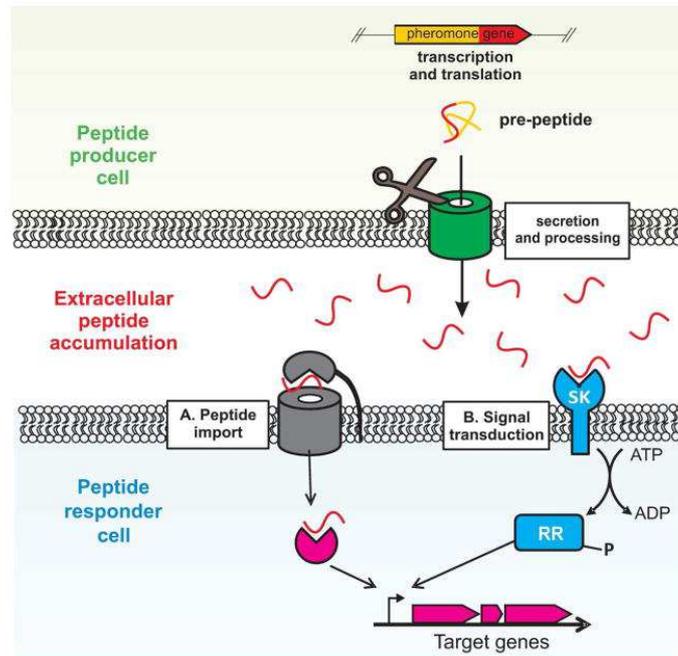


Figure 12 Quorum sensing chez les bactéries à Gram positif

(d'après Cook & Federle 2014)

De subtiles variations sont reconnues par des récepteurs à deux composants et assurent la spécificité du signal. Finalement chez les bactéries à Gram positif, quatre classes majeures de voies de signalisation du quorum ont été identifiées, celle reposant sur les peptides cycliques de type Agr, celle regroupant les peptides contenant le motif gly-gly (G-G), mais également les systèmes senseurs de la famille RNPP et enfin la dernière famille plus récemment caractérisée des Rgg-like régulateurs dont l'appartenance à la superfamille RNPP a déjà été proposée (Mashburn-Warren *et al.*, 2010 ; Fleuchot *et al.*, 2011). Il a été démontré que ces voies de signalisation contrôlaient une variété de processus chez les bactéries à Gram positif notamment la conjugaison, la compétence naturelle à la transformation, la formation des biofilms ainsi que la régulation des gènes de virulence. Ainsi tenter d'interférer avec le QS bactérien pourrait être une stratégie pour soigner des pathologies dues aux bactéries résistantes aux antibiotiques.

2.2 Quorum sensing chez *Enterococcus faecalis*

Des exemples de chacun des **quatre types de systèmes du QS** ont pu être identifiés chez *Enterococcus* (Cooke & Federle, 2014).

Chez *E. faecalis*, le **système Fsr** (Figure 13) a été mis en évidence, c'est un orthologue du système « Agr-type peptides » de *S. aureus* qui, chez cette bactérie contrôle l'expression des facteurs de virulence. Le locus *fsr* code pour un « peptide-based QS system » également lié à la virulence de cette bactérie. Ce système est régulé par le peptide GBAP (gelatinase biosynthesis-activating pheromone) associé avec la virulence d'*E. faecalis* dans des modèles d'endophtalmie et d'endocardite chez le lapin aussi bien qu'avec la formation de biofilm *in vitro* (Hancock & Perego 2004, Thurlow *et al.*, 2010). En effet, le locus *fsrABCD* est localisé immédiatement en amont des deux gènes précédemment cités *gelE* et *sprE* contrôlés positivement par le système Fsr, GeLE et SprE étant des régulateurs de la formation de biofilms (Qin *et al.*, 2000 ; Sifri *et al.*, 2002 ; Hancock & Perego, 2004). Bourgogne *et al.*, (2006) ont constaté qu'en plus de participer à la formation de biofilm, FsrB joue aussi un rôle dans l'expression des protéines de surface.

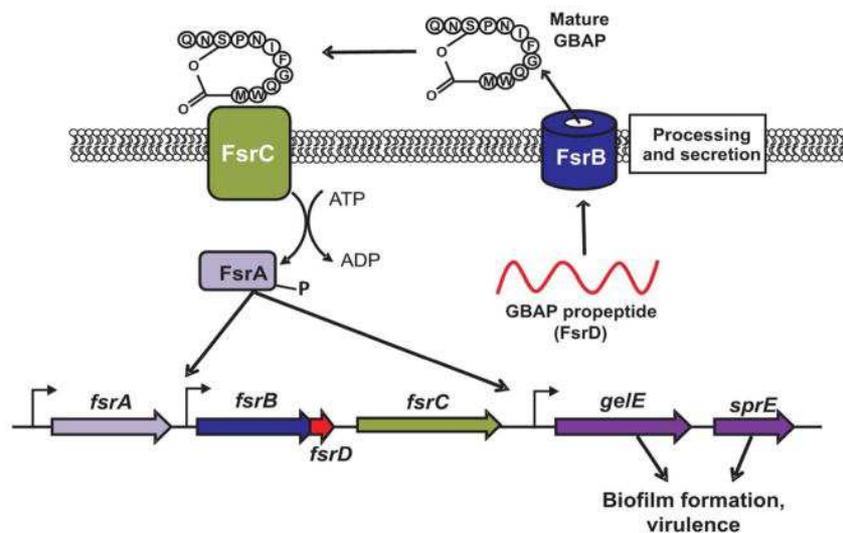


Figure 13 Système de quorum sensing Fsr chez *E. faecalis* (d'après Cook Federle 2014)

Chez les bactéries Gram positif, le **motif double-glycine (G-G)** joue un rôle clef dans la sécrétion de nombreux peptides intervenant dans le QS et dans la production de bactériocines. Les « Competence-stimulating-peptides » (CSP) et les bactériocines de classe II produites respectivement par les *Streptocoques* et les bactéries lactiques sont généralement synthétisés sous forme de pré-peptides inactifs contenant une séquence leader conservée de type G-G. Cette séquence est reconnue et éliminée par protéolyse lors de la sécrétion par un transporteur ABC, résultant en un relargage et activation du peptide. En se basant sur une analyse *in silico* du génome d'*E. faecalis* V583 un peptide putatif contenant le motif G-G a été trouvé et annoté (Dirix *et al.*, 2004).

Declerck *et al.*, (2007) ont décrit **PrgX** chez *E. faecalis* « the pheromone responsive gene regulator » auquel se lie les molécules du QS; le complexe résultant est alors transporté dans le cytoplasme afin d'interagir directement avec des membres de la famille RNPP conduisant alors à la modulation de l'expression de certains gènes. En effet, les entérocoques sont bien connus pour leurs capacités à réaliser la conjugaison et le transfert horizontal de gènes *via* des plasmides conjugatifs. La conjugaison chez les entérocoques est généralement contrôlée par deux « counteracting peptide pheromones » ou l'un des deux peptides sert comme inducteur de la voie de signalisation conduisant à la conjugaison et l'autre comme inhibiteur pour éviter un transfert conjugal non nécessaire avec des cellules qui possèderaient déjà le plasmide. Cependant cette voie de signalisation liée à la famille RNPP n'est pas seulement rattachée aux phénomènes de conjugaison et régule aussi la virulence d'*E. faecalis*, citons par exemple la substance d'agrégation qui facilite les phénomènes de conjugaison et l'adhésion à la fibrine (Hirt *et al.*, 2000). D'autre part, les **régulateurs Rgg** (pour regulator gene for glucosyltransferase) sont caractérisés par un domaine N-terminal de fixation à l'ADN de type XRE-hélice-tour-hélice et un domaine C-terminal riche en hélice α . Ces structures présentent des similarités avec PrgX de la famille RNPP (Mashburn-Warren *et al.*, 2010, Loughman JA

& Caparon MG, 2007). Dumoulin *et al.*, (2013) ont caractérisé la première Rgg-like protéine codée par le chromosome d'*E. faecalis*, nommée ElrR pour « enterococcal leucine-rich protein » qui a été identifiée comme un régulateur positif de l'expression d'*erlA* et qui contrôle vraisemblablement des gènes de virulence chez cette bactérie. En effet, ElrA favorise la virulence d'*E. faecalis* en stimulant la persistance bactérienne dans les macrophages et la production d'IL-6. Les résultats de Dumoulin *et al.*, (2013) ont pu être corrélés avec la virulence atténuée d'une souche δ elrR dans un modèle de péritonite chez la souris.

3. Quorum sensing chez les bactéries à Gram négatif

Chez les bactéries à Gram négatif, les molécules de communication sont majoritairement des homosérines lactones acylées (acyl-HSL) (Reading & Sperandio 2006).

3.1 Quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa*

Aujourd'hui on considère que 6 à 10% de l'expression des gènes et notamment les gènes de virulence de *P. aeruginosa* sont contrôlés par le QS. En effet, *P. aeruginosa* a deux systèmes de QS majeurs : les systèmes LasR/LasI et RhIR/RhII (**Figure 14**); ces systèmes possèdent des homologies de séquences avec le système LuxI/LuxR décrit chez *V. fischeri*. LasI et RhII étant les deux enzymes permettant la synthèse respective des molécules signal C12-HSL et C4-HSL de la famille des AHL. C12-HSL peut donc se fixer sur LasR et C4-HSL sur RhIR leurs récepteurs protéiques correspondants. La liaison de l'AHL à son récepteur protéique forme un activateur transcriptionnel permettant ainsi l'expression de nombreux gènes (Pearson *et al.*,2000). Les couples activateurs 3-oxo-C12-HSL-LasR et C4-HSL-RhIR activent également les gènes responsables de la synthèse de leur auto-inducteur, respectivement les gènes lasI et rhII, induisant ainsi une boucle de régulation positive. Un autre système de QS a pu être mis en évidence chez *P. aeruginosa*, il s'agit du *Pseudomonas* Quinolone Signal

(PQS), **Figure 14**, (Pesci *et al.*, 1999 ; Farrow *et al.*, 2015 ; Inaba *et al.*, 2015). La molécule synthétisée permettant le fonctionnement du système s'appelle la 2-Heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone. Ce système PQS est sous le contrôle des systèmes las et rhl, la protéine LasR étant requise pour la production de la PQS et la protéine RhlR pour la bioactivité de la PQS (Pesci *et al.*, 1999). La transcription des gènes nécessaires à la synthèse de la PQS est régulée positivement par lasR et négativement par le système Rhl, ce qui suggère que le système PQS constitue un régulateur entre les deux systèmes Las et Rhl (Diggle *et al.*, 2003). Ainsi, ce système serait indépendant de la densité bactérienne, contrairement aux deux autres cités : LasR/LasI et RhlR/RhlI (McKnight *et al.*, 2000 ; Inaba *et al.*, 2015).

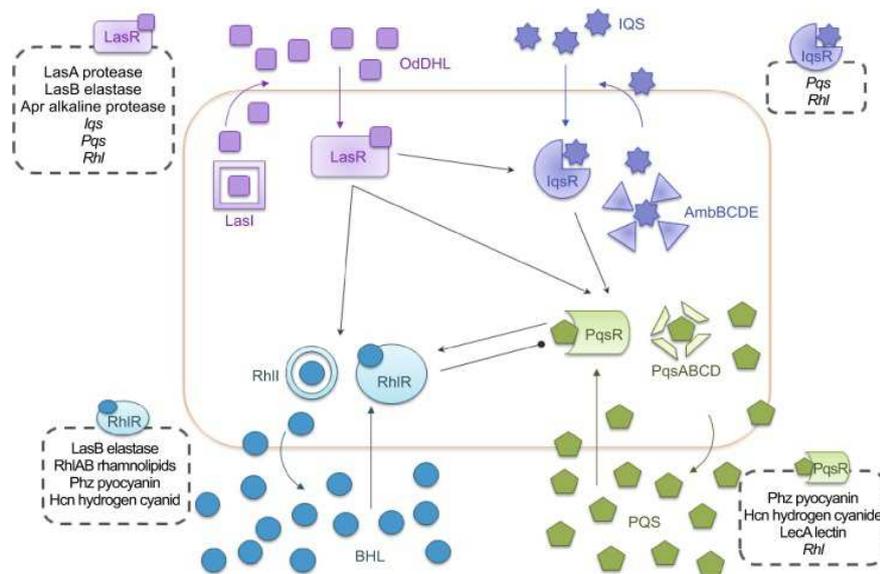


Figure 14 Quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* (Lee *et al.*, 2014)

3.2 Quorum sensing chez *Pseudomonas fluorescens*

Chez *P. fluorescens*, le QS a été mis en évidence récemment. Au sein du genre *Pseudomonas*, les bactéries de l'espèce *fluorescens* ne seraient pas toutes capables de réaliser ce type de communication. Cependant, certaines souches possèdent cette propriété. *P. fluorescens* 2P24

a une activité de biocontrôle en produisant des composés antifongiques ainsi que des sidérophores impliqués dans sa capacité de protection des plantes contre les agents pathogènes (Gao *et al.*, 2012). Cette souche possède un système de QS Pcol/pcoR fonctionnant sur le principe du système LuxI/LuxR, avec comme synthase de l'autoinducteur Pcol, et PcoR comme récepteur (Wei & Zhang 2006). Chez *P. fluorescens* NCIMB 10586, le système MupI/MupR possède des homologues de séquences avec les protéines des systèmes LuxI/LuxR mais également avec celles du système LasI/LasR de *P. aeruginosa*. Il a été démontré que le système MupI/MupR est à l'origine de la synthèse d'une petite molécule diffusible de type autoinducteur qui est capable d'activer le système LasI/LasR de *P. aeruginosa* et qu'en retour *P. aeruginosa* produit également des substances capables d'activer MupI/MupR (EL-sayed *et al.*, 2001). Récemment Martins *et al.*, (2014) ont mené une étude sur deux souches de *P. fluorescens* isolées du lait. Ils ont constaté que ces bactéries ne produisent d'AHL dans aucune des conditions testées et que dans ce cas présent, la formation de biofilm, le swarming et l'activité protéolytique de ces souches environnementales ne sont pas contrôlées par un système de QS dépendant des AHL. Mis en évidence récemment, les mécanismes de QS chez *P. fluorescens* ont principalement été recherchés et étudiés chez des souches liées à la rhizosphère.

4. Endocrinologie microbienne

L'être humain est composé de 10^{13} cellules eucaryotes pour environ 10^{14} bactéries (Henderson & Wilson 1996). Comme nous l'avons vu précédemment la relation existant entre ces deux entités est normalement positive pour les deux parties. On parle d'un concept de commensalisme pour caractériser cette association bénéfique. On sait aujourd'hui que si cette cohabitation entre hommes et bactéries est possible, bénéfique et indispensable, c'est parce que les deux acteurs établissent un lien de communication efficace. Ainsi, comme nous

l'avons vu auparavant, les bactéries sont capables de communiquer entre elles par les mécanismes de QS et quorum quenching. Qui plus est, de manière intéressante, certains AI bactériens possèdent des homologies de structures importantes avec des hormones eucaryotes. Cette connaissance a rapidement laissé penser que les bactéries sont donc capables de percevoir les signaux eucaryotes tout comme elles percevaient les AI des autres procaryotes. D'autre part, les bactéries sont en contact permanent avec les substances produites par l'hôte et soumises aux fluctuations de concentrations des hormones de l'hôte en fonction de l'état de santé et du statut immun de celui-ci. Au vue de ces constatations, le concept d'endocrinologie microbienne a pu émerger (Lyte *et al.*, 2003 ; Lyte 2014) en prenant en compte qu'un dialogue moléculaire existe entre eucaryote et procaryote. En effet, il a été démontré que certaines molécules eucaryotes pouvaient perturber "quencher" le QS bactérien (Hughes & Sperandio 2008 ; Brameyer *et al.*, 2015 ; Rückert *et al.*, 2015) et qu'en retour certains pathogènes pouvaient « profiter » des messages eucaryotes pour stimuler leur persistance et favoriser la réussite de l'infection (Lyte *et al.*, 2003). Mais, cet effet possède une réciprocité certaine car les molécules du QS peuvent aussi avoir un impact sur la transduction du signal chez les eucaryotes (Sperandio *et al.*, 2002). D'autre part, les hormones de stress eucaryotes en particulier les catécholamines sont depuis longtemps suspectées d'avoir un impact sur la croissance voire sur la virulence des bactéries (Kinney *et al.*, 2000). Une compréhension et une connaissance plus poussées des mécanismes régissant cette communication inter-règne permettraient de nombreux débouchés intéressants.

5. Dialogue inter-règne et effet des molécules eucaryotes sur les bactéries

Dans l'environnement, les bactéries sont en contact permanent avec des molécules eucaryotes et l'on sait aujourd'hui que certaines bactéries sont capables de percevoir des substances données et d'y répondre. Percevoir son environnement, ainsi que les variations dans cet

environnement et s'y adapter sont des moyens pour les bactéries de survivre et se développer. L'impact des molécules eucaryotes sur la croissance bactérienne est depuis longtemps connu et étudié. Cependant, les molécules eucaryotes n'affectent pas seulement ce paramètre de prolifération mais peuvent aussi toucher à la virulence des bactéries. En parallèle, dans les organismes multicellulaires, les concentrations locales des molécules eucaryotes de type hormones, neurotransmetteurs peuvent être modulées par de nombreux facteurs physiologiques et environnementaux. Le microbiote est donc lui aussi exposé à ces variations.

5.1 Bactéries et molécules délivrées par le système immunitaire

L'organisme réagit à la présence d'agents infectieux en produisant un certain nombre de messagers chimiques tels que des cytokines comme les interleukines (IL), les interférons (IFN), les facteurs de croissance hématopoiétiques (CFS) ainsi que les facteurs de nécrose des tumeurs (TNF) mais aussi, des peptides anti-microbiens. Le but de ses mécanismes de défense étant de protéger l'organisme et d'éradiquer les infections. Dans de telles conditions, les micro-organismes voulant survivre, persister et se multiplier ont mis en place des stratégies permettant parfois d'éviter voire de détourner les réactions immunitaires à leur avantage. L'impact des cytokines sur les bactéries a déjà été beaucoup étudié et il s'avère que l'interleukine-1 (Porat *et al.*, 1991), l'interleukine-2 (Denis *et al.*, 1991), le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Denis *et al.*, 1990), l'interleukin-6 (Meduri *et al.*, 1999), l'interferon- γ (Hogan *et al.*, 1993) et le TNF α : tumor necrosis factor α (Luo *et al.*, 1993) sont capables de promouvoir la croissance bactérienne. Il a été démontré également qu'IFN- γ augmente la virulence de *P. aeruginosa*. En effet, l'expression de la lectine PA-I de *P. aeruginosa* est induite par IFN γ suite à un mécanisme QS dépendant qui conduit une augmentation de la perméabilité de l'épithélium. Ceci facilite donc l'introduction de facteurs de virulence dans les cellules hôte (Wu *et al.*, 2005). Suite à ce constat, OprF a été proposé comme étant le senseur putatif d'INF- γ chez *P. aeruginosa* (Wu *et al.*, 2005). La β défensine

2 est une molécule de l'immunité dont le rôle est de participer à l'éradication des agents potentiellement pathogènes. Il a été démontré que cette molécule à des concentrations sub-inhibitrices est capable d'augmenter la virulence de certaines bactéries en particulier celle de *P. fluorescens* MFN1032, souche clinique possédant des propriétés de pathogène opportuniste. En effet, *P. fluorescens* MFN1032 est capable d'induire et de détourner à son profit, la sécrétion de β défensine 2 au niveau des cellules épithéliales, pour augmenter ses capacités cytotoxiques et/ou proinflammatoires (Madi *et al.*, 2013).

En ce qui concerne *P. aeruginosa*, cette bactérie est aussi capable de répondre à la dynorphine, peptide opioïde synthétisé par les neutrophiles au niveau intestinal. La dynorphine active une protéine régulatrice MvfR à l'origine de l'augmentation de production de signaux du QS et qui conduit par exemple, à la production de facteur de virulence tel que la pyocyanine (Zaborina *et al.*, 2007). MvfR serait donc le senseur putatif de la dynorphine chez *P. aeruginosa* (Zaborina *et al.*, 2007). Finalement chez *Pseudomonas*, les molécules signal du QS telles que la N-(3-oxododecanoyl)-l-homoserine lactone (3oxo-HSL) et la PQS possèderaient deux activités majeures : induire l'expression des facteurs de virulence et participer à des effets immuno-modulateurs facilitant son implantation chez l'hôte et les processus d'infection (Skindersoe *et al.*, 2009).

5.2 Bactéries et hormones peptidiques

Dans l'organisme, certaines hormones sont également connues comme ayant des propriétés affectant la croissance et/ou la virulence bactérienne. Parmi ces hormones, on retrouve les peptides natriurétiques : le peptide natriurétique ANP (atrial natriuretic peptide), le peptide natriurétique BNP (brain natriuretic peptide) et le CNP (peptide C) qui constituent une famille de polypeptides d'origine essentiellement cardiaque, ayant un effet natriurétique

(augmentation de l'élimination urinaire de sodium) et vasodilatateur. Il a été démontré que des bactéries du genre *Pseudomonas* sont capables de percevoir ces hormones (Rosay *et al.*, 2015). En effet, Blier *et al.*, (2011) ont montré que le CNP entraîne une augmentation de la virulence de *P. aeruginosa*. Ces auteurs ont également pu mettre en évidence la cascade d'activation engendrée par le CNP, cette activité étant relayée par l'activation de Vfr et PtxR à travers la stimulation des systèmes HSL. *P. fluorescens* est elle aussi capable de percevoir les peptides natriurétiques. Sa croissance n'est pas impactée par le BNP et le CNP, mais ces substances modulent sa virulence. En effet, un prétraitement de la bactérie par du CNP ou du BNP entraînent une augmentation de sa capacité à provoquer la nécrose des cellules gliales et une diminution de sa capacité à engendrer l'apoptose sur ces cellules. Enfin, ces peptides entraînent une modification de la structure du LPS de *P. fluorescens* qui serait à l'origine de la variation de sa virulence. La substance P (SP) est un neuropeptide associé à de nombreuses fonctions physiologiques parmi lesquelles la régulation de l'anxiété et de la douleur. Ce neuropeptide de la famille des tachykinine est largement présent au niveau du SNC, du SNP et des neurones ganglionnaires (Ribeiro-da-Silva & Hokfelt, 2000). Ce neuropeptide composé de 11 acides aminés est produit par les cellules intestinales E et C1 (**Figure 15**).

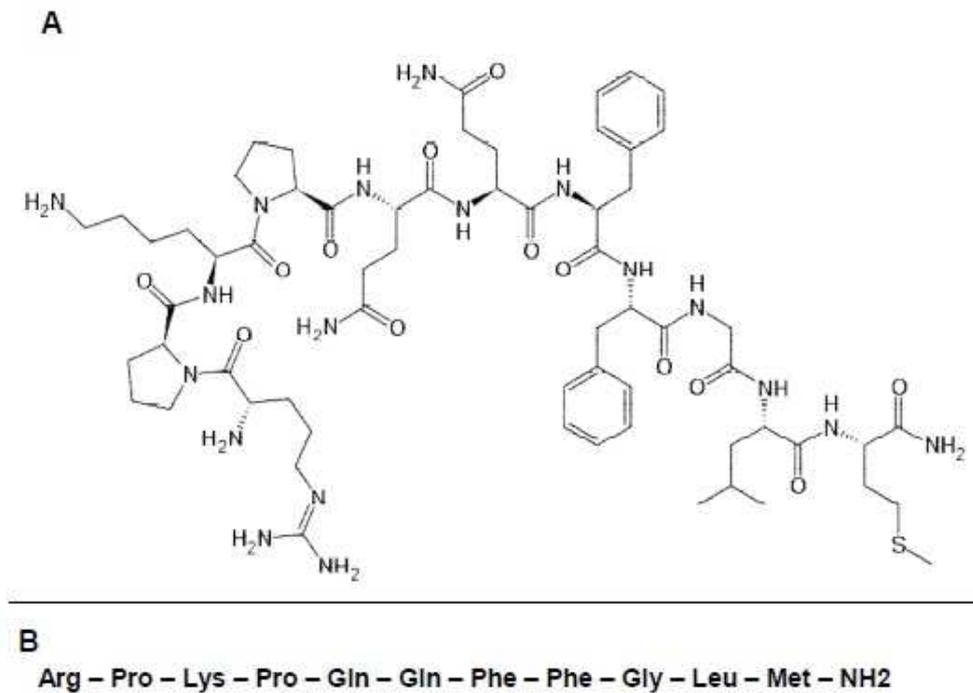


Figure 15 Structure (A) et séquence (B) de la substance P

La substance P est aussi libérée au niveau des fibres innervant l'intestin (Mitsui 2011), et des taux élevés de ce peptide sont retrouvés au niveau de la muqueuse intestinale et du rectum (Gooneratne *et al.*, 2008). La substance P peut induire des contractions au niveau de l'intestin (Lecci *et al.*, 2006) et se trouve être impliquée dans les phénomènes de nausées et de vomissements. Ainsi, un antagoniste de la substance P est utilisé comme anti-émétique au niveau clinique (Diemunsch & Grelot 2000). Ce neuropeptide est par ailleurs impliqué dans la sécrétion d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale suite à une infection à *Vibrio cholerae* (Turvill *et al.*, 2000). Enfin, des variations de la production locale de la substance P pourraient être associées à plusieurs pathologies inflammatoires gastro-intestinales, telles que la Maladie de Bowel ou la Maladie de Crohn, mais également dans le cas de pancréatites (Grady *et al.*, 2000; Koon *et al.*, 2011; Tavano *et al.*, 2012). Un rôle de la substance P a aussi été suggéré dans le cadre de la colite pseudomembraneuse ulcéreuse associée aux infections à *C. difficile* (O'Connor *et al.*, 2004). Un certain nombre d'études ont été réalisées afin de comprendre son impact sur les bactéries. A fortes concentrations ($>10^{-4}$ M) la substance P

possède des propriétés antimicrobiennes à la fois directe et indirecte contre certaines bactéries comme *E. coli* et *P. aeruginosa* en agissant comme un peptide antimicrobien cationique (Kowalska *et al.*, 2002). Ce neuropeptide possède également des propriétés antimicrobiennes contre *E. faecalis*, *S. aureus*, *Proteus vulgaris* ainsi que *C. albicans*. Cependant, de manière intéressante, ce neuropeptide possède, à des concentrations physiologiques, des effets pro-virulents sur *B. cereus*, *S. aureus* et *S. epidermidis* (Mijouin *et al.*, 2013). Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence que le senseur bactérien à la substance P est Ef-TU (Thermo unstable ribosomal elongation factor). La substance P peut aussi être perçue par des bactéries à Gram négatif telles que *P. fluorescens* chez qui il module l'adhésion et la production de biofilm (Hillion *et al.*, 2014).

Au niveau du système digestif, une myriade d'hormones participe à la régulation de la prise alimentaire, de la digestion et de la glycémie. Ces hormones sont en contact avec le microbiote intestinal parmi lesquelles on répertorie: l'insuline, la somatostatine, la ghréline, la gastrine...En considérant qu'*H. pylori* est une bactérie capable de survivre dans un environnement extrêmement hostile telle que la muqueuse gastrique, Chowers *et al.*, (2002) se sont intéressés à l'effet direct de cette hormone sur la croissance de cette bactérie. Ils ont pu mettre en évidence une diminution de la phase stationnaire de croissance ainsi qu'une augmentation du taux de croissance d'*H. pylori* sous l'effet de la gastrine à différentes concentrations comme celle retrouvée au niveau de la lumière intestinale ou celle présente dans le sérum. Cette molécule jouerait un rôle dans l'adaptation de la bactérie à cet habitat hostile. *H. pylori* est également capable de percevoir la somatostatine, hormone secrétée par les cellules δ de l'estomac, de l'intestin et du pancréas et ce mécanisme pourrait passer par un senseur putatif SSRT2-like (Yamashita, K. *et al.*, 1998). Au niveau de l'intestin, un certain nombre d'hormones relatives à la régulation de la prise alimentaire sont présentes parmi lesquelles l'Alpha-Melanocyte-Stimulating-Hormone (α MSH) **Figure 16**.

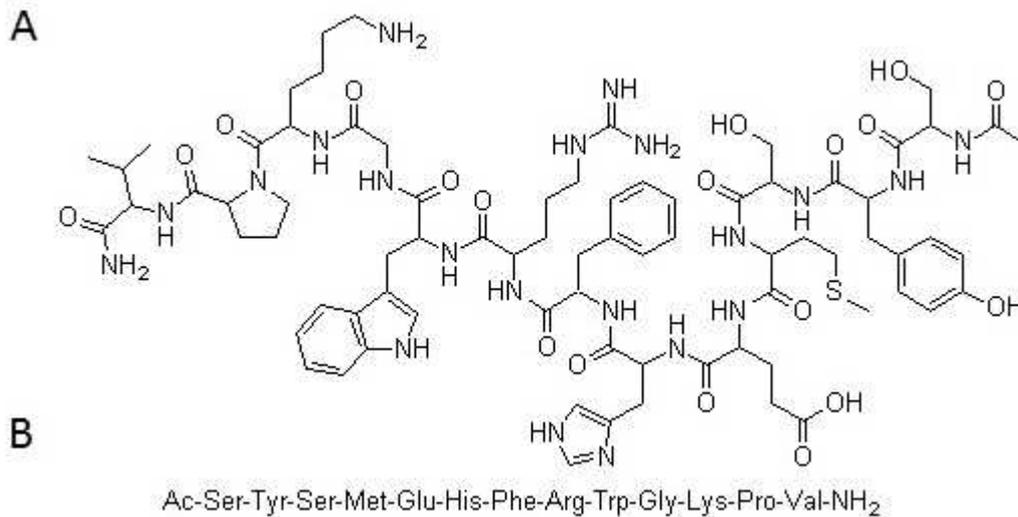


Figure 16 Structure (A) et Séquence (B) de l'Alpha-Melanocyte-Stimulating-Hormone (α MSH)

L' α MSH est un neuropeptide possédant une double fonction anti-inflammatoire et antimicrobienne contribuant probablement aux mécanismes de l'immunité innée (Donnarumma *et al.*, 2004). Ce peptide est produit par les cellules des glandes pituitaires mais aussi par des cellules extra pituitaire notamment par les monocytes, les kératinocytes ainsi que les cellules gastro-intestinales (Catania *et al.*, 2000). L' α MSH ainsi que certains de ses analogues sont connus pour exercer des effets antimicrobiens envers les bactéries ainsi que les levures. Des études ont montré qu'une séquence en C-term lys-pro-val inhibe la croissance de *Candida albicans* et de *S. aureus* alors qu'une séquence en N-term his-phe-arg-trp montre une activité antimicrobienne contre *Cryptococcus neoformans*. C'est la raison pour laquelle des analogues synthétiques de l' α MSH ont été étudiés dans le contexte de la santé humaine, en vue de leurs utilisations pour traiter certaines maladies (Grieco *et al.*, 2013).

Le peptide YY (PYY) est un court peptide (**Figure 17**) sécrété par les cellules de l'iléon et du côlon en réponse au repas et qui possède des propriétés anorexigènes.

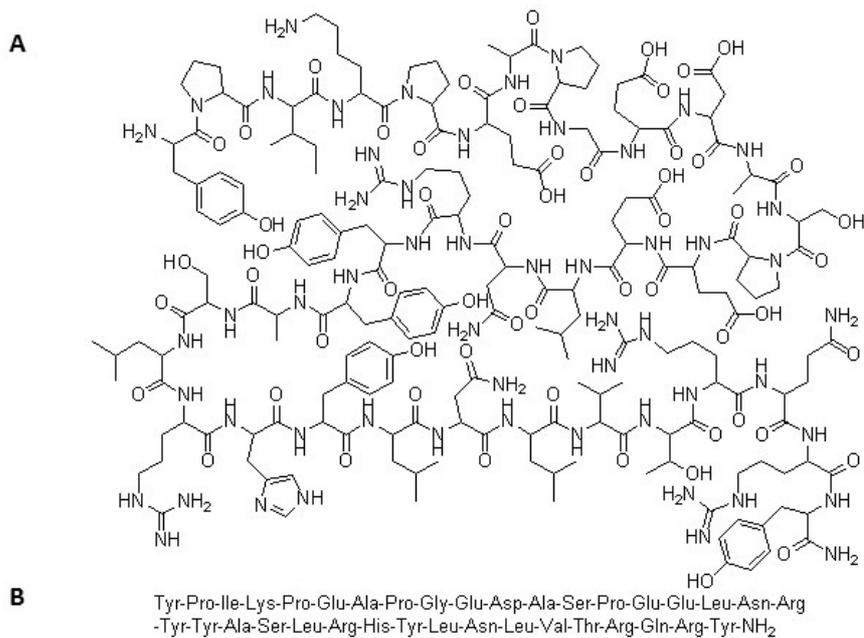


Figure 17 Structure (A) et séquence en acides aminés (B) du peptide YY.

Il est synthétisé dans les cellules L de la muqueuse gastro-intestinale. Le peptide YY appartient à la famille des YY tout comme le skin PYY isolé de la peau d'amphibien. Il s'avère que le skin PYY inhibe la prolifération d'un large spectre de micro-organismes pathogènes (Vouldoukis *et al.*, 1996). Ces propriétés sont également retrouvées pour le Neuropeptide Y ainsi que pour le peptide YY. Ce potentiel antimicrobien est similaire à celui des autres peptides antimicrobiens et reposerait sur l'endommagement des membranes bactériennes rendu possible par la présence d'un domaine particulier : le « C terminal alpha-helicol domain »₅PYY14-36, hautement conservé par les membres de la famille et qui serait responsable de la perméabilisation des membranes (Vouldoukis *et al.*, 1996).

La ghréline est un peptide de 28 acides aminés, existant sous deux formes la forme désacétylée DAG et la forme acétylée AG, c'est un peptide orexigène. Cette molécule possède des propriétés bactéricides contre les bactéries à Gram négatif comme *E. coli* et *P. aeruginosa* mais pas contre les bactéries à Gram positif comme *S. aureus* et *E. faecalis*. La ghréline en

quenchant la charge de surface d'*E. coli*, que ce soit sous forme acétylée ou non, se comporte comme un peptide antimicrobien cationique (Min *et al.*, 2012).

5.4 Bactéries et neurotransmetteurs

Les neurotransmetteurs sont des composés chimiques délivrés par les neurones ou par les cellules gliales et agissant sur d'autres neurones, appelés neurones postsynaptiques ou, plus rarement, sur d'autres types de cellules comme les cellules musculaires ou sur les astrocytes. Les neurotransmetteurs, encore appelés neuromédiateurs assurent la transmission des messages nerveux d'un neurone à l'autre, au niveau des synapses. Ainsi libérés par un neurone lors d'une stimulation, ils se fixent à un récepteur sur un autre neurone, ce qui entraîne la transmission de l'influx nerveux, ou à un récepteur sur une cellule cible, ce qui entraîne divers effets dans un organe. Le GABA est le neurotransmetteur inhibiteur majeur du SNC chez les mammifères et les oiseaux. Dagorn *et al.*, (2013) ont montré que ce neurotransmetteur est capable de moduler la virulence de *P. aeruginosa* et de *P. fluorescens* MF37, une souche d'origine environnementale ; en particulier ses propriétés de surface ainsi que son pouvoir cytotoxique. Alors que le GABA n'a aucun effet sur la production des biosurfactants, sur la production de pyoverdine ou encore sur l'activité hémolytique de la bactérie, ce neurotransmetteur a été associé à des réarrangements de la structure du LPS de la bactérie en particulier dans la région du lipide A. D'autre part, le GABA augmente l'activité nécrotique de *P. fluorescens* MF37 envers des cellules gliales mais réduit l'effet apoptotique de cette souche. Un senseur putatif du GABA a pu être identifié chez *P. fluorescens*, il s'agit de GBP (Guthrie *et al.*, 2000) et plus récemment une autre cible potentielle du GABA a été suggéré, il s'agit du facteur d'élongation efTU (Dagorn *et al.*, 2013).

La sérotonine joue un double rôle d'hormone et de neurotransmetteur dans le système nerveux central (**Figure 18**). Bien que cette molécule soit associée à l'humeur et donc aux fonctions cérébrales, de manière intéressante, 90% de la sérotonine retrouvée dans l'organisme est présente au niveau de la muqueuse intestinale (King, 2009). On sait également que sa production est directement régulée par le microbiote (Clarke *et al.*, 2013). La sérotonine est synthétisée et libérée par les cellules entérochromaffines et les thrombocytes au niveau intestinal.

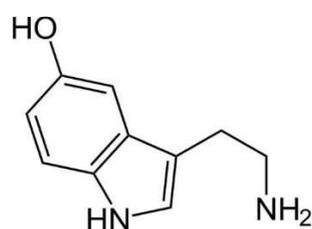


Figure 18 Structure de la sérotonine (5HT)

La sérotonine ajoutée dans une culture d'*E. coli* K12 stimule la prolifération cellulaire et l'accumulation de biomasse (Anuchin *et al.*, 2008). Dans ces travaux, les auteurs ont montré une courbe de croissance bactérienne dépendante de la concentration de sérotonine mais non linéaire, ce qui laisse envisager un mécanisme d'action de la molécule dépendant d'un récepteur ou d'un senseur (Anuchin *et al.*, 2008). La sérotonine est aussi connue pour stimuler la croissance et l'agrégation cellulaire d'autres espèces bactériennes, notamment d'*E. faecalis* ainsi que certains micro-organismes eucaryotes tels que la levure *Candida guilliermondii* (Strakhovskaia *et al.*, 1993). Il a été démontré que l'addition de 2,5-40mcM de sérotonine dans le milieu de culture de *Yersinia pestis* EV-76 et *Francisella tularensis* n'a pas d'effet sur la croissance bactérienne que ce soit à 28 ou à 37°C. Cependant l'administration de la sérotonine pendant une heure avant l'infection de souris par *Y. pestis* augmente la valeur de LD50 (dose létale 50) et diminue également le temps de survie des animaux.

Bactéries et catécholamines

Les catécholamines sont des composés organiques jouant un rôle d'hormone ou de neurotransmetteur (**Figure 19A**). Elles sont synthétisées par les cellules de la médullo-surrénale ainsi que par les neurones postganglionnaires du système nerveux orthosympathique à partir de la tyrosine. Au niveau structural, les catécholamines possèdent un noyau catéchol portant en position 1 une chaîne latérale éthylamine éventuellement substituée. Le noyau catéchol est caractérisé par la présence de deux groupements hydroxyles adjacents sur un noyau benzénique en position 3 et 4. Les catécholamines sont impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques centrales et périphériques telles que les fonctions cognitives, la régulation de l'humeur ainsi que la motilité intestinale (Eisenhofer G *et al.*, 2004). D'autre part, le tractus gastro-intestinal est densément innervé par les nerfs noradrénergique et dopaminergiques dont les fibres sont retrouvées dans la muqueuse (Li *et al.*, 2006). De plus, il a été découvert récemment que les cellules phagocytaires produisent des catécholamines (Flierl *et al.*, 2007). De manière intéressante, il a été mis en évidence que le LPS bactérien induit le relargage d'épinéphrine et de norepinéphrine par les macrophages dans la circulation sanguine (Flierl *et al.*, 2007 ; Flierl *et al.*, 2009). Les catécholamines présentes au niveau du système entérique seraient délivrées dans la lumière intestinale, participant ainsi aux concentrations locale et luminale en particulier lors d'épisodes pathologiques de stress sévère ou d'infections entériques (Asano *et al.*, 2012).

Ces molécules sont depuis longtemps connues pour stimuler la croissance de nombreuses bactéries telles que *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, de même qu'*E. coli* (Belay & Sonnenfeld 2002). Freestone *et al.*, (2007) ont démontré une spécificité d'induction de la croissance bactérienne en fonction de la catécholamine étudiée. En effet, ils ont testé l'effet de la dopamine, la norepinéphrine et l'épinéphrine sur trois souches bactériennes : *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* et *Yersinia enterocolitica*, il s'avère que les deux premières

souches répondent à chacune des trois substances testées même si l'impact de l'épinéphrine sur la croissance de ces deux bactéries est moins important que pour la dopamine et la norepinéphrine. De plus, il est notable que l'épinéphrine n'a pas eu d'effet sur la croissance de *Y. enterocolitica* contrairement à la dopamine et à la norepinéphrine.

En dehors de ces informations relatives à l'impact des catécholamines sur la croissance bactérienne, de nombreuses données quant à leur effet sur la virulence des bactéries sont maintenant disponibles.

Impact de l'épinéphrine et de la norepinéphrine sur les bactéries

Parmi les catécholamines (**Figure 19 A**) dont l'effet a été étudié chez les bactéries, on peut tout particulièrement citer l'épinéphrine et la norepinéphrine également connues sous le nom d'adrénaline et de noradrénaline respectivement. L'épinéphrine et la norepinéphrine sont toutes deux sécrétées par la médulla des glandes surrénales (**Figure 19 B et C**) mais également produites à l'extrémité des fibres nerveuses sympathiques où elles jouent le rôle de médiateurs chimiques en transférant les messages nerveux aux organes effecteurs. Ces deux neurotransmetteurs possèdent des structures apparentées, en effet, la norepinéphrine est quant à elle le précurseur de l'épinéphrine.

pourrait posséder différents systèmes de réponse à ces deux catécholamines. Confortant les observations faites lors de l'analyse par micropuces ADN, Li *et al.*, (2012) ont constaté que l'activité cytotoxique de la souche est augmentée par l'épinéphrine mais réprimée par la norepinéphrine mais qu'en revanche l'adhésion des bactéries aux cellules hôtes est augmentée sous l'effet de la norepinéphrine mais pas de l'épinéphrine. Ainsi ces neurotransmetteurs, bien que proches au niveau structural, n'activent pas toujours les mêmes voies métaboliques chez les bactéries qui les perçoivent et ne semblent pas toujours entraîner le même type de réponse bactérienne. Il a été démontré que la norepinéphrine entraîne l'augmentation de la croissance de *P. aeruginosa* en permettant un apport en fer à partir de la transferrine et ceci de manière indépendante à la pyoverdine. En effet, chez *P. aeruginosa*, la norepinéphrine est notamment capable d'entraîner la répression de l'expression de *toxA* et des gènes liés à la production des sidérophores. Ainsi, la norepinéphrine influencerait la pathogénicité de *P. aeruginosa* en affectant sa croissance et sa production de facteurs de virulence (Li *et al.*, 2009). D'autre part, la concentration de norepinéphrine augmente au niveau de l'intestin sous des conditions de stress ou de traumatisme or cette substance est connue pour stimuler la pathogénicité d'*E. coli*. Dans ce même microenvironnement, Cogan *et al.*, (2007) ont pu démontrer qu'un traitement avec 100µM norepinéphrine augmente le taux de croissance et la mobilité de *Campylobacter jejuni* ainsi que sa capacité à envahir les cellules épithéliales. De plus, cette bactérie provoque des dommages aux monocouches de cellules épithéliales digestives ainsi que des cassures au niveau des jonctions serrées ; cependant ces altérations sont plus importantes sous l'effet de la bactérie exposée à la norepinéphrine lors de sa croissance. Par ailleurs, ce neurotransmetteur en plus d'être capable de stimuler de manière importante la croissance de certains isolats cliniques d'*E. coli* : 0157 :H7, conduit à la production de Shiga-like toxins par ces mêmes bactéries (Lyte *et al.*, 1999). La norepinéphrine est aussi capable de stimuler l'activité cytotoxique de *Vibrio parahaemolyticus* en entraînant notamment la

transcription des gènes *vscQ* et *vscU* relatifs au SST1. Ainsi, la norepinéphrine retrouvée au niveau entérique modulerait la pathogénicité de *V. parahaemolyticus*. (Nakano 2007). Ce neurotransmetteur possède également des propriétés chémoattractantes envers *Brachyspira pilosicoli*. A une concentration de 0,05 mM, la croissance de cette bactérie est stimulée, son attraction pour les mucines augmentée, son taux d'attachement aux entérocytes potentialisé, favorisant ainsi la colonisation de cette bactérie (Naresh & Hampson 2011).

Récepteurs adrénérgiques bactériens

Chez les mammifères l'épinéphrine et la norepinéphrine sont reconnues par des récepteurs couplés aux protéines G. Ces neurotransmetteurs étant capables de modifier le comportement des bactéries, il semble donc évident que les bactéries puissent posséder des systèmes senseurs pour ces molécules.

En effet, on sait aujourd'hui que le système de QS AI-3/Epi/NE intervient dans le dialogue inter-règne avec les hormones épinéphrine et norepinéphrine. Ce système active la transcription des gènes de virulence chez les EHEC ainsi que chez les *E. coli* entérotoxiques (ETEC) (Marcie *et al*, 2006).

Le système de quorum sensing AI-3/Epi/NE

Au sein de ce système, l'histidine kinase senseur QseC, originellement identifiée chez *E. coli* par Sperandio *et al.*, (2002) est un récepteur adrénérgique bactérien capable de répondre à l'épinéphrine comme à la norépinéphrine. QseC est une protéine transmembranaire qui interagit via son domaine périplasmique avec AI-3 et les hormones de stress épinéphrine et norepinéphrine. Ainsi, l'épinéphrine peut se fixer sur QseC et initier une cascade de

régulation. Une fois AI-3 ou l'épinéphrine fixé sur le récepteur, il advient une autophosphorylation du récepteur au niveau de son domaine cytoplasmique qui va ensuite transférer son groupement phosphate à son régulateur de réponse QseB entraînant ainsi une cascade de signalisation conduisant à l'expression de certains gènes notamment des gènes de virulence. En effet, QseB va alors activer la transcription de FlhDC : le régulateur transcriptionnel du régulon flagellaire et autorégule sa propre transcription en se fixant au niveau des promoteurs flhDC tout comme qseBC respectivement. Ainsi, le gène qseBC code pour un système à deux composants du QS bactérien en réponse à la détection de ces molécules. Chez *E. coli* un autre récepteur adrénérgique de type histidine kinase a été identifié il s'agit de QseE qui quant à lui possède un élément régulateur nommé QseF. Ce second récepteur est un senseur de l'épinéphrine, du sulfate ainsi que du phosphate. En effet, Bansal *et al.*, (2007) ont pu constater que sous l'effet de l'épinéphrine et de la norepinéphrine et via ce récepteur, on observe une augmentation de l'expression des gènes liés à la mobilité ainsi que d'autres liés à la formation de biofilms chez *E. coli* O157:H7. QseE a également été identifié chez d'autres pathogènes comme *S. enterica* serovar typhimurium dont l'action en synergie avec QseC module différents aspects de sa pathogénèse (Moreira & Sperandio 2012). D'autres récepteurs adrénérgiques ont pu être identifiés chez certaines bactéries à Gram négatif. En effet, des homologues de QseBC sont présents chez de nombreux pathogènes comme les *E. coli* uropathogènes (UPEC), les *E. coli* entérotoxinogènes (EPEC), *S. enterica* serovar Typhi, *Pasteurella multocida*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus influenzae* ainsi que *E. coli* K12, une bactérie commensale (Clarke & Sperandio 2005) (**Tableau 1**). Il a été démontré que des récepteurs homologues à QseC existant chez *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus* ainsi que *Edwardsiella tarda* permettaient à l'épinéphrine de jouer un rôle de signal pour réguler différents facteurs de virulence impliqués notamment dans la mobilité, l'invasion et la formation de lésion par attachement et

effacement (A/E) ce qui est typique des infections à EHEC et à *E. coli* entéropathogènes. Chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, le récepteur homologue de QseC est un facteur clef dans sa pathogénèse (Moreira *et al.*, 2010). Au vue de tous ces éléments amenant à considérer le dialogue existant entre les micro-organismes et leur hôte, dialogue pouvant être l'essence d'un signal conduisant à l'augmentation de la virulence de certaines souches, un nouveau pan de recherche se penche maintenant sur la mise au point et l'utilisation d'inhibiteur de QseC. Curtis *et al.*, (2014) propose l'inhibiteur LED209, dirigé contre cette histidine kinase ; c'est donc un inhibiteur hautement spécifique des récepteurs adrénérgiques bactériens mais à large spectre au sein des bactéries à Gram négatif pouvant offrir une alternative face à la résistance de certains pathogènes aux antibiotiques. D'autre part, bien que les rôles des récepteurs bactériens adrénérgiques QseC et QseE soient bien caractérisés chez de nombreux pathogènes des rapports récents mettent en lumière l'existence de nouveaux récepteurs bactériens adrénérgiques participant activement aux interactions hôte-pathogène et impliquant les hormones de stress que sont l'épinéphrine et la norepinéphrine (Karavolos *et al.*, 2013). Parmi ceux-ci, on répertorie les senseurs BasS et CpxA des systèmes de transduction des signaux à deux composants de BasSR et CpxAR respectivement (Reading *et al.*, 2007 ; Karavolos *et al.*, 2008b ; 2011a ; Spencer *et al.*, 2010) (**Tableau 1**).

Noms	Poids (kDa)	Fonctions	Hormones	Références
TBD	varié	↗ croissance	Epi/NE	Freestone <i>et al.</i> , 2007
QseC	50,6	↗ virulence	Epi/NE	Clarke <i>et al.</i> , 2006
QseE	51,6	↗ virulence	Epi	Reading <i>et al.</i> , 2007
BasS	40,2	Résistance au peptide antimicrobien	Epi/NE	Karavolos <i>et al.</i> , (2008)
CpxA	51,6	Stress de l'enveloppe/hémolyse	Epi/NE	Karavolos <i>et al.</i> , (2011)

Tableau 1 Liste des récepteurs adrénérgiques bactériens putatifs

Un modèle de signalisation et d'interaction entre bactéries pathogènes et hormones de stress a été proposé par Karavolos *et al.*, (2014) **Figure 20**. Ces hormones de stress sont naturellement produites par le système neuroendocrinien au niveau des synapses où elles sont perçues par des récepteurs couplés aux protéines G. Une fois les récepteurs activés, ils facilitent le relargage des sous unités β et γ des protéines G avec un échange subséquent du GTP contre le GDP et leur association avec des partenaires effecteurs (E). Ainsi lors de l'infection, le LPS bactérien présent sur la membrane cellulaire bactérienne induit la sécrétion des hormones de stress par les neutrophiles et les macrophages de l'hôte. Les récepteurs adrénérgiques membranaires bactériens sont aussi capables de percevoir et de répondre à des signaux hétérologues à travers une altération du statut de phosphorylation du régulateur de réponse. Cependant la signalisation par les hormones de stress s'accomplit également de manière indépendante des récepteurs adrénérgiques bactériens via les protéines réceptrices de sidérophore médiant alors la provision de fer et l'augmentation de la croissance bactérienne.

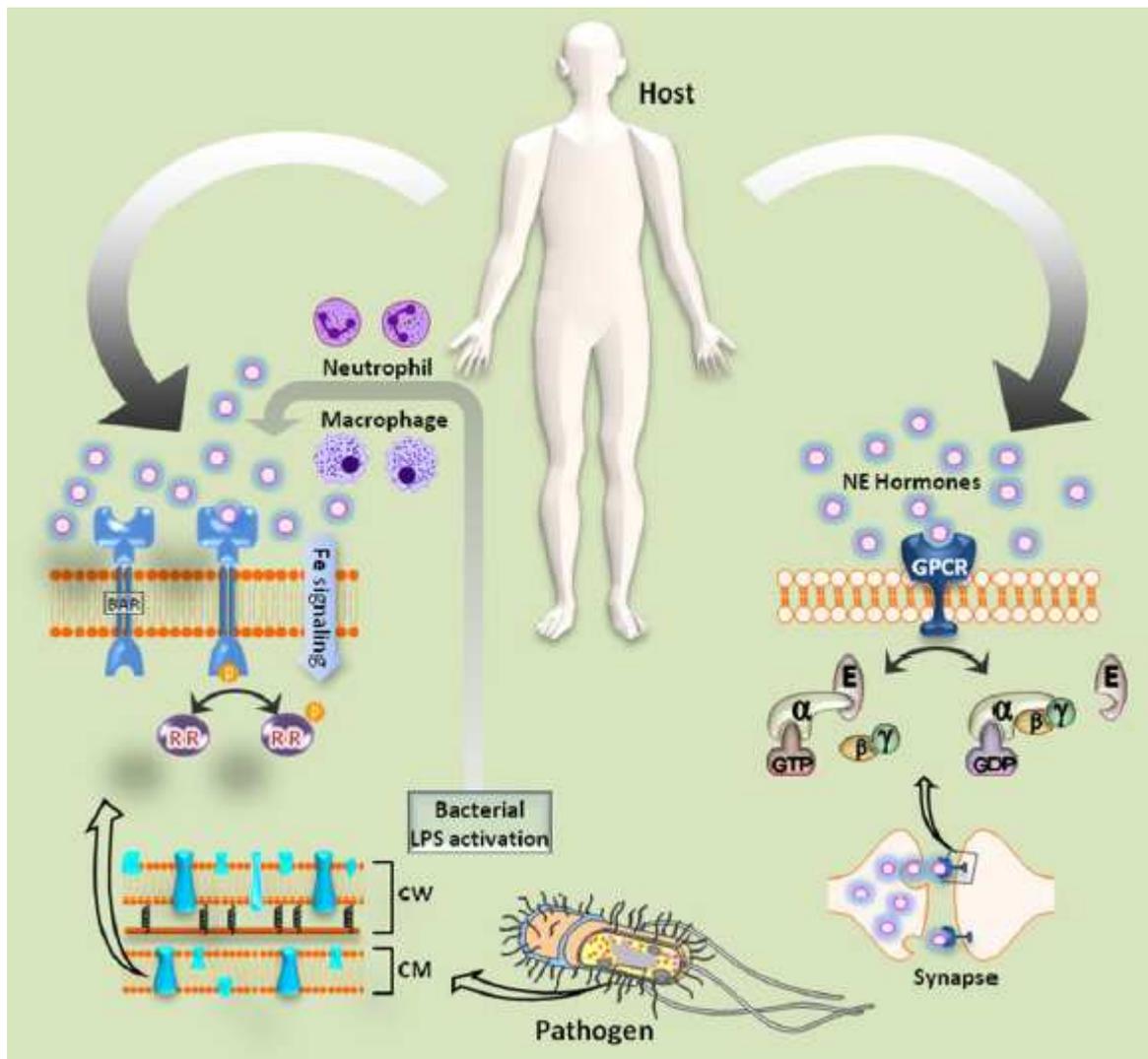


Figure 20 Signalisation et interactions entre bactéries pathogènes et hormones de stress (NE)

Ainsi de manière générale aujourd'hui, on peut constater qu'il existe un véritable dialogue entre les bactéries et leur hôte et que cette communication est bidirectionnelle. Ces échanges ont lieu grâce à de petites molécules pouvant être de type hormonal, nerveuse, peptidique, et cette communication est possible grâce à la perception chez les bactéries de signaux via des récepteurs. La nature de ces récepteurs s'avère être variée allant des récepteurs membranaires de type histidine kinase, porine, à des régulateurs transcriptionnels (Curtis *et al.*, 2014 ; Wu *et al.*, 2005 ; Xiao *et al.*, 2006).

Objectifs du travail

La lumière intestinale héberge l'essentiel de la population bactérienne commensale du corps humain et si les relations entre l'hôte et son microbiote sont généralement bénéfiques et essentielles pour les deux parties, des variations environnementales en apparence marginales pourraient induire des déséquilibres majeurs et conduire à des pathologies. Le microbiote intestinal est en contact permanent avec le système entéro-endocrinien, et en particulier avec les médiateurs qu'il délivre. Il n'est pas à exclure que ces facteurs jouent un rôle dans l'expression de la virulence des bactéries intestinales et pourraient favoriser ainsi l'apparition de pathobionte. Le concept d'endocrinologie microbienne proposé dans les années 1990 par Lyte a révélé qu'il existe en effet un véritable dialogue bidirectionnel entre les bactéries et les cellules eucaryotes (Lyte & Ernst 1992 ; Lyte 1993 ; Lyte *et al.*, 1996 ; Freestone *et al.*, 2008; Lyte 2014).

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été d'étudier l'effet de facteurs entéro-endocriniens sur des bactéries intestinales. Au vu du grand nombre de germes présents dans l'intestin et pouvant être en contact avec une myriade de facteurs entéro-endocriniens, j'ai sélectionné pour ce travail la sérotonine, la substance P, l'épinéphrine, l'alpha melanocyte stimulating hormone et le peptide YY, et j'ai examiné leur effet sur la physiologie et la virulence de bactéries du genre *Pseudomonas* (modèle Gram négatif) et sur *Enterococcus faecalis* (modèle Gram positif).

Le chapitre 1 présente les résultats qui ont été obtenus dans le cas de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis du criblage de l'ensemble des facteurs entéro-endocriniens sélectionnés. L'étude a ensuite été élargie à *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis* (chapitres 2 et 3) en se focalisant sur deux substances qui avaient provoqué des effets notables sur *Pseudomonas fluorescens* (l'épinéphrine et la substance P) et pour lesquelles l'effet sur la virulence bactérienne avait déjà été noté dans la littérature (Karavolos *et al.*, 2013, Mijouin *et al.*, 2013)

Enfin, pour avoir une vision plus globale de l'effet de facteurs entéro-endocriniens sur le microbiote intestinal, je me suis intéressée dans la dernière partie de mon travail de thèse à l'anorexie, un trouble alimentaire connu pour être associé à des modifications hormonales

(Singhal *et al.*, 2014). Cette étude a été réalisée sur un modèle de souris anorexiques et la composition du microbiote intestinal de ces souris a été déterminée par analyse MALDI/Biotyper (chapitre 4).

L'ensemble de ces travaux a été rendu possible grâce à la mise en place d'une collaboration et co-direction de thèse entre le laboratoire LMSM situé à Evreux (Dr Nathalie Connil) et le laboratoire UMR1073 (Pr Pierre Déchelotte) de Rouen. Cette co-direction m'a permis de compléter les études *in vitro* réalisées au LMSM, par une approche à l'expérimentation animale et de bénéficier pour l'ensemble de ma thèse, de l'expertise du laboratoire UMR1073, sur la nutrition et la physiologie de l'intestin.

Résultats

Chapitre I

Effet des facteurs neuroendocriniens intestinaux sur la virulence de *Pseudomonas fluorescens*

1-Introduction

Pseudomonas est un genre bactérien capable de s'adapter à de nombreux environnements différents. Au sein de ce genre, l'espèce la mieux caractérisée est *Pseudomonas aeruginosa*, pathogène opportuniste redoutable chez les sujets affaiblis et qui peut provoquer des infections aiguës ou chroniques. *P. fluorescens*, *putida* ou *mosselii* ont également été isolées de façon sporadique chez des patients hospitalisés mais leur association à la pathologie n'a pas toujours été clairement établie (Peix *et al.*, 2009). De fait, *P. fluorescens* a longtemps été considérée essentiellement comme un micro-organisme phytoprotecteur de la rhizosphère (Alsohim *et al.*, 2014). Cependant, ce germe est aussi présent à bas niveau comme bactérie commensale de l'intestin chez l'homme (Wei *et al.*, 2002). De plus, l'antigène I2 hautement spécifique de *P. fluorescens* a pu être détecté dans le sérum de 54% des patients atteints de la maladie de Crohn (Sutton *et al.*, 2000) et une corrélation entre la sévérité de la pathologie et le niveau d'antigène I2 a été démontrée (Dalwadi *et al.*, 2001). Plus récemment, *P. fluorescens* a également pu être isolée à partir de l'estomac (Patel *et al.*, 2013), et ces auteurs ont suggéré que cette bactérie pourrait être aussi fréquente que *H. pylori* dans le tractus digestif. Au cours des cinq dernières années, l'isolement de *P. fluorescens* comme agent responsable d'infections nosocomiales n'a cessé d'augmenter (Donnarumma *et al.*, 2010; Scales *et al.*, 2014). De plus, certaines souches cliniques de *P. fluorescens*, telle que MFN1032 sont adaptées à la température physiologique humaine (Chapalain *et al.*, 2008), présentent un potentiel pathogène important (Rossignol *et al.*, 2008; Sperandio *et al.*, 2010) et entraînent une réponse inflammatoire spécifique chez les entérocytes (Madi *et al.*, 2010). Il a été découvert récemment que *P. fluorescens* est aussi capable d'induire et de détourner à son profit, la sécrétion de la β -defensine-2 humaine, produite par les cellules épithéliales intestinales, afin d'augmenter sa virulence (Madi *et al.*, 2013).

Le système entérique, souvent considéré comme le second cerveau de notre organisme, libère dans la lumière intestinale, une multitude de neurotransmetteurs et neurohormones qui se retrouvent ainsi en contact avec le microbiote résident et transitoire de l'intestin. L'impact de ces molécules sur la physiologie des bactéries de l'intestin, et notamment sur *P. fluorescens* n'est pas connu. Dans ce

contexte, j'ai donc choisi d'étudier, l'effet de la sérotonine (5HT), la substance P (SP), l'épinéphrine (Epi), l'alpha-melanocyte-stimulating-hormone (α MSH) et du peptide YY (PYY), molécules présentes dans la lumière intestinale, sur la virulence de *P. fluorescens*.

2. Article

The pathogenic potential of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 on enterocytes can be modulated by serotonin, substance P and epinephrine.

[Biaggini K](#), Barbey C, Borrel V, Feuilleley M, Déchelotte P and Connil N (2015). Arch Microbiol. 197(8):983-990. doi: 10.1007/s00203-015-1135-y.

The pathogenic potential of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 on enterocytes can be modulated by serotonin, substance P and epinephrine

Kelly Biaggini^{1,2} · Corinne Barbey¹ · Valérie Borrel¹ · Marc Feuilloley¹ · Pierre Déchelotte² · Nathalie Connil¹

Received: 16 March 2015 / Revised: 23 June 2015 / Accepted: 4 July 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract *Pseudomonas fluorescens* is a commensal bacterium present at low level in the human digestive tract that has also been reported in many clinical samples (blood, urinary tract, skin, lung, etc.) and sometimes associated with acute opportunistic infections. It has recently been found that the human β -defensin-2 can enhance the pathogenic potential of *P. fluorescens*. In this study, we evaluated the effect of other intestinal molecules (5HT, SP and Epi) on growth and virulence of the clinical strain *P. fluorescens* MFN1032. We found that *P. fluorescens* MFN1032 growth was not mainly affected by these factors, but several modifications in the virulence behavior of this bacterium were observed. 5HT, SP and Epi were able to modulate the motility of *P. fluorescens* MFN1032. 5HT and SP had an effect on pyoverdinin production and IL-8 secretion,

respectively. Infection of Caco-2/TC7 cells with *P. fluorescens* MFN1032 pretreated by SP or Epi enhanced the permeability of the monolayers and led to a partial delocalization of F-actin to the cytoplasm. These findings show that some intestinal molecules can modulate the pathogenic potential of *P. fluorescens* MFN1032. We can hypothesize that this dialogue between the host and the human gut microbiota may participate in health and disease.

Keywords Serotonin · Substance P · Epinephrine · *Pseudomonas fluorescens* · Virulence

Introduction

Pseudomonas is a large genus, currently comprised of more than 100 species with remarkable metabolic and physiologic versatility, enabling them to adapt and colonize diverse ecological niches (Silby et al. 2011). The two best characterized *Pseudomonas* species are *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. *P. aeruginosa* is one of the most common opportunistic pathogens that are present at clinically undetectable levels in the normal gastrointestinal tract (Alverdy et al. 2000). *P. fluorescens* is often considered as a plant-growth-promoting rhizobacterium (Alsohim et al. 2014), but is also present in the human gut as a low level commensal (Wei et al. 2002). Interestingly, a highly specific antigen of *P. fluorescens*, designated as I2, was detected in the serum of 54 % of the patients suffering from Crohn's disease (Sutton et al. 2000), and a correlation between the severity of the pathology and the level of the circulating I2 antigen has been demonstrated (Dalwadi et al. 2001). Recently, a *P. fluorescens*-like bacterium has been isolated from the human stomach (Patel et al. 2013) and the authors estimated that *P. fluorescens* may be as common as *Helicobacter pylori* in the

Communicated by Djamel Drider.

✉ Nathalie Connil
nathalie.connil@univ-rouen.fr

Kelly Biaggini
kelly.biaggini@univ-rouen.fr

Corinne Barbey
corinne.barbey@univ-rouen.fr

Valérie Borrel
valerie.borrel@gmail.com

Marc Feuilloley
marc.feuilleley@univ-rouen.fr

Pierre Déchelotte
Pierre.Dechelotte@chu-rouen.fr

¹ Laboratoire de Microbiologie, Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA4312, Université de Rouen, Évreux, France

² INSERM Unité 1073 «Nutrition, Inflammation et dysfonction de l'axe intestin-cerveau», Université de Rouen, Rouen, France

gastrointestinal tract. The presence of *Pseudomonas* spp. in 80 % of antral biopsies has already been reported since 1975 (Steer and Colin-Jones 1975), and it has been suggested later that *Pseudomonas* strains may interfere with the identification of *H. pylori* (Domínguez-Bello et al. 2000). In the last few years, the isolation of *P. fluorescens* as the causative agent of nosocomial infections has rapidly increased (Donnarumma et al. 2010; Scales et al. 2014). This bacterium is also commonly isolated from respiratory specimens following lung transplantation (Dickson et al. 2014). Some clinical strains of *P. fluorescens* such as MFN1032 are adapted to the human physiological temperature (Chapalain et al. 2008), show various pathogenic potential (Rossignol et al. 2008, 2009; Sperandio et al. 2010, 2012) and trigger a specific inflammatory response in enterocytes (Madi et al. 2010). In fact, we also found recently that *P. fluorescens* could alter the intestinal barrier function by modulating IL-1 β expression through hematopoietic NOD2 signaling (Alnabhani et al. 2015).

In the host, bacteria are exposed to various innate defense mechanisms, but many pathogenic germs, like *Shigella*, enteropathogenic *Escherichia coli*, *Listeria*, *Staphylococcus* or *Streptococcus*, are able to escape or interfere with these protection systems (Phalipon and Sansonetti. 2007; Tattoli et al. 2013; Long et al. 2014; Okumura and Nizet. 2014). We have previously found that *P. fluorescens* can induce and divert the human β -defensin-2 secretion in intestinal epithelial cells, leading to an increase in virulence (Madi et al. 2013). However, the enteric system, which is sometimes designated as the second brain, releases also a multitude of neurotransmitters and neurohormones, and the impact of these enteroendocrine molecules on *P. fluorescens* remains largely unknown.

In the present work, we investigated the effect of serotonin (5HT), substance P (SP) and epinephrine (Epi) on the growth, motility and virulence of the clinical strain *P. fluorescens* MFN1032.

Materials and methods

Bacterial strain

Pseudomonas fluorescens MFN1032 was collected from a pulmonary tract infection in a hospital of Haute-Normandie (France; Chapalain et al. 2008) and routinely cultivated at 28 °C, in ordinary nutrient broth (ONB; Merck, Darmstadt, Germany).

Bacterial growth with 5HT, SP and Epi

Overnight cultures of *P. fluorescens* MFN1032 were diluted in ONB to a final optical density (OD) of 0.08 at 600 nm. 5HT, SP or Epi were added to a final concentration of 10⁻³ or 10⁻⁶ M. Bacteria were then grown for 24 h with

a Bioscreen spectrophotometer using the following parameters: shaking, reading every 30 min, temperature of 28 °C. Each culture was grown in triplicate, and the experiment was repeated three times.

Swarming and swimming motility assays

To test on motility, a sterile needle was used to lightly touch bacterial cultures and spotted gently in the middle of a swarm plate (Luria–Bertani Broth, 0.6 % bacteriological agar) or a swim plate (Luria–Bertani Broth, 0.3 % bacteriological agar). The plates were incubated at 28 °C, and the migration of bacteria was measured after 24 h from the point of inoculation (observed as a turbid zone in centimeters).

Production of pyoverdinin

Pyoverdinin production of *P. fluorescens* MFN1032 was determined after 48 h of growth in Bacto Casamino Acids medium (CAA). The results were expressed as the OD_{400 nm}/OD_{600 nm} ratio of the supernatant after removal of the bacteria by centrifugation (5 min, 10,000g) as previously described (Dagorn et al. 2013).

Caco-2/TC7 cells culture

The human colon adenocarcinoma cell line Caco-2/TC7 was used between passages 40–60. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 15 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 2 mM of L-glutamine, 100 U/ml each of penicillin and streptomycin and 1 % of nonessential amino acids. The cells were seeded and cultivated at 37 °C in 5 % CO₂–95 % air atmosphere, in 24-well tissue culture plates until confluence for cytotoxicity assay and quantification of IL-8; and on inserts (6.4 mm diameter, 3 μ m pore size, Falcon) until full differentiation (21 days) for transepithelial resistance measurements (TER) and actin staining.

Bacterial treatment with 5HT, SP or Epi and infection of Caco-2/TC7 cells

5HT, SP or Epi (10⁻⁶ M) were added to the cultures of *P. fluorescens* MFN1032 at the beginning of the exponential growth phase. After 4 h of exposition to these neuroendocrine factors, bacteria were collected by centrifugation for 5 min at 8000g, rinsed to remove any trace of the molecules and resuspended in DMEM without antibiotics and serum. Confluent or differentiated Caco-2/TC7 cells grown in 24-well plates or insert were then infected with control or treated bacteria at a MOI (multiplicity of infection) of 100:1 and incubated overnight at 37 °C in 5 % CO₂.

Cytotoxicity assay and quantification of IL-8

Supernatants from Caco-2/TC7 undifferentiated monolayers were collected after 18 h of infection. The concentration of lactate dehydrogenase (LDH), a cytoplasmic enzyme released upon cell death, was determined using the Cytotox 96 enzymatic assay (Promega, France). Total LDH release (100 % dead cells) was obtained by exposing Caco-2/TC7 cells to Triton X100 (0.9 %) as recommended by the manufacturer's instructions. IL-8 cytokine secretion was measured using ELISA Quantikine kit (R&D Systems, France).

Transepithelial resistance measurements

The transepithelial resistance (TER) of differentiated Caco-2/TC7 monolayers was measured after 18 h of bacterial infection, using the Millicell Electrical Resistance System (Millipore Corp, Bedford, MA). TER values are expressed as percentages of the initial level of the TER (baseline) measured for each individual cell monolayer in the inserts at the onset of the experiment.

Actin staining

At the end of infection, differentiated Caco-2/TC7 monolayers were washed with PBS, fixed for 10 min with 3.7 % paraformaldehyde and permeabilized for 5 min with 0.2 % Triton X100 at room temperature. The cells were then incubated with 1 % bovine serum albumin in PBS for 10 min, and the apical F-actin cytoskeleton was stained with Alexa-488 phalloidin (1 U/insert) for 45 min at room temperature. Following three washes in PBS, cell monolayers were examined using a confocal laser scanning microscope (Zeiss, LSM710) equipped with an argon laser for 488 nm excitation of Alexa-488. An oil-immersion objective lens (X63) was used, and imaging parameters standardized to allow direct comparison between images.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error (SE) calculated over a minimum of three separate experiments. Statistical significance was determined using Student's *t* test.

Results

Bacterial growth with 5HT, SP and Epi

The growth of *P. fluorescens* MFN1032 with 10^{-6} or 10^{-3} M of 5HT (Fig. 1a), SP (Fig. 1b) or Epi (Fig. 1c) was monitored for 24 h. The results show that the three molecules tested had only few effects on the growth of *P.*

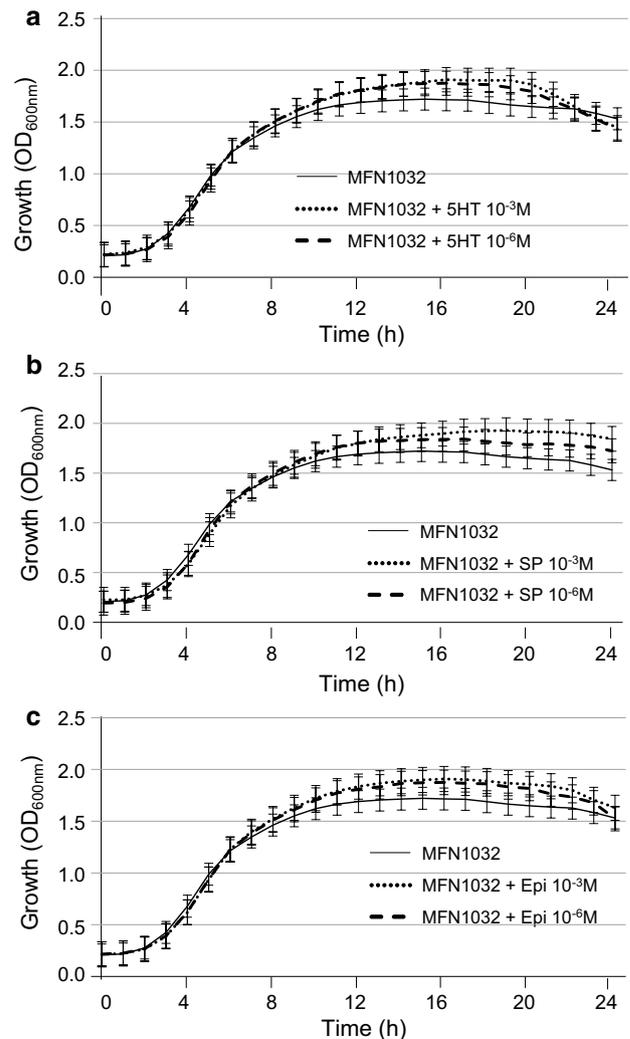


Fig. 1 Effect of 5HT, SP and Epi (10^{-6} and 10^{-3} M) on the growth of *P. fluorescens* MFN1032

fluorescens MFN1032. Lag phase and growth rate were not affected. This result indicates that if virulence is enhanced in the next experiments of our study, it could not be directly attributed to bacterial overgrowth.

Swimming and swarming motility tests

Swimming and swarming motilities were studied using 0.3 and 0.6 % agar in petri dishes. The migration distances of *P. fluorescens* MFN1032 pretreated or not with 5HT, SP or Epi were measured after 24 h incubation (Fig. 2). It appeared that only 5HT modulated significantly the swimming motility of *P. fluorescens* MFN1032. Indeed, untreated bacteria swam 5.7 ± 0.3 cm, whereas they reached 7.2 ± 0.3 cm after 5HT treatment. Conversely, the three molecules tested increased the swarming motility of *P. fluorescens* MFN1032, reaching 5.8 ± 0.3 , 6.3 ± 0.4

Fig. 2 Effect of 5HT, SP and Epi (10^{-6} M) on swimming (a) and swarming (b) motilities of *P. fluorescens* MFN1032. Y axis indicates the distance traveled (cm) by the bacteria. NS not significant, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, versus untreated bacteria

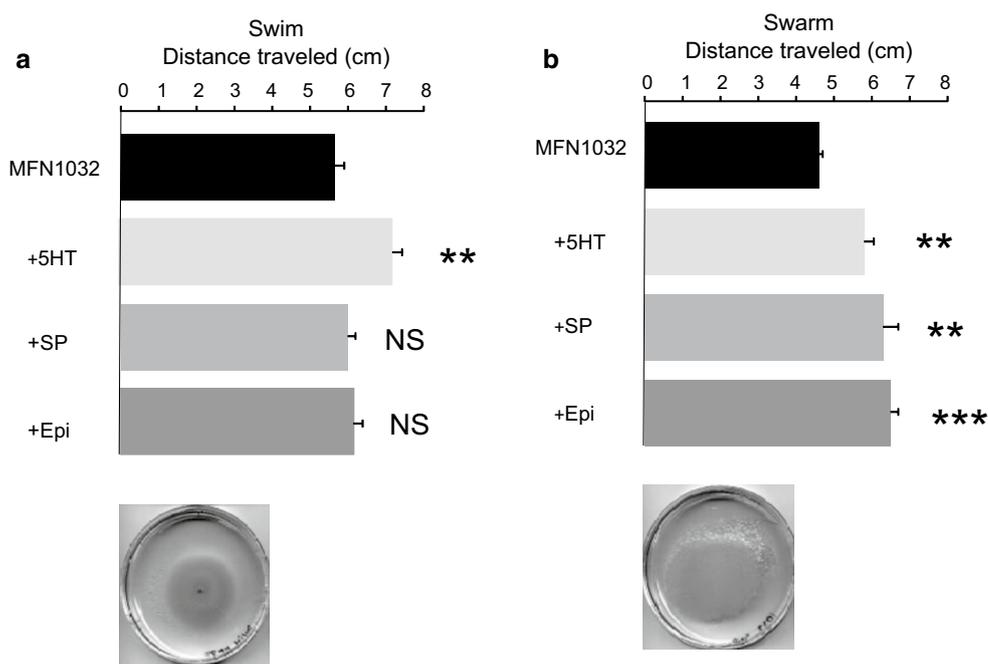
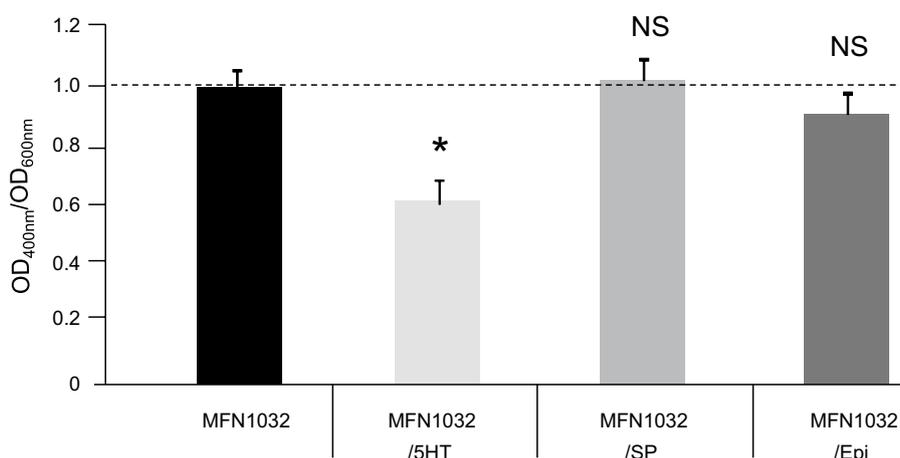


Fig. 3 Effect of 5HT, SP and Epi (10^{-6} M) on pyoverdinin production by *P. fluorescens* MFN1032. Pyoverdinin production is expressed as the ratio of pyoverdinin adsorption (OD_{400nm}) to the bacterial density (OD_{600nm}). NS not significant, * $P < 0.05$, versus untreated bacteria



and 6.5 ± 0.2 cm, in the presence of 5HT, SP and Epi, respectively, compared to 4.6 ± 0.1 cm for the untreated bacteria.

Production of pyoverdinin

Pyoverdinin is a siderophore and virulence factor essential for the colonization of bacteria belonging to *Pseudomonas* genus (Meyer et al. 1996). Here, we investigated the effect of 5HT, SP and Epi on the production of pyoverdinin by *P. fluorescens* MFN1032 after 48 h of bacterial culture (Fig. 3). The results show that 5HT induced a decrease in pyoverdinin production, whereas SP and Epi had no significant effect.

Cytotoxicity assay and IL-8 secretion

The cytotoxicity and pro-inflammatory potential of *P. fluorescens* MFN1032 treated with 5HT, SP or Epi were compared to untreated bacteria. We found that the cytotoxicity of *P. fluorescens* MFN1032 was not modified by any of the molecules tested (Fig. 4a), but when the bacteria were treated with SP before the infection of Caco-2/TC7 cells, the production of IL-8 was significantly increased (Fig. 4b).

Transepithelial electrical resistance measurements

The effect of *P. fluorescens* MFN1032 on differentiated Caco-2/TC7 cells was evaluated after 18 h of infection

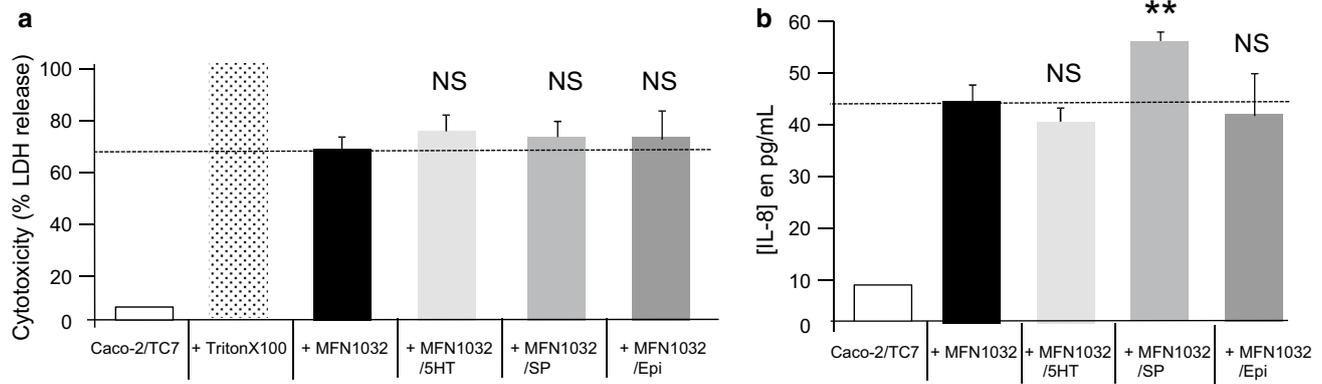
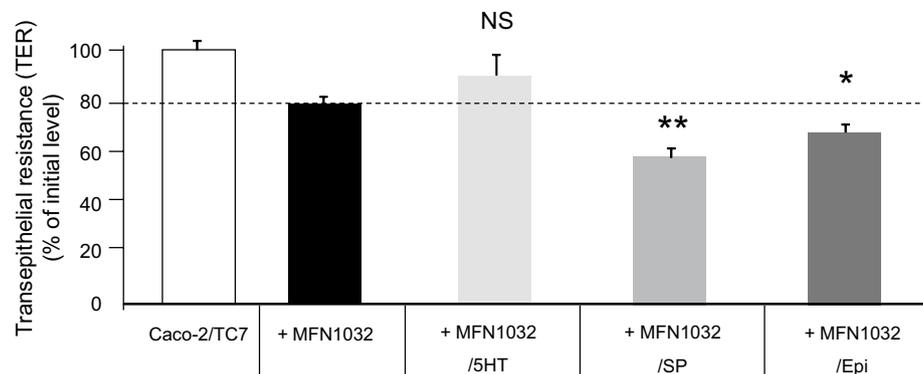


Fig. 4 Effect of 5HT, SP and Epi (10^{-6} M) on *P. fluorescens* MFN1032 cytotoxic activity toward Caco-2/TC7 cells (**a**) and pro-inflammatory potential: activation of interleukin-8 (IL-8) secretion

by Caco-2/TC7 cells (**b**). Cytotoxicity was evaluated by measurement of lactate dehydrogenase (LDH) released from damaged cells. NS not significant, ** $P < 0.01$, versus cells infected by untreated bacteria

Fig. 5 Effect of *P. fluorescens* MFN1032 treated or not by 5HT, SP and Epi (10^{-6} M) on the transepithelial resistance (TER) of differentiated Caco-2/TC7 cell monolayers after 18 h of infection. The data are expressed as percentage of the initial TER, measured across the monolayer at the onset of the experiment. NS not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus Caco-2/TC7 cell monolayers infected with untreated bacteria



(Fig. 5). The results show that the TER of the Caco-2/TC7 monolayers decreased more when the infection was done with the bacteria pretreated with SP or Epi than infection with the untreated bacteria. On the contrary, pretreatment of *P. fluorescens* MFN1032 with 5HT had no effect. This suggests that SP and Epi may enhance the damages of the monolayer provoked by the bacteria.

Actin staining

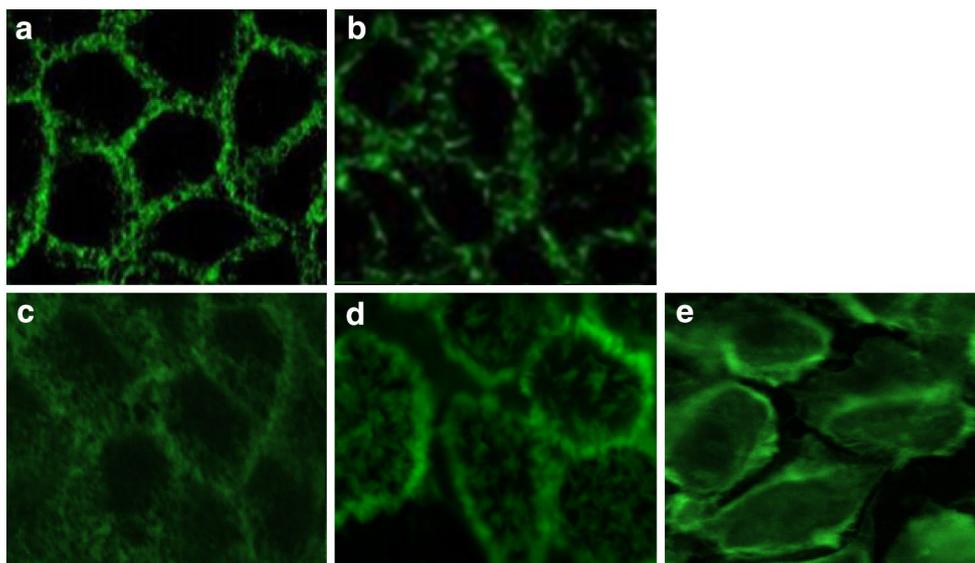
To visualize the results obtained by TER measurements, F-actin cytoskeleton was stained and observed by confocal microscopy. Differentiated Caco-2/TC7 cells showed a well-defined network of F-actin (Fig. 6a). When the monolayer was infected with *P. fluorescens* MFN1032, the F-actin appeared partly disorganized (Fig. 6b), and the same result was obtained when *P. fluorescens* MFN1032 was exposed to 5HT before infection of Caco-2/TC7 cells (Fig. 6c). Conversely, a pretreatment of the bacteria by SP (Fig. 6d) or Epi (Fig. 6e) led to the disruption of cell-to-cell contact of the epithelium and the redistribution of some F-actin filaments to the cytoplasm. These damages of the

Caco-2/TC7 monolayer are in agreement with the TER measurements.

Discussion

Although most widely studied for its role in the soil and the rhizosphere, *P. fluorescens* possesses a number of functional traits that provide it with the capability to grow and thrive in mammalian hosts. Multiple culture-based and culture-independent studies have identified it at low levels in the indigenous microbiota of various body sites. Although this germ is not generally considered as a bacterial pathogen in human, it has been associated with bacteremia and 54 % of Crohn's disease patients were found to develop serum antibodies to *P. fluorescens* (Sutton et al. 2000). This suggests that association between humans and *P. fluorescens* during health and disease may be complex. This bacterium was recently found to be able to induce and divert the human β -defensin-2 secretion in intestinal epithelial cells to enhance its virulence (Madi et al. 2013). However, the effect of other intestinal molecules produced by the

Fig. 6 Effect of *P. fluorescens* MFN1032 treated or not by 5HT, SP and Epi (10^{-6} M) on the F-actin cytoskeleton of Caco-2/TC7 cells. F-actin cytoskeleton was stained with Alexa Fluor® 488 phalloidin and examined using a confocal laser scanning microscope. Uninfected Caco-2/TC7 cells (a), Caco-2/TC7 cells infected with *P. fluorescens* MFN1032 (b), Caco-2/TC7 cells infected with *P. fluorescens* MFN1032 treated by 5HT (c), Caco-2/TC7 cells infected with *P. fluorescens* MFN1032 treated by SP (d), Caco-2/TC7 cells infected with *P. fluorescens* MFN1032 treated by Epi (e)



host on the virulence of *P. fluorescens* remains unknown. Our study shows for the first time that 5HT, SP and Epi can modulate the virulence behavior of the clinical strain *P. fluorescens* MFN1032, whereas its growth was feebly affected by these molecules even at high concentration level. Nevertheless, several eukaryotic molecules are known to be able to modulate positively or negatively the bacterial growth. High concentrations of SP ($>10^{-4}$ M) have previously been shown to display both direct and indirect antimicrobial activities on several bacteria including *E. coli* and *P. aeruginosa*, by acting as a weak cationic antimicrobial peptide (Kowalska et al. 2002; Hansen et al. 2006; Lesouhaitier et al. 2009). Conversely, 5HT added to an *E. coli* K12 culture stimulates cell proliferation and biomass accumulation (Anuchin et al. 2008), and the authors of this study showed a nonlinear concentration dependence curve probably due to a specific receptor-/sensor-dependent mechanism. 5HT was also found to enhance the growth and cellular aggregation of other bacterial species including *Streptococcus faecalis* or eukaryotic microorganisms, such as the yeast *Candida guilliermondii* (Strakhovskaia et al. 1993). Catecholamines, which include norepinephrine (NE), Epi and dopamine, are able to increase significantly the growth of *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *E. coli* (Belay and Sonnenfeld 2002), and this varies greatly among bacterial species (Belay et al. 2003). In our study, we found that even at concentrations much above those physiologically present in the host (10^{-3} M), the growth of *P. fluorescens* MFN1032 was not significantly affected by 5HT, SP and Epi, as previously observed for *P. fluorescens* with antimicrobial peptides (Madi et al. 2013), but also with γ -aminobutyric acid (GABA) (Dagorn et al. 2013) and natriuretic peptides (Veron et al. 2008).

We found that the modulation of virulence varied with the intestinal factor tested. SP and Epi were shown to increase the swarming motility of *P. fluorescens* MFN1032, while 5HT enhanced both the swimming and swarming capacities of the bacteria but led to a decrease in pyoverdinin production. In *E. coli* O157:H7 (EHEC), Epi and NE were found to increase motility and biofilm formation (Bansal et al. 2007). In fact, the AI-3 quorum-sensing system is involved in interkingdom signaling with the eukaryotic hormones Epi/NE. This AI-3/Epi/NE signaling system activates transcription of virulence genes in EHEC (Clarke et al. 2006) and is also found in other gram-negative bacteria like *Salmonella enterica* serovar Typhimurium for which this system is a key factor of in vitro and in vivo pathogenesis (Moreira et al. 2010). In *P. aeruginosa*, NE may replace siderophore by providing iron and this could repress the production of siderophores like pyoverdinin (Visca et al. 2002; Stintzi et al. 1999; Li et al. 2009).

None of the intestinal molecules tested significantly modulates the cytotoxicity of *P. fluorescens* MFN1032, but when the bacteria were pretreated with SP before infection of the Caco-2/TC7 cells, an increase in IL-8 secretion could be observed. Conversely, elevated necrotic activity has been found for *P. fluorescens* following treatment with natriuretic peptides (BNP, CNP) and GABA, and this was partially attributed to modifications in the LPS structure of the bacteria and surface properties (Veron et al. 2008; Dagorn et al. 2013). In addition, unlike our results, the cytotoxicity of *Bacillus cereus* has been found to be strongly stimulated after exposure to SP and increases in virulence in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* were also observed (Mijouin et al. 2013).

A pretreatment of *P. fluorescens* MFN1032 with SP or Epi before infection of Caco-2/TC7 cells enhanced the permeability of the monolayer as shown by TER measurement and observation of the cells and F-actin by confocal microscopy. Indeed, Caco-2/TC7 monolayers were more damaged when infected with *P. fluorescens* MFN1032 pretreated by SP or Epi than after infection with the untreated bacteria. The same kind of effect was reported for Caco-2 cells infected with *Campylobacter jejuni* after treatment by NE (Cogan et al. 2007). Indeed, these authors found that when *C. jejuni* was grown in iron-limited media in the presence of NE, growth rate, motility and invasion of cultured epithelial cells were increased compared with cultures grown in the absence of the molecule. Bacteria exposed to NE during growth also caused greater subsequent disruption of cultured epithelial cell monolayers, inducing widespread breakdown of tight junctions.

In summary, our results demonstrate that the virulence behavior of *P. fluorescens* MFN1032 can be modulated by intestinal factors and this effect is molecule dependent. This suggests that intestinal molecules may be sensed by the gut microbiota and probably participate in health and disease. In the future, further studies should be necessary to investigate the mode of action of the enteroendocrine factors on *P. fluorescens* MFN1032 virulence and the modulation of the gut microbiota.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Alnabhani Z, Montcuquet N, Biaggini K, Dussaillant M, Roy M, Ogier-Denis E, Madi A, Jallane A, Feuilloy M, Hugot JP, Connil N, Barreau F (2015) *Pseudomonas fluorescens* alters the intestinal barrier function by modulating IL-1 β expression through hematopoietic NOD2 signaling. *Inflamm Bowel Dis* 21(3):543–555
- Alsohim AS, Taylor TB, Barrett GA, Gallie J, Zhang XX, Altamirano-Junqueira AE, Johnson LJ, Rainey PB, Jackson RW (2014) The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion. *Environ Microbiol* 16(7):2267–2281
- Alverdy J, Holbrook C, Rocha F, Seiden L, Wu RL, Musch M, Chang E, Ohman D, Suh S (2000) Gut-derived sepsis occurs when the right pathogen with the right virulence genes meets the right host: evidence for in vivo virulence expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann Surg* 232(4):480–489
- Anuchin AM, Chuvelev DI, Kirovskaya TA, Oleskin AV (2008) Effects of monoamine neuromediators on the growth-related variables of *Escherichia coli* K-12. *Mikrobiologiya* 77(6):674–680
- Bansal T, Englert D, Lee J, Hegde M, Wood TK, Jayaraman A (2007) Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect Immun* 75(9):4597–4607
- Belay T, Sonnenfeld G (2002) Differential effects of catecholamines on in vitro growth of pathogenic bacteria. *Life Sci* 71(4):447–456
- Belay T, Aviles H, Vance M, Fountain K, Sonnenfeld G (2003) Catecholamines and in vitro growth of pathogenic bacteria: enhancement of growth varies greatly among bacterial species. *Life Sci* 73(12):1527–1535
- Chapalain A, Rossignol G, Lesouhaitier O, Merieau A, Gruffaz C, Guerillon J, Meyer JM, Orange N, Feuilloy MG (2008) Comparative study of 7 fluorescent pseudomonad clinical isolates. *Can J Microbiol* 54:19–27
- Clarke MB, Hughes DT, Zhu C, Boedeker EC, Sperandio V (2006) The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(27):10420–10425
- Cogan TA, Thomas AO, Rees LE, Taylor AH, Jepson MA, Williams PH, Ketley J, Humphrey TJ (2007) Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni*. *Gut* 56(8):1060–1065
- Dagorn A, Chapalain A, Mijouin L, Hillion M, Duclairioir-Poc C, Chevalier S, Taupin L, Orange N, Feuilloy MG (2013) Effect of GABA, a bacterial metabolite, on *Pseudomonas fluorescens* surface properties and cytotoxicity. *Int J Mol Sci* 14(6):12186–12204
- Dalwadi H, Wei B, Kronenberg M, Sutton CL, Braun J (2001) The Crohn's disease-associated bacterial protein I2 is a novel enteric cell superantigen. *Immunity* 15(1):149–158
- Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, Walker N, Scales BS, Beck JM, Martinez FJ, Curtis JL, Lama VN, Huffnagle GB (2014) Changes in the lung microbiome following lung transplantation include the emergence of two distinct pseudomonas species with distinct clinical associations. *PLoS ONE* 9(5):e97214
- Domínguez-Bello MG, Reyes N, Teppa-Garrán A, Romero R (2000) Interference of *Pseudomonas* strains in the identification of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 38(2):937
- Donnarumma G, Buommino E, Fusco A, Paoletti I, Auricchio L, Tufano MA (2010) Effect of temperature on the shift of *Pseudomonas fluorescens* from an environmental microorganism to a potential human pathogen. *Int J Immunopathol Pharmacol* 23(1):227–234
- Hansen CJ, Burnell KK, Brogden KA (2006) Antimicrobial activity of Substance P and Neuropeptide Y against laboratory strains of bacteria and oral microorganisms. *J Neuroimmunol* 177(1–2):215–218
- Kowalska K, Carr DB, Lipkowski AW (2002) Direct antimicrobial properties of substance P. *Life Sci* 71(7):747–750
- Lesouhaitier O, Veron W, Chapalain A, Madi A, Blier AS, Dagorn A, Connil N, Chevalier S, Orange N, Feuilloy M (2009) Gram-negative bacterial sensors for eukaryotic signal molecules. *Sensors* 9(9):6967–6990
- Li W, Lyte M, Freestone PP, Ajmal A, Colmer-Hamood JA, Hamood AN (2009) Norepinephrine represses the expression of *toxA* and the siderophore genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 299(1):100–109
- Long TM, Nisa S, Donnenberg MS, Hassel BA (2014) Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits type I interferon- and RNase L-mediated host defense to disrupt intestinal epithelial cell barrier function. *Infect Immun* 82(7):2802–2814
- Madi A, Lakhdari O, Blottière HM, Guyard-Nicodème M, Le Roux K, Groboillot A, Svinareff P, Doré J, Orange N, Feuilloy MG, Connil N (2010) The clinical *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 strain exerts a cytotoxic effect on epithelial intestinal cells and induces interleukin-8 via the AP-1 signaling pathway. *BMC Microbiol* 10:215

- Madi A, Alnabhani Z, Leneveu C, Mijouin L, Feuilloley M, Connil N (2013) *Pseudomonas fluorescens* can induce and divert the human β -defensin-2 secretion in intestinal epithelial cells to enhance its virulence. Arch Microbiol 195(3):189–195
- Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C, Holder IA (1996) Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun 64(2):518–523
- Mijouin L, Hillion M, Ramdani Y, Jaouen T, Duclairoir-Poc C, Follet-Gueye ML, Lati E, Yvergnaux F, Driouich A, Lefeuvre L, Farmer C, Misery L, Feuilloley MG (2013) Effects of a skin neuropeptide (substance p) on cutaneous microflora. PLoS ONE 8(11):e78773
- Moreira CG, Weinshenker D, Sperandio V (2010) QseC mediates *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence in vitro and in vivo. Infect Immun 78(3):914–926
- Okumura CY, Nizet V (2014) Subterfuge and sabotage: evasion of host innate defenses by invasive gram-positive bacterial pathogens. Annu Rev Microbiol 68:439–458
- Patel SK, Pratap CB, Verma AK, Jain AK, Dixit VK, Nath G (2013) *Pseudomonas fluorescens*-like bacteria from the stomach: a microbiological and molecular study. World J Gastroenterol 19(7):1056–1067
- Phalipon A, Sansonetti PJ (2007) *Shigella's* ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival? Immunol Cell Biol 85(2):119–129
- Rosignol G, Merieau A, Guerillon J, Veron W, Lesouhaitier O, Feuilloley MG, Orange N (2008) Involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of a clinical strain of *Pseudomonas fluorescens*. BMC Microbiol 8:189
- Rosignol G, Sperandio D, Guerillon J, Duclairoir Poc C, Soum-Souter E, Orange N, Feuilloley MG, Merieau A (2009) Phenotypic variation in the *Pseudomonas fluorescens* clinical strain MFN1032. Res Microbiol 160(5):337–344
- Scales BS, Dickson RP, LiPuma JJ, Huffnagle GB (2014) Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. Clin Microbiol Rev 27(4):927–948 (Review)
- Silby MW, Winstanley C, Godfrey SA, Levy SB, Jackson RW (2011) *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. FEMS Microbiol Rev 35(4):652–680
- Sperandio D, Rosignol G, Guerillon J, Connil N, Orange N, Feuilloley MG, Merieau A (2010) Cell-associated hemolysis activity in the clinical strain of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032. BMC Microbiol 10:124
- Sperandio D, Decoin V, Latour X, Mijouin L, Hillion M, Feuilloley MG, Orange N, Merieau A (2012) Virulence of the *Pseudomonas fluorescens* clinical strain MFN1032 towards *Dictyostelium discoideum* and macrophages in relation with type III secretion system. BMC Microbiol 12:223
- Steer HW, Colin-Jones DG (1975) Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolone sodium. Gut 16(8):590–597
- Stintzi A, Johnson Z, Stonehouse M, Ochsner U, Meyer JM, Vasil ML, Poole K (1999) The pvc gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa*: role in synthesis of the pyoverdine chromophore and regulation by PtxR and PvdS. J Bacteriol 181(13):4118–4124
- Strakhovskaia MG, Ivanova EV, Fraňkin GI (1993) Stimulatory effect of serotonin on the growth of the yeast *Candida guilliermondii* and the bacterium *Streptococcus faecalis*. Mikrobiologiya 62(1):46–49
- Sutton CL, Kim J, Yamane A, Dalwadi H, Wei B, Landers C, Targan SR, Braun J (2000) Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. Gastroenterology 119(1):23–31
- Tattoli I, Sorbara MT, Yang C, Tooze SA, Philpott DJ, Girardin SE (2013) *Listeria* phospholipases subvert host autophagic defenses by stalling pre-autophagosomal structures. EMBO J 32(23):3066–3078
- Veron W, Orange N, Feuilloley MG, Lesouhaitier O (2008) Natriuretic peptides modify *Pseudomonas fluorescens* cytotoxicity by regulating cyclic nucleotides and modifying LPS structure. BMC Microbiol 8:114
- Visca P, Leoni L, Wilson MJ, Lamont IL (2002) Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. Mol Microbiol 45(5):1177–1190
- Wei B, Huang T, Dalwadi H, Sutton CL, Bruckner D (2002) Braun J (2002) *Pseudomonas fluorescens* encodes the Crohn's disease-associated I2 sequence and T-cell superantigen. Infect Immun 70(12):6567–6575

3. Résultats complémentaires

En plus des résultats obtenus pour la souche *P. fluorescens* MFN1032 d'origine clinique, et présentés dans cet article publié dans Archives of Microbiology, nous avons étudié l'effet de la sérotonine, la substance P et l'épinéphrine sur la cytotoxicité et le potentiel proinflammatoire de *P. fluorescens* MF37, mutant spontané rifampicine résistant d'une souche environnementale isolée du lait (Burini *et al.*, 1994) Les résultats sont présentés sur la **Figure 21**.

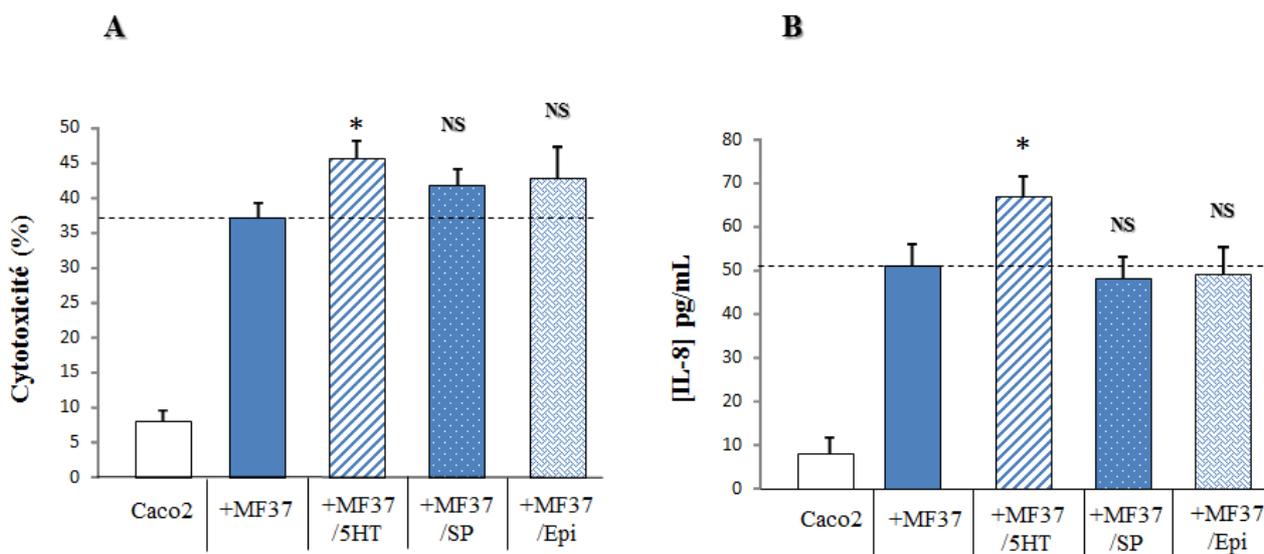


Figure 21 Effet de la sérotonine (5HT), la substance P (SP) et l'épinéphrine (Epi) 10^{-6} M sur la cytotoxicité de *P. fluorescens* MF37 envers les cellules Caco-2/TC7 (A) et sur son potentiel proinflammatoire (B) : sécrétion d'interleukine 8 (IL8) par les cellules Caco-2/TC7. NS non significatif, * $P < 0,05$, comparé aux bactéries non traitées.

Nous avons pu montrer que chez *P. fluorescens* MF37, seule la sérotonine entraîne une augmentation significative de la cytotoxicité et du potentiel proinflammatoire de la bactérie, alors que la substance P et l'épinéphrine n'ont pas d'effet. Pour *P. fluorescens* MFN1032, nous avons vu au contraire dans l'article que seule la substance P avait un effet sur le potentiel proinflammatoire de la bactérie. Nous pouvons donc conclure que l'action des molécules intestinales est variable

suivant la souche étudiée et émettre l'hypothèse que ces deux bactéries n'ont probablement pas les mêmes systèmes senseurs pour la détection de ces molécules.

Nous avons également étudié l'effet de la sérotonine, la substance P et l'épinéphrine sur la production de pyoverdine chez *P. fluorescens* MF37. Les résultats sont présentés ci-dessous sur la **Figure 22**.

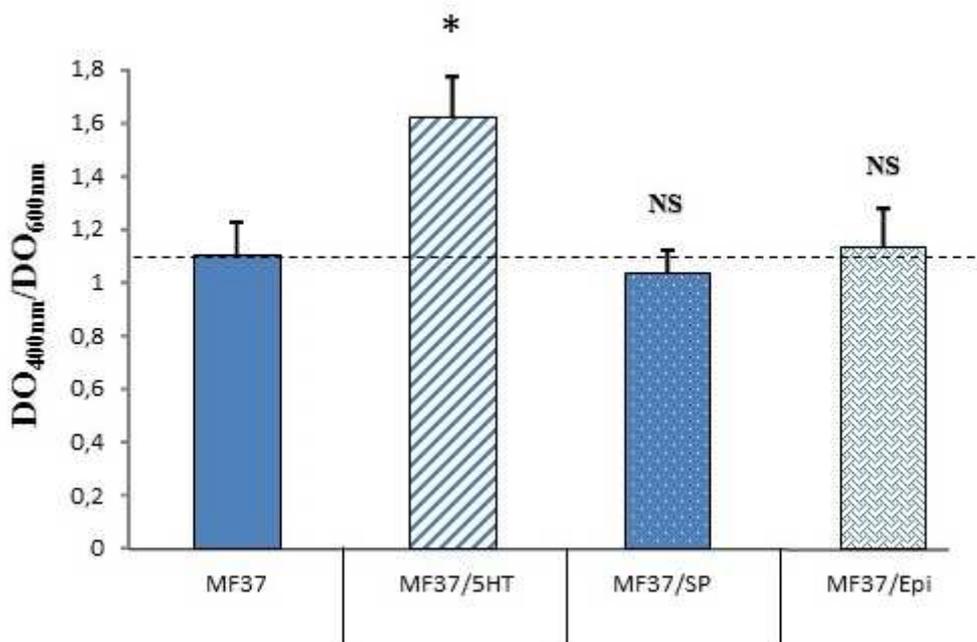


Figure 22 Effet de la sérotonine (5HT), la substance P (SP) et l'épinéphrine (Epi) 10^{-6} M sur la production de pyoverdine chez *P. fluorescens* MF37. NS : non significatif, * $P < 0,05$, comparé aux bactéries non traitées.

Les résultats montrent que chez *P. fluorescens* MF37, la sérotonine entraîne également une augmentation de la production de pyoverdine alors que la substance P et l'épinéphrine n'ont pas d'effet. Une fois de plus, ce test montre une variabilité de réponse suivant les souches testées puisqu'au contraire nous avons vu dans l'article précédent que la sérotonine entraînait une diminution de la production de pyoverdine chez *P. fluorescens* MFN1032.

Pour compléter cette étude, nous avons recherché l'effet d'autres molécules intestinales, l'alpha-melanocyte-stimulating-hormone (α MSH) et le peptide YY (PYY) sur la cytotoxicité de *P. fluorescens* MF37 et *P. fluorescens* MFN1032 (**Figure 23**) et sur le potentiel proinflammatoire de ces bactéries (**Figure 24**).

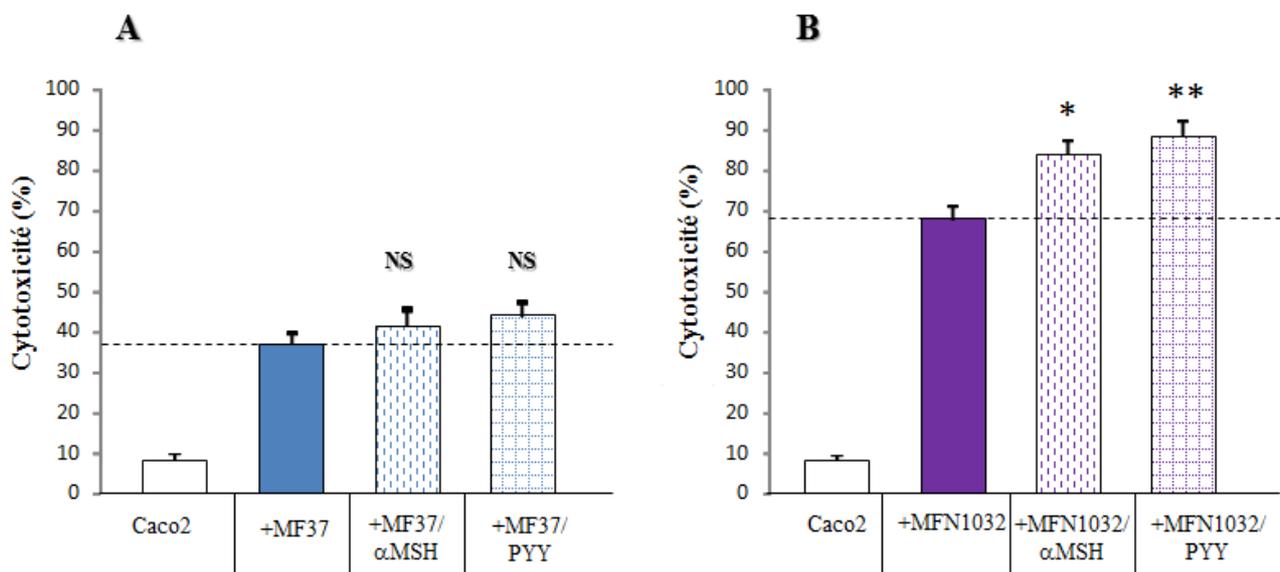


Figure 23 Effet de l'alpha-melanocyte-stimulating-hormone (α MSH) et du peptide YY (PYY)

10^{-6} M sur la cytotoxicité de *P. fluorescens* MF37 (A) et *P. fluorescens* MFN1032 (B) envers les cellules Caco-2/TC7. NS : non significatif, * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ comparé aux cellules infectées par les bactéries non traitées.

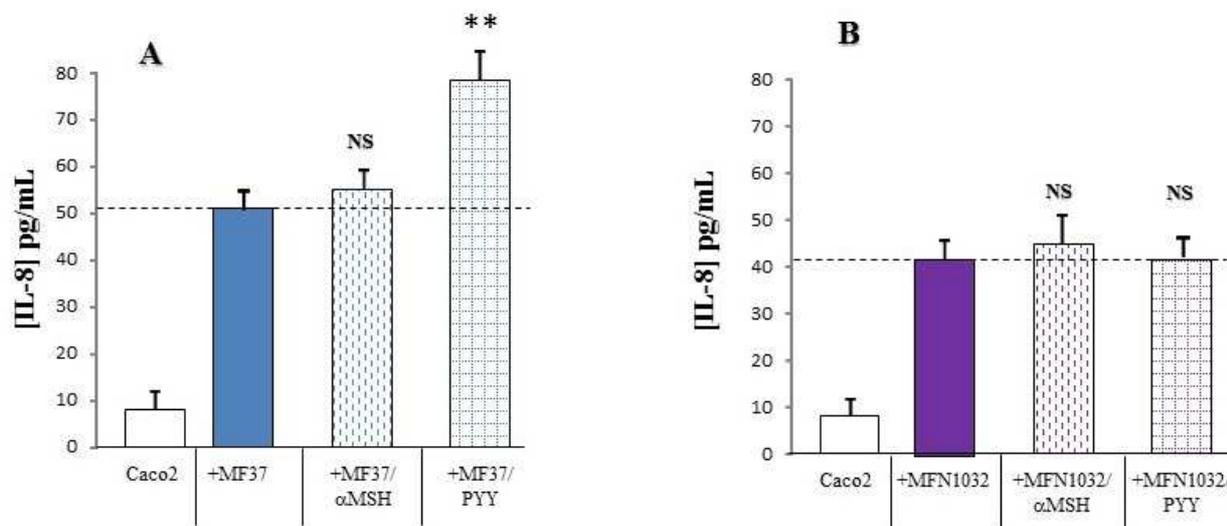


Figure 24 Effet de l'alpha-melanocyte-stimulating-hormone (α MSH) et du peptide YY (PYY) sur le potentiel proinflammatoire de *P. fluorescens* MF37 (A) et *P. fluorescens* MFN1032 (B) : activation de la sécrétion d'interleukine 8 (IL8) par les cellules Caco-2/TC7. NS non significatif, ** $P < 0,01$ comparé aux cellules infectées par les bactéries non traitées.

D'après les résultats obtenus, l'alpha-melanocyte-stimulating-hormone et le peptide YY ne modulent la cytotoxicité que chez *P. fluorescens* MFN1032, tandis que le peptide YY augmente le potentiel proinflammatoire de *P. fluorescens* MF37 mais pas celui de *P. fluorescens* MFN1032. Ce test confirme que *P. fluorescens* MF37 et *P. fluorescens* MFN1032 présentent des réponses physiologiques très différentes envers les molécules intestinales. Ceci peut s'expliquer en partie par leur origine, MFN1032 étant une souche clinique et MF37 une souche environnementale, leur adaptation à l'hôte ainsi que leurs systèmes senseurs ont probablement évolué de manière très distincte.

4. Discussion

Ce travail a montré pour la première fois que la sérotonine, la substance P, l'épinéphrine, l'alpha-melanocyte-stimulating-hormone et le peptide YY sont capables de moduler la virulence de *P. fluorescens* alors que la croissance est faiblement affectée même avec de fortes concentrations de ces molécules. Dans certaines études, il a été observé au contraire une activité antimicrobienne directe et indirecte de la substance P ($>10^{-4}$ M) comme par exemple pour *E. coli* et *P. aeruginosa* (Kowalska *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2006; Lesouhaitier *et al.*, 2009). L'alpha-melanocyte-stimulating-hormone présente une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* (Singh & Mukhopadhyay 2014; Madhuri *et al.*, 2009) et le peptide YY contre un large spectre de micro-organismes pathogènes (Vouldoukis *et al.*, 1996). Par ailleurs, la sérotonine stimule la prolifération d'*E. coli* K12 et l'accumulation de biomasse au début de la phase exponentielle de croissance. La courbe obtenue, non linéaire par rapport à la concentration de molécule testée pourrait être le signe d'un mécanisme dépendant d'un récepteur spécifique (Anuchin *et al.*, 2008). Il a été montré aussi que la sérotonine est capable de stimuler la croissance et l'agrégation de certaines espèces bactériennes comme *Streptococcus faecalis* (*E. faecalis*) ou de la levure *Candida guilliermondii* (Strakhovskaia *et al.*, 1993). Les catécholamines (dopamine, norepinéphrine et epinéphrine) sont capables d'augmenter significativement la croissance de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *E. coli* (Belay & Sonnenfeld 2002) et ceci varie fortement en fonction du micro-organisme étudié (Belay *et al.*, 2003). Dans notre étude, nous avons pu constater que même pour des concentrations bien plus élevées que les concentrations physiologiques ($> 10^{-3}$ M) la croissance de *P. fluorescens* MFN1032 et de *P. fluorescens* MF37 n'est pas affectée, que ce soit par la sérotonine, la substance P, l'épinéphrine, l'alpha-melanocyte-stimulating-hormone ou le peptide YY. Des résultats similaires ont été obtenus précédemment avec la β -défensine-2 (Madi *et al.*, 2013), le GABA (Dagorn *et al.*, 2013) ou les peptides natriurétiques (Veron *et al.*, 2008). Par ailleurs, nous avons pu constater que la modulation de la virulence varie en fonction du facteur intestinal testé. La substance P et l'épinéphrine augmentent la capacité de *P. fluorescens* MFN1032 à « swarmer » tandis que la

sérotonine augmente les deux types de nages bactériennes étudiés : le swarming et le swimming, tout en conduisant à la diminution de production de pyoverdine chez cette bactérie. Au contraire, chez *P. fluorescens* MF37, et parmi les molécules testées, seule la sérotonine a eu un effet sur la production de pyoverdine, en conduisant à l'augmentation de la synthèse de ce sidérophore. Chez *E. coli* O157:H7 (EHEC), l'épinéphrine et la norepinéphrine augmentent la mobilité et la formation de biofilms (Bansal *et al.*, 2007). En effet, le système de quorum-sensing AI-3 est impliqué dans le dialogue inter-règne et agit de concert avec les molécules eucaryotes épinéphrine/norépinéphrine. Ce système de signalisation AI-3/Epi/NE active la transcription de gènes de virulence chez les EHEC (Clarke *et al.*, 2006) et il est également retrouvé chez d'autres bactéries à Gram négatif telles que *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pour qui il est un facteur clef de leurs pathogénèses *in vitro* et *in vivo* (Moreira *et al.*, 2010). En fournissant du fer, la norépinéphrine peut remplacer les sidérophores chez *P. aeruginosa*, ce qui pourrait être à l'origine de la répression de la production des sidérophores tel que la pyoverdine (Stintzi *et al.*, 1999; Visca *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2009). Dans notre étude, l'alpha-melanocyte-stimulating-hormone et le peptide YY ont conduit à une augmentation significative du potentiel cytotoxique de *P. fluorescens* MFN1032 sans pour autant moduler le pouvoir proinflammatoire de cette souche. Au contraire, l'alpha-melanocyte-stimulating-hormone et le peptide YY n'ont eu aucun effet sur la cytotoxicité de *P. fluorescens* MF37, alors que le prétraitement de cette bactérie par le peptide YY a conduit à une augmentation significative de la production d'IL8. Parmi toutes les molécules testées, seule la substance P a entraîné une augmentation du potentiel proinflammatoire de *P. fluorescens* MFN1032 et seule la sérotonine a pu stimuler le pouvoir cytotoxique de *P. fluorescens* MF37. Une hausse de la cytotoxicité de *P. fluorescens* a déjà pu être constatée suite à un traitement de la bactérie par des peptides natriurétiques (BNP, CNP) ou par le GABA et ceci avait été attribué, au moins partiellement, à la structure du LPS de la bactérie mais aussi à ses propriétés de surfaces (Veron *et al.*, 2008, Dagorn *et al.*, 2013). Chez *Bacillus cereus*, la substance P stimule fortement la cytotoxicité, un effet similaire mais à plus bas niveau a été constaté pour *Staphylococcus aureus* et

Staphylococcus epidermidis (Mijouin *et al.*, 2013).

Dans notre étude, nous avons constaté aussi qu'un prétraitement de *P. fluorescens* MFN1032 par la substance P ou l'épinéphrine avant l'infection des cellules Caco-2/TC7 augmente la perméabilité de la monocouche de cellules. Après marquage de l'actine F et observation au microscope confocal, les cellules Caco-2/TC7 apparaissaient en effet plus endommagées. La même chose avait été notée précédemment si des cellules Caco-2 sont infectées avec *Campylobacter jejuni* suite à un traitement par la norepinéphrine (Cogan *et al.*, 2007). Ces auteurs avaient également constaté que suite à la culture de *C. jejuni* dans un milieu limité en fer en présence de norepinéphrine la croissance et la mobilité de la bactérie augmentent, ainsi que sa capacité d'invasion des cellules épithéliales. De plus, *C. jejuni* exposée à la norepinéphrine pendant sa croissance provoque une destruction importante des jonctions serrées et de la monocouche de cellules Caco-2/TC7.

En résumé, l'ensemble des travaux exposés dans cette première partie, démontre que le potentiel de virulence de *P. fluorescens* peut être modulé par des facteurs intestinaux et que l'effet induit est dépendant à la fois de la molécule testée et de l'origine de la souche considérée. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que *P. fluorescens* est capable de percevoir certains facteurs entéro-endocriniens. Il nous a semblé intéressant d'élargir ensuite cette étude à d'autres bactéries pouvant être présentes parmi la flore résidente et/ou transitoire de l'intestin.

Chapitre II

Effet de l'épinéphrine sur la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

et *Enterococcus faecalis* V583

I-Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que l'épinéphrine ainsi que d'autres facteurs intestinaux sont capables de moduler la virulence de *Pseudomonas fluorescens*. Nous avons souhaité ensuite élargir ces travaux à d'autres bactéries pouvant être retrouvées parmi la flore résidente et/ou transitoire de l'intestin. Ainsi, nous avons choisi d'étudier l'impact de l'épinéphrine sur *P. aeruginosa* (une bactérie à Gram négatif) et *E. faecalis* (une bactérie à Gram positif). A notre connaissance, très peu d'études ont été effectuées jusqu'à présent sur l'effet des catécholamines sur les bactéries à Gram positif, et elles concernent essentiellement leur impact sur la croissance bactérienne (Belay & Sonnenfeld 2002 ; O'Donnell *et al.*, 2006). En effet, les catécholamines sont capable de stimuler la croissance de certaines bactéries à Gram positif telles que : *E. faecalis* (Freestone *et al.*, 1999), *Streptococcus Pneumoniae* (Sandrini *et al.*, 2014), *Staphylococcus aureus* (Belay & Sonnenfeld 2002), *Staphylococcus Epidermidis* (Lyte *et al.*, 2003, Neal *et al.*, 2001) ainsi que d'autres *Staphylococci* coagulase négatif (Neal *et al.*, 2001). Ces molécules stimulent la capacité de la bactérie à former des biofilms, par exemple au niveau dentaire et donc de persister chez l'hôte (Roberts *et al.*, 2002) ainsi qu'au niveau des cathéters (Lyte *et al.*, 2003). Cet effet sur la croissance et la formation de biofilms par les hormones de stress dépend à la fois de la souche bactérienne et de la substance testée (Belay *et al.*, 2003 ; Belay & Sonnenfeld 2002). Récemment, Sandrini *et al.*, (2014) ont pu démontrer que *Pneumococcus* détecte la norépinéphrine et en tire avantage afin d'augmenter ses propriétés de virulence. En effet, la norépinéphrine stimule la production de biofilms, ainsi que l'expression de gènes intervenant dans le métabolisme central et la colonisation de l'hôte. Il semblerait que cette capacité de perception du signal a un rôle essentiel dans la transition de la bactérie de la colonisation à invasion, élément clef dans sa capacité à causer des pneumonies, septicémies ainsi que des méningites (Sandrini *et al.*, 2014). De manière similaire, Lyte *et al.*, (2003) ont rapporté que les catécholamines favorisaient la production de biofilms chez *S. epidermidis* en stimulant en particulier la synthèse d'exopolysaccharides. Chez les bactéries à Gram négatif, il existe de nombreuses études concernant l'effet des catécholamines, la plupart

concerne la croissance qui est modulée par ces molécules (Primerose *et al.*, 1999 ; Belay & Sonnenfeld 2002, Belay *et al.*, 2003, O'Donnell *et al.*,2006). Cependant, il a également été démontré chez *Actinobacillus pleuropneumonia* que l'épinéphrine entraîne une augmentation de son pouvoir cytotoxique ainsi que la modulation de l'expression de certains gènes liés à sa virulence tel que le gène *apxIA RTX-I*, lié à la production d'une toxine importante pour la pathogenèse de cette bactérie (Schaller *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 2012). Certains travaux de recherche ont concerné l'effet de l'épinéphrine sur la virulence de bactéries à Gram négatif (Halang *et al.*, 2015 ; Graziano *et al.*, 2014) mais surtout l'effet de la norépinéphrine. Sachant que certains récepteurs à la norépinéphrine sont aussi des senseurs à l'épinéphrine, comme par exemple QseC chez *E. coli* (Weigel *et al.*, 2015), on peut s'attendre à ce que de nombreuses espèces bactériennes à Gram négatif soient réceptives à la norépinéphrine mais aussi à l'épinéphrine. La norépinéphrine module l'expression de gènes relatifs à la virulence notamment chez *A. pleuropneumonia* (Li *et al.*, 2012), *V. parahaemolyticus* (Nakano 2007), *E. coli* EHEC (Marcie *et al.*, 2006). Il a aussi été démontré que la norépinéphrine entraîne une augmentation de la mobilité chez *E. coli* (Sturbelle *et al.*, 2015), *Vibrio harveyi* (Yang *et al.*, 2014) et favorise l'adhésion de certaines bactéries comme *A. pleuropneumonia*, *B. pilosicoli* et *C. jejuni*, aux cellules entérocytaires et leur colonisation (Naresh & Hampson 2011 ; Li *et al.*, 2012). En outre, la signalisation croisée AI3-Epi/NE, joue un rôle très important dans la communication inter-règne, en impliquant à la fois des molécules eucaryotes et le quorum sensing bactérien. Chez *P. aeruginosa*, la norepinéphrine module la production de facteurs de virulence (Li *et al.*, 2009) et Hegde *et al.*, (2009) ont pu mettre en évidence qu'elle agit sur la virulence de *P. aeruginosa* via le quorum sensing et le système *Las*, et régule l'expression des gènes *toxA* et ceux codant des sidérophores la pyochéline et la pyoverdine (Li *et al.*, 2009). Toutefois, un rôle similaire de l'épinéphrine restait à être démontré. Dans ce contexte, l'objectif de mon travail a été d'étudier l'effet de l'épinéphrine sur la virulence de *P. aeruginosa* et de rechercher si cette molécule peut aussi moduler la virulence d'un pathogène opportuniste de la famille des bactéries à Gram positif, et pour ce faire nous avons choisi *E. faecalis* comme modèle d'étude.

2. Résultats

Effet de l'épinéphrine sur la virulence de *P. aeruginosa* PAO1

Effet de l'épinéphrine sur le pouvoir cytotoxique et proinflammatoire de *P. aeruginosa* PAO1.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de l'épinéphrine sur le potentiel cytotoxique et proinflammatoire de *P. aeruginosa* PAO1 envers des cellules Caco-2/TC7 non différenciées. Pour cela, les cellules Caco-2/TC7 ont été infectées 18 h avec *P. aeruginosa* PAO1 (à une MOI de 100) prétraitées ou non avec l'épinéphrine 10^{-6} M. A la fin de l'incubation, la cytotoxicité a été évaluée en mesurant les cellules vivantes colorées au rouge neutre et l'IL8 a été dosée grâce au kit ELISA CXCL8/IL8 Quantikine (R&D Systems). Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 25** ci-dessous.

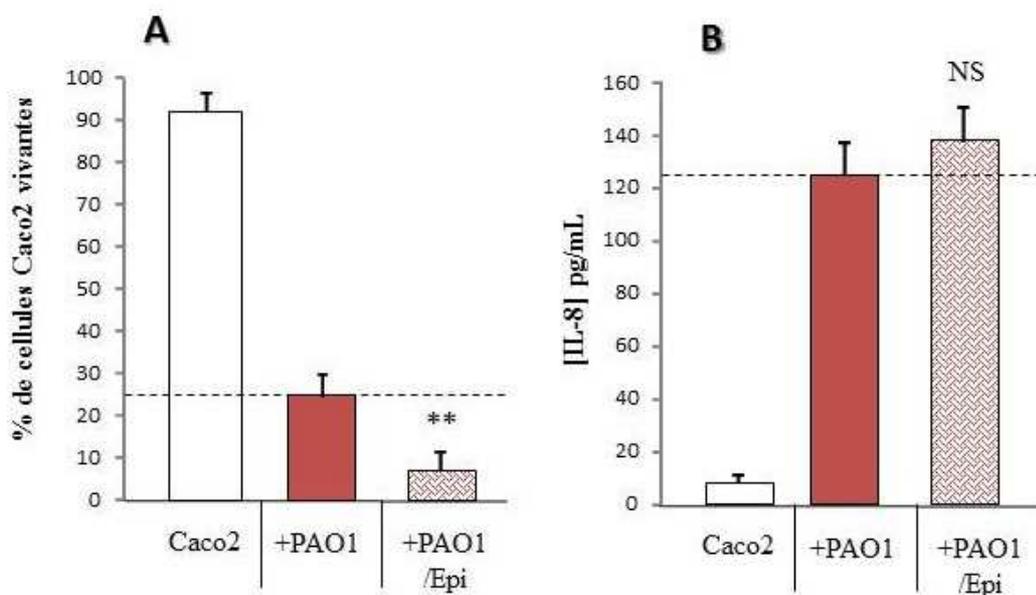


Figure 25 Effet de l'épinéphrine (Epi) 10^{-6} M sur l'activité cytotoxique (A) et sur le potentiel proinflammatoire (B) de *P. aeruginosa* PAO1 envers les cellules Caco-2/TC7 (B). NS non significatif, ** $P < 0,01$, comparé aux bactéries non traitées

Nous avons pu montrer que le traitement de *P. aeruginosa* PAO1 avec l'épinéphrine 10^{-6} M, avant infection des cellules Caco-2/TC7, entraîne une diminution significative du nombre de cellules vivantes colorées au rouge neutre, donc une cytotoxicité plus élevée (**Figure 25 A**). Au contraire, la production d'IL8 par les cellules Caco-2/TC7 n'est pas modulée lorsque la bactérie est exposée à l'épinéphrine 10^{-6} M (**Figure 25 B**).

Effet de l'épinéphrine sur la résistance transépithéliale (TER), la translocation, l'invasion et l'adhésion bactérienne

Nous avons aussi regardé si le fait d'exposer *P. aeruginosa* PAO1 à l'épinéphrine 10^{-6} M modifie son action sur la perméabilité de cellules Caco-2/TC7 différenciées cultivées sur inserts, et ses capacités d'adhésion, invasion et translocation. Pour évaluer la perméabilité, la résistance transépithéliale (TER) a été mesurée au bout de 18 h et les bactéries qui ont réussi à transloquer à travers la monocouche ont été dénombrées au niveau basolatéral. Pour les expériences d'adhésion/invasion, le temps d'infection a été réduit à 4 h.

Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 26**. Ils montrent qu'au bout de 4 h, les bactéries sont capables d'adhérer aux cellules Caco-2/TC7 ainsi que de les envahir (**Figure 26A** et **26B**). Les potentiels adhésif et invasif de *P. aeruginosa* PAO1 prétraitée par l'épinéphrine 10^{-6} M augmentent de manière significative. L'indice d'adhésion passe de 41 à 52 bactéries / cellule en moyenne (**Figure 26A**), et on observe $4,5 \cdot 10^5$ bactéries invasives/ml pour la souche traitée contre $2,2 \cdot 10^5$ bactéries invasives/ml pour la souche non traitée (**Figure 26B**). Par ailleurs, une diminution de la résistance transépithéliale des cellules Caco-2/TC7 de -58 % par rapport aux cellules contrôle suite à l'infection par *P. aeruginosa* PAO1 a été constatée mais cette diminution de la résistance transépithéliale est encore plus importante sous l'effet de la bactérie prétraitée par l'épinéphrine 10^{-6} M (-75 %) (**Figure 26C**). En parallèle, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de la translocation de *P. aeruginosa* PAO1 prétraitée par l'épinéphrine 10^{-6} M à travers la couche de

cellules Caco-2/TC7. Etant donné que *P. aeruginosa* PAO1 est à la fois capable d'altérer la résistance transépithéliale et la perméabilité du tapis cellulaire, mais aussi d'envahir les cellules Caco-2/TC7, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette bactérie est capable de transloquer à la fois par voies paracellulaire et transcellulaire.

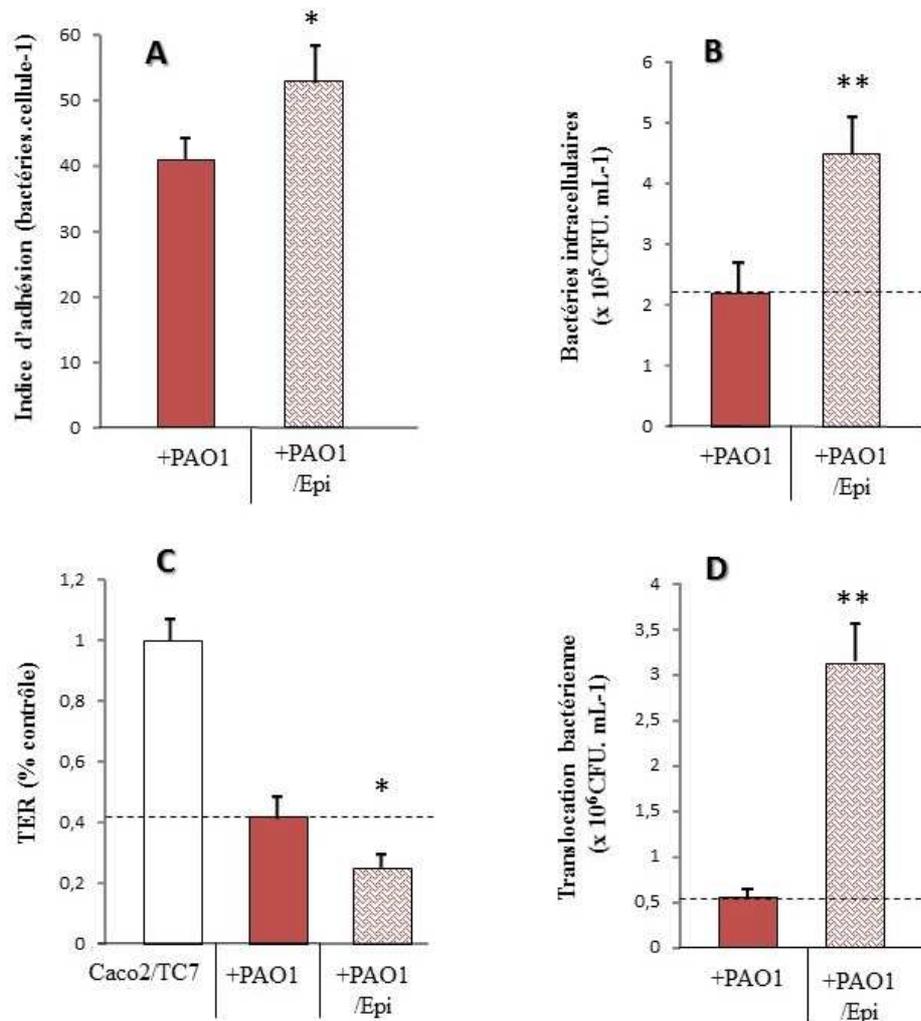


Figure 26 Effet de *P. aeruginosa* PAO1 prétraitée ou non par l'épinéphrine (Epi) 10^{-6} M sur la résistance transépithéliale (TER) des cellules Caco-2/TC7 après infection pendant 18 h (A). Effet de l'épinéphrine 10^{-6} M sur la translocation (B), l'adhésion (C) et l'invasion (D) de *P. aeruginosa* PAO1 sur les cellules Caco-2/TC7. NS non significatif, * P<0,05, ** P<0,01 comparés aux bactéries non traitées.

Effet de l'épinéphrine sur la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* PAO1

L'impact de l'épinéphrine 10^{-6} M sur la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* a également été étudié. Pour cela, les bactéries ont été cultivées à 37°C dans des plaques 96 puits et mises en contact ou non avec l'épinéphrine 10^{-6} M. Une coloration au cristal violet permet de dénombrer les bactéries ayant adhéré au plastique (O'Toole & Kolter 1998). Ce test a été effectué au bout de 6, 12 et 24 h de culture en présence de la molécule. Les résultats sont présentés sur la **Figure 27**.

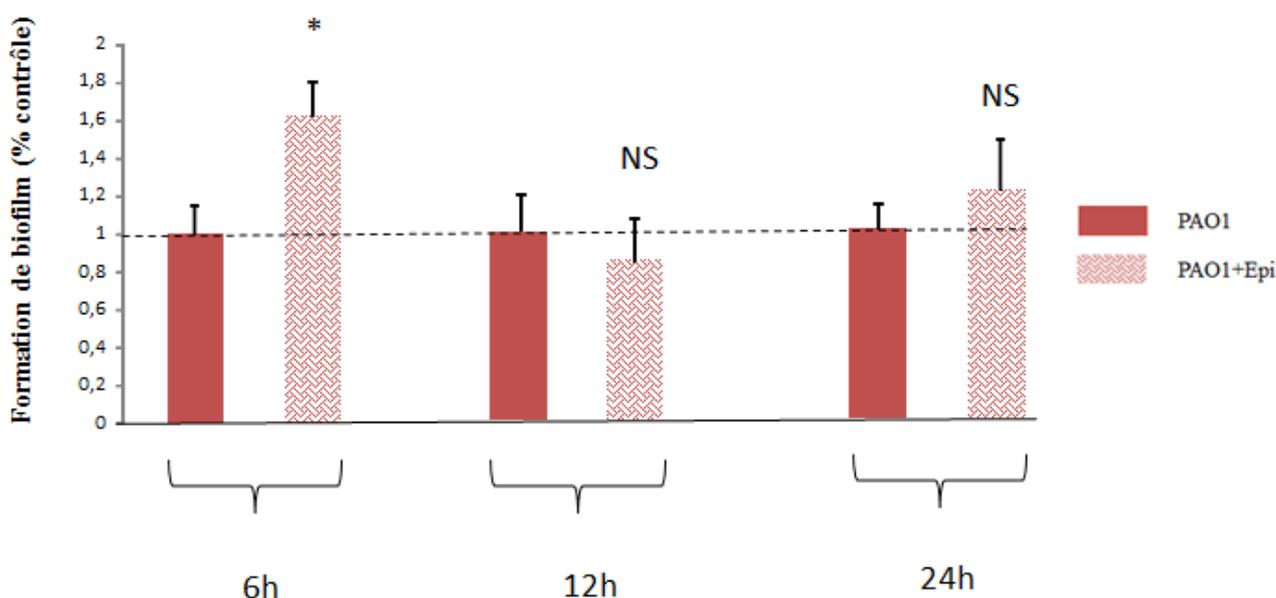


Figure 27 Effet de l'épinéphrine 10^{-6} M sur la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* PAO1. Les mesures ont été prises à 6, 12 et 24 h. NS non significatif, * $P < 0,05$, comparées aux bactéries non traitées.

Nous pouvons observer que l'épinéphrine a un impact uniquement au début de la formation du biofilm. En effet, le biofilm de *P. aeruginosa* est augmenté légèrement en présence de la molécule après 6 h de culture mais pas au bout de 12 et 24 h. L'épinéphrine jouerait donc plutôt un rôle dans les étapes initiales de la formation de biofilm comme l'adhésion au support, ce qui est cohérent par rapport à ce qui a été observé précédemment (**Figure 26A**) concernant l'adhésion sur cellules Caco-2/TC7.

Effet de l'épinéphrine sur la virulence d'*Enterococcus faecalis* V583

Effet de l'épinéphrine sur le pouvoir cytotoxique et proinflammatoire d'*Enterococcus faecalis* V583

L'effet de l'épinéphrine sur le potentiel cytotoxique et proinflammatoire d'*E. faecalis* V583 a été évalué par un dosage au rouge neutre, colorant permettant la coloration des cellules vivantes, et par le dosage d'IL8 dans les surnageants, après infection des cellules Caco-2/TC7 à une MOI de 100. Les mesures ont été réalisées après 4 et 15 h d'infection des cellules entérocytaires (**Figure 28**).

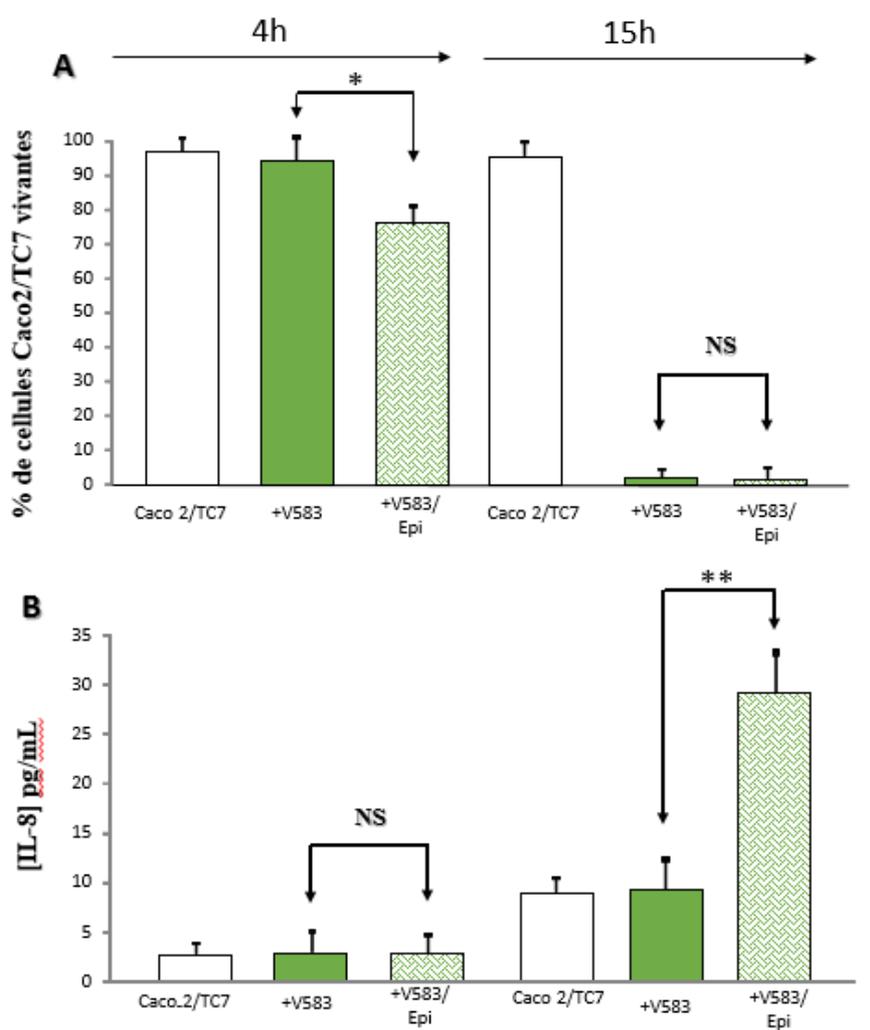


Figure 28 Effet de l'épinéphrine (Epi) 10^{-6} M sur l'activité cytotoxique (A) et sur le potentiel proinflammatoire (B) d'*E. faecalis* V583 après 4 et 15 h d'infection des cellules Caco-2/TC7.

NS non significatif, * P < 0.05 ; ** P < 0.01, comparé aux bactéries non traitées

Les résultats obtenus montrent qu'après 4 h d'infection des cellules Caco-2/TC7, la bactérie prétraitée par l'épinéphrine entraîne une baisse de la viabilité cellulaire plus importante (**Figure 28A**). Cependant au bout de 15 h, on ne constate plus de différences entre bactérie prétraitée ou non. La production d'IL8 par les cellules Caco-2/TC7 au bout de 4 h d'infection est similaire à la production des cellules non infectées (>10pg/ml) et le prétraitement des bactéries par l'épinéphrine 10^{-6} M n'a pas montré d'effet sur ce paramètre (**Figure 28B**). En revanche, après 15 h d'infection, une forte augmentation de la production d'IL8 est observée sous l'effet de la bactérie prétraitée à l'épinéphrine 10^{-6} M (**Figure 28B**) alors que l'infection par la bactérie non traitée n'entraîne pas de production d'IL8 (**Figure 28B**).

Effet de l'épinéphrine sur les potentiels d'adhésion et d'invasion d'*E. faecalis* V583

Des tests d'adhésion/invasion ont été réalisés. Pour cela, les cellules Caco-2/TC7 cultivées jusqu'à confluence ont été infectées pendant 3 h par *E. faecalis* prétraitée ou non avec l'épinéphrine 10^{-6} M. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 29**. Ils montrent qu'un traitement d'*E. faecalis* V583 par l'épinéphrine 10^{-6} M augmente l'adhésion de la bactérie aux cellules Caco-2/TC7 (indice d'adhésion multiplié par 2). Au contraire, aucun effet sur l'invasion n'a été constaté (**Figure 29**).

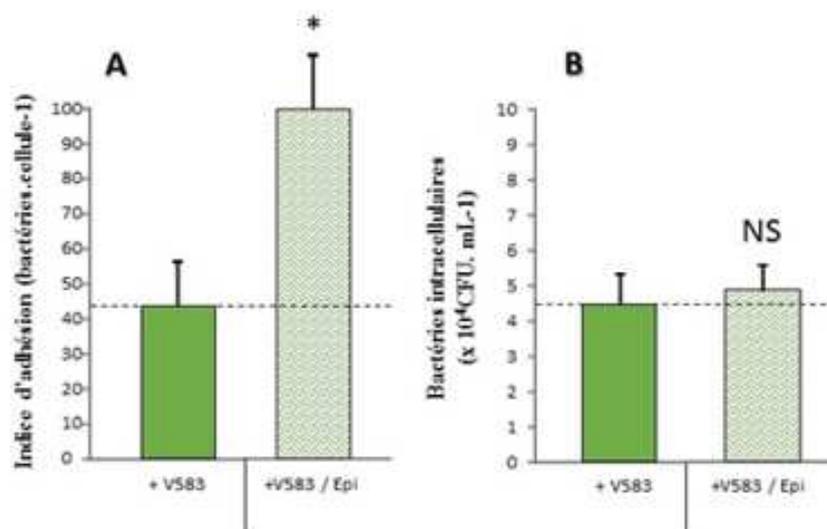


Figure 29 Potentiels d'adhésion (A) et d'invasion (B) d'*E. faecalis* V583 prétraitée par l'épinéphrine 10^{-6} M après 3 h d'infection. NS non significatif, * P<0.05 comparés aux bactéries non traitées.

Effet de l'épinéphrine sur la capacité d'*E. faecalis* V583 à altérer la résistance transépithéliale des cellules Caco-2/TC7, et sur la translocation bactérienne

Les cellules Caco-2/TC7 ont été cultivées sur inserts jusqu'à différenciation, puis infectées avec *E. faecalis* V583, prétraitées ou non avec l'épinéphrine 10^{-6} M. La résistance transépithéliale a été mesurée au bout de 4 et 24 h avec un ohm mètre (Millicell ERS). Pour le test de translocation, à l'issue de 4 et 24 h d'infection, 100 μ l du milieu basolatéral ont été récupérés, dilués et étalés sur gélose BHI agar. Les colonies ont été dénombrées après 48 h d'incubation à 37°C.

Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 30**.

Nous pouvons observer qu'au bout de 4 h d'infection, *E. faecalis* n'a pas eu d'effet sur la résistance transépithéliale des cellules Caco-2/TC7. Après 24 h, la résistance transépithéliale est diminuée de façon similaire, que les cellules soient infectées avec la bactérie traitée, ou non traitée avec l'épinéphrine 10^{-6} M (**Figure 30A**). L'épinéphrine n'a pas eu non plus d'effet sur la capacité d'*E. faecalis* V583 à traverser la monocouche de cellules Caco-2/TC7 (**Figure 30B**), contrairement à ce qui avait été observé précédemment concernant l'effet de l'épinéphrine chez *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*

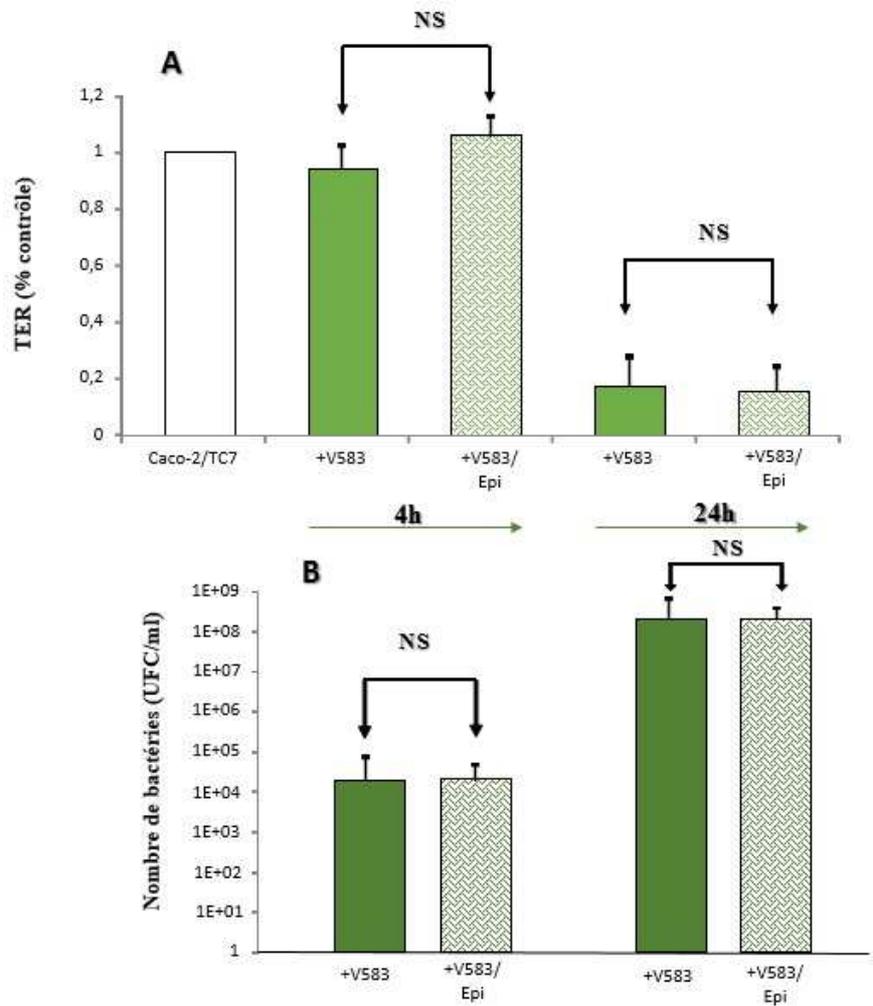


Figure 30 Effet d'*E. faecalis* V583 prétraitée ou non par l'épinéphrine (Epi) 10^{-6} M sur la résistance transépithéliale des cellules Caco-2/TC7 après infection pendant 4 et 24 h (A). Effet l'épinéphrine 10^{-6} M sur la translocation d'*E. faecalis* V583 (B). NS non significatif, comparés aux bactéries non traitées..

3. Discussion

Dans cette étude, nous avons recherché l'effet de l'épinéphrine sur la virulence d'une bactérie à Gram négatif, *P. aeruginosa* PAO1, et la virulence d'une bactérie à Gram positif, *E. faecalis* V583. L'épinéphrine (et surtout la norépinéphrine) sont des neurotransmetteurs dont le rôle dans le dialogue inter-règne est aujourd'hui bien documenté (Marcie *et al.*, 2006). L'effet stimulant de l'épinéphrine sur la croissance de nombreux micro-organismes, surtout des bactéries à Gram négatif est étudié depuis longtemps (Freestone *et al.*, 1999 ; Belay & Sonnenfeld 2002). Il a été montré en effet que les catécholamines entraînent une augmentation de la croissance d'*E. coli*, mais aussi de *P. aeruginosa*, et *E. faecalis* (Freestone *et al.*, 1999). Afin d'évaluer l'impact de l'épinéphrine sur la virulence de nos bactéries modèles, en s'affranchissant d'un éventuel effet sur leur croissance, une concentration de 10^{-6} M (se rapprochant des conditions physiologiques dans l'intestin) a été utilisée dans notre étude.

Nos travaux montrent que l'épinéphrine est capable de moduler le pouvoir cytotoxique et la capacité d'adhésion aux cellules Caco-2/TC7 de *P. aeruginosa* PAO1 et d'*E. faecalis* V583. Des résultats similaires ont été obtenus par Li *et al.*, (2012) chez *A. pleuropneumonia* avec une augmentation du pouvoir cytotoxique de 27% des bactéries traitées par l'épinéphrine . De même, Nakano (2007) a mis en évidence un effet stimulant de la norépinéphrine sur l'activité cytotoxique de *V. parahaemolyticus* (+20%) et une augmentation de l'adhésion de *B. pilosicoli* aux cellules Caco-2/TC7 a été observé après traitement par la norépinéphrine (Naresh & Hampson 2011). Bansal *et al.*, (2007) ont aussi mis en évidence une stimulation de l'adhésion d'*E. coli* O157 :H7 aux cellules HeLa, suite à un traitement de la bactérie par la norépinéphrine. Dans notre étude, nous avons également observé chez *P. aeruginosa* une accélération de l'étape initiale de formation du biofilms. Ce résultat est cohérent avec les travaux de Freestone et Bansal montrant que les catécholamines peuvent favoriser la formation de biofilms chez *S. Epidermidis* (Freestone *et al.*, 2003) et *E. coli* EHEC (Bansal *et al.*, 2007).

Un impact de l'épinéphrine sur le pouvoir proinflammatoire d'*E. faecalis* V583, mais pas sur celui de *P. aeruginosa* PAO1 a été mis en évidence. Cependant chez *P. aeruginosa* PAO1, et contrairement à *E. faecalis* V583, d'autres paramètres de virulence sont affectés par l'épinéphrine tels que la capacité de la bactérie à entraîner une diminution de la résistance transépithéliale ainsi que ses potentiels de translocation et d'invasion. De manière similaire, Cogan *et al.*, (2007) ont pu montrer une augmentation de la virulence de *C. Jejuni* suite à un prétraitement de la bactérie par la norépinéphrine. En effet, elle stimule le pouvoir invasif de *C. jejuni* ainsi que sa capacité à altérer la résistance transépithéliale des cellules Caco-2/TC7 différenciées (Cogan *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces observations suggère que des bactéries à Gram négatif et à Gram positif comme *P. aeruginosa* PAO1 et *E. faecalis* V583, expriment des senseurs (ou récepteurs) pour l'épinéphrine. Afin d'aborder cette question, nous pourrions tester des antagonistes des récepteurs α et β adrénergiques connus chez les eucaryotes, comme la phentolamine ou le propranolol (Spencer *et al.*, 2010), mais également LED209 qui est un antagoniste des récepteurs adrénergiques bactériens en particulier de QseC (Rasko *et al.*, 2008 ; Curtis *et al.*, 2014). En complément, il sera nécessaire d'établir la courbe dose réponse de l'effet de l'épinéphrine chez ces germes dans la mesure où cela peut indirectement informer sur l'affinité du ligand au récepteur. Des systèmes à deux composants bactériens tels que QseB/C et QseE/F permettent à certaines bactéries Gram négatif de capter l'épinéphrine et jouent le rôle de régulateur global de la virulence chez ces micro-organismes (Weigel & Demuth 2015, Moreira & Sperandio 2012). Ainsi, des homologues de la protéine QseC d'*E. coli* ont été retrouvés chez *Yersinia*, *Pasteurella*, *Salmonella* ... et aussi chez certaines bactéries du genre *Pseudomonas* (**Tableau 2**). En effet, un système senseur à deux composants putatif présent chez *P. aeruginosa* possède 31% d'identité avec la protéine QseC d'*E. coli* (**Tableau 2**). Chez *P. fluorescens* PF5, un senseur histidine kinase présente également 31% d'identité avec la protéine QseC d'*E. coli*.

Table S1. QseC Homologs

Organism	Annotation	GenBank Accession	Identity
<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	sensor protein QseC	NP_708838.1	92
<i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895	hypothetical protein CKO_04415	YP_001455907.1	80
<i>Enterobacter</i> sp. 638	sensor protein QseC	YP_001178140.1	69
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	sensor protein QseC	NP_462093.1	79
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi str. CT18	sensor protein QseC	NP_457571.1	78
<i>Yersinia moliareti</i> ATCC 43969	COG0642: Signal transduction histidine kinase	ZP_00825878.1	61
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578	putative 2-component sensor protein	YP_001337067.1	71
<i>Haemophilus influenzae</i> PittGG	sensor protein QseC	YP_001291883.1	44
<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>multocida</i> str. Pm70	YgiY	NP_245152.1	46
<i>Coxiella burnetii</i> RSA 493	sensor histidine kinase	NP_820223.1	32
<i>Burkholderia phytatum</i> STM815	periplasmic sensor signal transduction histidine kinase	ZP_01500068.1	36
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	signal transduction histidine kinase	YP_725931.1	37
<i>Legionella pneumophila</i> str. Paris	hypothetical protein lpp1254	YP_123578.1	30
<i>Bordetella parapertussis</i> 12822	two-component system histidine kinase	NP_884854.1	37
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> SCHU S4	sensor histidine kinase	YP_169166.1	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	probable two-component sensor	AAG08163.1	31
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	sensor histidine kinase	YP_260953.1	31
<i>Vibrio</i> sp.	signal transduction histidine kinase	VVA0112	29
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> SCRI1043	sensor protein QseC	YP_048139.1	56
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serovar 1 str. 4074	COG0642: Signal transduction histidine kinase	ZP_00204505.1	38
<i>Yersinia pestis</i> CO92	two-component system sensor protein	CAL22096.1	33
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 32953	two-component system sensor protein	CAH19708.1	32
<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081	sensor protein BasS/PmrB	YP_001004792.1	31
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	sensor protein qseC	NP_900562.1	42

Tableau 2 Protéines homologues de QseC d'après Rasko *et al.*, 2008 , modifié par K.Biaggini

Pour compléter ces informations, nous avons utilisé la base de données UNIPROT afin de rechercher d'autres homologues potentiels de systèmes à deux composants QseB/C et QseE/F chez *Enterococcus* et *Pseudomonas*. J'ai pu constater que des homologues de QseB existent aussi chez *Enterococcus* et *Pseudomonas*. En effet, chez *E. faecalis*, T2PHH6 est annoté comme régulateur transcriptionnel putatif sur UNIPROT et présente 38,1 % d'identité avec QseB d'*E. coli*. Chez *P. aeruginosa* la protéine PmrA révèle 52,5% d'identité avec QseB d'*E. coli*. Un homologue de la protéine QseF est aussi existant chez *P. aeruginosa*, et présente 24% d'identité avec QseE d'*E. coli*. Un rôle éventuel de ces protéines comme senseurs de l'épinéphrine chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 et *Enterococcus faecalis* V583 reste à être démontré.

Chapitre III

La substance P stimule la production d'acide lactique et la virulence chez

***Enterococcus faecalis* V583**

1. Introduction

Les peptides antimicrobiens sont produits par tous les organismes vivants que ce soit les animaux, les plantes ou les invertébrés et sont impliqués dans la réponse immunitaire innée (Ganz 2003 ; Brogden *et al.*, 2003 ; Vizioli & Salzet, 2002). Certains neuropeptides possèdent aussi des propriétés antimicrobiennes (Brogden, 2005), comme le neuropeptide Y et la substance P (Hansen *et al.*, 2006 ; Kowalska *et al.*, 2002 ; Shimizu *et al.*, 1998), et sont connus pour être des acteurs importants de l'axe intestin cerveau (Holzer & Farzi, 2014). La substance P est abondante au niveau de la peau (Roosterman *et al.*, 2006) et de l'intestin (Margolis & Gershon 2009). Dans l'intestin, la substance P est exprimée au niveau des plexus myentérique et sous muqueux et est retrouvée à la fois au niveau des neurones sensitifs intrinsèques et extrinsèques. Les cellules effectrices de l'immunité telles que les macrophages, les éosinophiles et les lymphocytes produisent également de la substance P. Un rôle de ce neuropeptide dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin a été suggéré (Margolis & Gershon, 2009). Au niveau de la peau, la substance P constitue également un médiateur majeur de l'inflammation, qui contribue à la pathogenèse de nombreuses maladies cutanées telles que le psoriasis, les dermatites atopiques et l'acné (Mijouin *et al.*, 2013).

E. faecalis est une bactérie lactique à Gram positif, commensale de l'intestin, présente chez l'homme et les animaux. Très répandue dans l'environnement, elle peut être isolée à partir de niches écologiques variées, les produits fermentés, le lait humain mais aussi les sécrétions vaginales. *E. faecalis* Symbioflor 1 a été utilisée comme probiotique afin de réduire le risque de rechutes chez les patients atteints de sinusite chronique, et la sévérité des bronchites récurrentes (Christoffersen *et al.*, 2012). Toutefois, l'utilisation des Enterocoques comme probiotique ou ferment fromager reste controversé en raison des risques de transfert de gènes de virulence et de résistance aux souches bactériennes humaines (Franz *et al.*, 2003 ; Ogier & Serror, 2008 ; Aguilar-Galvez *et al.*, 2012). En effet, certaines souches comme *E. faecalis* V583 sont également connues pour être des pathogènes opportunistes. Cette bactérie isolée d'un patient souffrant d'une infection sanguine persistante, est aussi capable d'entraîner des infections urinaires, des bactériémies et des endocardites infectieuses

chez des patients immunodéprimés (McDonald *et al.*, 2005, Sahm *et al.*, 1989). Ces infections peuvent être difficiles à traiter car certaines souches d'*E. faecalis* sont résistantes aux antibiotiques, notamment à la vancomycine. *E. faecalis* possède une grande capacité d'adaptation et fait partie des pathogènes nosocomiaux les plus fréquemment rencontrés en milieu hospitalier (Giridhara Upadhyaya *et al.*, 2009 ; Vebø *et al.*, 2009). Cependant, les mécanismes exacts par lesquels cette bactérie est capable de passer d'un statut de bactérie commensale à pathobionte restent pour l'instant très mal connus. Nous émettons l'hypothèse que chez l'hôte ou après l'infection, *E. faecalis* se retrouve en contact avec de nombreuses substances eucaryotes dont certaines ayant des propriétés antimicrobiennes permettant d'éradiquer le pathogène, mais que d'autres au contraire, pourraient dans certains cas faciliter sa colonisation. Dans ce contexte, le but de cette étude a été de déterminer si la substance P possède une activité antimicrobienne contre *E. faecalis* V583 ou pourrait moduler la colonisation et la pathogénicité de cette bactérie.

2. Article

Substance P promotes acid lactic production and virulence in *Enterococcus faecalis* V583

Biaggini K, Borrel V, Szunerits S, Boukherroub R, N'Diaye A, Bonnin-Jusserand M, Duflos G, Feuilleley M, Drider D, Déchelotte P and Connil N. (2015) Soumis à *Frontiers in Microbiology*

Substance P promotes acid lactic production and virulence in *Enterococcus faecalis* V583

Kelly Biaggini¹, Valérie Borrel¹, Sabine Szunerits², Rabah Boukherroub², Awa N'Diaye¹, Maryse Bonnin-Jusserand³, Guillaume Duflos⁴, Marc G. Feuilloley¹, Djamel Drider⁵, Pierre Déchelotte⁶, Nathalie Connil^{1*}

¹Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement EA4312, Université de Rouen, France,

²Institute of Electronics, Microelectronics and Nanotechnology, UMR-CNRS 8520, Université Lille 1,

France, ³Institut Charles Viollette EA7394, Université du Littoral Côte d'Opale, France, ⁴Laboratoire de Sécurité des Aliments, Département des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture, ANSES, France,

⁵Institut Charles Viollette, EA7394, Université Lille 1 - Sciences et Technologies, France, ⁶INSERM Unité 1073 «Nutrition, Inflammation et dysfonction de l'axe intestin-cerveau», Université de Rouen, France

Submitted to Journal:
Frontiers in Microbiology

Specialty Section:
Microbial Physiology and Metabolism

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
173729

Received on:
23 Oct 2015

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

NC designed experiments. KB, VB, DD, GD, MB, SS, RB performed the experiments. AN, MF, DD, PD, NC wrote the paper. All the authors read and approved the final manuscript.

Keywords

Substance P, Virulence, Lactic Acid, Enterococcus faecalis, gut

Abstract

Word count: 182

E. faecalis, generally considered as a saprophytic bowel commensal, has recently emerged as an important nosocomial pathogen causing severe urinary tract infections, surgical wound infections, bacteremia, and bacterial endocarditis. This bacterium is capable of forming biofilms on various surfaces and its high level of antibiotic resistance contributes to its pathogenicity. The aim of this study was to evaluate the effect of Substance P (SP), an antimicrobial peptide that is produced in the gut and skin, on *E. faecalis*. We found that SP did not have antibacterial activity against *E. faecalis* V583 (MIC>1000 µg/ml). Conversely, SP stimulated aggregation and hydrophobicity of *E. faecalis* V583 and some physiological traits were modulated. The production of lactic acid was concomitantly enhanced with tyramine. The cytotoxicity and translocation of *E. faecalis* V583 were accelerated when the bacteria were pretreated with SP before infection of intestinal Caco-2/TC7 cells. These results highlight that more extensive studies are mandatory to screen within the human microbiota, which bacteria are responsive to host molecules. These substances may have profound effects on both commensals and pathogens, and could promote or severely affect health.

Ethics statement

(Authors are required to state the ethical considerations of their study in the manuscript including for cases where the study was exempt from ethical approval procedures.)

Did the study presented in the manuscript involve human or animal subjects: No

1 **Substance P promotes acid lactic production and virulence in**
2 ***Enterococcus faecalis* V583**

3
4
5 Kelly Biaggini¹⁺, Valérie Borrel¹⁺, Sabine Szunerits², Rabah Boukherroub², Awa N’Diaye¹,
6 Maryse Bonnin-Jusserand³, Guillaume Duflos⁴, Marc Feuilloley¹, Djamel Drider⁵, Pierre
7 Déchelotte⁶ and Nathalie Connil^{1*}

8
9 1 Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement EA4312, Université de
10 Rouen, Evreux, France

11 2 Institute of Electronics, Microelectronics and Nanotechnology, UMR-CNRS 8520,
12 Université Lille 1, Villeneuve d’Ascq, France

13 3 Institut Charles Viollette EA7394, Université du Littoral Côte d’Opale, Boulogne Sur Mer,
14 France

15 4 Laboratoire de Sécurité des Aliments, Département des Produits de la Pêche et de
16 l’Aquaculture, ANSES, Boulogne Sur Mer, France

17 5 Institut Charles Viollette, EA7394, Université Lille 1 – Sciences et Technologies,
18 Villeneuve d’Ascq, France

19 6 INSERM Unité 1073 «Nutrition, Inflammation et dysfonction de l’axe intestin-cerveau»,
20 Université de Rouen, Rouen, France

21
22 + These authors contributed equally to this work.

23
24 Correspondence:

25 Dr. Nathalie Connil

26 Laboratoire de Microbiologie, Signaux et Microenvironnement (EA4312)

27 Université de Rouen/IUT d’Evreux

28 55, rue saint Germain

29 27000 Evreux

30 nathalie.connil@univ-rouen.fr

38 **Abstract**

39 *E. faecalis*, generally considered as a saprophytic bowel commensal, has recently emerged as
40 an important nosocomial pathogen causing severe urinary tract infections, surgical wound
41 infections, bacteremia, and bacterial endocarditis. This bacterium is capable of forming biofilms
42 on various surfaces and its high level of antibiotic resistance contributes to its pathogenicity.
43 The aim of this study was to evaluate the effect of Substance P (SP), an antimicrobial peptide
44 that is produced in the gut and skin, on *E. faecalis*. We found that SP did not have antibacterial
45 activity against *E. faecalis* V583 (MIC>1000 µg/ml). Conversely, SP stimulated aggregation
46 and hydrophobicity of *E. faecalis* V583 and some physiological traits were modulated. The
47 production of lactic acid was concomitantly enhanced with tyramine. The cytotoxicity and
48 translocation of *E. faecalis* V583 were accelerated when the bacteria were pretreated with SP
49 before infection of intestinal Caco-2/TC7 cells. These results highlight that more extensive
50 studies are mandatory to screen within the human microbiota, which bacteria are responsive to
51 host molecules. These substances may have profound effects on both commensals and
52 pathogens, and could promote or severely affect health.

53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87

In review

88 **Introduction**

89 Antimicrobial peptides are produced by many living cells in animals, plants, and invertebrates,
90 and constitute integral components of innate host defense (Ganz, 2003 ; Brogden et al., 2003 ;
91 Vizioli and Salzet, 2002). Several neuropeptides also have antimicrobial activity (Brogden,
92 2005) such as Neuropeptide Y (NPY) and Substance P (SP) (Hansen et al., 2006 ; Kowalska et
93 al., 2002 ; Shimizu et al., 1998), and are known to be implicated in the microbiota-gut-brain
94 axis (Holzer and Farzi, 2014). SP is an undecapeptide of the tachykinin family which is
95 abundant in the skin (Mijouin et al., 2013) and the gut (Margolis and Gershon, 2009). In the
96 skin, SP is considered as a major mediator of inflammation. It contributes to the pathogenesis
97 of numerous skin diseases, like psoriasis, atopic dermatitis and acne (Mijouin et al., 2013). In
98 the bowel, SP is expressed in both myenteric and submucosal plexuses and is found within
99 intrinsic and extrinsic sensory neurons. Immune effector cells, such as monocytes,
100 macrophages, eosinophils, and lymphocytes, also express SP. A role of various levels of SP in
101 the pathophysiology of inflammatory bowel disease has been suggested but disparate results
102 were reported depending of the studies (Margolis and Gershon, 2009).

103 *Enterococcus faecalis* is a common resident of the gastrointestinal tract of humans and animals,
104 and a wide-spread Gram-positive lactic acid bacterium that can be isolated from a variety of
105 habitats, including fermented foods, human milk and vaginal secretions. *E. faecalis* Symbioflor
106 1 is also used as probiotic for more than 20 years and has been reported to reduce the number
107 of relapses in patients with chronic recurrent hypertrophic sinusitis, as well as the number and
108 severity of relapses in patients with chronic recurrent bronchitis (Christoffersen et al., 2012).
109 Nevertheless, the use of enterococci as a probiotic or cheese starter remains controversial, due
110 to the risks of transfer of antimicrobial resistance and virulence genes to human strains (Franz
111 et al., 2003 ; Ogier and Serror, 2008). In fact, some strains, such as *E. faecalis* V583, are known
112 to be opportunistic pathogen. This bacterium originates from a patient suffering from a
113 persistent bloodstream infection, and it can cause diseases like urinary tract infections,
114 bacteremia, and infective endocarditis in immunocompromised patients (McDonald et al.,
115 2005, Sahm et al., 1989). These infections may be problematic because some *E. faecalis* strains
116 are resistant to many antibiotics including vancomycin, and Enterococci are now considered
117 among the most prevalent nosocomial pathogens (Giridhara Upadhyaya et al., 2009). The
118 opportunistic pathogen *E. faecalis* has extraordinary capacities to grow under adverse
119 conditions and to colonize and survive in a large range of ecological niches (Vebø et al., 2009).
120 The mechanism by which this bacterium is able to cross the barrier from a commensal to
121 become a pathobiont is still not well understood. We can hypothesize that in the host or after
122 infection, *E. faecalis* may be in contact with various Eukaryotic molecules that have
123 antimicrobial properties and help fighting against the pathogen or in the contrary can contribute
124 to promote the bacterial colonization. The aim of this study was therefore to determine whether
125 SP display antimicrobial activity against *E. faecalis* V583 or modulate colonization and
126 pathogenicity of the bacteria.

127

128 **Materials and Methods**

129

130 **Bacterial strain, culture conditions and reagents**

131 The clinical isolate *E. faecalis* V583 was used in this study (Sahm et al., 1989). The strain was
132 cultivated at 37°C in Brain Heart Infusion (BHI) medium and stored at -80°C in 50% (v/v)
133 glycerol. SP was purchased from PolyPeptide group and a stock solution was freshly prepared
134 for each experiment.

135

136

137

138

139 **Minimal Inhibitory Concentration (MIC) analysis**

140 MIC was studied by microdilution in Mueller Hinton (MH) broth using an inoculum of 10^5
141 colony forming units per ml. Microtiter plate containing triplicate two-fold dilution series of
142 1000 $\mu\text{g/ml}$ SP was incubated overnight at 37°C . Turbidity was observed at the end of
143 incubation.

144

145 **LIVE/DEAD analysis by confocal microscopy**

146 Viability of *E. faecalis* V583 treated or not with SP was analyzed using the LIVE/DEAD
147 *BacLight* Bacterial Viability Kit for microscopy (L7007, Invitrogen). In this system, live
148 bacteria stain with SYTO 9 to produce a green fluorescence whereas dead bacteria stain with
149 propidium iodide (PI) to produce a red fluorescence. Briefly, 3 μl of the SYTO 9/PI mixture,
150 prepared according to the manufacturer's instruction, was added to the bacterial cells previously
151 treated with 10^{-2} , 10^{-4} or 10^{-6} M of SP for 2 h, and untreated cells were kept as control. The
152 samples were incubated for 15 min in dark at room temperature and 5 μl of this sample was
153 trapped in between coverslip and glass slide. The slide was viewed under a confocal laser-
154 scanning microscope (LSM 710 CLSM, Zeiss), using 60X objective sequentially using
155 fluorescence setting for FITC (green/SYTO 9, viable cells) and PI (red/PI, dead cells) filters,
156 respectively, followed by phase contrast and bright field settings. SYTO 9 and PI images were
157 merged and acquired using ZEN[®] software (Zeiss).

158

159 **Scanning electron microscopy (SEM)**

160 10^8 CFU/ml bacterial suspension was incubated with 10^{-4} M of SP in phosphate buffered saline
161 (PBS) for 2 h. At the end of incubation, the bacteria were washed with PBS and fixed on
162 coverslips with 1% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.3) for 2 h. After
163 washing with Milli-Q[®] water, bacteria were dehydrated with increasing ethanol concentration
164 (50, 70, 95 and 100%). Dry coverslips were mounted on stubs and coated with 5 nm platinum
165 (Quorum Technologies Q150T, Elexience, France). Bacteria were observed with a secondary
166 detector in a Zeiss SEM Merlin Compact VP (Zeiss, France) operating at 5 kV.

167

168 **Microbial adhesion to solvents (MATS)**

169 Microbial adhesion to solvents was measured according to Al Atya et al. (2015) and Al Kos et
170 al. (2003) with a slight modification. Bacteria grown in BHI with or without SP (10^{-4} or 10^{-6}
171 M) for 18 h at 37°C , were harvested by centrifugation at 5000 g for 15 min, washed twice, and
172 resuspended in PBS to approximately 10^8 CFU/ml. The absorbance of the cell suspension was
173 measured at 600 nm (A_0). One ml of solvent was added to 3 ml of cell suspension. After a 10
174 min preincubation at room temperature, the two-phase system was mixed by vortexing for 2
175 min. The aqueous phase was removed after 20 min of incubation at room temperature, and the
176 absorbance at 600 nm (A_1) was measured. Two apolar solvents were tested : xylene and toluene.
177 Bacterial adhesion to these solvents reflects cell surface hydrophobicity. The percentage of
178 bacterial adhesion to the solvents was calculated as $1-(A_1/A_0) \times 100$.

179

180 **Lactic acid and tyramine quantification**

181 Lactic acid was quantified as recently described (Al Atya et al., 2015). Briefly, *E. faecalis* were
182 grown in BHI with or without 10^{-6} M SP at 37°C , and samples were withdrawn after 14 h of
183 incubation, centrifuged (10 000 g, 4°C , 10 min), and sterilized by filtration using Millipore filter
184 (0.2 μm). The concentration of lactic acid in the samples was determined by HPLC spectra
185 system P1000XR (Thermo, USA).

186 For tyramine analysis, the bacterial samples were prepared similarly, except that tyrosine (800
187 mg/l) was added in the BHI medium (Bargossi et al., 2015). The quantification was performed

188 by mixing 20 µl of bacterial samples with 80 µl of perchloric acid (0.2M) and 5 µl of 1.7
189 diaminoheptane (6.4 mg/ml), shaking until complete homogenization and centrifuging at 8000
190 g, 4°C, 5 min). The steps of derivatization using dansylchloride and purification are described
191 in Duflos et al. (1999). Hitachi Elite LaChrom HPLC System was used to quantify tyramine
192 with Kromasil column (C18, 5 µm 100 Å ; 25 cm x 4.6 mm).

193

194 **Caco-2/TC7 cells and culture**

195 The Caco-2/TC7 cells were used between passages 50 and 70. Cells were routinely grown at
196 37°C in 5% CO₂-95% air atmosphere in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
197 supplemented with 15% heat-inactivated foetal calf serum, and Penicillin/Streptomycin. For
198 experimental assays, the cells were seeded in 24-well tissue culture plates (for cytotoxicity
199 assay and interleukine-8 (IL-8) quantification) or on insert (3 µm pore size) to ensure epithelial
200 differentiation (for transepithelial electrical resistance (TER) measurement and translocation
201 assay).

202

203 **Bacterial treatment with SP and infection of Caco-2/TC7 cells**

204 For all the following experiments conducted on Caco-2/TC7 cells, only a dose of 10⁻⁶ M SP
205 was used, which is more relevant to the physiological concentration in the gut. SP was added
206 to the cultures of *E. faecalis* V583 at the beginning of the exponential growth phase. The
207 bacteria were exposed for 2 h with the peptide, then centrifuged for 5 min at 8000 g, washed
208 and resuspended in cell culture medium without antibiotics and serum. Caco-2/TC7 cells were
209 infected at a MOI (multiplicity of infection) of 100:1 with the bacteria treated or not with SP,
210 and incubated for 15 h at 37°C, CO₂ 5%, unless otherwise stated.

211

212 **Cytotoxicity and quantification of IL-8**

213 The cytotoxicity of *E. faecalis* V583 treated or not with SP was estimated by enumeration of
214 the remaining Caco-2/TC7 viable cells, 4 h and 24 h after infection, using the neutral red (NR)
215 uptake assay. Only viable cells will take up NR by active transport and incorporate the dye into
216 lysosomes. Following infection, Caco-2/TC7 cells were washed once in PBS and incubated
217 with NR (50 µg/ml) for 1 h at 37°C, CO₂ 5%. After incubation, the cells were rinsed once in
218 PBS, and NR incorporated in viable cells was extracted with a solution of 50% (v/v) ethanol
219 and 1% (v/v) acetic acid for 10 min before measuring optical density at 550 nm.

220 The level of IL-8 was quantified in the supernatant of Caco-2/TC7 cells, 14 h after infection,
221 using the CXCL8 ELISA Quantikine kits (R&D systems) according to the manufacturer's
222 protocol.

223

224 **Transepithelial electrical resistance (TER)**

225 The effect of *E. faecalis* V583, treated or not with SP, on the TER of Caco-2/TC7 monolayers
226 was measured at 0 h, 4 h, 18 h and 24 h, using the Millicell Electrical Resistance System. For
227 each conditions tested, the TER values were expressed as percentages of the initial level
228 measured in the insert.

229

230 **Bacterial translocation**

231 After 4 h and 24 h infection of the Caco-2/TC7 inserts, aliquots of 100 µl of the basolateral
232 compartment were collected and the number of bacteria that crossed the epithelial monolayers
233 was determined by serial dilution and plating onto BHI agar

234

235 **Statistical analysis**

236 All the assays were performed in triplicate. GRAPH PAD PRISM software and Student's t-test were
237 used to compare the data statistically.

238 Results

239 MIC analysis and microscopic observations

240 No MIC value could be obtained using the microdilution method in Mueller Hinton (MH) broth.
241 Turbidity was seen in all the microplate wells (MIC>1000 µg/ml). Thus, antimicrobial effect
242 of SP on *E. faecalis* V583 was also studied using confocal analysis and the LIVE/DEAD
243 BacLight Bacterial Viability Assay Kit. It can be clearly seen from **Figure 1A** that untreated
244 control *E. faecalis* V583 appeared green (indicating viable cells stained by SYTO 9). When the
245 bacteria were exposed for 2 h with 10^{-6} M (**Figure 1B**) or 10^{-4} M SP (**Figure 1C**), no additional
246 dead cells were detected. Unexpectedly, a treatment with 10^{-2} M SP led to approximately 50%
247 of red bacteria demonstrating dead cells (**Figure 1D**), although MIC analysis had not shown
248 antimicrobial activity even for high concentrations of SP. Moreover, confocal observations
249 allowed us to notice that bacteria seem to slightly agglutinate when exposed to 10^{-4} or 10^{-2} M
250 SP compared to untreated bacteria and bacteria exposed to 10^{-6} M. SEM analysis confirmed
251 these observations. Control *E. faecalis* V583 (**Figure 2A**) were mostly associated by 2 or 4
252 cells, whereas bacteria exposed to 10^{-4} M SP (**Figure 2B**) can appear in cluster of more than 10
253 cells.

254

255 Hydrophobicity

256 The scores values of hydrophobicity of *E. faecalis* V583 treated or not with 10^{-6} or 10^{-4} M SP
257 are presented in **Figure 3**. We can see that when the bacteria were exposed to SP,
258 hydrophobicity slightly increased.

259

260 Lactic acid and tyramine quantification

261 The **Figure 4A** shows the lactic acid production normalized to control. Exposure of *E. faecalis*
262 V583 to 10^{-6} M SP led to an increase of lactate production. Tyramine production was also
263 enhanced when the bacteria were treated with SP (**Figure 4B**). This may explain why the pH
264 was not modified despite the acid production.

265

266 Cytotoxicity and quantification of IL-8

267 The cytotoxicity was determined by measuring the remaining viable cells with NR assay
268 (**Figure 5A**). The results show that Caco-2/TC7 cells were fastly killed when infected with *E.*
269 *faecalis* V583 pre-exposed to 10^{-6} M SP. Indeed, after 4 h of infection, 80 % of the cells co-
270 incubated with *E. faecalis* V583 remained viable, whereas only 62 % if the bacteria were treated
271 with SP before infection. Quantification of IL-8 (**Figure 5B**) show no significant effect of SP
272 on the proinflammatory potential of *E. faecalis* V583.

273

274 Transepithelial electrical resistance (TER) and bacterial translocation

275 The transepithelial resistance of differentiated Caco-2/TC7 was monitored during 24 h (**Figure**
276 **6A**). The results show that TER decreased fastly at 18 h of infection if the bacteria were exposed
277 to SP (-53%) compared to infection with untreated bacteria (-38%). After 24 h of infection,
278 Caco-2/TC7 cells were damaged in both cases, there is no longer any statistically significant
279 difference. Unexpectedly, the translocation assay show that even before the decrease in TER,
280 *E. faecalis* V583 has moved from the apical to basolateral compartment and 100 times more
281 bacteria exposed to SP crossed the epithelial barrier than untreated bacteria. After 24 h of
282 infection, and due to the alteration of the monolayer (as this was previously seen by TER
283 measurement), all the bacteria, exposed or not to SP were recovered in the basolateral
284 compartment.

285

286

287 **Discussion**

288 Neuropeptides such as SP are important transmitters in the bidirectional gut-brain
289 communication network, that may influence the activity of the gastrointestinal microbiota and
290 its interaction with the gut-brain axis (Holzer and Farzi, 2014). As SP is known to display
291 antimicrobial activity against oral, respiratory, gut and skin bacteria (Hansen et al., 2006; El
292 Karim et al., 2008) but also to conversely enhance virulence of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus*
293 *aureus* (Mijouin et al., 2013) and *Pseudomonas fluorescens* (Biaggini et al., 2015), the aim of
294 our study was to determine its effect on *E. faecalis* V583.

295 MIC analysis showed no antibacterial activity of SP against *E. faecalis* V583 even for a high
296 concentration of 1000 µg/ml (7.10^{-4} M). However, confocal microscopy using LIVE/DEAD
297 BacLight Bacterial Viability Assay allowed to notice some dead cells for SP $> 10^{-4}$ M and the
298 bacteria also seem to slightly agglutinate which was then confirmed by SEM microscopy.
299 Kowalska et al. (2002) found that the MIC of SP against *E. faecalis* ATCC 19212 also studied
300 by the microdilution method in liquid broth was 0.13%, whereas El Karim et al. (2008) found
301 that *E. faecalis* NCTC 12697 was highly resistant to SP with a MIC value, determined by the
302 radial diffusion assay > 500 µg/ml. It seems that the susceptibility of *E. faecalis* to SP may be
303 strain-variable and/or depend on the method used to assess antimicrobial activity. To a certain
304 extent, agglutination of the bacteria, as this was observed by microscopy, may also help them
305 to survive to the antimicrobial peptide. SP is a cationic antimicrobial peptide that may kill
306 bacteria by pore formation and/or probably also act as a metabolic inhibitor (Brogden, 2005).
307 Aggregation of bacteria is often associated with hydrophobicity, and these two parameters can
308 help to adhere to different surfaces including intestinal epithelial cells (Del Re et al., 2000).
309 Therefore, *E. faecalis* V583 was examined for its hydrophobicity according to exposure to SP.
310 The results showed that a treatment of the bacteria with 10^{-4} or 10^{-6} M SP both increased the
311 hydrophobicity value. This allows us to hypothesize that SP in the gastrointestinal tract may
312 promote adhesion of *E. faecalis* and/or other gut microbes to the mucosa.

313 As *E. faecalis* V583 is known to be an opportunistic pathogen, we found obvious to examine
314 some virulence properties of the bacteria following SP exposure. We found that lactic acid
315 production was enhanced when *E. faecalis* V583 is treated with SP. Lactic acid is produced by
316 the lactate dehydrogenase (LDH) enzyme, which seems to be important for multiple stress
317 resistance and virulence in *E. faecalis* (Rana et al., 2013). In our study, the increase of lactic
318 acid production during exposure of the bacteria to SP didn't result to a fall in pH (data not
319 shown). To protect the bacteria from its own acid production (Fernandez et al., 2007; Lin et al.,
320 1996), *E. faecalis* is able to decarboxylate amino acid, especially tyrosine in tyramine (Connil
321 et al., 2002; Bargossi et al., 2015). In fact, tyramine biosynthesis is transcriptionally induced at
322 low pH (Linares et al., 2009; Perez et al., 2015) and this improves the fitness of *E. faecalis* and
323 *E. durans* in acidic environments such as in the gastrointestinal tract (Fernández de Palencia et
324 al., 2011; Perez et al., 2015). We showed in our study that exposure to SP enhanced the
325 production of tyramine by *E. faecalis* V583 concomitantly with lactic acid, this may explain
326 why no modification in pH was observed. The biosynthesis of tyramine is a general species
327 trait of *E. faecalis* (Ladero et al., 2012). Large amounts of this biogenic amine can cause
328 toxicological effects including migraines and hypertension and sometimes problems as serious
329 as cerebral haemorrhages (Pessione, 2012). Thus, production of tyramine by gut commensal *E.*
330 *faecalis* exposed to SP deserves more attention. In our study, *E. faecalis* V583 has also been
331 used for the infection of Caco-2/TC7 cells following treatment of the bacteria with SP. The
332 results showed that cytotoxicity of *E. faecalis* V583 increased with SP exposure whereas the
333 proinflammatory potential remained unchanged. Moreover, the permeability of differentiated
334 Caco-2/TC7 cells increased rapidly when infected with *E. faecalis* V583 exposed to SP,
335 allowing the bacteria to translocate faster to the basolateral compartment. Finally, all these
336 observations show that SP promotes acid lactic production and virulence in *E. faecalis* V583.

337 Consequently, future work is needed to identify the bacterial sensor in *E. faecalis*. For this, Ef-
338 Tu may be a reliable candidate as it has been found as the SP sensor in *Bacillus cereus* (Mijouin
339 et al., 2013). It remains also to determine which other bacteria within the gut microbiota
340 expresses neuropeptide receptors or releases metabolites that are ligands for eucaryotic
341 neuropeptide receptors. This may probably help to better understand the complex relationship
342 between brain, gut and microbiota, and to found adequate therapy in intestinal disorders.

343

344 **Acknowledgments**

345 The authors would like to thank Nicolas Barois from the Center for Infection and Immunity of
346 Lille (CIIL, CNRS UMR8204-INSERM U1019) for recording the SEM images.

347

348 **References**

349 Al Atya, A.K., Drider-Hadiouche, K., Ravallec, R., Silvain, A., Vachee, A., and Drider, D.
350 (2015). Probiotic potential of *Enterococcus faecalis* strains isolated from meconium. *Front.*
351 *Microbiol.* 6:227. doi: 10.3389/fmicb.2015.00227

352 Bargossi, E., Tabanelli, G., Montanari, C., Lanciotti, R., Gatto, V., Gardini, F., and Torriani, S.
353 (2015). Tyrosine decarboxylase activity of enterococci grown in media with different
354 nutritional potential: tyramine and 2-phenylethylamine accumulation and tyrDC gene
355 expression. *Front. Microbiol.* 6:259. doi: 10.3389/fmicb.2015.00259

356 Biaggini, K., Barbey, C., Borrel, V., Feuilloley, M., Déchelotte, P., and Connil, N. (2015). The
357 pathogenic potential of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 on enterocytes can be modulated
358 by serotonin, substance P and epinephrine. *Arch. Microbiol.* 197, 983-990. doi:
359 10.1007/s00203-015-1135-y

360 Brogden, K.A., Ackermann, M., McCray, P.B. Jr., and Tack, B.F. (2003). Antimicrobial
361 peptides in animals and their role in host defences. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 22, 465-478.

362 Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?
363 *Nat Rev Microbiol.* 3, 238-250.

364 Christoffersen, T.E., Hult, L.T., Kuczkowska, K., Moe, K.M., Skeie, S., Lea, T., et al. (2014).
365 In vitro comparison of the effects of probiotic, commensal and pathogenic strains on
366 macrophage polarization. *Probiotics. Antimicrob. Proteins.* 6, 1-10. doi: 10.1007/s12602-013-
367 9152-0

368 Connil, N., Le Breton, Y., Dousset, X., Auffray, Y., Rincé, A., and Prévost H. (2002).
369 Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine
370 production. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3537-3544.

371 Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and
372 hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 438-442.

373 Duflos, G., Dervin, C., Malle, P., and Bouquelet, S. (1999). Use of biogenic amines to evaluate
374 spoilage in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangus merlangus*). *J AOAC Int.*
375 82, 1357-63.

376

377

- 379 El Karim, I.A., Linden, G.J., Orr, D.F., and Lundy, F.T. (2008). Antimicrobial activity of
380 neuropeptides against a range of micro-organisms from skin, oral, respiratory and
381 gastrointestinal tract sites. *J. Neuroimmunol.* 200, 11-16. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.05.014
- 382 Fernández, M., Linares, D.M., Rodríguez, A., and Alvarez, M.A. (2007). Factors affecting
383 tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 1400-
384 1406.
- 385 Fernández, de Palencia, P., Fernández, M., Mohedano, M.L., Ladero, V., Quevedo, C., Alvarez,
386 M.A., et al. (2011). Role of tyramine synthesis by food-borne *Enterococcus durans* in
387 adaptation to the gastrointestinal tract environment. *Appl Environ Microbiol.* 77, 699-702. doi:
388 10.1128/AEM.01411-10
- 389 Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., and Holzapel, W.H. (2003). *Enterococci* in foods--
390 a conundrum for food safety. *Int. J. Food. Microbiol.* 88, 105-122.
- 391 Ganz, T. (2003). The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integr. Comp. Biol.* 43,
392 300-304.
- 393 Giridhara, Upadhyaya, P.M., Ravikumar, K.L., and Umapathy, B.L. (2009). Review of
394 virulence factors of *enterococcus*: an emerging nosocomial pathogen. *Indian. J. Med.*
395 *Microbiol.* 27, 301-305. doi: 10.4103/0255-0857.55437
- 396 Hansen, C.J., Burnell, K.K., and Brogden, K.A. (2006). Antimicrobial activity of Substance P
397 and Neuropeptide Y against laboratory strains of bacteria and oral microorganisms. *J.*
398 *Neuroimmunol.* 177, 215-218.
- 399 Holzer, P., and Farzi, A. (2014). Neuropeptides and the microbiota-gut-brain axis. *Adv. Exp.*
400 *Med. Biol.* 817, 195-219. doi: 10.1007/978-1-4939-0897-4_9
- 401 Kos, B., Susković, J., Vuković, S., Simpraga, M., Frece, J., and Matosić, S. (2003). Adhesion
402 and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.*
403 94, 981-987.
- 404 Kowalska, K., Carr, D.B., and Lipkowski, A.W. (2002). Direct antimicrobial properties of
405 substance P. *Life. Sci.* 71, 747-750.
- 406 Ladero, V., Fernández, M., Calles-Enríquez, M., Sánchez-Llana, E., Cañedo, E., Martín, M.C.,
407 et al. (2012). Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level
408 trait in enterococci? *Food. Microbiol.* 30, 132-138. doi: 10.1016/j.fm.2011.12.016
- 409 Linares, D.M., Fernández, M., Martín, M.C., and Alvarez, M.A. (2009). Tyramine biosynthesis
410 in *Enterococcus durans* is transcriptionally regulated by the extracellular pH and tyrosine
411 concentration. *Microb. Biotechnol.* 2, 625-633. doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00117.x.
- 412 Lin, J., Smith, M.P., Chapin, K.C., Baik, H.S., Bennett, G.N., and Foster, J.W. (1996).
413 Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ.*
414 *Microbiol.* 62, 3094-3100.
- 415 Margolis, K.G., and Gershon, M.D. (2009). Neuropeptides and inflammatory bowel disease.
416 *Curr. Opin. Gastroenterol.* 25, 503-511. doi: 10.1097/MOG.0b013e328331b69e
- 417 McDonald, J.R., Olaison, L., Anderson, D.J., Hoen, B., Miro, J.M., Eykyn, S., et al. (2005).
418 Enterococcal endocarditis: 107 cases from the international collaboration on endocarditis
419 merged database. *Am. J. Med.* 118, 759-766.

- 420 Mijouin, L., Hillion, M., Ramdani, Y., Jaouen, T., Duclairoir-Poc, C., Follet-Gueye, M.L., et
421 al. (2013). Effects of a skin neuropeptide (substance p) on cutaneous microflora. *PLoS. One.*
422 8:e78773. doi: 10.1371/journal.pone.0078773
- 423 Ogier, J.C., and Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus*
424 genus. *Int. J. Food. Microbiol.* 126, 291-301.
- 425 Perez, M., Calles-Enríquez, M., Nes, I., Martin, M.C., Fernandez, M., Ladero, V., et al. (2015).
426 Tyramine biosynthesis is transcriptionally induced at low pH and improves the fitness of
427 *Enterococcus faecalis* in acidic environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 3547-3558. doi:
428 10.1007/s00253-014-6301-7
- 429 Pessione E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and
430 shadows. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:86. doi: 10.3389/fcimb.2012.00086
- 431 Rana, N.F., Sauvageot, N., Laplace, J.M., Bao, Y., Nes, I., Rincé, A., et al. (2013). Redox
432 balance via lactate dehydrogenase is important for multiple stress resistance and virulence in
433 *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 81, 2662-2668. doi: 10.1128/IAI.01299-12
- 434 Sahm, D.F, Kissinger, J., Gilmore, M.S., Murray, P.R., Mulder, R., Solliday, J., et al. (1989).
435 *In vitro* susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob.*
436 *Agents. Chemother.* 33, 1588-1591.
- 437 Vebø, H.C., Snipen, L., Nes, I.F., and Brede, D.A. (2009). The transcriptome of the nosocomial
438 pathogen *Enterococcus faecalis* V583 reveals adaptive responses to growth in blood. *PLoS.*
439 *One.* 4:e7660. doi: 10.1371/journal.pone.0007660
- 440 Vizioli, J., and Salzet, M. (2002). Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates.
441 *Trends. Pharmacol. Sci.* 23, 494-496.

442

443 **Legends to figures**

444

445 **Figure 1. LIVE/DEAD analysis of *E. faecalis* V583 by confocal microscopy after 2 h**
446 **exposure to SP.** (A) 0 M, (B) 10^{-6} M, (C) 10^{-4} M and (D) 10^{-2} M SP. Viable (green bacteria)
447 stained with SYTO 9, dead (red) bacteria stained with PI. Scale bar= 5 μ m.

448

449 **Figure 2. Scanning electron microscopic (SEM) images of *E. faecalis* V583 after 2 h**
450 **exposure to SP.** (A) 0 M and (B) 10^{-4} M SP. Scale bar= 1 μ m.

451

452 **Figure 3. Cell surface hydrophobicity of *E. faecalis* V583 determined by a MATS test after**
453 **2 h exposure to SP.**

454 ■ untreated bacteria, ■ *E. faecalis* V583 exposed to 10^{-6} M SP, ■ *E. faecalis* V583 exposed
455 to 10^{-4} M SP, NS not significant, * $P < 0.05$ versus untreated bacteria

456

457

458

459 **Figure 4. (A) Acid lactic and (B) tyramine production by *E. faecalis* V583 exposed to SP.**

460 ■ untreated bacteria, ■ *E. faecalis* V583 exposed to 10^{-6} M SP, ** $P < 0.01$ versus untreated
461 bacteria

462

463 **Figure 5. (A) Viability of Caco-2/TC7 cells and (B) IL-8 secretion after infection with *E.***
464 ***faecalis* V583 exposed to SP.**

465 ■ infection with untreated bacteria, ■ infection with *E. faecalis* V583 exposed to 10^{-6} M SP
466 * $P < 0.05$ versus untreated bacteria

467

468 **Figure 6. (A) Transepithelial resistance (TER) of Caco-2/TC7 cells.**

469 □ TER of non infected cells, ■ TER of cells infected with untreated bacteria, ■ TER of cells
470 infected with *E. faecalis* V583 pretreated with 10^{-6} M SP

471 **B) Bacterial translocation of *E. faecalis* V583 across Caco-2/TC7 cells.**

472 ■ untreated bacteria, ■ *E. faecalis* V583 pretreated with 10^{-6} M SP

473 NS not significant, * $P < 0.05$ versus untreated bacteria

474

475

476

477

478

479

480

481

482

Figure 1.JPEG

In review

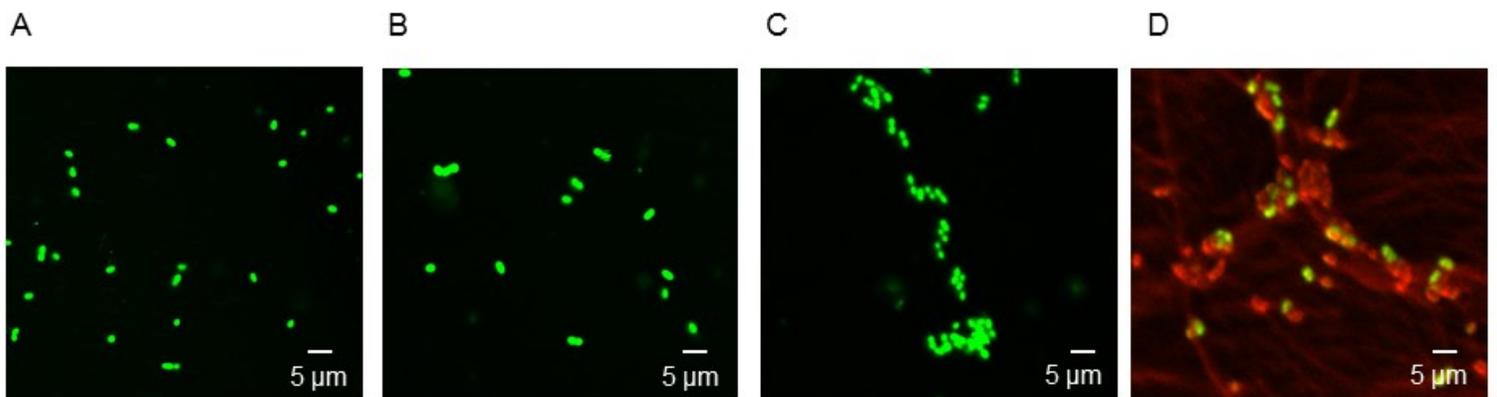
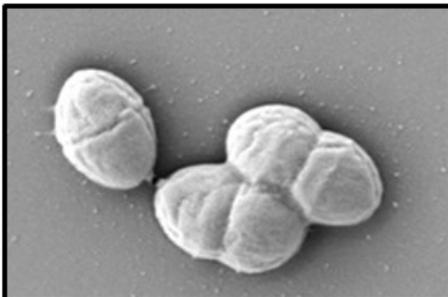
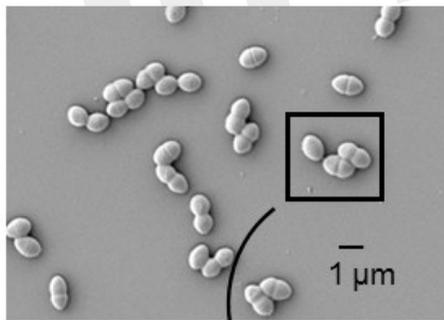


Figure 2.JPEG

A



B

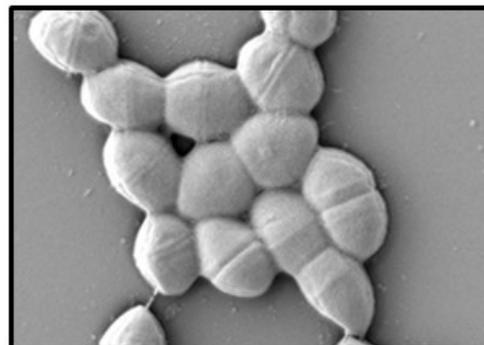
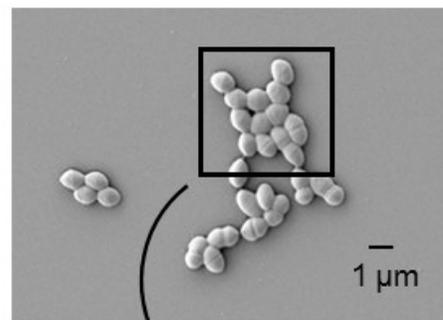


Figure 3.JPEG

In review

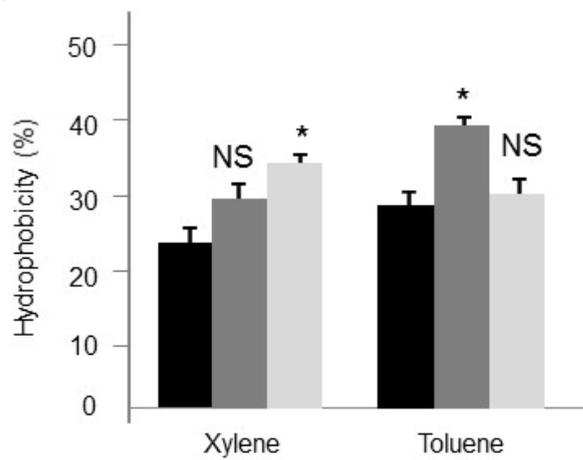


Figure 4.JPEG

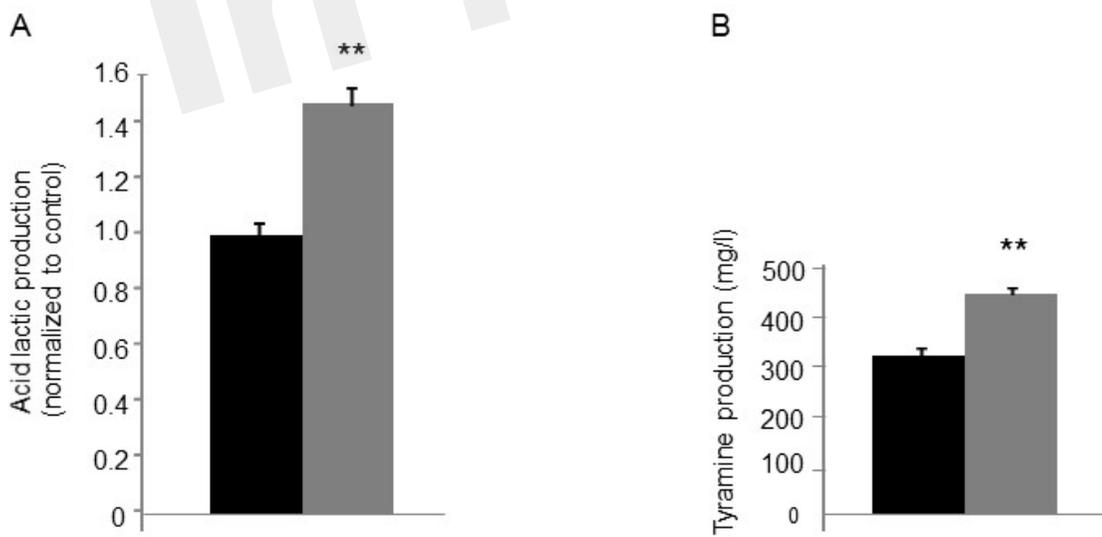


Figure 5.JPEG

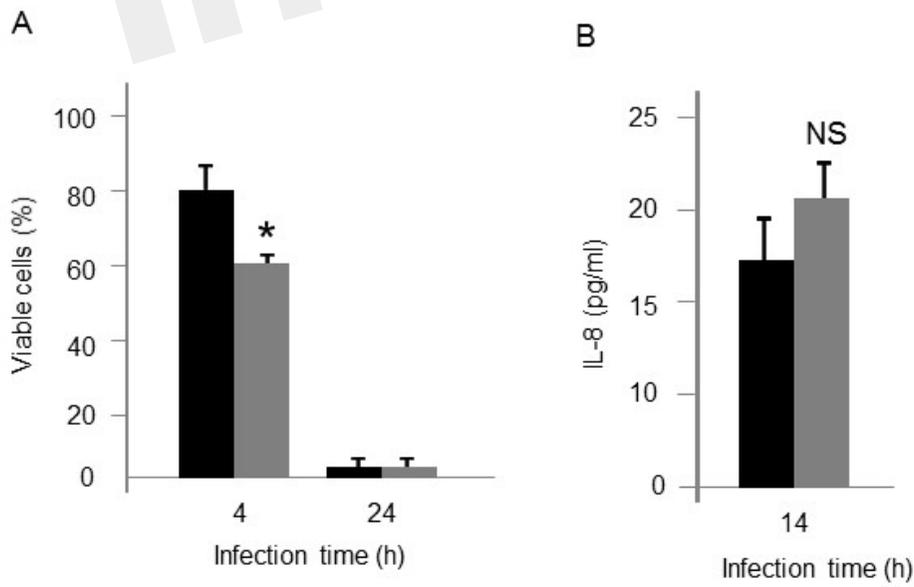
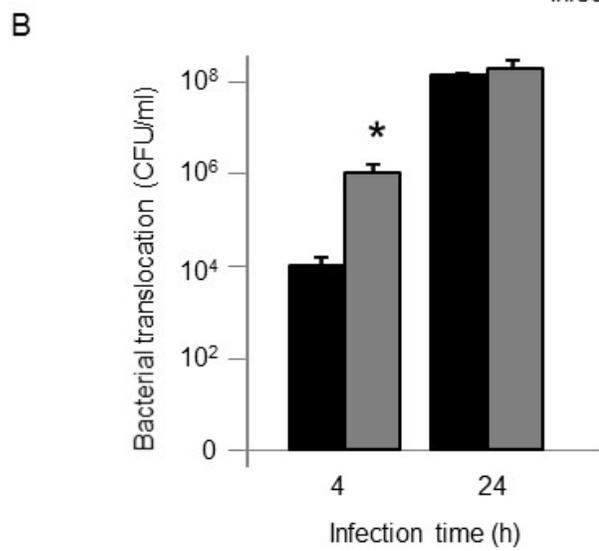
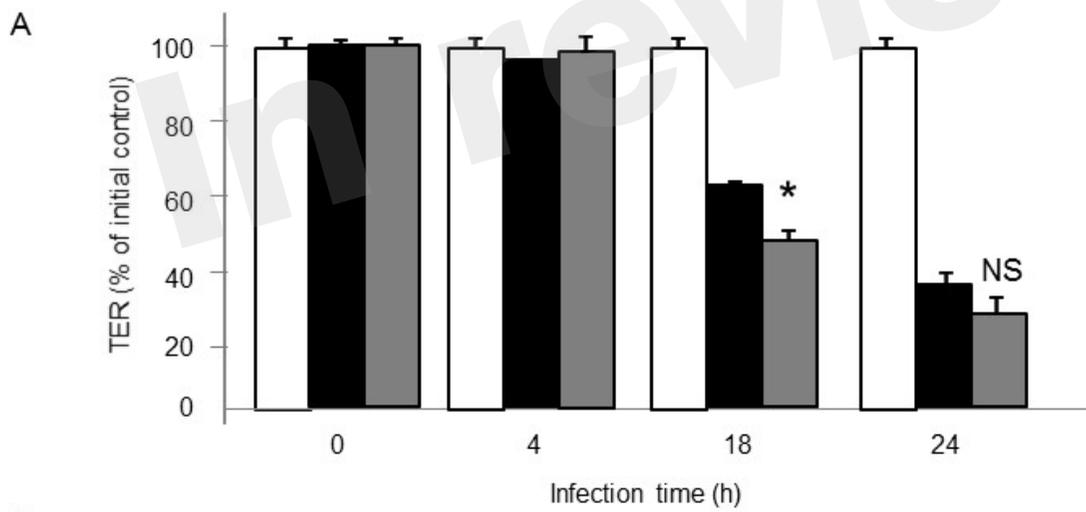


Figure 6.JPEG



3. Discussion

La substance P est un neuropeptide qui joue un rôle important dans l'axe intestin cerveau et qui pourrait influencer l'activité du microbiote intestinal et son interaction avec ce réseau complexe. La substance P est connue pour avoir une activité antimicrobienne envers de nombreuses bactéries pouvant être retrouvées au niveau buccal, respiratoire, intestinal ou cutané (Hansen *et al.*, 2006 ; El Karim *et al.*, 2008). Cependant, la substance P est aussi capable par ailleurs d'augmenter la virulence de *B. cereus*, *S. aureus* (Mijouin *et al.*, 2013) et *P. fluorescens* (Biaggini *et al.*, 2015). Dans notre étude, nous avons donc voulu déterminer l'effet de la substance P sur *E. faecalis* V583.

Les analyses de la CMI effectuées par la méthode de microdilution en bouillon Mueller Hinton n'ont pas permis de montrer une activité antimicrobienne de la substance P contre *E. faecalis* V583 même pour une forte concentration de 1000 µg/ml (7.10^{-4} M). Un second test a été réalisé pour estimer l'effet antibactérien éventuel de ce neuropeptide sur *E. faecalis* V583. Pour ce faire, après 2 h de contact entre la bactérie et la substance P, *E. faecalis* V583 a été observée au microscope confocal à l'aide du kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Assay. Ce kit permet de colorer les bactéries vivantes avec un fluorochrome vert, le SYTO 9 et les bactéries mortes en rouge avec l'iodure de propidium (IP). Pour un traitement d'*E. faecalis* V583 avec la substance P à une concentration $> 10^{-4}$ M, nous avons pu mettre en évidence la présence de bactéries mortes, ou du moins présentant une altération de leur intégrité membranaire, et observer une tendance à l'agglutination. Cette agglutination des bactéries a pu être confirmée en microscopie électronique à balayage. En milieu liquide, la formation d'agrégats par *E. faecalis* peut participer au transfert de plasmides conjugatifs et donc à l'échange de matériel génétique (transfert horizontal de gènes) (Grohmann *et al.*, 2003 ; Olmsted *et al.*, 1991). L'agglutination pourrait être aussi un moyen de la bactérie pour mieux résister à l'effet antibactérien de la substance P. En effet, la substance P est un peptide cationique qui peut entraîner la mort bactérienne par formation de pores membranaires mais il a aussi été envisagé que cette molécule puisse agir comme un inhibiteur métabolique (Brogden 2005). Précédemment, Kowalska *et al.*, (2002) ont déterminé par une méthode de microdilutions en

milieu liquide que la CMI de la substance P pour *E. faecalis* ATCC 19212 est de 0,13%. En revanche, la souche *E. faecalis* NCTC 12697 est plus résistante à la substance P avec une valeur de CMI > 500 µg/ml, selon un test de diffusion radiale (El Karim *et al.*, 2008). Il semblerait donc que la susceptibilité d'*E. faecalis* à la substance P puisse être variable en fonction des souches et/ou dépendante de la méthode utilisée pour déterminer l'activité antimicrobienne.

L'agrégation des bactéries est souvent associée à leur hydrophobicité et ces deux paramètres peuvent les aider à adhérer à différents types de surface (Krasowska & Sigler 2014), notamment aux cellules épithéliales intestinales (Del Re *et al.*, 2000). Pour cette raison, nous avons aussi étudié les propriétés d'hydrophobicité d'*E. faecalis* V583. Les résultats ont montré qu'un traitement de la bactérie à la substance P 10^{-4} ou 10^{-6} M augmente l'hydrophobicité d'*E. faecalis* V583. Ceci nous a permis de faire l'hypothèse que la substance P pourrait faciliter l'adhésion d'*E. faecalis* ou d'autres micro-organismes à la muqueuse intestinale. L'hydrophobicité de surface d'*E. faecalis* ainsi que la capacité de cette bactérie à s'auto-agréger sont des paramètres qui favorisent la capacité de ce germe à former des biofilms (Krasowska & Sigler 2014).

Nous avons ensuite examiné l'effet de la substance P sur la virulence d'*E. faecalis* V583. L'acide lactique est produit par la lactate déshydrogénase (LDH), enzyme qui joue un rôle important dans la résistance au stress et dans la virulence d'*E. faecalis* (Rana *et al.*, 2013). Nous avons pu constater dans notre étude, une augmentation de la production d'acide lactique chez *E. faecalis* V583 suite au traitement de la bactérie par la substance P en revanche aucune baisse du pH n'a été observée. En effet, pour se protéger de sa propre production d'acide (Fernandez *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 1996), *E. faecalis* est connue comme étant capable de décarboxyler des acides aminés, en particulier la tyrosine en tyramine (Connil *et al.*, 2002; Bargossi *et al.*, 2015). La biosynthèse de la tyramine est induite à faible pH (Linares *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2015) ce qui améliore l'adaptation d'*E. faecalis* et *E. durans* aux environnements acides tels que le tractus gastro-intestinal (Fernández de Palencia *et al.*, 2011 ; Perez *et al.*, 2015). Nous avons pu montrer qu'un prétraitement de la bactérie par la substance P entraîne en effet une augmentation de la production de tyramine chez

E. faecalis V583 de manière simultanée à la production d'acide lactique, ce qui pourrait expliquer l'absence de modification du pH. De grandes quantités d'amines biogènes peuvent provoquer des effets toxicologiques, notamment des migraines et de l'hypertension, mais aussi parfois des troubles plus graves tels que des hémorragies cérébrales (Pessione, 2012). Ainsi, la production éventuelle de tyramine par les bactéries *E. faecalis* commensales de l'intestin, suite à une exposition à la substance P mériterait d'être étudiée plus en détail.

Dans la suite de ces travaux, des cellules Caco-2/TC7 ont été infectées avec *E. faecalis* V583 prétraitée ou non avec la substance P. Les résultats ont montré que le pouvoir cytotoxique d'*E. faecalis* V583 augmente sous l'effet de la substance P alors que son potentiel proinflammatoire reste inchangé. De plus, une forte augmentation de la perméabilité des cellules Caco-2/TC7 différenciées a été constatée lorsque ces cellules sont infectées avec des bactéries prétraitées avec la substance P et la translocation bactérienne était accélérée. La capacité de translocation d'*E. faecalis* est de manière générale souches dépendante (Zeng *et al.*, 2004) et peut être de manière inquiétante liée à la migration d'*E. faecalis* du tractus gastro-intestinal vers la circulation sanguine conduisant potentiellement à des infections systémiques telles que les bactériémies et parfois même à des endocardites (Zeng *et al.*, 2004).

En conclusion, cette étude a permis de montrer que la substance P favorise la production d'acide lactique et la virulence d'*E. faecalis* V583. Des travaux sont actuellement en cours au sein du laboratoire, pour tenter d'identifier le senseur bactérien d'*E. faecalis* à ce neuropeptide. Pour cela, Ef-Tu semble être un bon candidat. C'est un facteur d'élongation procaryote présent en grande quantité chez les bactéries (Beck BD 1979). La fonction principale d'Ef-Tu est son activité GTPase, il agit en se liant à un aminoacyl-ARNt dans le cytoplasme et en l'apportant au site libre d'un ribosome. Il a également été démontré que lors de stress chez les bactéries, cette protéine est transloquée à la surface bactérienne (Dallo *et al.*, 2012) et qu'elle est le récepteur du plasminogène chez *B. anthracis* (Chung *et al.*, 2011). De manière intéressante, Mijouin *et al.*, 2013 ont mis en évidence Ef-TU comme senseur pour la substance P chez *B. cereus* et plus récemment chez

S. aureus et *S. epidermidis* (Mijouin, N'Diaye *et al.*, en préparation). Il semblerait donc que cette protéine soit un senseur multifonctionnel des signaux de l'hôte chez certaines bactéries (Mijouin *et al.*, 2013). Dans notre étude, nous avons donc aligné la séquence de la protéine Ef-TU d'*E. faecalis* V583 avec celle de *B. cereus* sur le site UNIPROT. Les résultats ont montré 83% d'identité entre les deux protéines. Des expériences complémentaires seront donc nécessaires pour déterminer si Ef-TU chez *E. faecalis* V583 est également un senseur de la substance P.

D'autre part, il serait intéressant d'étudier, au sein du microbiote intestinal, quelles autres bactéries, pourraient exprimer des récepteurs aux neuropeptides ou sécréter des métabolites pouvant être des ligands pour les récepteurs aux neuropeptides eucaryotes.

Chapitre IV

Analyse du microbiote intestinal aérobie d'un modèle murin d'anorexie

(souris ABA)

1. Introduction

Le microbiote intestinal est un écosystème complexe dont la composition est influencée par différents facteurs tel que l'âge, le régime alimentaire, des facteurs génétiques, mais aussi la présence d'antibiotiques ou de probiotiques. Les études métagénomiques ont permis de découvrir que plus de 80% des bactéries hébergées par notre intestin ne sont pas cultivables. Cependant, de nombreux biais liés aux méthodes d'extraction, au choix des amorces ont été rapportés, pouvant conduire à des résultats différents à partir du même échantillon en fonction de la technique utilisée, ou des résultats contradictoires suivant les équipes de recherche ayant effectué les travaux. Plus récemment, la culturomique bactérienne a été proposée comme un outil de choix pour l'analyse du microbiote intestinal (Lagier *et al.*, 2012). Elle est basée sur l'utilisation d'un grand nombre de conditions de culture couplée à une méthode d'identification rapide par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) ou par amplification et séquençage de l'ARN 16S pour les colonies non identifiées. Contrairement au microbiote des personnes obèses ou diabétiques (Turnbaugh *et al.*, 2009 ; Bekkering *et al.*, 2013), la flore intestinale des patients anorexiques a été très peu étudiée jusqu'à présent (Pfleiderer *et al.*, 2013). On peut cependant supposer que la modification de la sécrétion hormonale (sérotonine, leptine, ghréline, peptide YY..) qui a été décrite chez les patients anorexiques (Kaye *et al.*, 1991 ; Singhal *et al.*, 2014) ainsi que la baisse de disponibilité en nutriments puissent affecter la composition du microbiote et/ou que ce microbiote puisse aussi agir sur l'axe intestin/cerveau et peut être moduler la satiété et la prise alimentaire. Dans ce contexte, une partie de mon travail de thèse à consister à caractériser par culturomique/MALDI-TOF couplée au système d'identification Biotyper®, les bactéries associées au phénotype anorexique, et à les comparer à des souris en restriction alimentaire, et à des souris ayant une alimentation normale. Pour ce faire, un modèle de souris anorexiques (ABA, activity-based anorexia model) récemment développé (Gutierrez, 2013 ; Carrera *et al.*, 2014 ; Jésus *et al.*, 2014) a été utilisé en collaboration avec l'équipe du Pr Pierre Déchelotte, Inserm U1073, « Nutrition, inflammation et dysfonction de l'axe intestin-cerveau ». Dans ce

modèle, les souris sont soumises à une restriction alimentaire et à une activité physique amplifiée afin de reproduire ce qui est constaté chez les patients anorexiques.

Au bout de 17 jours, les contenus caecaux des souris ont été récupérés, dilués et étalés sur différents milieux gélosés Tryptone Soy Agar medium (TSA) et incubés pendant 72 h à 37°C. Les colonies bactériennes isolées sur gélose ont ensuite été prélevées et analysées à l'aide du système MALDI/Biotyper®, qui permet d'identifier les bactéries par leur profil protéique total. Pour certains isolats, l'identification a été confrontée et/ou complétée par des techniques classiques d'identification bactérienne (état frais, coloration de Gram, galeries API).

2. Résultats

Dans cette étude, je me suis focalisée sur l'identification des bactéries aérobies car l'expérience était plus aisée à mettre en œuvre dans un premier temps. De plus, il a été montré que des bactéries aérobies sont souvent présentes dans l'intestin à proximité des cryptes (Pédrón *et al.*, 2012) mais ce microbiote intestinal aérobie reste assez peu étudié à ce jour.

La composition du microbiote intestinal aérobie de souris ABA modèle d'anorexie a ainsi été comparée à celui de souris subissant une restriction alimentaire (souris RA) ainsi qu'à celui de souris contrôle (souris C). Au total, 800 isolats bactériens ont été analysés.

Identification bactérienne par MALDI-TOF/ Biotyper et galerie API

Pour débiter, l'identification par le système MALDI-TOF biotyper et par galerie API ont été comparées. Les résultats obtenus pour dix souches bactériennes tirées aléatoirement parmi les bactéries prélevées sur les géloses ont été confrontés et sont présentés sur le **Tableau 3**.

	MALDI biotyper	Galerie API
1	<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>
2	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
3	<i>Paenicibacillus amyloleticus</i>	<i>Bacillus lentus</i>
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
5	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
6	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
7	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus lentus</i>
8	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
9	<i>Microbacterium arborescens</i>	<i>Microbacterium spp</i>
10	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>

Tableau 3 Identification bactérienne par MALDI-TOF/biotyper et galerie Api

Nous pouvons voir que pour 9 des dix souches considérées, l'identification est identique au niveau du genre entre les deux techniques, et pour 6, l'identification est identique au niveau de l'espèce. Pour l'isolat 3, des identifications différentes ont été obtenues. L'analyse MALDI-TOF biotyper propose *Paenicibacillus amyloleticus* alors que les galeries API révèlent la présence de *Bacillus lentus*. *P. amyloleticus* est une bactérie à Gram positif, anaérobie facultative, incluse à l'origine dans le genre *Bacillus* puis reclassifiée dans un genre séparé en 1993 (Van Leeuwenhoek, 1993). Ainsi certaines caractéristiques génétiques, protéiques et/ou biochimiques pourraient expliquer le résultat obtenu. Pour l'isolat 7, seule l'identification à l'échelle de l'espèce diffère entre les deux techniques avec comme résultat : *B. cereus* et *B. pumilus*.

Diversité des bactéries cultivables aérobies de l'intestin des souris

Distribution et abondance relative des différents phyla des isolats bactériens des souris contrôles, ABA et RA.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la distribution et l'abondance relative par phylum des bactéries chez les trois types de souris étudiées (C, ABA et RA). Les résultats sont présentés sur la **Figure 31**.

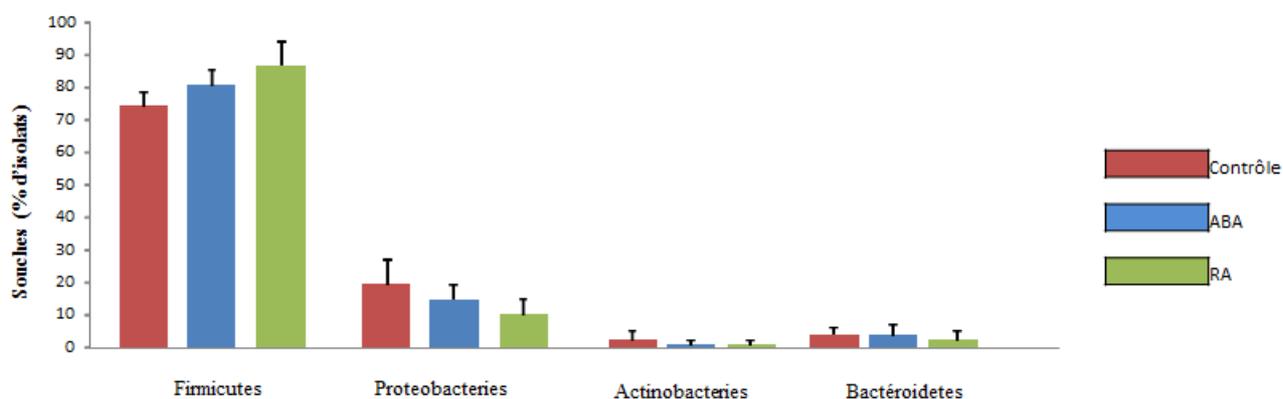


Figure 31 Distribution et abondance relative des isolats bactériens des souris ABA, RA et contrôle

Les résultats montrent une augmentation des Firmicutes chez les souris ABA (81,1%) et les souris RA (86,3%) par rapport aux souris C (73,7%). Cette augmentation est plus importante chez les souris RA. Au niveau des Protéobactéries, on constate une diminution de la proportion de ce phylum chez les souris RA (10,5%) et les souris ABA (14,1%) par rapport aux souris C (19,7%), donc une inversion du rapport Firmicutes/Protéobactéries.

En ce qui concerne les Actinobacteries, on note une diminution de leur proportion chez les souris anorexiques ABA (0,9%) aussi bien que chez les souris en restriction alimentaire RA (0,81%). Chez les souris contrôle, ce phylum représente 2,6% de la population.

Pour les Bacteroidetes, leur proportion chez les souris C et les souris ABA sont similaires, respectivement 3,9 et 3,8% tandis qu'elle diminue chez les souris RA (2,4%). Bien que des variations soient observées dans les résultats celles-ci ne sont pas statistiquement significatives.

Distribution et abondance relative des différents genres bactériens

Nous avons comparé les genres bactériens retrouvés au sein des deux phyla majoritaires : les Firmicutes et les Proteobacteries chez les 3 types de souris (**Figure 32**).

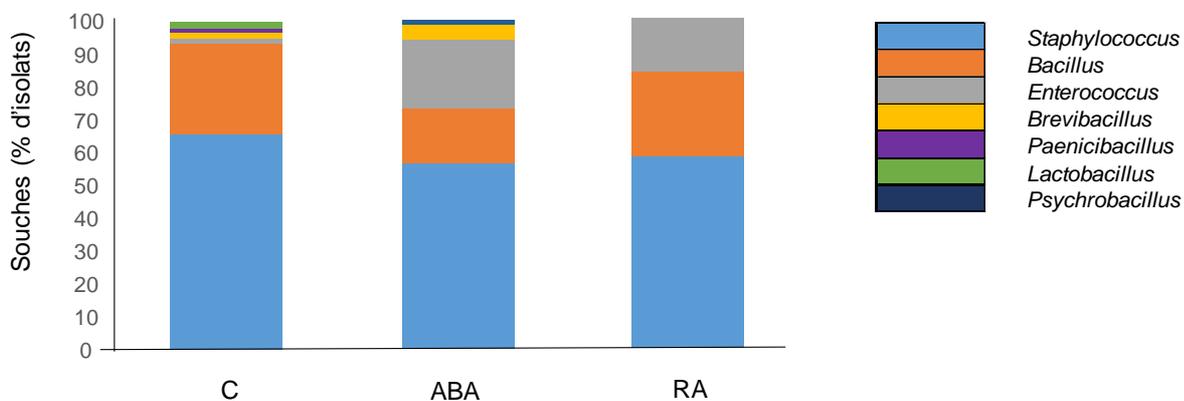


Figure 32 Distribution et abondance relative par genre chez les Firmicutes

Pour les Firmicutes, la **Figure 32** montre une diminution de la diversité des genres bactériens si on compare souris C/ souris RA et souris C/ souris ABA. Trois genres bactériens sont retrouvés chez les trois types de souris : *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Enterococcus*. Celui représentant la plus grande proportion des Firmicutes est le genre *Staphylococcus*. Nous notons que les genres *Paenicibacillus* et *Lactobacillus* ne sont retrouvés ni chez les souris ABA ni chez les souris RA et que le genre *Brevibacillus* disparaît du microbiote des souris RA. En revanche le genre *Psychrobacillus* semble être une signature associée aux souris ABA. On note également une augmentation de 14,4% des bactéries du genre *Enterococcus* chez les souris RA et de 19,5% chez les souris ABA par rapport aux souris C.

Les genres bactériens présents au sein des Protéobactéries, des différentes souris testées, sont détaillés sur la **Figure 33**.

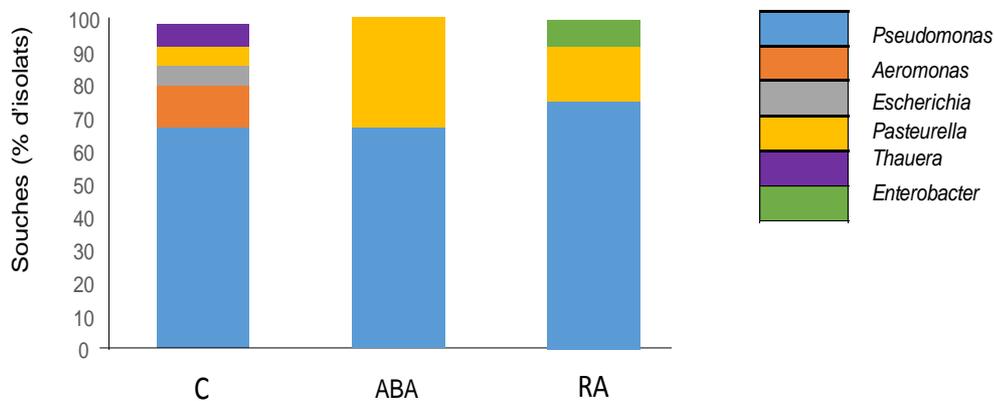


Figure 33 Distribution et abondance relative par genre chez les Protéobactéries

Concernant le phylum des Proteobacteries, on note une diminution de la diversité bactérienne entre souris C et souris ABA et RA, qui semble plus importante chez les souris ABA. Dans ce phylum, les genres représentés chez toutes les souris sont : *Pseudomonas* et *Pasteurella*. *Escherichia*, *Aeromonas*, et *Thauera* ne sont retrouvés que chez les souris contrôle (C) tandis que les *Enterobacter* semblent caractéristiques des souris RA dans cette étude. Les bactéries du genre *Aeromonas* sont le plus souvent présentes dans les eaux douces, les eaux d'égouts, les sédiments mais peuvent également être des contaminants de l'alimentation (Ghenghesh *et al.*, 2008 ; Humphries & Schuetz 2015). En ce qui concerne les bactéries du genre *Thauera*, leur niche écologique est habituellement la rhizosphère (Marmulla & Harder 2014) mais certaines données précisent également la capacité de certaines souches à adopter une respiration anaérobie (Macy *et al.*, 1993 ; Hylemon & Harder 1998) ce qui peut aussi expliquer leur présence au niveau intestinal. Parmi les colonies identifiées, quel que soit le lot considéré (C, RA, ABA), les 5 espèces les plus retrouvées étaient *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* et *Enterococcus faecalis* ce qui correspond à ce qui est habituellement retrouvé chez les

souris (Huang *et al.*, 2015). Afin de favoriser la croissance et l'isolement de bactéries plus exigeantes, la mise au point de conditions de culture différentes pourrait être envisagé par variation du milieu utilisé temps et températures d'incubation.

3. Discussion

Dans cette étude, au total 800 colonies bactériennes soit environ 270 par type de souris ont été analysées et leurs identifications réalisées par MALDI-TOF/Biotyper. Ces colonies ont été isolées à partir d'une mise en culture du contenu caecal de dix souris appartenant à chacune des catégories : contrôle, ABA et RA. Pour évaluer l'efficacité de cette technique de spectrométrie de masse, l'identification de certaines colonies a également été réalisée par galeries API et les résultats comparés. Dans la plupart des cas, l'analyse à l'aide du logiciel Biotyper montre une bonne efficacité.

Pour ce qui concerne les résultats des identifications bactériennes, il semblerait qu'il existe des différences en termes de composition du microbiote des souris anorexiques ABA par rapport aux souris témoin C. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de la proportion des Firmicutes ainsi qu'une diminution du phylum des Proteobacteries chez les souris ABA, des variations similaires sont toutefois également observées chez les souris RA. Il semble donc que si on considère la population aérobie des bactéries intestinales des trois types de souris : C, ABA et RA au niveau du phylum, les variations observées, pourraient être dues à la diminution de l'alimentation. Parallèlement, cette étude a mis en évidence une baisse de la diversité bactérienne chez les souris ABA et RA par rapport au contrôle mais également l'apparition ou la disparition de certains genres bactériens. D'autre part, certains genres bactériens sont retrouvés uniquement chez les souris ABA comme par exemple *Psychrobacillus* qui est une bactérie plus communément isolée des sols (Pham *et al.*, 2015 ; Bravo *et al.*, 2015). Des résultats similaires ont pu être observés

par Pfeleiderer *et al.*, (2013) qui ont mis en évidence 11 nouvelles espèces bactériennes à partir d'échantillons collectés chez des patients anorexiques. Armougom *et al.*, (2009) ont également montré une augmentation de la présence de *Methanobrevibacter smithii* chez des patients anorexiques et ceci serait dû à une réponse adaptative chez les patients afin d'optimiser l'utilisation des nutriments. Dans notre étude, une faible proportion des isolats (17%) n'a pas pu être identifiée par la technique Biotyper. Ceci peut être en partie expliqué par le fait que l'identification se base sur des comparaisons de spectres protéiques obtenus à partir des échantillons et que l'identification formelle ne peut avoir lieu que si le spectre de référence de la bactérie est déjà répertorié dans la base de données. Or deux éléments sont également à prendre en considération, l'émergence récente de cette nouvelle technique d'identification laissant envisager quelques manques dans la liste des spectres de référence et d'autre part le fait que les spectres bactériens sont issues d'une base de donnée clinique, donc des bactéries présentes chez l'homme, alors que notre étude se focalise ici sur le microbiote de modèles murins. Pour contourner ce biais technique, des essais complémentaires peuvent être envisagés en réalisant l'identification bactérienne comme nous l'avons vu précédemment par les techniques classiques de microbiologie (identification Pasteurienne, galeries API) mais aussi en utilisant des analyses PCR, analyse de l'ARN 16S et pyroséquençage...

Il serait aussi utile d'augmenter le nombre d'isolats analysés pour atteindre environ 1000 colonies bactériennes par type de souris et renforcer ainsi les valeurs statistiques. De plus, de cette étude nous nous sommes focalisés sur le microbiote aérobie alors que 75% de la flore microbienne intestinale est anaérobie (Van Schaik *et al.*, 2015). Il serait donc intéressant de poursuivre ces travaux sur les bactéries anaérobies des souris C, ABA et RA. Une autre piste à investiguer serait un lien potentiel entre les dérèglements hormonaux liés à l'anorexie et la variation locale en certains facteurs entéro-endocriniens qui pourrait favoriser l'émergence d'une dysbiose voire induire un changement de la virulence de certaines espèces bactériennes. Enfin, cette étude s'inscrit dans un contexte plus global de la compréhension des mécanismes impliqués dans l'anorexie mentale, l'étude chez la souris ne semble être qu'une étape avant de poursuivre ce type de travaux chez

l'homme. En France, l'anorexie mentale toucherait environ 1,5 % des personnes de sexe féminin, entre 15 et 35 ans soit environ 230 000 personnes, et les troubles du comportement alimentaire voient augmenter leur fréquence dans tous les pays du monde. Il s'agit donc d'un véritable problème de santé publique qui justifie de poursuivre ainsi des études dans ce sens, afin de mieux comprendre l'anorexie mentale et les traitements préventifs/et ou curatifs que l'on pourrait développer y compris concernant la modification du microbiote des personnes touchées par ce trouble.

Conclusion générale et perspectives

Le but de cette thèse a été d'étudier le dialogue système entéroendocrinien / microbiote intestinal dans le contexte plus global de l'axe intestin-cerveau. Le bon fonctionnement de cet axe intestin-cerveau est essentiel à l'équilibre physiologique de l'organisme entier (Mulak & Bonaz 2015 ; Petra *et al.*, 2015 ; Burokas *et al.*, 2015). Dans des conditions pathologiques liées à des maladies très variées allant des maladies chroniques inflammatoires de l'intestin aux troubles alimentaires, des désordres peuvent apparaître. Ils s'étendent de dysbioses microbiennes, aux déséquilibres hormonaux, aux troubles psychiques en passant par des épisodes inflammatoires. Ainsi, dans le contexte des maladies liées à la prise alimentaire, en particulier de l'anorexie pour laquelle des déséquilibres hormonaux ont été constatés (Kaye *et al.*, 1991, Singhal *et al.*, 2014 ; Fazeli & Klibanski 2014), nous avons pu mettre en évidence des variations au sein de la composition du microbiote aérobie de nos souris ABA du modèle d'anorexie. L'étude des bactéries isolées à partir des contenus caecaux a révélé des différences entre souris ABA et souris contrôles au niveau de la répartition entre phyla bactériens (inversion du rapport Firmicutes/Protéobactéries). Cependant, nous avons fait l'hypothèse que ces variations pouvaient être dues à l'appauvrissement de l'alimentation des animaux, puisque cette modification a pu aussi être observée chez les souris RA soumises à une restriction alimentaire. Cependant, chez les souris ABA, nous avons constaté un appauvrissement global au niveau de la diversité bactérienne au sein des Proteobactéries mais aussi l'apparition ou la disparition de certaines bactéries au sein des Firmicutes. La disparition de certains genres bactériens comme *Escherichia*, *Aeromonas*, et *Thauera* peut résulter en la perte de fonctions métaboliques données mais peut aussi conduire à l'augmentation d'un genre bactérien précis comme c'est le cas dans notre étude avec *Pasteurella*. Au niveau intestinal, la perte de diversité peut aussi favoriser l'implantation et/ou l'augmentation de certaines bactéries qui ne devraient être que transitoires et/ou sous dominantes. L'ensemble de

ces phénomènes peut conduire à des dysbioses, caractéristiques de nombreuses pathologies liées au microbiote intestinal (Kim 2015). Dans notre étude, nous avons montré également que la proportion du genre *Enterococcus* augmente chez les souris ABA tout comme ceci avait été montré précédemment chez des personnes atteintes par la maladie de Crohn (Kang *et al.*, 2010). En effet, ces bactéries pourraient jouer le rôle d'indicateur de dysbiose dans les pathologies chroniques inflammatoires de l'intestin (Kang *et al.*, 2010). Des études complémentaires sont requises pour comprendre quels signaux conduisent à ces modulations et en quoi l'apparition ou la disparition de certains genres bactériens pourraient être impliquée dans l'anorexie. Si la connaissance du microbiote a beaucoup progressé ces dernières années, c'est grâce à l'apport de nouvelles technologies. A l'origine, les études sur le microbiote étaient basées sur les cultures des micro-organismes puis de nouveaux outils sont apparus tels que la métagénomique. Les études métagénomiques ont permis de découvrir que plus de 80% des bactéries hébergées par notre intestin ne sont pas cultivables. Cependant, de nombreux biais liés aux méthodes d'extraction, au choix des amorces ont été rapportés, pouvant conduire à des résultats différents à partir du même échantillon en fonction de la technique utilisée, ou des résultats contradictoires suivant les équipes de recherche ayant effectué les travaux. De plus, cette technique révèle la présence de certains micro-organismes par la seule mise en évidence de leur ADN, elle ne peut rendre compte de l'activité métabolique de ceux-ci. Plus récemment, la culturomique bactérienne a été proposée comme un outil de choix pour l'analyse du microbiote intestinal (Lagier *et al.*, 2012). Elle est basée sur l'utilisation d'un grand nombre de conditions de culture couplée à une méthode d'identification rapide par spectrométrie de masse MALDI-TOF ou par amplification et séquençage de l'ARN 16S pour les colonies non identifiées. Contrairement à la métagénomique, la culturomique en utilisant de nombreuses conditions de cultures et/ou isolement sur des milieux spécifiques peut aider à ne pas occulter des bactéries qui seraient sous dominante dans le microbiote étudié ; or ces

micro-organismes ne sont pas à négliger étant donné que, bien qu'en faible proportion, ils peuvent parfois jouer un rôle fondamental au niveau du métabolisme (Sartor 2008). A ce même titre bien que la majorité des bactéries intestinales soient anaérobies, on sait aujourd'hui qu'au niveau des cryptes intestinales, une population bactérienne aérobie résidente est présente (Pédron *et al.*, 2012). Au sein de ces cryptes sont retrouvées des bactéries symbiotiques et plus occasionnellement des pathogènes opportunistes. Les bactéries résidentes des cryptes joueraient ainsi un rôle essentiel dans la protection et l'homéostasie du colon (Pédron *et al.*, 2012).

En parallèle de cette étude concernant le microbiote des souris ABA, nous avons souhaité investiguer l'effet des facteurs entéroendocriniens sur la virulence des bactéries intestinales. Le microbiote intestinal est composé de 10^{14} bactéries impliquées dans une multitude de fonctions physiologiques à l'échelle de l'organisme entier. Parmi cette population microbienne commensale, on retrouve des bactéries possédant un réel potentiel pathogène, celui-ci pouvant s'exprimer dans certaines conditions particulières, ces bactéries sont qualifiées de pathobionte.

De manière intéressante, les résultats de nos travaux montrent que les facteurs entéroendocriniens peuvent être perçus par le microbiote intestinal et que la perception de ce message hormonal peut conduire à des réponses bactériennes aux molécules eucaryotes. En effet, les facteurs entéroendocriniens tels que la sérotonine, la substance P, l'épinéphrine, l' α MSH ainsi que le peptide YY sont capables d'entraîner une augmentation de la virulence de certaines bactéries intestinales que ce soit des germes à Gram positif ou à Gram négatif. Dans cette thèse, je me suis intéressée à *P. aeruginosa* qui est depuis longtemps considéré comme un pathogène opportuniste, lié à des maladies affectant particulièrement les personnes immuno-déprimées; mais aussi à *P. fluorescens* dont un lien avait été mis en évidence avec la maladie de Crohn (Wei *et al.*, 2002; Nakaruma *et al.*, 2003 ; Papp *et al.*, 2007) et qui présente

certains caractères identiques aux pathogènes opportunistes. Ces travaux ont montré que le potentiel pathogène de *P. fluorescens* peut être stimulé par certains facteurs entéroendocriniens tels que la sérotonine, la substance P, l'épinéphrine, l' α MSH, le peptide YY en modulant un ou plusieurs paramètres de virulence de la bactérie comme son pouvoir cytotoxique ou proinflammatoire, sa capacité à produire de la pyoverdine et à endommager le cytosquelette d'actine des entérocytes. L'effet pro-virulent de ces substances intestinales est dépendant du facteur entéroendocrinien testé, de l'origine de la souche bactérienne et du paramètre considéré. Nous avons montré que la sérotonine a un impact sur la cytotoxicité, le pouvoir proinflammatoire ainsi que la production de pyoverdine chez *P. fluorescens*. L'effet de la sérotonine sur cette bactérie devra être complété en recherchant si d'autres facteurs essentiels à la pathogénicité de cette souche sont modulés par cette molécule. Il est intéressant de noter, qu'une augmentation de la concentration en sérotonine au niveau intestinal a pu être associée aux phénomènes inflammatoires (Guseva *et al.*, 2014). Il a également été démontré que la quantité de cellules enterochromaffines produisant cette monoamine augmente dans le cas d'inflammation de la muqueuse et que dans la maladie de Crohn, ces altérations de production pouvaient représenter un élément clef dans les anomalies des fonctions intestinales. Parallèlement, Kidd *et al.*, 2009 ont mis en évidence que le LPS d'*E. coli* peut participer à la stimulation de production de sérotonine par les cellules entérochromaffines issues de malades de Crohn. Ainsi, il semblerait opportun de poursuivre les études concernant *P. fluorescens* et la sérotonine, deux acteurs dont on suspecte l'implication dans la maladie de Crohn.

E. faecalis est une bactérie à Gram positif utilisée dans le domaine agroalimentaire pour sa capacité à donner certaines propriétés organoleptiques aux aliments. Cependant, des souches d'*E. faecalis* comme par exemple *E. faecalis* V583 sont également connues pour posséder un véritable arsenal de facteurs de virulence et pour leur résistance à de nombreux antibiotiques.

E. faecalis est donc désormais considérée comme un pathobionte potentiel. Dans la suite de mon travail, nous avons donc décidé d'étudier l'impact de la substance P sur *E. faecalis* V583. Les résultats de ces expériences ont montré que la substance P, connue pour ses propriétés antimicrobiennes, ne semble pas avoir d'effet majeur sur la croissance et/ou la viabilité d'*E. faecalis* V583. En revanche, la substance P entraîne une augmentation de l'hydrophobicité de la bactérie et favorise l'auto-agrégation des cellules bactériennes. L'effet de ce neuropeptide pourrait favoriser les phénomènes d'échanges de matériel génétique et participer à la persistance de la bactérie chez l'hôte. Qui plus est, j'ai montré que la substance P promeut la production d'acide lactique ainsi que la virulence d'*E. faecalis* V583. En effet, suite à un traitement de la bactérie par ce facteur entéroendocrinien, on constate une augmentation de la production d'acide lactique sans pour autant observer de variation du pH. Il semblerait qu'*E. faecalis* contrebalance ce phénomène par la synthèse de tyramine afin que sa propre production d'acide ne lui soit pas dommageable. Une forte production d'acide lactique peut participer à la pathogénicité d'une bactérie en provoquant des effets toxicologiques très importants chez l'hôte et ce phénomène n'est pas sans impact sur le rôle potentiel de la substance P et de *E. faecalis* dans l'homeostasie intestinale. En effet, la substance P module un grand nombre de traits de virulence chez *E. faecalis* V583 tels que son pouvoir cytotoxique envers les entérocytes, sa capacité à transloquer et à endommager l'épithélium intestinal. Ainsi, la substance P pourrait favoriser la capacité d'*E. faecalis* V583 à entraîner des dommages, persister et coloniser son hôte. A cet égard, il faut noter que les bactéries du genre *Enterococcus* sont suspectées d'être impliquées dans la maladie de Crohn (Kang *et al.*, 2010). Ces bactéries sont en effet connues pour entraîner des dommages au niveau de l'épithélium intestinal en activant par exemple les macrophages qui relarguent alors des cytokines proinflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-12) (Marcinkiewicz *et al.*, 2007). Elles sont aussi capables de produire des ions superoxydes (Huycke *et al.*, 2001) mais les mécanismes

exacts permettant d'expliquer leur implication dans les pathologies inflammatoires restent à déterminer (Kang *et al.*, 2010).

L'épinéphrine est un neurotransmetteur et un acteur majeur du dialogue inter-règne. Si l'impact de ce neurotransmetteur sur la virulence des bactéries pathogènes à Gram négatif a jusqu'alors été particulièrement étudié, bien peu est connu quant à l'effet de l'épinéphrine sur la virulence des bactéries à Gram positif ni sur la virulence de bactéries pathogènes opportunistes. Dans la suite de mes travaux de thèse, l'impact de l'épinéphrine sur les potentiels pathogènes de *P. aeruginosa* PAO1 (bactérie à Gram négatif) et d'*E. faecalis* V583 (bactérie à Gram positif) a donc été évalué. J'ai pu mettre en évidence que l'épinéphrine module le potentiel cytotoxique et inflammatoire des bactéries testées ainsi que leurs capacités à envahir et adhérer aux cellules intestinales. Qui plus est ce neurotransmetteur affecte la capacité de translocation de ces germes ainsi que l'aptitude de *P. aeruginosa* à former des biofilms. Ici encore l'impact de l'épinéphrine sur la virulence bactérienne est souche et paramètre dépendant.

L'ensemble des résultats obtenus pour cette partie, concernant l'effet des substances entéroendocrines sur la virulence des bactéries intestinales, fournit donc des éléments intéressants qui suggèrent que l'état physiologique, psychique et immun de l'hôte pourrait être ressenti comme un signal par les bactéries et que la perception de ce message par les micro-organismes pourrait conduire à une variation de leur potentiel pathogène. Cependant, dans le cadre de ce projet, seuls certains paramètres de virulence ont été étudiés or les bactéries modèles utilisées possèdent un ensemble très large de facteurs de virulence. Il serait donc nécessaire d'approfondir ces études par une analyse globale de la réponse pro-virulente d'une bactérie à une substance donnée. Des analyses à l'échelle du transcriptome et du protéome pourraient être envisagées afin de déterminer pour une substance donnée, l'ensemble des variations de l'expression génique et modulation du profil protéique induites chez la bactérie

considérée. Ainsi des analyses par qRT-PCR ou bien puces à ADN et par Orbitrap pourraient être menées de front pour évaluer l'impact des substances testées sur l'expression des gènes de virulence ou codant pour des régulateurs transcriptionnels par exemple, de la production des ARN messagers jusqu'à la synthèse factuelle des protéines correspondantes.

Dans le contexte de la compréhension de l'impact des facteurs entéroendocriniens sur le quorum sensing de nos souches, en particulier l'impact de l'épinéphrine sur la virulence de *P. aeruginosa*, lors de cette thèse, une étude reposant sur des constructions de fusions transcriptionnelles a été entamée. Ces constructions permettent la fusion d'un gène déterminé avec lux ce qui entraîne alors une production de bioluminescence proportionnelle à l'activité transcriptionnelle du gène. La transcription du gène d'intérêt peut alors être suivie en parallèle de la croissance bactérienne permettant donc de déterminer si le facteur entéroendocrinien testé a un impact sur la transcription de certains gènes importants du quorum sensing tels que LasB, LasR, LasI, RHLI, RHLR... En effet, le rôle majeur des systèmes de quorum sensing chez *P. aeruginosa* dans la régulation des gènes de virulence et dans les infections humaines est largement documentée (Castillo-Juárez *et al.*, 2015). Chez *P. aeruginosa*, les systèmes de quorum sensing LasR, RhlI et PQS sont interconnectés de manière complexe (Dekimpe & Déziel 2009) et connus pour être chez la bactérie des capteurs de signaux environnementaux (Jensen *et al.*, 2006).

Il serait également intéressant d'étudier les mécanismes à l'origine de ces réponses bactériennes, par quel moyen les substances entéro-endocriniennes sont-elles perçues, quelles cascades de régulation sont activées dans la cellule bactérienne et quels second messagers sont mis en jeu. Veron *et al.*, (2008) ont mis en évidence que le BNP provoque une forte augmentation des concentrations intracellulaires d'AMPc et le CNP de GMPc chez *P. fluorescens*. Il semblerait que cet évènement soit lié à la modification de la structure du

LPS de la bactérie et de son potentiel pathogène général. Afin de compléter nos résultats, le dosage de seconds messagers chez *Pseudomonas* est donc envisagé.

D'autre part, il serait intéressant d'investiguer l'origine de la perception des molécules eucaryotes chez nos bactéries modèles. En effet, ces dernières décennies ont vu l'émergence du concept d'endocrinologie microbienne conduisant à l'identification de nombreux récepteurs bactériens aux molécules eucaryotes. A notre connaissance, aucun récepteur bactérien pour la sérotonine, l' α MSH, le peptide YY n'ont pour le moment été identifiés. En revanche, un récepteur à la substance P a été mis en évidence chez *B. cereus*, *S. epidermidis* et *S. aureus*. Ce senseur est une protéine initialement identifiée en tant que facteur d'élongation ribosomal (EfTu) mais qui apparaît aujourd'hui comme faisant partie d'une gamme de plus en plus large de protéines multifonctionnelles désignées sous le terme générique de « Moonlight proteins ». Ces protéines sont en effet capables de migrer d'un compartiment à un autre, dans le cas d'EfTu du stroma bactérien au périplasma, où elles changent de conformation, éventuellement se dimérisent et acquièrent des fonctions totalement nouvelles, dont celle de senseur ou de récepteur. Au vu des résultats obtenus, nous avons recherché la présence d'une protéine homologue à EfTu chez *E. faecalis* V583. La séquence du facteur d'élongation étant disponible, elle a pu être alignée avec la séquence du facteur d'élongation EfTu de *B. cereus* et les résultats ont montré 83% d'identité entre les deux séquences. Afin de poursuivre la recherche du senseur de la substance P chez *E. faecalis* des expériences d'immunoprécipitation/Orbitrap sont en cours de réalisation. D'autre part, de nombreux récepteurs adrénergiques bactériens tels que QseC, QseE, QseF ont également été identifiés pour l'épinéphrine et la norepinéphrine chez certaines bactéries à Gram négatif. En utilisant la base de données Uniprot, nous avons recherché la présence de ces récepteurs potentiels chez *Pseudomonas* ainsi que chez *E. faecalis*. Des protéines annotées sont ressorties de cette recherche mais l'alignement de leurs séquences avec les séquences des protéines d'*E. coli*

correspondantes ont révélé de faibles pourcentages d'identité. Pour tenter alors de mieux comprendre par quel système senseur pourrait passer le message nous pourrions tester des antagonistes de récepteurs adrénérgiques. En effet, différents types d'antagonistes des récepteurs adrénérgiques eucaryotes (phentolamine et propranolol) et bactériens (LED209) sont disponibles. Il serait donc opportun de voir si l'une ou l'autre de ces catégories serait capable de bloquer l'effet que l'épinéphrine a sur la virulence des trois souches de *Pseudomonas* et la souche d'*E. faecalis* testées dans cette étude. Dans ce contexte, des immunoprécipitations suivis d'identification par Orbitrap pourront aussi être envisagés pour isoler et mettre en évidence des senseurs bactériens à l'épinéphrine chez nos souches modèle.

Nous avons observé une augmentation de la virulence de *P. fluorescens* sous l'effet d' α MSH. Parallèlement, Tennoune *et al.*, (2014) ont montré que la protéine de choc thermique bactérienne ClpB est un antigène mimétique de l' α MSH à l'origine de troubles alimentaires. En effet des immunoglobulines ou des auto-anticorps réactifs avec l' α MSH dont l'origine était jusqu'alors inconnue, interviennent dans la régulation de la prise alimentaire et des émotions. Or dans les expériences de Tennoune *et al.*, l'immunisation de souris par ClpB a conduit à la production d'IgG réagissant de manière croisée avec l' α MSH influençant alors la prise alimentaire, le poids corporel, l'anxiété ainsi que la signalisation par le récepteur 4 à la mélanocortine des souris modèle. Les micro-organismes de l'intestin exprimant ClpB interviendraient donc dans l'étiologie des troubles alimentaires. Si nous avons pu constater lors de nos expériences que certains facteurs entéro-endocriniens augmentaient et modulaient la virulence des bactéries, il est aussi connu que dans de nombreux troubles physiologiques, métaboliques et psychiques, des déséquilibres hormonaux ainsi que des dysbioses sont constatés. Il serait donc opportun d'étudier plus en détail comment un déséquilibre hormonal pourrait conduire au niveau de l'axe intestin-cerveau à une dysbiose et comment une dysbiose pourrait mener à un déséquilibre hormonal.

Les résultats obtenus lors de cette thèse s'inscrivent donc dans une perspective de la compréhension de l'axe intestin-cerveau et apportent de nouveaux éléments quant à l'importance du dialogue entre le système entéro-endocrinien et le microbiote intestinal qui apparaît être lié à l'équilibre physiologique général de l'organisme aussi bien qu'aux pathologies relatives à l'homéostasie hormonale que ce soit des maladies intestinales comme des maladies extra-intestinales, physiologiques ou liées au psychisme.

Matériels et Méthodes

1. Cultures et tests sur les bactéries

1.1 Cultures bactériennes

Trois souches de *Pseudomonas* ont été utilisées : *Pseudomonas fluorescens* MF37, *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 et *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ainsi qu'une souche d'*Enterococcus* : *Enterococcus faecalis* V583.

P. fluorescens MF37 est une souche psychrotrophe dont la température optimale de croissance est de 28°C mais peut survivre à 37°C. C'est un mutant spontané rifampicine-résistant de la souche MF0, qui a été isolée du lait cru (Burini *et al.*, 1994). *P. fluorescens* MFN1032 est une souche hospitalière (biovar 1) issue d'expectorations purulentes d'un patient hospitalisé au CHU de Rouen et capable de se multiplier à 37°C. Elle a été caractérisée par identification polyphasique, séquençage de l'ARN 16S et sidérotypage (Chapalain *et al.*, 2008). *P. aeruginosa* PAO1 provient d'une collection internationale. Sa température optimale de croissance est de 37°C. C'est une bactérie reconnue comme pathogène opportuniste avéré, ayant la capacité d'adhérer et d'infecter les cellules eucaryotes en provoquant une lyse cellulaire. L'isolat clinique *E. faecalis* V583, souche ERV (Entérocoque Résistant à la Vancomycine) a aussi été utilisé dans notre étude (Sahm *et al.*, 1989). Toutes ces souches sont conservées à -20°C dans des cryotubes (Nalgene System), contenant du bouillon nutritif ordinaire (BNO) pour *Pseudomonas* ou du bouillon cœur-cerveille (Brain Heart Infusion, BHI) pour *Enterococcus* et 15% de glycérol. Un soucier de référence est stocké à -80°C. Les précultures bactériennes ont été réalisées par ensemencement de 200 µl des aliquots congelés dans 10 ml de BNO pour *Pseudomonas* ou de BHI pour *Enterococcus*. Les souches de *Pseudomonas* placées sous agitation (180 rpm) pour assurer une bonne oxygénation du milieu et à la température optimale de croissance de la souche considérée, soit 28°C pour les deux souches de *P. fluorescens*, et 37°C pour *P. aeruginosa* PAO1. *Enterococcus* est incubé à 37°C

en statique. Les précultures parvenues en phase stationnaire ont été utilisées pour préparer les cultures. Pour ce faire, les bactéries ont étéensemencées dans des erlenmeyers de 100 ml en milieu BNO ou BHI de telle sorte que le volume de culture représente 1/10ème du volume total de l'erlenmeyer et que la densité optique initiale (DO) soit de 0,08 à la longueur d'onde de 600 nm. Puis, les cultures bactériennes ont été incubées avec ou sans le facteur enteroendocrinien à tester, sous agitation (180 rpm) pour *Pseudomonas*, et en statique pour *Enterococcus* à leur température optimale de croissance, jusqu'au début de l'entrée en phase stationnaire. Ensuite, elles ont été récupérées pour réaliser les différentes expériences d'infection des cellules eucaryotes.

1.2 Prétraitement des bactéries avec les molécules

Pour les tests de mobilité bactérienne, la quantification de la pyoverdine produite, l'analyse de cytotoxicité, le dosage d'interleukine 8 (IL8), la translocation, l'adhésion, l'invasion et la mesure de la résistance transépithéliale, les bactéries ont été prétraitées en phase exponentielle pendant 4 h pour *Pseudomonas* ou 2 h pour *Enterococcus* avec 10^{-6} M de la molécule à tester (sérotonine, substance P, epinéphrine, α MSH ou peptide YY) ou par un équivalent d'eau déionisée stérile. Au terme de cette incubation, les bactéries ont été utilisées pour réaliser les tests de mobilité bactérienne, la quantification de la pyoverdine produite, ou l'infection de cellules Caco-2/TC7 à une MOI (multiplicity of infection) de 100 pour l'analyse de cytotoxicité, le dosage d'interleukine 8 (IL8), la mesure de la résistance transépithéliale, la translocation, l'adhésion et l'invasion.

1.3 Effet des molécules sélectionnées sur la croissance bactérienne

Des suivis de croissance bactérienne ont été réalisés sur 24 h à l'aide d'un Bioscreen (lecteur de microplaques 96 puits) par mesure de DO à 600 nm. *P. fluorescens* MFN1032 a été ensemencée (200 µl/puits) dans les microplaques en triplicat à DO 0,08 en présence ou non des facteurs à tester sérotonine, substance P ou épinephrine (10^{-6} ou 10^{-3} M).

1.4 Analyse de CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)

La CMI de la substance P sur *E. faecalis* V583 a été déterminée par microdilutions dans du milieu Mueller Hinton (MH) en utilisant un inoculum bactérien à une concentration de 10^5 UFC/ml. Une microplaque contenant des triplicats de dilutions en série au demi de 1000 µg/ml de substance P ont été inoculés sur la nuit à 37°C, puis la turbidité a été observée à la fin de l'incubation.

1.5 Production de pyoverdine chez *Pseudomonas*

La production de pyoverdine, sidérophore produit par les bactéries du genre *Pseudomonas* a été quantifiée. En résumé, des cultures bactériennes traitées ou non par la molécule à tester sont préparées en milieu CAA (pour 1l : 5 g de casaminoacides ; 0,90 g de K_2HPO_4 ; 2 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; pH 7,4). Au bout de 48 h de croissance, la DO_{600nm} des cultures bactériennes a été mesurée. Un volume de 2 ml de chaque culture est centrifugé à 10000 g pendant 5 min à température ambiante. Puis la DO_{400nm} des surnageants de cultures a été mesurée et la quantité de pyoverdine en solution normalisée au nombre de bactéries présentes dans le milieu à 48 h (DO_{400nm}/DO_{600nm}).

1.6 Etude de la formation des biofilms en microplaques 96 puits

Une culture bactérienne de *P. aeruginosa* PAO1 a été préparée à une DO de 0,08 dans du milieu BNO contenant ou non de l'épinéphrine (10^{-6} M), répartie dans des microplaques 96 puits (100 μ l par puits), puis incubée en statique pendant 6, 12 ou 24 h à 37°C. Après l'incubation, la DO₆₀₀ initiale des puits a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque multimodal (Flex-Xenius XM; SAFAS). Le surnageant de chaque puits a été éliminé ensuite les puits rincés 3 fois avec 200 μ l d'eau physiologique stérile. Du cristal violet à 0,1% a alors été ajouté et les microplaques incubées 30 min à température ambiante. Ceci permet la coloration des bactéries ayant adhérees aux puits de la microplaque. A la fin de l'incubation, les puits ont de nouveau été rincés 3 fois avec 200 μ l d'eau physiologique stérile. Enfin, les puits ont été incubés 15 min avec 150 μ l de SDS à 1% pour solubiliser le cristal violet et la DO₆₀₀ finale des puits mesurée. Le pourcentage de formation des biofilms par les bactéries dans chaque puits a été déterminé par la relation suivante : % de formation des biofilms = (DO₆₀₀ sans cristal violet / DO₆₀₀ avec cristal violet) X 100. Dans cette relation, la DO₆₀₀ sans cristal violet correspond à la DO₆₀₀ des puits après 24 h d'incubation avant ajout du cristal violet, la DO₆₀₀ avec cristal violet correspond à la DO₆₀₀ des puits après ajout du cristal violet.

1.7 Mobilité bactérienne

Deux types de mobilité ont été étudiés chez *Pseudomonas* : le swimming et le swarming. Le swimming correspond à une nage bactérienne dans les liquides, tandis que le swarming aussi appelé essaimage est un déplacement à la surface d'un milieu solide. Les bactéries ont été traitées ou non avec les différents facteurs à tester, à une concentration de 10^{-6} M, puis ensemencées dans une gélose Luria Bertani (LB) à 0,3% d'agar par pique centrale superficielle pour le swimming, et du LB à 0,6% d'agar par dépôt d'une goutte en surface de

la gélose pour le swarming. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées pendant 24 h à la température optimale de croissance de la bactérie testée et la mobilité bactérienne mesurée.

1.8 Hydrophobicité

Chez *E. faecalis* V583, l'hydrophobicité a été déterminée en utilisant la méthode (MATH) Micobial adhesion to hydrocarbons selon les protocoles d'Al Atya *et al.*, 2015 et de Kos *et al.*, (2003). Les bactéries ont été cultivées en milieu BHI avec ou sans substance P (10^{-4} ou 10^{-6} M) pendant 18 h à 37°C, centrifugées à 5000 g pendant 15 min, lavées 2 fois et resuspendues dans du PBS à une concentration de 10^8 UFC/ml. La densité optique de la suspension cellulaire a été mesurée à 600 nm (A0). Un millilitre de solvant (xylène ou toluène) a été ajouté à 3 ml de suspension cellulaire. Après 10 min de préincubation à température ambiante, le système à deux phases a été vortexé pendant 2 min. La phase aqueuse a été éliminée après 20 min d'incubation à température ambiante et la DO mesurée à 600 nm (A1). Le pourcentage d'adhésion bactérienne au solvant a été calculé par la relation $1-(A1/A0) \times 100$.

1.9 Quantification d'acide lactique et de tyramine

L'acide lactique a été dosé selon le protocole décrit par Al Atya *et al.*, (2015). *E. faecalis* a été cultivé dans du BHI avec ou sans la substance P 10^{-6} M à 37°C pendant 14 h, puis les suspensions ont été centrifugées (10 000 g, 4°C, 10 min) et le surnageant stérilisé par filtration en utilisant un filtre Millipore (0, 2 µm). La concentration d'acide lactique a été déterminée par HPLC spectra system P1000XR (Thermo, USA). Pour le dosage de tyramine, les échantillons bactériens ont été préparés de manière similaire mais avec une

supplémentation en tyrosine (800 mg/l) ajoutée dans le milieu de culture bactérien (Bargossi *et al.*, 2015). La quantification de tyramine a été réalisée après mélange de 20 µl de surnageant bactérien filtré avec 80 µl d'acide perchlorique (0,2 M) et 5 µl de diaminoheptane (6,4 mg/ml), homogénéisation et centrifugation (8000 g, 4°C, 5 min). Les étapes de dérivation avec le chlorure de dansyle et la purification ont été décrit par Duflos *et al.*, (1999). Le système HPLC Hitachi Elite LaChrom a été utilisé pour quantifier la tyramine sur colonne Kromasil (C18, 5 µm 100A ; 25 cm x 4.6 mm).

1.10 Analyse LIVE/DEAD par microscopie confocale

La viabilité d'*E. faecalis* V583 traité ou non par la substance P a été analysée en utilisant le kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Assay Kit for microscopy (L7007, Invitrogen). Un mélange 50/50 (v/v) de deux marqueurs : SYTO 9 (pour les cellules viables) et IP (pour les cellules mortes) a été réalisé comme recommandé par le protocole du fournisseur. En bref, 3 µl du mélange ont été ajoutés aux cellules bactériennes précédemment traitées avec 10^{-2} , 10^{-4} ou 10^{-6} M de substance P pendant 2 h et comparées aux cellules non traitées. Les échantillons ont été incubés pendant 15 min à l'obscurité à température ambiante et 5 µl d'échantillon déposés entre lame et lamelle. Ensuite, les lames ont été observées en microscopie confocale à fluorescence (LSM 710 CLSM, Zeiss) à l'objectif x60 de manière séquentielle afin d'observer seul le marquage FITC (vert/SYTO 9, cellules viables) puis IP (rouge/IP, cellules mortes). Les images en SYTO 9 et IP ont été superposées et acquises en utilisant le logiciel ZEN.

1.11 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Une suspension bactérienne à 10^8 UFC/ml a été incubée avec 10^{-6} ou 10^{-4} M de substance P dans du PBS pendant 1 h. A la fin de l'incubation, les bactéries ont été lavées dans du PBS et fixées pendant 2 h dans du tampon cacodylate de sodium (pH 7.3, 0.1 M) et contenant 1% de glutaraldéhyde. Par la suite, les bactéries ont été lavées 3 fois avec de l'eau Milli-Q® et déshydratées dans des bains d'éthanol croissants (50, 70, 95 et 100 %) et les échantillons, recouverts d'une couche de platine (5 nm) (Quorum Technologies Q150T, Elexience, France). Enfin, les bactéries ont pu être observées à l'aide d'un microscope électronique à balayage Zeiss Merlin Compact VP (Zeiss, France) utilisé à 5 kV.

2. Cultures et tests sur cellules eucaryotes

2.1 Cultures cellulaires

Les cellules Caco-2/TC7, issues d'adénocarcinomes du côlon humain ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium, Lonza) contenant 20% de sérum de veau fœtal, 2 mM de L-glutamine et 100 U/ml du mélange pénicilline/streptomycine et incubées à 37°C sous 5% de CO₂. Pour les expériences de cytotoxicité, le dosage d'interleukine 8 (IL8), l'adhésion et l'invasion, les cellules Caco-2/TC7 ont étéensemencées en plaques 24 puits et incubées jusqu'à confluence avant infection avec les bactéries. Pour l'étude du cytosquelette, les cellules ont été cultivées sur lamelles de verre jusqu'à confluence. Pour les tests de résistance transépithéliale et translocation bactérienne, les cellules Caco-2/TC7ensemencées

sur des inserts de culture (**Figure 34**) ont été incubées pendant 21 jours à 37°C sous 5 % de CO₂. La culture sur insert permet aux cellules de se différencier et d'acquérir un phénotype proche de celui des entérocytes de l'intestin grêle (Hidalgo *et al.*, 1989). Dans ce modèle, les cellules reposent sur un filtre microporeux permettant les échanges entre le compartiment supérieur représentant la lumière intestinale (pôle apical) et le compartiment inférieur représentant le milieu intérieur (pôle basolatéral) (**Figure 34**). Les inserts utilisés dans ce travail avaient des pores de 3 µm (Falcon), taille choisie afin de permettre un éventuel passage des bactéries testées.

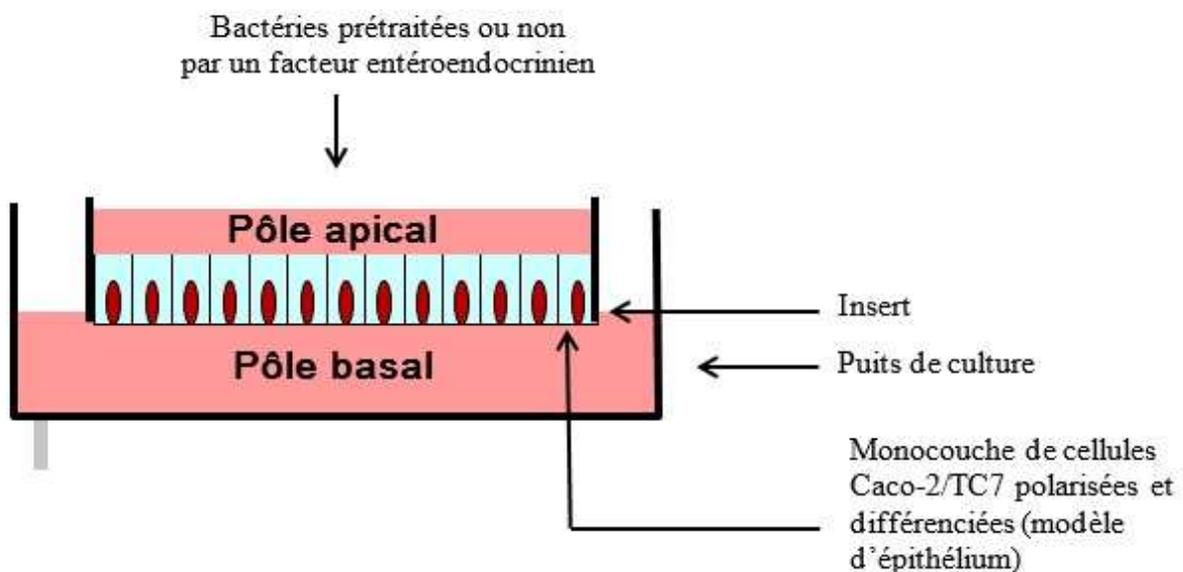


Figure 34 Schéma de la culture des cellules Caco-2/TC7 sur insert

2.2 Infection des cellules eucaryotes

Pour l'ensemble des expériences nécessitant une infection des cellules Caco-2/TC7, 1 ml de la culture bactérienne traitée ou non par les facteurs entéroendocriniens a été centrifugé à 2500 g pendant 10 min et le culot bactérien, lavé puis repris dans du milieu DMEM dépourvu de sérum et d'antibiotiques (milieu d'infection) à une concentration de 10⁸ UFC/ml. Le milieu de

culture des cellules eucaryotes a alors été retiré et remplacé par la suspension bactérienne préparée précédemment. Les cellules eucaryotes ont ensuite été incubées en présence des bactéries, à 37°C sous 5% de CO₂ (condition nécessaire pour la culture cellulaire). Pour réaliser les tests LDH, rouge neutre, dosage d'IL8, ou le marquage du cytosquelette d'actine-F, les cellules Caco-2/TC7 ont été infectées pendant 18 h avec les souches de *Pseudomonas* ou pendant 4 h et 15 h avec *Enterococcus*. Pour les expériences de résistance transépithéliale et de translocation, les cellules Caco-2/TC7 cultivées sur inserts ont été infectées pendant 18 h avec *Pseudomonas* ou 4 et 24 h avec *Enterococcus*. Enfin, pour les expériences d'adhésion et d'invasion, les cellules Caco-2/TC7 ont été infectées pendant 4 h avec *Pseudomonas* ou 3 h avec *Enterococcus*.

2.3 Analyse de cytotoxicité par dosage de la lactate déshydrogénase

(test LDH)

Pour évaluer le pouvoir cytotoxique des différentes souches de *Pseudomonas*, nous avons dosé la LDH (lactate déshydrogénase) avec le kit Cytotox 96 (Promega). La LDH est une enzyme stable dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, qui est libérée dans le milieu de culture cellulaire en cas de perte d'intégrité de la membrane cytoplasmique. Son dosage permet donc d'évaluer la proportion de cellules mortes par lyse après contact avec les bactéries. Le kit utilisé dans notre étude met en jeu une réaction enzymatique couplée à la production d'un chromophore. La coloration obtenue est le résultat de la conversion du sel de tétrazolium en rouge de formazan. Dans nos expériences, la LDH a été dosée dans le surnageant de culture après l'infection des cellules Caco-2/TC7 avec les bactéries du genre *Pseudomonas* prétraitées ou non avec les facteurs entéroendocriniens à tester. Pour réaliser ce test, un volume de 50 µl du surnageant de cellules Caco-2/TC7 infectées ou non par les

bactéries a été prélevé dans chaque puits de culture et transféré dans un tube à hémolyse. 50 µl de réactif Cytotox 96 a alors été ajouté et le mélange placé à l'obscurité pendant 30 min. La réaction enzymatique a été stoppée par 50 µl de solution Stop fournie avec le kit, et 850 µl d'eau déionisée ajoutées afin d'ajuster le volume à 1 ml puis une mesure colorimétrique effectuée à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (SmartSpec™ Plus). Le 100% de lyse correspond à la lyse complète obtenue après traitement des cellules eucaryotes avec un détergent (Triton X100 à 0,9%).

2.4 Analyse de cytotoxicité par test au rouge neutre

La coloration au rouge neutre a été utilisée pour estimer la viabilité cellulaire des cellules Caco-2/TC7 suite à l'infection par *P. aeruginosa* PAO1 ou *E. faecalis* V583. Le rouge neutre est un colorant capable de marquer les lysosomes des cellules vivantes alors que les cellules mortes ne l'intègrent pas. Suite à l'infection par *P. aeruginosa* PAO1 ou par *E. faecalis* V583, préalablement prétraitées ou non avec les facteurs entéroendocriniens, les surnageants ont été retirés, les cellules entérocytaires rincées au PBS avant d'être colorées au rouge neutre pendant une heure. Les cellules ont de nouveau été lavées et un mélange eau/éthanol/acide acétique (50/49/1) ajouté pour dissoudre le colorant s'étant fixé dans les lysosomes des cellules qui étaient encore vivantes. Enfin la DO a été mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm.

2.5 Dosage de l'interleukine 8 (IL8)

L'interleukine 8 (IL8) a été quantifiée dans le surnageant de culture des cellules Caco-2/TC7 après infection, en utilisant le kit Human CXCL8/IL-8 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems)

selon les recommandations du fournisseur.

2.6 Résistance transépithéliale (TER)

Les cellules Caco-2/TC7 cultivées sur inserts et différenciées ont été infectées par l'une des trois souches de *Pseudomonas* ou bien par *E. faecalis* V583 puis la résistance transépithéliale a été mesurée à l'aide d'un ohmètre (Millicell Electrical Resistance System). Les résultats obtenus ont été exprimés en pourcentage de la valeur initiale avant infection pour chaque insert.

2.7 Translocation bactérienne

Les cellules Caco-2/TC7 cultivées et différenciées ont été infectées au niveau apical par *P. aeruginosa* PAO1 ou *E. faecalis* V583. Suite à l'incubation, 100 µl du milieu basolatéral ont été récupérés, dilués de façon décimale et étalés sur GNO ou étalés sur BHI agar à 37°C. Les géloses ont été incubées pendant 24 h, et les bactéries dénombrées afin d'obtenir le nombre d'UFC/ml.

2.8 Adhésion/Invasion bactérienne

Le test que nous avons utilisé, permet à la fois d'évaluer le nombre de bactéries ayant adhéré aux cellules Caco-2/TC7 et le nombre ayant pénétrées dans ces cellules.

L'invasion bactérienne a été étudiée sur des tapis cellulaires confluent cultivés sur plaques 24 puits. Après l'infection des cellules avec *P. aeruginosa* PAO1 ou *E. faecalis* V583, les puits ont été lavés 3 fois avec 1 ml de DMEM. La moitié des puits de culture a servi à déterminer le nombre de bactéries totales ayant adhéré et/ou pénétrées dans les cellules Caco-2/TC7.

Dans ces échantillons, les cellules ont seulement été traitées par 500 µl de Triton à 0,1%, puis incubées 15 min à 37°C, les bactéries ne sont pas affectées par ce traitement. Ensuite, 100 µl des dilutions 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} des puits infectés par *P. aeruginosa* PAO1 ont été étalés sur GNO agar, et 100 µl des dilutions 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} sur BHI agar des puits infectés par *E. faecalis*. Les géloses ont été incubées à 37°C pendant 24 h puis dénombrées. Pour déterminer le nombre de bactéries intracellulaires, les cellules Caco2/TC7 ont été traitées avec 500 µl d'une solution de gentamycine à 300 µg/ml pour *Pseudomonas* et 500 µl d'un cocktail d'antibiotiques : mélange pénicilline/streptomycine (Biowhittaker-Cambrex) 100 U/ml pour *Enterococcus*. Etant donné que ces antibiotiques ne peuvent pas traverser la membrane cytoplasmique des cellules Caco2/TC7, seules les bactéries encore présentes en surface ou à l'extérieur des cellules ont été éliminées. Par la suite, les puits ont été lavés 3 fois avec 500 µl de PBS et enfin les cellules lysées avec 500 µl de triton 0,1% pendant 15 min à 37°C afin de libérer les bactéries potentiellement présentes dans le cytoplasme des cellules. Enfin, 100 µl du contenu des puits ont été étalés sur GNO agar pour *P. aeruginosa* PAO1 et BHI agar pour *E. faecalis* V583 aux dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} . Après incubation des géloses à 37°C pendant 24 h, les colonies sont dénombrées. Les puits sans antibiotique ont permis d'obtenir le nombre total de bactéries présentes (adhérentes plus invasives) alors que ceux traités avec antibiotiques, ont permis d'évaluer le nombre de bactéries invasives. Le nombre de bactéries adhérentes a été obtenu par soustraction : bactéries totales moins bactéries invasives.

2.9 Marquage de l'actine-F

Après infection par *P. fluorescens* MF37 ou *P. fluorescens* MFN1032, le réseau apical d'actine-F des cellules Caco-2/TC7 a été visualisé afin d'étudier d'éventuelles modifications du cytosquelette. Les lamelles ont été lavées trois fois avec du PBS avant d'être fixées 10 min

avec du paraformaldéhyde à 3,7%. Trois nouveaux lavages au PBS ont été réalisés avant de perméabiliser les cellules avec du Triton X100 à 0,1% pendant 5 min à température ambiante. Après cette perméabilisation, les cellules ont été incubées 10 min dans de la BSA (bovine serum albumine)/PBS à 1% puis la phalloïdine Alexa-488 (1U/insert) a été ajoutée pendant 45 min à température ambiante pour le marquage de l'actine-F. A la fin du marquage, les cellules ont été lavées trois fois au PBS et observées au microscope confocal (Zeiss, LSM710).

3. Etude du microbiote intestinal de souris

3.1 Modèles d'étude : souris C, RA et ABA

En collaboration avec l'équipe du Pr Pierre Déchelotte (INSERM U1073, Nutrition, Inflammation et Dysfonction de l'axe Intestin-Cerveau, Université de Rouen), qui a développé un modèle murin anorexique, des souris mâles C57Bl/6 ont été réparties en trois lots.

Le lot 1 correspond aux souris « Contrôle » (C), elles ont reçu une alimentation normale et n'ont pas de roue à leur disposition.

Le lot 2 comprend les souris « Restriction Alimentaire » (RA), elles ont été soumises à une restriction alimentaire progressive et n'avaient pas de roue à leur disposition. Ce groupe permet de mettre en évidence l'éventuel impact d'une diminution de la ration alimentaire sur le microbiote intestinal.

Le lot 3 correspond aux souris modèles d'anorexie, appelées « ABA » (activity-based anorexia). Elles ont été soumises à une restriction alimentaire progressive comme les souris RA, et la présence d'une roue dans leur environnement fait qu'elles augmentent

progressivement leur activité physique et se détournent de l'alimentation de façon similaire à ce qui peut être observé chez certains patients anorexiques.

Après 17 jours d'expérimentation, les souris de chaque lot ont été euthanasiées, puis les contenus caecaux transférés dans des tubes stériles et conservés à -80°C jusqu'à identification bactérienne.

3.2 Mise en culture

Le contenu caecal des souris a été remis en suspension dans 5 ml d'eau physiologique puis étalé sur milieu gélosé TSA (Trypticase soy agar). Les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C pendant 72 h. Chaque colonie qui se développe sur la gélose a été ré-isolé afin d'obtenir une culture pure.

3.3 Identification bactérienne par MALDI/Biotyper couplée au logiciel

Biotyper ®

Les micro-organismes ont été identifiés par la méthode de spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) (Bruker, Marcy-L'étoile, France) couplée à l'algorithme MALDI-Biotyper 3.0® qui permet de mesurer l'empreinte moléculaire unique d'un organisme. Plus précisément, l'appareil mesure les protéines les plus abondantes qui se trouvent dans chaque micro-organisme. Les spectres protéiques obtenus ont été comparés aux spectres de référence présents dans la base de données. Le logiciel génère des scores représentant la probabilité d'avoir une identification microbienne correcte.

Différentes méthodes d'identification sont possibles avec ce système. Une méthode directe

par simple dépôt d'une colonie sur la cible du MALDI, une méthode d'extraction rapide à l'acide formique et une méthode d'extraction dans un mélange éthanol/acide formique.

3.3.1 Dépôt direct

Afin d'être identifiées par le MALDI Biotyper, les colonies contenant les micro-organismes ont été déposées directement sur la cible dédiée au MALDI Biotyper.

3.3.2 Extraction rapide

Si la méthode par dépôt direct n'avait pas donné de résultats concluants, une extraction rapide des protéines pouvait être réalisée. Elle a été effectuée en ajoutant 1,2 µl d'acide formique sur les spots des colonies, déposés sur la cible MALDI, une fois que ceux-ci sont secs. L'acide formique permet de lyser les parois bactériennes et de libérer les protéines qui seront détectées par le système MALDI biotyper.

3.3.3 Extraction dans un mélange éthanol / acide formique

Afin d'optimiser l'identification, une extraction dans un mélange éthanol / acide formique pouvait aussi être réalisée. Pour ce faire, une ou plusieurs colonies ont été suspendues dans 300 µl d'eau déminéralisée et 900 µl d'éthanol ont été ajoutés. L'éthanol permet de déstructurer les parois bactériennes afin de libérer les protéines. Ces dernières sédimentent au fond du tube. Après une centrifugation de 2 min à 13000 rpm, 10 µl à 50 µl d'acide formique ont été ajoutés au culot parfaitement sec (couleur blanche). L'acide formique permet de resuspendre les protéines, 1 µl de cette suspension a alors été déposé sur la cible MALDI.

Quel que soit la méthode ayant été utilisée, l'appareil doit être calibré grâce à une solution BTS (Bacterial Test Standard) déposée, à raison de 1 µl, sur la cible MALDI. Une fois tous les spots de dépôt secs, ils ont été recouverts par 1 µl de matrice HCCA (Acide- α -cyano-4-hydroxycinnamique). Cette matrice permet d'assister la désorption-ionisation du laser et de

stabiliser le matériel déposé afin d'éviter sa dégradation au cours du temps.

4. Statistiques

Tous les résultats présentés dans ce rapport ont été calculés en effectuant la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes. Le test T de Student a été utilisé pour estimer la significativité des valeurs obtenues.

Références

A

Abrahamsson TR, Jakobsson T, Björkstén B, Oldaeus G, Jenmalm MC. (2013) No effect of probiotics on respiratory allergies: a seven-year follow-up of a randomized controlled trial in infancy. *Pediatr Allergy Immunol.* 24(6):556-61

Achari GA, Ramesh R. (2015) Characterization of bacteria degrading 3-hydroxy palmitic acid methyl ester (3OH-PAME), a quorum sensing molecule of *Ralstonia solanacearum*. *Lett Appl Microbiol.* 60(5):447-55.

Adlerberth I, Wold AE. (2009) Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr.* 98(2):229-38.

Aguilar-Galvez A, Dubois-Dauphin R, Destain J, Campos D, Thonart P. (2012) Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique) *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2012 16(1), 67-76

Al Atya AK, Drider-Hadiouche K, Ravallec R, Silvain A, Vachee A, Drider D. (2015) Probiotic potential of *Enterococcus faecalis* strains isolated from meconium. *Front Microbiol.* 2; 6:227.

Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, Gianotti L, Peck MD, Dunn DL, Pyles T, Childress CP, Ash SK. (1990) The process of microbial translocation. *Ann.Surg.* 212, 496–510.

Alsohim AS, Taylor TB, Barrett GA, Gallie J, Zhang XX, Altamirano-Junqueira AE, Johnson LJ, Rainey PB, Jackson RW. (2014) The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion. *Environ Microbiol.* 16(7):2267-81.

Alverdy J, Holbrook C, Rocha F, Seiden L, Wu RL, Musch M, Chang E, Ohman D, Suh S. (2000) Gut-Derived sepsis occurs when the right pathogen with the right virulence genes meets the right host: evidence for *in vivo* virulence expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann.Surg.* 232, 480–489.

Ang J, Ezike E, Asmar B. (2004) Antibacterial resistance. *Indian. J. Pediatr.* 71:229-239.

Anuchin AM, Chuvelev DI, Kirovskaya TA, Oleskin AV. (2008) Effects of monoamine neuromediators on the growth-related variables of *Escherichia coli* K-12. *77(6):674-680.*

Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H. (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 4, 1563-1589.

Arat S, Bullerjahn GS, Laubenbacher R. (2015) A network biology approach to denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One.* 23; 10 (2):e0118235.

Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccah D, Raoult D. (2009) Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients. *PLoS One.* 4(9):e7125.

Asano Y, Hiramoto T, Nishino R, Aiba Y, Kimura T, Yoshihara K, Koga Y, Sudo N. (2012) Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1; 303(11):G1288-95.

Ash C, Priest FG, Collins MD. (1993) Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 64(3-4):253-60.

Ayyadurai N, Ravindra Naik P, Sreehari Rao M, Sunish Kumar R, Samrat SK, Manohar M, Sakthivel N. (2006) Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. *J Appl Microbiol.* 100(5):926-37.

Azghani AO, Miller EJ, Peterson BT. (2000) Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. *Lung* 178, 261-269.

Azghani AO, Idell S, Bains M, Hancock RE. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microb Pathog.* 33 (3):109-14.

B

Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JL. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(44):15718-15723.

Baig NF, Dunham SJ, Morales-Soto N, Shrout JD, Sweedler JV, Bohn PW. (2015) Multimodal chemical imaging of molecular messengers in emerging *Pseudomonas aeruginosa* bacterial communities. *Analyst.* 7;140 (19):6544-52.

Bano N, Musarrat J. (2004) Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Curr Microbiol.* 46(5):324-8.

Bansal T, Englert D, Lee J, Hegde M, Wood TK, Jayaraman A. (2007) Differential effects of Epinephrine, Norepinephrine, and Indole on *Escherichia coli* O157:H7 Chemotaxis, Colonization, and Gene Expression. *Infect Immun.* 75(9): 4597–4607.

Bargossi E, Tabanelli G, Montanari C, Lanciotti R, Gatto V, Gardini F, Torriani S. (2015) Tyrosine decarboxylase activity of enterococci grown in media with different nutritional potential: tyramine and 2-phenylethylamine accumulation and tyrDC gene expression. *Front. Microbiol.* 6:259.

Barthe C, Joly J R, Ramsay D, Boissinot M, Benhamou N. (1988) Common epitope on the lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* recognized by a monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 26, 1016-1023.

Bartholome AL, Albin DM, Baker DH, Holst JJ, Tappenden KA. (2004) Supplementation of total parenteral nutrition with butyrate acutely increases structural aspects of intestinal adaptation after an 80% jejunioileal resection in neonatal piglets. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 28(4):210-22; discussion 222-3.

- Bassler BL, Losick R. (2006)** Bacterially speaking. *Cell*. 21; 125 (2):237-46.
- Bassler BL. (1999)** How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*. 2(6):582-7. Review.
- Beargie R, Lynd P, Tucker E, Duhring J. (1975)** Perinatal infection and vaginal flora. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 122:31-33.
- Becerra C, Albesa I, Eraso AJ. (2001)** Leukotoxicity of pyoverdinin, production of reactive oxygen species, and effect of UV radiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 13; 285(2):414-8.
- Beck BD. (1979)** Polymerization of the bacterial elongation factor for protein synthesis, EF-Tu. *Eur J Biochem* 97: 495–502.
- Beebe DK, Walley E. (1992)** Diabetic diarrhea. An underdiagnosed complication? *Postgrad Med*. 91(8):179-86.
- Bekkering P, Jafri I, Van Overveld FJ, Rijkers GT. (2013)** The intricate association between gut microbiota and development of type 1, type 2 and type 3 diabetes. *Expert Rev Clin Immunol*. 9(11):1031-41.
- Belay T, Sonnenfeld G. (2002)** Differential effects of catecholamines on *in vitro* growth of pathogenic bacteria. *Life Sci*. 71, 447-456.
- Belay T, Aviles H, Vance M, Fountain K, Sonnenfeld G. (2003)** Catecholamines and *in vitro* growth of pathogenic bacteria: enhancement of growth varies greatly among bacterial species. *Life Sci*. 8; 73(12):1527-35.
- Benno Y, Suzuki K, Suzuki K, Narisawa K, Bruce WR, Mitsuoka T. (1986)** Comparison of the fecal microflora in rural Japanese and urban Canadians. *Microbiol. Immunol*. 30:521-532.
- Bernstein DI, Lummus ZL, Santilli G, Siskosky J, Bernstein IL. (1995)** Machine operator's lung. A hypersensitivity pneumonitis disorder associated with exposure to metalworking fluid aerosols. *Chest* 108, 636-641.
- Biaggini K, Barbey C, Borrel V, Feuilloley M, Déchelotte P, Connil N. (2015)** The pathogenic potential of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 on enterocytes can be modulated by serotonin, substance P and epinephrine. *Arch. Microbiol*. 197, 983-990.
- Blier AS, Veron W, Bazire A, Gerault E, Taupin L, Vieillard J, Rehel K, Dufour A, Le Derf F, Orange N, Hulen C, Feuilloley MG, Lesouhaitier O. (2011)** C-type natriuretic peptide modulates quorum sensing molecule and toxin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 157: 1929-1944.
- Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L. (1983)** Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 5, 279-313.
- Bodilis J, Nsigue-Meilo S, Besaury L, Quillet L. (2012)** Variable copy number, intra-genomic heterogeneities and lateral transfers of the 16S rRNA gene in *Pseudomonas*. *PLoS One*. 2012; 7(4):e35647

- Bonnemaison E, Lanotte P, Cantagrel S, Thionois S, Quentin R, Chamboux C, Laugier J. (2003)** Comparison of fecal flora following administration of two antibiotic protocols for suspected maternofetal infection. *Biol Neonate*. 84(4):304-10.
- Bonomo RA, Szabo D. (2006)** Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*. 1;43 Suppl 2:S49-56. Review.
- Bornert G. (2000)** Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Revue Méd Vét* 151, 1003-1010.
- Bourgogne A, Hilsenbeck SG, Dunny GM, Murray BE. (2006)** Comparison of OG1RF and an isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the *Fsr* system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease. *J Bacteriol*. 188(8):2875-84.
- Bouza E, San Juan R, Munoz P, Voss A, Kluytmans J. (2001)** A European perspective on nosocomial urinary tract infections I. Report on the microbiology workload, etiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-003 study). European Study Group on Nosocomial Infections. *Clin. Microbiol. Infect*. 7:523-531.
- Brameyer S, Bode HB, Heermann R. (2015)** Languages and dialects: bacterial communication beyond homoserine lactones. *Trends Microbiol*.
- Bravo D, Braissant O, Cailleau G, Verrecchia E, Junier P. (2015)** Isolation and characterization of oxalotrophic bacteria from tropical soils. *Arch Microbiol*. 197(1):65-77.
- Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, Bienenstock J, Cryan JF. (2011)** Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(38):16050-5.
- Brogden KA. (2005)** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*. 3, 238-250
- Brogden KA, Ackermann M, McCray PBJ, Tack BF. (2003)** Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 22, 465-478.
- Brown CL, Smith K, Wall DM, Walker D. (2015)** Activity of Species-specific Antibiotics Against Crohn's Disease-Associated Adherent-invasive *Escherichia coli*. *Inflamm Bowel Dis*. 21 (10):2372-82.
- Bruzaud J, Tarrade J, Coudreuse A, Canette A, Herry JM, Taffin de Givenchy E, Darmanin T, Guittard F, Guilbaud M, Bellon-Fontaine MN. (2015)** Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 1; 131:59-66.
- Buie T, Campbell DB, Fuchs GJ, Furuta GT, Levy J, Vandewater J, Whitaker AH, Atkins D, Bauman ML, Beudet AL, Carr EG, Gershon MD, Hyman SL, Jirapinyo P, Jyonouchi H, Kooros K, Kushak R, Levitt P, Levy SE, Lewis JD, Murray KF, Natowicz MR, Sabra A, Wershil BK, Weston SC, Zeltzer L, Winter H. (2010)** Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: a consensus report. *Pediatrics*. 125 Suppl 1:S1-18.

- Buommino E, Morelli F, Metafora S, Rossano F, Perfetto B, Baroni A, Tufano MA. (1999)** Porin from *Pseudomonas aeruginosa* induces apoptosis in an epithelial cell line derived from rat seminal vesicles. *Infect Immun* 67, 4794-4800.
- Burcelin R, Serino, Chabo C, Blasco-Baque V, Amar J. (2011)** Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta diabetologica* 48, 257-273.
- Burdychova R, Komprda T. (2007)** Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol. Lett.* 276, 149-155.
- Burgos F, Torres A, González J, Puig de la Bellacasa J, Rodriguez-Roisin R, Roca J. (1996)** Bacterial colonization as a potential source of nosocomial respiratory infections in two types of spirometer. *Eur Respir J.* 9(12):2612-7.
- Burini JF, Gügi B, Merieau A, Guespin-Michel JF. (1994)** Lipase and acidic phosphatase from the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*: two enzymes whose synthesis is regulated by the growth temperature. *FEMS Microbiol Lett.* 15; 122 (1-2):13-8.
- Burokas A, Moloney RD, Dinan TG, Cryan JF. (2015)** Microbiota regulation of the Mammalian gut-brain axis. *Adv Appl Microbiol.* 91:1-62.
- Butel MJ. (2014)** Probiotics, gut microbiota and health. *Med Mal Infect.* 44(1):1-8
- Byng GS, Eustice DC, Jensen RA. (1979)** Biosynthesis of phenazine pigments in mutant and wild-type cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 138, 846-852.

C

- Carrera O, Fraga A, Pellón R, Gutiérrez E. (2014)** Rodent model of activity-based anorexia. *Curr Protoc Neurosci.* 10; 67:9.47.1-9.47.11.
- Castillo-Juárez I, Maeda T, Mandujano-Tinoco EA, Tomás M, Pérez-Eretza B, García-Contreras SJ, Wood TK, García-Contreras R. (2015)** Role of quorum sensing in bacterial infections.
- Catania A, Cutuli M, Garofalo L, Carlin A, Airaghi L, Barcellini W, Lipton JM. (2000)** The neuropeptide alpha-MSH in host defense. *Ann N Y Acad Sci.* 917:227-31. Review.
- Chapalain A, Rossignol G, Lesouhaitier O, Merieau A, Gruffaz C, Guerillon J, Meyer J M, Orange N, Feuilleley MG. (2008)** Comparative study of 7 fluorescent pseudomonad clinical isolates. *Can J Microbiol* 54, 19-27
- Chenoweth CD, Schaberg D. (1990)** The epidemiology of enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 9 (2):80-9.
- Chiba M, Fukushima T, Inoue S, Horie Y, Iizuka M, Masamune O. (1998)** *Listeria monocytogenes* in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* 33(4):430-4.
- Chowers MY, Keller N, Bar-Meir S, Chowers Y. (2002)** A defined human gastrin sequence stimulates the growth of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett.* 17; 217 (2):231-6.

- Christoffersen TE, Hult LT, Kuczkowska K, Moe KM, Skeie S, Lea T, Kleiveland CR. (2014)** *In vitro* comparison of the effects of probiotic, commensal and pathogenic strains on macrophage polarization. *Probiotics. Antimicrob. Proteins.* 6, 1-10.
- Chung MC, Tonry JH, Narayanan A, Manes NP, Mackie RS, Gutting B, Mukherjee DV, Popova TG, Kashanchi F, Bailey CL, Popov SG. (2011)** *Bacillus anthracis* interacts with plasmin(ogen) to evade C3b-dependent innate immunity. *PLoS One.* 25;6 (3):e18119.
- Chuang YC, Chang WN, Lu CH, Wu HS, Chang HW. (1999)** *Pseudomonas aeruginosa* central nervous system infections: analysis of clinical features of 16 adult patients. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 62, 300-307.
- Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, Harris HM, Coakley M, Lakshminarayanan B, O'Sullivan O, Fitzgerald GF, Deane J, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, O'Mahony D, van Sinderen D, Wallace M, Brennan L, Stanton C, Marchesi JR, Fitzgerald AP, Shanahan F, Hill C, Ross RP, O'Toole PW. (2012)** Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488, 178-184.
- Clarke S, Grenham P, Scully P, Fitzgerald RD, Moloney F, Shanahan TG, Dinan TG, Cryan JF. (2013)** The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Molecular Psychiatry* 18, 666-673
- Clarke MB, Hughes DT, Zhu C, Boedeker EC, Sperandio V. (2006)** The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5; 103 (27):10420-5.
- Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. (2012)** The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 148, 1258-1270. *Infect. Dis.* V9:80-89.
- Clewell DB. (1993)** Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* 73:9-12.
- Clewell DB, Weaver KE. (1989)** Sex pheromones and plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid.* 21(3):175-84. Review.
- Cogan TA, Thomas AO, Rees LE, Taylor AH, Jepson MA, Williams PH, Ketley J, Humphrey TJ. (2007)** Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni*. *Gut.* 56(8):1060-5.
- Cohen TS, Prince A. (2012)** Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med.*18 (4):509-19.
- Comolli JC, Hauser AR, Waite L, Whitchurch CB, Mattick JS, Engel JN. (1999)** *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity *in vitro* and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun.*67 (7):3625-30.
- Connil N, Le Breton Y, Dousset X, Auffray Y, Rincé A, Prévost H. (2002)** Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine production. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3537-3544.
- Cook LC, Federle MJ. (2014)** Peptide pheromone signaling in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *FEMS Microbiol Rev.*38 (3):473-92.
- Cornelis P, Matthijs S. (2002)** Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environ Microbiol* 4, 787-798.

Cornelis P, Hohnadel D, Meyer JM. (1989) Evidence for different pyoverdine-mediated iron uptake systems among *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Infect Immun* 57, 3491-3497.

Cosson P, Zulianello L, Join-Lambert O, Faurisson F, Gebbie L, Benghezal M, Van Delden C, Curty L K, Kohler T. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *Journal of bacteriology* 184, 3027-3033.

Costello EK, Carlisle EM, Bik EM, Morowitz MJ, Relman DA. (2013) Microbiome assembly across multiple body sites in low-birthweight infants. *MBio.* 29; 4(6)

Cowell BA, Evans DJ, Fleiszig SM. (2005) Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion. *FEMS Microbiol Lett* 250, 71-76.

Cross AR. (1987) The inhibitory effects of some iodonium compounds on the superoxide generating system of neutrophils and their failure to inhibit diaphorase activity. *Biochem Pharmacol.* 15; 36 (4):489-93.

Curtis MM, Russell R, Moreira CG, Adebessin AM, Wang C1, Williams NS, Taussig R, Stewart D, Zimmern P, Lu B, Prasad RN, Zhu C, Rasko DA, Huntley JF, Falck JR, Sperandio V. (2014) QseC inhibitors as an antivirulence approach for Gram-negative pathogens. *MBio.* 5(6):e02165.

D

Dagorn A, Chapalain A, Mijouin L, Hillion M, Duclairoir-Poc C, Chevalier S, Taupin L, Orange N, Feuilloy MG. (2013) Effect of GABA, a Bacterial Metabolite, on *Pseudomonas fluorescens* Surface Properties and Cytotoxicity. *Int J Mol Sci.* 6; 14 (6):12186-204.

Dallo SF, Zhang B, Denno J, Hong S, Tsai A, Haskins W, Ye JY, Weitao T. (2012) Association of *Acinetobacter baumannii* EF-Tu with cell surface, outer membrane vesicles, and fibronectin. *ScientificWorldJournal.* 2012:128705.

Danese S, Scaldaferrri F, Papa A, Pola R, Sans M, Gasbarrini G, Pola P, Gasbarrini A. Platelets: new players in the mucosal scenario of inflammatory bowel disease. (2004) *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*8 (5):193-8. Review.

Dalwadi H, Wei B, Kronenberg M, Sutton CL, Braun J. (2001) The Crohn's disease-associated bacterial protein I2 is a novel enteric t cell superantigen. *Immunity* 15(1):149-158

Declerck N, Bouillaut L, Chaix D, Rugani N, Slamti L, Hoh F, Lereclus D, Arold ST. (2007) Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(47):18490-5

Decoin V, Barbey C, Bergeau D, Latour X, Feuilloy MG, Orange N, Merieau A. (2014) A type VI secretion system is involved in *Pseudomonas fluorescens* bacterial competition. *PLoS One.* 9(2):e89411.

Decoin V, Gallique M, Barbey C, Le Mauff F, Poc CD, Feuilloy MG, Orange N, Merieau A. (2015) A *Pseudomonas fluorescens* type 6 secretion system is related to mucoidy, motility and bacterial competition. *BMC Microbiol.* 26; 15:72.

- Deibel RH, Silliker JH. (1963)** Food-poisoning potential of the enterococci. *J. Bacteriol.* 85:827-832.
- Dekimpe V, Déziel E. (2009)** Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology.* 155(Pt 3):712-23.
- De Lima Pimenta A, Di Martino P, Le Boudier E, Hulen C, Blight MA. (2003)** *In vitro* identification of two adherence factors required for *in vivo* virulence of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbes Infect.* 5(13):1177-87.
- Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. (2000)** Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 438-442.
- De Mot R, Proost P, Van Damme J, Vanderleyden J. (1992)** Homology of the root adhesin of *Pseudomonas fluorescens* OE 28.3 with porin F of *P. aeruginosa* and *P. syringae*. *Mol Gen Genet* 231, 489-493.
- Denis M, Ghadirian E. (1990)** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor restricts growth of tubercle bacilli in human macrophages. *Immunol Lett.* 24(3):203-6.
- Denis M, Campbell D, Gregg EO. (1991)** Interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor stimulate growth of a virulent strain of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 59, 1853-1856.
- De Palma G, Collins SM, Bercik P, Verdu EF. (2014)** The Microbiota-Gut-Brain axis in gastrointestinal disorders: Stressed bugs, stressed brain or both? *J Physiol.*
- Dhakal R, Bajpai VK, Baek KH. (2012)** Production of gaba (γ - Aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Braz J Microbiol.* 43(4):1230-41.
- Diaz C, Schilardi PL, Salvarezza RC, Fernandez Lorenzo de Mele M. (2011)** Have flagella a preferred orientation during early stages of biofilm formation? AFM study using patterned substrates. *Colloids Surf B Biointerfaces* 82, 536-542.
- Diemunsch P, Grélot L. (2000)** Potential of substance P antagonists as antiemetics. *Drugs.* 60(3):533-46.
- Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Cámara M, Williams P. (2003)** The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol.* 50(1):29-43.
- Dirix G, Monsieurs P, Dombrecht B, Daniels R, Marchal K, Vanderleyden J, Michiels J. (2004)** Peptide signal molecules and bacteriocins in Gram-negative bacteria: a genome-wide *in silico* screening for peptides containing a double-glycine leader sequence and their cognate transporters. *Peptides.* 25(9):1425-40. Review.
- Donnarumma G, Buommino E, Fusco A, Paoletti I, Auricchio L, Tufano MA. (2010)** Effect of temperature on the shift of *Pseudomonas fluorescens* from an environmental microorganism to a potential human pathogen. *Int J Immunopathol Pharmacol* 23(1):227-234

Donnarumma G, Paoletti I, Buommino E, Tufano MA, Baroni A. (2004) Alpha-MSH reduces the internalization of *Staphylococcus aureus* and down-regulates HSP 70, integrins and cytokine expression in human keratinocyte cell lines. *Exp Dermatol.* 13(12):748-54.

Duflos G, Dervin C, Malle P, Bouquelet S. (1999) Use of biogenic amines to evaluate spoilage in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangus merlangus*). *J AOAC Int.* 82, 1357-63.

Dumoulin R, Cortes-Perez N, Gaubert S, Duhutrel P, Brinster S, Torelli R, Sanguinetti M, Posteraro B, Repoila F, Serror P. (2013) Enterococcal Rgg-like regulator ElrR activates expression of the *elrA* operon. *J Bacteriol.*195 (13):3073-83.

E

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 10; 308(5728):1635-8.

Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. (2004) Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev.*56 (3):331-49. Review.

Ekiel A, Aptekorz M, Kazek B, Wiechuła B, Wilk I, Martirosian G. (2010) Intestinal microflora of autistic children *Med Dosw Mikrobiol.* 62(3):237-43. Polish.

El Karim IA, Linden GJ, Orr DF, Lundy FT. (2008) Antimicrobial activity of neuropeptides against a range of micro-organisms from skin, oral, respiratory and gastrointestinal tract sites. *J. Neuroimmunol.* 200,11-16.

El-Salhy M. (2015) Recent developments in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol.* 7; 21(25):7621-36

El-Sayed AK, Hothersall J, Thomas C M. (2001) Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Microbiology* 147, 2127-2139.

El-Sukhon SN. (2002) Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* from sheep with fleece rot in northern and middle Jordan. *Vet Dermatol* 13, 247-251.

Enzensberger R, Shah PM, Knothe H. (1985) Impact of oral ciprofloxacin on the faecal flora of healthy volunteers. *Infection* 13:273-275.

F

Farrow JM, Hudson LL, Wells G, Coleman JP, Pesci EC. (2015) CysB Negatively Affects the Transcription of *pqsR* and *Pseudomonas* Quinolone Signal Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 15; 197 (12):1988-2002.

- Favier, Vaughan E, De Vos WM, Akkermans ADL. (2002)** Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in Human Neonates *Appl Environ Microbiol.* 68(1): 219–226.
- Fazeli PK, Klibanski A. (2014)** Bone metabolism in anorexia nervosa. *Curr Osteoporos Rep.* 12(1):82-9.
- Feinbaum RL, Urbach JM, Liberati NT, Djonovic S, Adonizio A, Carvunis AR Ausubel FM. (2012)** Genome-Wide Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence-Related Genes Using a *Caenorhabditis elegans* Infection Model. *PLoS Pathog* 8, e1002813.
- Feldman C, Kassel M, Cantrell J, Kaka S, Morar R, Goolam Mahomed A, Philips JI. (1999)** The presence and sequence of endotracheal tube colonization in patients undergoing mechanical ventilation. *Eur Respir J.* 13(3):546-51.
- Fernández M, Linares DM, Rodríguez A, Alvarez MA. (2007)** Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73,1400-1406.
- Fernández de Palencia P, Fernández M, Mohedano ML, Ladero V, Quevedo C, Alvarez MA, López P. (2011)** Role of tyramine synthesis by food-borne *Enterococcus durans* in adaptation to the gastrointestinal tract environment. *Appl Environ Microbiol.* 77, 699-702.
- Finck-Barbancon V, Goranson J, Zhu L, Sawa T, Wiener-Kronish JP, Fleiszig SM, Wu C, Mende-Mueller L, Frank, DW. (1997)** ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol Microbiol* 25, 547-557.
- Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, Youn E, Summanen PH, Granpeesheh D, Dixon D, Liu M, Molitoris DR, Green JA. (2010)** pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* 16(4):444-53.
- Fisher K, Phillips C. (2009)** *In vitro* inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. *Br J Biomed Sci.*; 66 (4):180-5.
- Fishwick D, Tate P, Elms J, Robinson E, Crook B, Gallagher F., Lennox R, Curran A. (2005)** Respiratory symptoms, immunology and organism identification in contaminated metalworking fluid workers. What you see is not what you get. *Occup Med (Lond)* 55, 238-241.
- Fito-Boncompte L, Chapalain A, Bouffartigues E, Chaker H, Lesouhaitier O, Gicquel G, Bazire A, Madi A, Connil N, Véron W, Taupin L, Toussaint B, Cornelis P, Wei Q, Shioya K, Déziel E, Feuilloley MG, Orange N, Dufour A, Chevalier S. (2011)** Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect Immun* 79, 1176-1186.
- Flahaut S, Boutibonnes P, Auffray Y (1997)** Enterococci in human environment. *Can. J. Microbiol.* 43:699-708.
- Fleiszig SM, Arora SK, Van R, Ramphal R. (2001)** FlhA, a component of the flagellum assembly apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*, plays a role in internalization by corneal epithelial cells. *Infect Immun* 69, 4931-4937.

- Fleuchot B, Gitton C, Guillot A, Vidic J, Nicolas P, Besset C, Fontaine L, Hols P, Leblond-Bourget N, Monnet V, Gardan R. (2011)** Rgg proteins associated with internalized small hydrophobic peptides: a new quorum-sensing mechanism in streptococci. *Mol Microbiol.* 80(4):1102-19.
- Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Sarma JV, Day DE, Lentsch AB, Huber-Lang MS, Ward PA. (2009)** Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response. *PLoS One.* 2009; 4(2):e4414.
- Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Chen AJ, Sarma JV, Zetoune FS, McGuire SR, List RP, Day DE, Hoesel LM, Gao H, Van Rooijen N, Huber-Lang MS, Neubig RR, Ward PA. (2007)** Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature.* 11; 449 (7163):721-5.
- Forbes A, Kalantzis T. (2006)** Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Int J Colorectal Dis* 21, 399-401.
- Franciosi E, Carafa I, Nardin T, Schiavon S, Poznanski E, Cavazza A, Larcher R, Tuohy KM. (2015)** Biodiversity and γ -aminobutyric acid production by lactic acid bacteria isolated from traditional alpine raw cow's milk cheeses. *Biomed Res* 2015:625740.
- Franz CMAP, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. (2003)** Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88:105-122.
- Franz CMAP, Holzapfel, Stiles ME. (1999)** Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* 47:1-24.
- Freeman LR, Angelini P, Silverman GJ, Merritt C Jr. (1975)** Production of hydrogen cyanide by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Microbiol.* 29(4):560-1.
- Freestone PP, Haigh RD, Lyte M. (2007)** Blockade of catecholamine-induced growth by adrenergic and dopaminergic receptor antagonists in *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* *BMC Microbiol* 30; 7:8.
- Freestone PP, Haigh RD, Williams PH, Lyte M. (2003)** Involvement of enterobactin in norepinephrine-mediated iron supply from transferrin to enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2003 May 16; 222(1):39-43.
- Freestone PP, Haigh RD, Williams PH, Lyte M. (1999)** Stimulation of bacterial growth by heat-stable, norepinephrine-induced autoinducers. *FEMS Microbiol Lett.* 1; 172 (1):53-60.
- Fuqua WC, Winans SC. (1994)** A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol.* 176(10):2796-806.
- Fuse K, Fujimura S, Kikuchi T, Gomi K, Iida Y, Nukiwa T, Watanabe A. (2013)** Reduction of virulence factor pyocyanin production in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother.* 19(1):82-8.

- Gallagher LA, Manoil C. (2001)** *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *Journal of bacteriology* 183, 6207-6214.
- Ganz T. (2003)** The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integr. Comp. Biol.* 43, 300-304.
- Gao J, Yu X, Xie Z. (2012)** Draft genome sequence of high-siderophore-yielding *Pseudomonas sp.* strain HYS. *J Bacteriol.* 194(15):4121.
- Gardner SE, Frantz RA. (2008)** Wound bioburden and infection-related complications in diabetic foot ulcers. *Biol Res Nurs.* 10(1):44-53.
- Gardini F, Bover-Cid S, Tofalo R, Belletti N, Gatto V, Suzzi G, Torriani S. (2008)** Modeling the aminogenic potential of *Enterococcus faecalis* EF37 in dry fermented sausages through chemical and molecular approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(9), 2740-2750.
- Ghenghesh KS, Ahmed SF, El-Khalek RA, Al-Gendy A, Klena J. (2008)** *Aeromonas*-associated infections in developing countries. *J Infect Dev Ctries.* 1; 2(2):81-98.
- Giaffer MH, Clark A, Holdsworth CD. (1992)** Antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in patients with Crohn's disease and their possible pathogenic importance. *Gut.* 33(8):1071-5.
- Giani T, Morosini MI, D'Andrea MM, García-Castillo M, Rossolini GM, Cantón R. (2012)** Assessment of the Phoenix™ automated system and EUCAST breakpoints for antimicrobial susceptibility testing against isolates expressing clinically relevant resistance mechanisms. *Clin Microbiol Infect.* 18 (11):E452-8.
- Goulet O, Joly F. (2010)** Intestinal microbiota in short bowel syndrome. *Gastroenterol Clin Biol.* 34 Suppl 1:S37-43.
- Guarner F, Malagelada JR. (2003)** Gut flora in health and disease. *Lancet* 361, 512- 519.
- Giridhara Upadhyaya PM, Ravikumar KL, Umapathy BL. (2009)** Review of virulence factors of *Enterococcus*: an emerging nosocomial pathogen. *Indian J Med Microbiol.* 27(4):301-5.
- Gisbert JP, Pérez-Aisa A, Bermejo F, Castro-Fernández M, Almela P, Barrio J, Cosme A, Modolell I, Bory F, Fernández-Bermejo M, Rodrigo L, Ortuño J, Sánchez-Pobre P, Khorrami S, Franco A, Tomas A, Guerra I, Lamas E, Ponce J, Calvet X; H. pylori Study Group of the Asociación Española de Gastroenterología (Spanish Gastroenterology Association). (2013)** Second-line therapy with levofloxacin after failure of treatment to eradicate *Helicobacter pylori* infection: time trends in a Spanish Multicenter Study of 1000 patients. *J Clin Gastroenterol.* 47 (2):130-5.
- Goldberg JB, Pler GB. (1996)** *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides and pathogenesis. *Trends Microbiol.* 4(12):490-4. Review.
- Gooneratne ML, Facer P, Knowles CH, Chan CL, Lunniss PJ, Scott SM, Anand P, Williams NS. (2008)** Normalization of substance P levels in rectal mucosa of patients with faecal incontinence treated successfully by sacral nerve stimulation. *Br J Surg.* 95(4):477-83.
- Goulet O, Joly F. (2010)** Intestinal microbiota in short bowel syndrome. *Gastroenterol Clin Biol.* 34 Suppl 1:S37-43

Grady EF, Yoshimi SK, Maa J, Valeroso D, Vartanian RK, Rahim S, Kim EH, Gerard C, Gerard N, Bunnett NW, Kirkwood KS. (2000) Substance P mediates inflammatory oedema in acute pancreatitis via activation of the neurokinin-1 receptor in rats and mice *Br J Pharmacol* 130(3): 505-512.

Graziano TS, Closs P, Poppi T, Franco GC, Cortelli JR, Groppo FC, Cogo K. (2014) Catecholamines promote the expression of virulence and oxidative stress genes in *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 49(5):660-9.

Grieco P, Carotenuto A, Auriemma L, Limatola A, Di Maro S, Merlino F, Mangoni ML, Luca V, Di Grazia A, Gatti S, Campiglia P, Gomez-Monterrey I, Novellino E, Catania A. (2013) Novel α -MSH peptide analogues with broad spectrum antimicrobial activity. *PLoS One.*23; 8(4):e61614.

Grohmann E, Muth G, Espinosa M. (2003) Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (2): 277-301. *Cell Microbiol.* 15(1):98-113.

Guidi R, Guerra L, Levi L, Stenerlöw B, Fox JG, Josenhans C, Masucci MG, Frisan T. (2013) Chronic exposure to the cytolethal distending toxins of Gram-negative bacteria promotes genomic instability and altered DNA damage response. 15(1):98-113.

Guo L, He X, Shi W. (2014) Intercellular communications in multispecies oral microbial communities. *Front Microbiol.* 1; 5:328.

Guseva D, Holst K, Kaune B, Meier M, Keubler L, Glage S, Buettner M, Bleich A, Pabst O, Bachmann O, Ponimaskin EG. (2014) Serotonin 5-HT₇ receptor is critically involved in acute and chronic inflammation of the gastrointestinal tract. *Inflamm Bowel Dis.* 20(9):1516-29.

Guthrie GD, Nicholson-Guthrie CS. (1989) Gamma-Aminobutyric acid uptake by a bacterial system with neurotransmitter binding characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7378-7381.

Gutierrez. (2013) A rat in the labyrinth of anorexia nervosa: contributions of the activity-based anorexia rodent model to the understanding of anorexia nervosa. *Int J Eat Disord.* 46(4):289-301

Gutschik E, Moller S, Christensen N. (1979) Experimental endocarditis in rabbits, 3: Significance of the proteolytic capacity of the infecting strains of *Streptococcus faecalis*. *Acta Pathol Microbiol Scand* 87:353-62.

H

Haas D, Defago G. (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol* 3, 307-319.

Halang P, Toulouse C, Geißel B, Michel B, Flauger B, Müller M, Voegelé RT, Stefanski V, Steuber J. (2015) Response of *Vibrio cholerae* towards the catecholamine hormones epinephrine and norepinephrine. *J Bacteriol.* 28. pii: JB.00345-15.

Hammes W, Haller D, Gänzle M. (2008) Fermented meat. In: Farnworth E., ed. Handbook of fermented functional foods. 2nd ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press Taylor & Francis Group, 291-320.

Hancock LE, Perego M. (2004) The *Enterococcus faecalis* fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. J Bacteriol. 186(17):5629-39.

Hansen CJ, Burnell KK, Brogden KA. (2006) Antimicrobial activity of Substance P and Neuropeptide Y against laboratory strains of bacteria and oral microorganisms. J Neuroimmunol 177(1-2):215-218

Hartmann P, Chen WC, Schnabl B. (2012) The intestinal microbiome and the leaky gut as therapeutic targets in alcoholic liver disease. Frontiers in physiology 3, 402.

Hass W, Shepard BD, Gilmore MS. (2002) Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. Nature 415:84-7.

Hassett DJ, Cuppoletti J, Trapnell B, Lyman SV, Rowe JJ, Yoon SS, Hilliard GM, Parvatiyar K, Kamani MC, Wozniak DJ, Hwang SH, McDermott TR, Ochsner UA. (2002) Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. Adv Drug Deliv Rev. 5; 54 (11):1425-43. Review.

Hegde M, Wood TK, Jayaraman A. (2009) The neuroendocrine hormone norepinephrine increases *Pseudomonas aeruginosa* PA14 virulence through the las quorum-sensing pathway. Appl Microbiol Biotechnol. 84(4):763-76.

Henderson B, Wilson M. (1996) Homo bacteriens and a network of surprises. J Med Microbiol. 45(6):393-4

Hendrickx AP, Willems RJ, Bonten MJ, Van Schaik W. (2009) LPxTG surface proteins of enterococci. Trends Microbiol. 17(9):423-30.

Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. Gastroenterology 96, 736-749.

Hillion M, Mijouin L, Jaouen T, Barreau M, Meunier P, Lefevre L, Lati E, Chevalier S, Feuilloley MG. (2013) Comparative study of normal and sensitive skin aerobic bacterial populations. Microbiologyopen. 2(6):953-61.

Hinz KH, Heffels-Redmann U, Poppel M. (1992) [Multicausal infectious respiratory tract disease of young fattening turkeys]. Dtsch Tierarztl Wochenschr 99, 75-78.

Hirt H, Erlandsen SL, Dunny GM. (2000) Heterologous inducible expression of *Enterococcus faecalis* pCF10 aggregation substance asc10 in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus gordonii* contributes to cell hydrophobicity and adhesion to fibrin. J Bacteriol. 182(8):2299-306.

Hirvonen MR, Huttunen K, Roponen M. (2005) Bacterial strains from moldy buildings are highly potent inducers of inflammatory and cytotoxic effects. Indoor Air 15 Suppl 9, 65-70.

- Hogan JS, Todhunter DA, Smith KL, Schoenberger PS, Sordillo LM. (1993)** Growth responses of coliform bacteria to recombinant bovine cytokines. *J. Dairy Sci.* 76, 978-982.
- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. (2010)** Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 35(4):322-32.
- Holzapfel W, Schillinger U, Buckenhüskes H. (2008)** Sauerkraut. In: Farnworth E., ed. *Handbook of fermented functional foods.* 2nd ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press Taylor & Francis Group, 395-412.
- Holzer P, Farzi A. (2014)** Neuropeptides and the microbiota-gut-brain axis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 817, 195-219.
- Hsueh PR, Teng LJ, Pan HJ, Chen YC, Sun CC, Ho SW, Luh KT. (1998)** Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients. *J Clin Microbiol* 36, 2914-2917.
- Huang R, Tao X, Wan C1, Li S, Xu H, Xu F, Shah NP, Wei H. (2015)** *In vitro* probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* ZDY 2013 and its modulatory effect on gut microbiota of mice. *J Dairy Sci.* 98 (9):5850-61.
- Huffnagle GB. (2010)** The microbiota and allergies/asthma. *PLoS Pathog.* 6(5)
- Hughes DT, Sperandio V. (2008)** Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol.* 6(2):111-20.
- Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cezard JP. (2003)** Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* 362, 2012-2015.
- Humphries RM, Schuetz AN. (2015)** Antimicrobial susceptibility testing of bacteria that cause gastroenteritis. *Clin Lab Med.* 35(2):313-31
- Huttunen K, Hyvarinen A, Nevalainen A, Komulainen H, Hirvonen MR. (2003)** Production of proinflammatory mediators by indoor air bacteria and fungal spores in mouse and human cell lines. *Environ Health Perspect* 111, 85-92.
- Huycke MM, Moore D, Joyce W, Wise P, Shepard L, Kotake Y, Gilmore MS. (2001)** Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires Demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases. *Mol Microbiol* 42: 729-40.
- Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. (1998)** Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis* 4:239-249.
- Huycke MM, Gilmore MS. (1997)** *In vivo* survival of *Enterococcus faecalis* is enhanced by extracellular superoxide production. *Adv Exp Med Biol.* 418:781-4.
- Hylemon PB, Harder J. (1998)** Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems. *FEMS Microbiol Rev.* 22(5):475-88.

Igbinosa IH, Nwodo UU, Sosa A, Tom M, Okoh AI. (2012) Commensal *Pseudomonas* species isolated from wastewater and freshwater milieus in the Eastern Cape Province, South Africa, as reservoir of antibiotic resistant determinants. *Int J Environ Res Public Health*. 9(7):2537-49.

Inaba T, Oura H, Morinaga K, Toyofuku M, Nomura N. (2015) The *Pseudomonas* Quinolone Signal Inhibits Biofilm Development of *Streptococcus mutans*. *Microbes Environ*. 30(2):189-91

Ionescu M, Baccari C, Da Silva AM, Garcia A, Yokota K, Lindow. (2013) Diffusible signal factor (DSF) synthase RpfF of *Xylella fastidiosa* is a multifunction protein also required for response to DSF. *J Bacteriol*. 195(23):5273-84.

Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR. (2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*. 139:485–498

J

Jackson MK, Phillips SN. (1996) Necrotizing hepatitis in pet birds associated with *Pseudomonas fluorescens*. *Avian Dis* 40, 473-476.

Jayaseelan S, Ramaswamy D, Dharmaraj S. (2014) Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol*. 30(4):1159-68.

Jensen V, Löns D, Zaoui C, Bredenbruch F, Meissner A, Dieterich G, Münch R, Häussler S. (2006) RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and -independent pathways. *J Bacteriol*. 188(24):8601-6.

Jésus P, Ouelaa W, François M, Riachy L, Guérin C, Aziz M, Do Rego JC, Déchelotte P, Fetissov SO, Coëffier M. (2014) Alteration of intestinal barrier function during activity-based anorexia in mice. *Clin Nutr*. 33(6):1046-53.

Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. (1994) Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev*. 7:462-478.

Johnson AP. (1994) The pathogenicity of Enterococci. *J Antimicrob Chemother* 33:1083-9.

Joly F, Coffin B, Messing B. (2007) Rôle de la flore dans les pathologies digestives (maladie de Crohn, rectocolite ulcérohémmorragique, cancer colorectal exclus). *Nutrition clinique et métabolisme* 21, 89-94.

Jones RN, Marshall SA, Pfaller MA, Wilke WW, Hollis RJ, Erwin ME, Edmond ME, Wenzel RP. (1997) Nosocomial enterococcal blood stream infections in the SCOPE Program: antimicrobial resistance, species occurrence, molecular testing results, and laboratory testing accuracy.

Jyot J, Balloy V, Jouvion G, Verma A, Touqui L, Huerre M, Chignard M, Ramphal R. (2011) Type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: *in vivo* evidence of a significant role in death due to lung infection. *J Infect Dis* 203, 1369-1377.

K

Kainer MA, Devasia RA, Jones TF, Simmons BP, Melton K, Chow S, Broyles J, Moore KL, Craig AS, Schaffner W. (2007) Response to emerging infection leading to outbreak of linezolid-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis.* 13(7):1024-30.

Kalia VC. (2014) In search of versatile organisms for quorum-sensing inhibitors: acyl homoserine lactones (AHL)-acylase and AHL-lactonase. *FEMS Microbiol Lett.* 359(2):143.

Kamada N, Chen GY, Inohara N, Nunez G. (2013) Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature immunology* 14, 685-690.

Kaneko T, Bando Y, Kurihara H, Satomi K, Nonoyama K, Matsuura N. (1997) Fecal microflora in a patient with short-bowel syndrome and identification of dominant *lactobacilli*. *J Clin Microbiol.* 35(12):3181-5.

Kang S, Denman SE, Morrison M, Yu Z, Dore J, Leclerc M, McSweeney CS. (2010) Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray. *Inflamm Bowel Dis.* 16 (12):2034-42

Kaplan HB, Greenberg EP. (1985) Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol.* 163(3):1210-4.

Karavolos MH, Winzer K, Williams P, Khan CM. (2013) Pathogen espionage: multiple bacterial adrenergic sensors eavesdrop on host communication systems. *Mol Microbiol.* 87(3):455-65

Karavolos MH, Williams P, Khan CM. (2011) Interkingdom crosstalk: host neuroendocrine stress hormones drive the hemolytic behavior of *Salmonella typhi*. *Virulence.* 2(4):371-4. Epub 2011 Jul 1. Review.

Karavolos MH, Bulmer DM, Spencer H, Rampioni G, Schmalen I, Baker S, Pickard D, Gray J, Fookes M, Winzer K, Ivens A, Dougan G, Williams P, Khan CM. (2011) *Salmonella Typhi* sense host neuroendocrine stress hormones and release the toxin haemolysin E. *EMBO Rep* 12: 252–258.

Karavolos MH, Spencer H, Bulmer DM, Thompson A, Winzer K, Williams P, Hinton JC, Khan CM. (2008) Adrenaline modulates the global transcriptional profile of *Salmonella* revealing a role in the antimicrobial peptide and oxidative stress resistance responses. *BMC Genomics.* 6; 9:458.

Karovičová J, Kohajdová Z. (2005) Biogenic amines in food. *Chem. Pap.,* 59(1), 70-79.

- Kau AL, Martin SM, Lyon W, Hayes E, Caparon MG, Hultgren SJ. (2005)** *Enterococcus faecalis* tropism for the kidneys in the urinary tract of C57BL/6J mice. *Infect Immun.*73 (4):2461-8.
- Kayaoglu G, Ørstavik D. (2004)** Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1; 15 (5):308-20. Review.
- Kaye WH, Gwirtsman HE, George DT, Ebert MH. (1991)** Altered serotonin activity in anorexia nervosa after long-term weight restoration. Does elevated cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid level correlate with rigid and obsessive behavior? *Arch Gen Psychiatry.* 48(6):556-62.
- Keşli R, Gökçen C, Buluç U, Terzi Y. (2014)** Investigation of the relation between anaerobic bacteria genus *clostridium* and late-onset autism etiology in children. *J Immunoassay Immunochem.* 35(1):101-9.
- Kidd M, Gustafsson BI, Drozdov I, Modlin IM. (2009)** IL1beta- and LPS-induced serotonin secretion is increased in EC cells derived from Crohn's disease. *Neurogastroenterol Motil.* 21(4):439-50.
- Kim A. (2015)** Dysbiosis: A Review Highlighting Obesity and Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Gastroenterol.* 49 Suppl 1:S20-4
- King MV, Spicer CH, Sleight AJ, Marsden CA, Fone KC. (2009)** Impact of regional 5-HT depletion on the cognitive enhancing effects of a typical 5-HT(6) receptor antagonist, Ro 04-6790, in the Novel Object Discrimination task. *Psychopharmacology (Berl).* 202(1-3):111-23.
- Kinney KS, Austin CE, Morton DS, Sonnenfeld G. (2000)** Norepinephrine as a growth stimulating factor in bacteria--mechanistic studies. *Life Sci.* 10; 67(25):3075-85.
- Kleiman SC, Carroll IM, Tarantino LM, Bulik CM. (2015)** Gut feelings: A role for the intestinal microbiota in anorexia nervosa? *Int J Eat Disord.* Jul 48(5):449-51.
- Köhler W. (2007)** The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 297:133-150.
- Koon HW, Shih DQ, Hing TC, Chen J, Ho S, Zhao D, Targan SR, Pothoulakis C. (2011)** Substance P induces CCN1 expression via histone deacetylase activity in human colonic epithelial cells. *Am J Pathol* 179(5): 2315-2326
- Kos B, Susković J, Vuković S, Simpraga M, Frece J, Matosić S. (2003)** Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol.* 94(6):981-7
- Kowalska K, Carr DB, Lipkowski AW. (2002)** Direct antimicrobial properties of substance P. 5; 71 (7):747-50.
- Krasowska A, Sigler K. (2014)** How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Front Cell Infect Microbiol.* 19; 4:112.
- Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. (1992)** Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun* 60:25-30.

Kučerová K, Svobodová H, Tůma S, Ondráčková I, Pločková I. (2009) Production of biogenic amines by enterococci. Czech J. Food Sci., 27(2) S2-50–S2-55.

Kurrie E, Bhaduri S, Krieger D, Gaus W, Heimpel H, Pflieger H, Arnold R, Vanek E (1981) Risk factors for infections of the oropharynx and the respiratory tract in patients with acute leukemia. J. Infect. Dis. 144:128-136.

L

Laarman AJ, Bardoel BW, Ruyken M, Fernie J, Milder FJ, van Strijp JA, Rooijackers SH. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. J Immunol 188, 386-393.

Lagier JC, Million M, Hugon P, Armougom F, Raoult D. (2012) Human gut microbiota: repertoire and variations. Front Cell Infect Microbiol. 2; 2:136.

Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. (2002) Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 7072-7077.

Lancefield RC. (1933) A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J. Exp. Med. 57:571-595.

Laverty G, Gorman SP, Gilmore BF. (2014) Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. Pathogens. 18; 3 (3):596-632.

Lecci A, Capriati A, Altamura M, Maggi CA. (2006) Tachykinins and tachykinin receptors in the gut, with special reference to NK2 receptors in human. Auton Neurosci. 30; 126-127:232-49.

Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. (1988) Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N. Engl. J. Med. 319:157-161.

Leid JG, Willson CJ, Shirliff ME, Hassett D, Parsek MR, Jeffers AK. (2005) The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. J Immunol 175, 7512-7518.

Leneveu-Jenvrin C, Madi A, Bouffartigues E, Biaggini K, Feuilloy M, Chevalier S, Connil N. (2013) Cytotoxicity and inflammatory potential of two *Pseudomonas mosselii* strains isolated from clinical samples of hospitalized patients. BMC Microbiol.13:123.

Lesouhaitier O, Veron W, Chapalain A, Madi A, Blier AS, Dagorn A, Connil N, Chevalier S, Orange N, Feuilloy M. (2009) Gram negative bacterial sensors for eukaryotic signal molecules. Sensors 9(9):6967–6990

Leuschner R, Kurihara R, Hammes W. (1999) Formation of biogenic amines by proteolytic enterococci during cheese ripening. J. Sci. Food Agric., 79, 1141-1144.

Lewenza S, Visser MB, Sokol PA. (2002) Interspecies communication between *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. Can J Microbiol. 48(8):707-16.

- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. (2006)** Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 21; 444(7122):1022-3.
- Li C, Kuemmerle JF. (2014)** Mechanisms that mediate the development of fibrosis in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 20(7):1250-8.
- Li H, Qiu T, Huang G, Cao Y. (2010)** Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microb Cell Fact*. 12; 9:85.
- Li L, Xu Z, Zhou Y, Sun L, Liu Z, Chen H, Zhou R. (2012)** Global effects of catecholamines on *Actinobacillus pleuropneumoniae* gene expression. *PLoS One*. 7(2):e31121
- Li W, Lyte M, Freestone PP, Ajmal A, Colmer-Hamood JA, Hamood AN. (2009)** Norepinephrine represses the expression of *toxA* and the siderophore genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. 299(1):100-9
- Liao CH, McCallus DE. (1998)** Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. *Applied and environmental microbiology* 64, 914-921.
- Linares DM, Fernández M, Martín MC, Alvarez MA. (2009)** Tyramine biosynthesis in *Enterococcus durans* is transcriptionally regulated by the extracellular pH and tyrosine concentration. *Microb. Biotechnol*. 2, 625-633.
- Lin J, Smith MP, Chapin KC, Baik HS, Bennett GN, Foster JW. (1996)** Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol*. 62, 3094-3100.
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. (2009)** Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 22 (4):582-610. Review.
- Lonvaud-Funel. (2001)** Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 199(1):9-13.
- López-Díaz TM, Santos JA, Gonzalez CJ, Moreno B, Garcia ML. (1995)** Bacteriological quality of traditional Spanish blue cheese. *Milchwissenschaft* 50:503–505.
- Loughman JA, Caparon MG. (2007)** Contribution of invariant residues to the function of Rgg family transcription regulators. *J Bacteriol*. 189(2):650-5.
- Lowe AM, Lambert PA, Smith AW. (1995)** Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect Immun*. 63(2):703-6.
- Luo G, Niesel DW, Shaban RA, Grimm EA, Klimpel GR. (1993)** Tumor necrosis factor alpha binding to bacteria: evidence for a high-affinity receptor and alteration of bacterial virulence properties. *Infect. Immun*. 61, 830-835.
- Ly NP, Litonjua A, Gold DR, Celedon JC. (2011)** Gut microbiota, probiotics, and vitamin D: interrelated exposures influencing allergy, asthma, and obesity? *The Journal of allergy and clinical immunology* 127, 1087-1094; quiz 1095-1086.

- Lyte M. (2014)** Microbial endocrinology: Host-microbiota neuroendocrine interactions influencing brain and behavior. *Gut Microbes*. 5 (3):381-9
- Lyte M. (2010)** The microbial organ in the gut as a driver of homeostasis and disease. *Med Hypotheses*. 74(4):634-8.
- Lyte M. (2004)** Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century. *Trends Microbiol*. 12(1):14-20.
- Lyte M, Freestone PP, Neal CP, Olson BA, Haigh RD, Bayston R, Williams PH. (2003)** Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. *Lancet*. 11; 361(9352):130-5.
- Lyte M, Arulanandam BP, Frank CD. (1996)** Production of Shiga-like toxins by *Escherichia coli* O157:H7 can be influenced by the neuroendocrine hormone norepinephrine. *J Lab Clin Med*. 128(4):392-8.
- Lyte M. (1993)** The role of microbial endocrinology in infectious disease. *J Endocrinol*. 137(3):343-5. Review.
- Lyte M, Ernst S. (1992)** Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sci*. 50(3):203-12.

M

- Macy JM, Rech S, Auling G, Dorsch M, Stackebrandt E, Sly LI. (1993)** *Thauera selenatis* gen. nov., sp. nov., a member of the beta subclass of Proteobacteria with a novel type of anaerobic respiration. *Int J Syst Bacteriol*. 43(1):135-42.
- Madhuri Shireen T, Venugopal SK, Ghosh D, Gadepalli R, Dhawan B, Mukhopadhyay K. (2009)** *In vitro* antimicrobial activity of alpha-melanocyte stimulating hormone against major human pathogen *Staphylococcus aureus*. *Peptides*. 30(9):1627-35.
- Madi A, Alnabhani Z, Leneveu C, Mijouin L, Feuilloley M, Connil N. (2013)** *Pseudomonas fluorescens* can induce and divert the human β -defensin-2 secretion in intestinal epithelial cells to enhance its virulence. *Arch Microbiol*. 195(3):189-95.
- Madi A, Lakhdari O, Blottière HM, Guyard-Nicodème M, Le Roux K, Groboillot A, Svinareff P, Doré J, Orange N, Feuilloley MG, Connil N. (2010)** The clinical *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 strain exerts a cytotoxic effect on epithelial intestinal cells and induces Interleukin-8 via the AP-1 signaling pathway. *BMC Microbiol*. 10:215.
- Magnus CA, McCurdy AR, Ingledew WM. (1988)** Further studies on the thermal resistance of *Streptococcus faecium* and *Streptococcus faecalis* in pasteurized ham. *Can. Inst. Food Sci. Technol. j*. 21:209–212.
- Mandlik A, Swierczynski A, Das A, Ton-That H. (2008)** Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol*. 16(1):33-40

- Marcinkiewicz J, Ciszek M, Bobek M, Strus M, Heczko PB, Kurnyta M, Biedroń R, Chmielarczyk A. (2007)** Differential inflammatory mediator response *in vitro* from murine macrophages to lactobacilli and pathogenic intestinal bacteria. *Int J Exp Pathol.* 88: 155–164.
- Mårdh PA, Ursing B, Sandgren E. (1980)** Lack of evidence for an association between infection with *Chlamydia trachomatis* and Crohn's disease, as indicated by micro-immunofluorescence antibody tests. *Acta Pathol Microbiol Scand B.* 88(1):57-9.
- Margolis KG, Gershon MD. (2009)** Neuropeptides and inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 25, 503-511.
- Markou P, Apidianakis Y. (2014)** Pathogenesis of intestinal *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cancer. *Front Cell Infect Microbiol.* 7; 3:115. Review.
- Marmulla R, Harder J. (2014)** Microbial monoterpene transformations-a review. *Front Microbiol.* 15; 5:346.
- Marshall JC, Christou NV, Meakins JL. (1993)** The gastrointestinal tract. The “undrained abscess” of multiple organ failure. *Ann.Surg.* 218, 111–119.
- Marteau P. (2013)** Microbiote intestinale. *EMC Gastroenterologie* 8, 1-8.
- Martins ML, Pinto UM, Riedel K, Vanetti MC, Mantovani HC, de Araújo EF. (2014)** Lack of AHL-based quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens* isolated from milk. *Braz J Microbiol.* 9; 45(3):1039-46
- Mashburn-Warren L, Morrison DA, Federle MJ. (2010)** A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in *Streptococcus spp.* via an Rgg regulator. *Mol Microbiol.* 78(3):589-606.
- McCabe-Sellers B, Staggs C, Bogle M. (2006)** Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: a crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. *J. Food Compos. Anal.,* 19, S58-S65.
- McDonald JR, Olaison L, Anderson DJ, Hoen B, Miro JM, Eykyn S, Abrutyn E, Fowler VG Jr, Habib G, Selton-Suty C, Pappas PA, Cabell CH, Corey GR, Marco F, Sexton DJ. (2005)** Enterococcal endocarditis: 107 cases from the international collaboration on endocarditis merged database. *Am. J. Med.* 118:759-766.
- McKnight SL, Iglewski BH, Pesci EC. (2000)** The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 182(10):2702-8.
- Meduri GU, Kanangat S, Stefan J, Tolley E, Schaberg D. (1999)** Cytokines IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha enhance *in vitro* growth of bacteria. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.,* 160, 961-967.
- Megran DW. (1992)** Enterococcal endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* 15:63-71.
- Mérens, Delacour, Plésiat, Cavallo, Jeannot (2011)** *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone des Laboratoires* Volume 2011, Issue 435, Pages 49–62

- Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C Holder IA. (1996)** Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 64, 518-523.
- Meylheuc T, Van Oss CJ, Bellon-Fontaine MN. (2001)** Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. *J Appl Microbiol* 91, 822-832.
- Mezghani-Abdelmoula S, Khemiri A, Lesouhaitier O, Chevalier S, Orange N, Cazin L, Feuilloy MG. (2004)** Sequential activation of constitutive and inducible nitric oxide synthase (NOS) in rat cerebellar granule neurons by *Pseudomonas fluorescens* and invasive behaviour of the bacteria. *Microbiol Res* 159, 355-363.
- Mijouin L, Hillion M, Ramdani Y, Jaouen T, Duclairoir-Poc C, Follet-Gueye ML, Lati E, Yvergnaux F, Driouich A, Lefeuvre L, Farmer C, Misery L, Feuilloy MG. (2013)** Effects of a skin neuropeptide (substance p) on cutaneous microflora. *PLoS One*. 8; 8(11):e78773.
- Min C, Ohta K, Kajiya M, Zhu T, Sharma K, Shin J, Mawardi H, Howait M, Hirschfeld J, Bahammam L, Ichimonji I, Ganta S, Amiji M, Kawai T. (2012)** The antimicrobial activity of the appetite peptide hormone ghrelin. *Peptides*. 36(2):151-6.
- Minaxi, Saxena J. (2010)** Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* RM-3 as a potential biocontrol agent. *Mycopathologia*. 170 (3):181-93.
- Mitsui R. (2011)** Immunohistochemical analysis of substance P-containing neurons in rat small intestine. *Cell Tissue Res*. 343(2):331-41.
- Miyata S, Casey M, Franz DW, Ausubel FM, Drenkard E. (2003)** Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun* 71, 2404-2413.
- Miyazaki S, Matsumoto T, Tateda K, Ohno A, Yamaguchi K. (1995)** Role of exotoxin A in inducing severe *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. *J Med Microbiol* 43, 169-175.
- Moon JS, Kim SY, Cho KJ, Yang SJ, Yoon GM, Eom HJ, Han NS. (2013)** Isolation and characterization of histamine-producing bacteria from fermented fish products. *J Microbiol*. 51(6):881-5.
- Moreira CG, Weinshenker D, Sperandio V. (2010)** QseC mediates *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium virulence *in vitro* and *in vivo*. *Infect Immun*. 78(3): 914–26.
- Moreira CG, Sperandio V. (2012)** Interplay between the QseC and QseE bacterial adrenergic sensor kinases in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenesis. *Infect Immun*. 80(12):4344-53.
- Mulak A, Bonaz B. (2015)** Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. *World J Gastroenterol*. 7; 21 (37):10609-20
- Mulcahy H, Sibley CD, Surette MG, Lewenza S. (2011)** *Drosophila melanogaster* as an animal model for the study of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections *in vivo*. *PLoS Pathog* 7, e1002299.

Mull CC, Scarfone RJ, Conway D. (2000). Ecthyma gangrenosum as a manifestation of *Pseudomonas* sepsis in a previously healthy child. *Ann Emerg Med* 36, 383-387.

Mundt JO. (1986) Enterococci. p. 1063–1065. In P.H.A. Sneath et al. (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Murray BE, Weinstock GM. (1999) Enterococci: new aspects of an old organism. *Proc. Assoc. Am. Physicians*. 111:328-334.

Murray BE. (1990) The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:46-65.

N

Nagarajkumar M, Bhaskaran R, Velazhahan R. (2004) Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol Res* 159, 73-81.

Nakamura S, Higashiyama Y, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Mizuta Y, Kohno S. (2008) The roles of the quorum-sensing system in the release of extracellular DNA, lipopolysaccharide, and membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn J Infect Dis* 61, 375-378.

Nakamura RM, Matsutani M, Barry M. (2003) Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta* 335, 9-20.

Nakano M, Takahashi A, Sakai Y, Kawano M, Harada N, Mawatari K, Nakaya Y. (2007) Catecholamine-induced stimulation of growth in *Vibrio* species. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 649-653.

Nakano M, Takahashi A, Sakai Y, Nakaya Y. (2007) Modulation of pathogenicity with norepinephrine related to the type III secretion system of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Infect Dis.* 1; 195(9):1353-60.

Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Hook M, Murray BE. (2000) *Enterococcus faecalis* adhesion, Ace mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen Type I. *Infect Immun* 68:5218-24.

Nannini EC, Teng F, Singh KV, Murray BE. (2005) Decreased virulence of a *gls24* mutant of *Enterococcus faecalis* OG1RF in an experimental endocarditis model. *Infect Immun.*73 (11):7772-4.

Naresh R, Hampson DJ. (2011) Exposure to norepinephrine enhances *Brachyspira pilosicoli* growth, attraction to mucin and attachment to Caco-2 cells. *Microbiology.* 157(Pt 2):543-7

Neal CP, Freestone PP, Maggs AF, Haigh RD, Williams PH, Lyte M. (2001) Catecholamine inotropes as growth factors for *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiol Lett.* 15; 194(2):163-9.

Nealson KH, Hastings JW. (1977) Low oxygen is optimal for luciferase synthesis in some bacteria. *Ecological implications.* *Arch Microbiol.* 4; 112 (1):9-16.

Neidig N, Paul R J, Scheu S, Jousset A. (2011) Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 drive complex non-trophic interactions with bacterivorous nematodes. *Microb Ecol* 61, 853-859.

Noble CJ. (1978) Carriage of group D *streptococci* in the human bowel. *J. Clin. Pathol.* 31:1182-1186.

Noe FF, Nickerson WJ. (1958) Metabolism of 2-pyrrolidone and gamma aminobutyric acid by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 75: 674-81.

O

O'Donnell PM, Aviles H, Lyte M, Sonnenfeld G. (2006) Enhancement of *in vitro* growth of pathogenic bacteria by norepinephrine: importance of inoculum density and role of transferrin. *Appl Environ Microbiol.* 72(7):5097-9.

Ogier JC, Calteau A, Forst S, Goodrich-Blair H, Roche D, Rouy Z, Suen G, Zumbihl R, Givaudan A, Tailliez P, Médigue C, Gaudriault S. (2010) Units of plasticity in bacterial genomes: new insight from the comparative genomics of two bacteria interacting with invertebrates, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *BMC Genomics.* 15; 11: 568.

Ogier JC, Serror P. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126:291-301.

O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. (2004). The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 201(2): 167-180.

O'Hara AM, Shanahan F. (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports* 7, 688-693.

Okuda J, Hayashi N, Okamoto M, Sawada S, Minagawa S, Yano Y, Gotoh N. (2010) Translocation of *Pseudomonas aeruginosa* from the intestinal tractis mediated by the binding of ExoS to an na, K-ATPase regulator, FXYD3. *Infect. Immun.* 78, 4511–4522.

Olivares M, Laparra JM, Sanz Y. (2013) Host genotype, intestinal microbiota and inflammatory disorders. *Br J Nutr.*109 Suppl 2:S76-80.

Olmsted SB, Kao SM, van Putte LJ, Gallo JC, Dunny GM. (1991) Role of the pheromone-inducible surface protein Asc10 in mating aggregate formation and conjugal transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10. *J Bacteriol.* 173(23):7665-72.

Omaye S. (2004) Food and nutritional toxicology. Boca Raton, FL, USA: CRC PRESS.

Osawa K, Nakajima M, Kataoka N, Arakawa S, Kamidono S. (2002) Evaluation of antibacterial efficacy of drugs for urinary tract infections by genotyping based on pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *J Infect Chemother* 8, 353-357.

Osmon S, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. (2004) Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 125, 607–616.

Ostroff RM, Vasil AI, Vasil ML. (1990) Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of bacteriology 172, 5915-5923.

O'Toole GA, Kolter R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol. 30(2):295-304.

P

Padmanabhan J, Parthasarathi R, Subramanian V, Chattaraj PK. (2005) Molecular structure, reactivity, and toxicity of the complete series of chlorinated benzenes. J Phys Chem A 109, 11043-11049.

Palleroni NJ. (1984) Family 1. *Pseudomonaceae* In: bergey's manuel of systematic bacteriology .Volume 1.

Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. (2007) Development of the human infant intestinal microbiota. PLoS Biol. 5(7):e177.

Papadopoulou C, Economou V, Sakkas H, Gousia P, Giannakopoulos X, Dontorou C, Filioussis G, Gessouli H, Karanis P, Levediotou S. (2008) Microbiological quality of indoor and outdoor swimming pools in Greece: investigation of the antibiotic resistance of the bacterial isolates. Int J Hyg Environ Health 211, 385-397.

Papoff P, Ceccarelli G, d'Ettorre G, Cerasaro C, Caresta E, Midulla F, Moretti C. (2012). Gut microbial translocation in critically ill children and effects of supplementation with pre-and probiotics. Int.J.Microbiol. 151393.

Papp M, Altorjay I, Lakatos PL. (2007) Relevance of serologic studies in inflammatory bowel diseases. Orv Hetil. 13; 148 (19):887-96.

Park AJ, Collins J, Blennerhassett PA, GhiaJE, Verdu EF, Bercik P, Collins SM. (2013) Altered colonic function and microbiota profile in a mouse model of chronic depression. Neurogastroenterol Motil. 25 (9) : 733–e575.

Parker CT, Sperandio V. (2009) Cell-to-cell signalling during pathogenesis. Cell Microbiol.11 (3):363-9.

Pasargiklian I, Lusco G, Paizis G, Mascheroni E. (1996) Ticarcillin/clavulanic acid: determination of minimal inhibitory concentrations against bacterial strains isolated from patients in intensive care units. Comparison with other agents. J Chemother 8, 113-121.

Patel SK, Pratap CB, Verma AK, Jain AK, Dixit VK, Nath G. (2013) *Pseudomonas fluorescens*-like bacteria from the stomach: a microbiological and molecular study. World J Gastroenterol 19(7):1056–1067

Paulsen IT, Banerjee L, Myers GS, Nelson KE, Seshadri R, Read TD, Fouts DE, Eisen JA, Gill SR, Heidelberg JF, Tettelin H, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac L, Beanan M, Daugherty S, DeBoy RT, Durkin S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, Vamathevan J, Tran B, Upton J, Hansen T, Shetty J, Khouri H, Utterback T, Radune D, Ketchum KA,

- Dougherty BA, Fraser CM. (2003)** Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 299:2071-2074.
- Payment P, Coffin E, Paquette G. (1994)** Blood agar to detect virulence factors in tap water heterotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 60, 1179-1183.
- Pédrón T, Mulet C, Dauga C, Frangeul L, Chervaux C, Grompone G, Sansonetti PJ. (2012)** A crypt-specific core microbiota resides in the mouse colon. *MBio*. 22;3(3).
- Pei Z, Bini EJ, Yang L, Zhou M, Francois F, Blaser MJ. (2004)** Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(12):4250-5.
- Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E. (2009)** Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *infect Genet Evol*. 9(6):1132-47.
- Pearson JP, Feldman M, Iglewski BH, Prince A. (2000)** *Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signaling Is Required for Virulence in a Model of Acute Pulmonary Infection *Infect Immun*. 68(7): 4331–4334.
- Perez M, Calles-Enríquez M, Nes I, Martin MC, Fernandez M, Ladero V, Alvarez MA. (2015)** Tyramine biosynthesis is transcriptionally induced at low pH and improves the fitness of *Enterococcus faecalis* in acidic environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 99, 3547-3558.
- Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH. (1999)** Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28; 96(20):11229-34.
- Pessione E. (2012)** Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2:86. doi: 10.3389/fcimb.2012.00086
- Petra AI, Panagiotidou S, Hatziagelaki E, Stewart JM, Conti P, Theoharides TC. (2015)** Gut-Microbiota-Brain Axis and Its Effect on Neuropsychiatric Disorders With Suspected Immune Dysregulation. *Clin Ther*. 37 (5):984-95
- Pfleiderer A, Lagier JC, Armougom F, Robert C, Vialettes B, Raoult D. (2013)** Culturomics identified 11 new bacterial species from a single anorexia nervosa stool sample. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 32(11):1471-1481.
- Pham VH, Jeong SW, Kim J. (2015)** *Psychrobacillus soli* sp. nov., capable of degrading oil, isolated from oil-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 65(9):3046-52.
- Picot L, Abdelmoula SM, Merieau A, Leroux P, Cazin L, Orange N, Feuilloley MG (2001)** *Pseudomonas fluorescens* as a potential pathogen: adherence to nerve cells. *Microbes Infect* 3, 985-995.
- Picot L, Chevalier, S, Mezghani-Abdelmoula S, Merieau A, Lesouhaitier O, Leroux P, Cazin L, Orange N, Feuilloley MG. (2003)** Cytotoxic effects of the lipopolysaccharide from *Pseudomonas fluorescens* on neurons and glial cells. *Microb Pathog* 35, 95-106.
- Picot L, Mezghani-Abdelmoula S, Chevalier S, Merieau A, Lesouhaitier O, Guerillon J, Cazin L, Orange, N, Feuilloley MG. (2004)** Regulation of the cytotoxic effects of *Pseudomonas fluorescens* by growth temperature. *Research in microbiology* 155, 39-46.

Pillar CM, Gilmore MS. (2004) Enterococcal virulence--pathogenicity island of *E. Faecalis*. Front Biosci 9:2335-2346.

Pillar CM, Hobden JA. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and keratitis in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 43, 1437-1444.

Podbielski A, Kreikemeyer B. (2004) Cell density--dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. Int J Infect Dis.8 (2):81-95. Review.

Porat R, Clark BD, Wolff SM, Dinarello CA. (1991) Enhancement of growth of virulent strains of *Escherichia coli* by interleukin-1. Science.18; 254(5030):430-2.

Porwancher R, Sheth A, S Remphrey S, Taylor E, Hinkle C, Zervos M. (1997) Epidemiological study of hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: possible transmission by an electronic ear-probe thermometer. Infect Control Hosp Epidemiol. 18 (11):771-3.

Prabakaran G, Hoti SL, Rao HS, Vijjapu S. (2015) Di-rhamnolipid is a mosquito pupicidal metabolite from *Pseudomonas fluorescens* (VCRC B426). Acta Trop. 148:24-31.

Prabakaran G, Paily KP, Padmanabhan V, Hoti SL, Balaraman K. (2003) Isolation of a *Pseudomonas fluorescens* metabolite/exotoxin active against larvae and pupae of vector mosquitoes. Pest Manag Sci 59, 21-4.

Preston GM, Bertrand N, Rainey PB. (2001) Type III secretion in plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. Mol Microbiol 41, 999-1014.

Preuss I, Kaiser I, Gehring U. (2001) Molecular characterization of a phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C. European journal of biochemistry / FEBS 268, 5081-5091.

Price-Whelan A, Dietrich LE, Newman DK. (2006) Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. Nat Chem Biol 2, 71-78.

Puckett A, Davison G, Entwistle CC, Barbara JA. (1992) Post transfusion septicaemia 1980-1989: importance of donor arm cleansing. J Clin Pathol 45, 155-157.

Q

Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. (2000) Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. Infect Immun.68 (5):2579-86.

R

Rajilic-Stojanovic M. (2013) Function of the microbiota. Best practice & research Clinical gastroenterology 27, 5-16.

Rana NF, Sauvageot N, Laplace JM, Bao Y, Nes I, Rincé A, Posteraro B, Sanguinetti M, Hartke A. (2013) Redox balance via lactate dehydrogenase is important for multiple stress resistance and virulence in *Enterococcus faecalis*. Infect. Immun. 81, 2662-2668.

Rasko DA, Moreira CG, Li de R, Reading NC, Ritchie JM, Waldor MK, Williams N, Taussig R, Wei S, Roth M, Hughes DT, Huntley JF, Fina MW, Falck JR, Sperandio V. (2008) Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science*. 321(5892):1078-80.

Read RR, Costerton JW. (1987) Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Can J Microbiol*. 33(12):1080-90.

Reading NC, Sperandio V. (2006) Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 254 (1):1-11. Review.

Reading NC, Torres AG, Kendall MM, Hughes DT, Yamamoto K, Sperandio V. (2007) A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. *J Bacteriol*. 189(6):2468-76

Rebière-Huët J, Guérillon J, Pimenta AL, Di Martino P, Orange N, Hulen C. (2002) Porins of *Pseudomonas fluorescens* MFO as fibronectin-binding proteins. *FEMS Microbiol Lett*. 24; 215 (1):121-6.

Reinsch N, Plicht B, Lind A, Janosi RA, Buck T, Kamler M, Jakob H, Naber CK, Erbel R. (2008) Recurrent infective endocarditis with uncommon Gram-negative *Pasteurella multocida* and *Pseudomonas aeruginosa*: a case report. *J Heart Valve Dis* 17, 710-713.

Reyes-Haro D, Labrada-Moncada FE, Miledi R, Martínez-Torres A. (2015) Dehydration-Induced Anorexia Reduces Astrocyte Density in the Rat Corpus Callosum. *Neural Plast*. 2015; 2015:474917.

Rezzonico F, Binder C, Défago G, Moëgne-Loccoz Y. (2005) The type III secretion system of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* KD targets the phytopathogenic Chromista *Pythium ultimum* and promotes cucumber protection. *Mol Plant Microbe Interact*.; 18 (9):991-1001.

Ribeiro-da-Silva A, Hökfelt T. (2000) Neuroanatomical localisation of Substance P in the CNS and sensory neurons. *Neuropeptides*. 34(5):256-71.

Richards, Edwards MJJR, Culver DH, Gaynes RP. (1999) Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit. Care Med*. 27:887-892.

Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. (2000) Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*. 21:510-515.

Roberts A, Matthews JB, Socransky SS, Freestone PP, Williams PH, Chapple IL. (2002) Stress and the periodontal diseases: effects of catecholamines on the growth of periodontal bacteria *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol*. 17(5):296-303.

Roberts JC, Singh KV, Okhuysen PC, Murray BE. (2004) Molecular epidemiology of the *fsr* locus and of gelatinase production among different subsets of *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol*. 42(5):2317-20.

- Rodríguez-Navarro DN, Dardanelli MS, Ruíz-Saínz JE. (2007)** Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol Lett.* 272(2):127-36.
- Rolhion N, Darfeuille-Michaud A. (2007)** Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 13(10):1277-83. Review.
- Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. (2006)** Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev.* 86(4):1309-79.
- Rosay T, Bazire A, Diaz S, Clamens T, Blier AS, Mijouin L, Hoffmann B, Sergent JA, Bouffartigues E, Boireau W, Vieillard J, Hulen C, Dufour A, Harmer NJ, Feuilloley MG, Lesouhaitier O. (2015)** *Pseudomonas aeruginosa* Expresses a Functional Human Natriuretic Peptide Receptor Ortholog: Involvement in Biofilm Formation. *MBio.* 25; 6 (4)
- Rosenfeld Y, Shai Y. (2006)** Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochim Biophys Acta* 1758, 1513-1522.
- Rossignol G, Sperandio D, Guerillon J, Duclairoir Poc C, Soum- Soutera E, Orange N, Feuilloley MG, Merieau A. (2009)** Phenotypic variation in the *Pseudomonas fluorescens* clinical strain MFN1032. *Res Microbiol* 160(5):337–344
- Rossignol G, Merieau A, Guerillon J, Veron W, Lesouhaitier O, Feuilloley MG, Orange, N. (2008)** Involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of a clinical strain of *Pseudomonas fluorescens*. *BMC Microbiol* 8, 189.
- Rückert C, Birmes FS, Müller C, Niewerth H, Winkler A, Fetzner S, Kalinowski J. (2015)** Complete genome sequence of *Rhodococcus erythropolis* BG43 (DSM 46869), a degrader of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecules. *J Biotechnol.* 22. pii: S0168-1656(15)30071-7.
- Rudrappa T, Splaine RE, Biedrzycki ML, Bais HP. (2008)** Cyanogenic pseudomonads influence multitrophic interactions in the rhizosphere. *PLoS One* 3, e2073.
- Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. (2009)** *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 7:526–536.
- Ryall B, Davies JC, Wilson R, Shoemark A, Williams HD. (2008)** *Pseudomonas aeruginosa*, cyanide accumulation and lung function in CF and non-CF bronchiectasis patients. *Eur Respir J* 32, 740-747.

S

- Sahm DF, Kissinger J, Gilmore MS, Murray PR, Mulder R, Solliday J, Clarke B. (1989)** *In vitro* susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 33, 1588-1591.
- Sakai M, Atsuta S, Kobayashi M. (1989)** *Pseudomonas fluorescens* isolated from the diseased rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Kitasato Arch Exp Med* 62, 157-162.

- Saldías MS, Ortega X, Valvano MA. (2009)** *Burkholderia cenocepacia* O antigen lipopolysaccharide prevents phagocytosis by macrophages and adhesion to epithelial cells. *J Med Microbiol.* 58 (Pt 12):1542-8.
- Salonen A, de Vos WM, Palva A. (2010)** Gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: present state and perspectives. *Microbiology* 156, 3205-3215.
- Sanderson K, Wescombe, L, Kirov SM, Champion A, Reid DW. (2008)** Bacterial cyanogenesis occurs in the cystic fibrosis lung. *Eur Respir J* 32, 329-333.
- Sandler RH, Finegold SM, Bolte ER, Buchanan CP, Maxwell AP, Väisänen ML, Nelson MN, Wexler HM. (2000)** Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J Child Neurol.* 15 (7):429-35.
- Sandrini S, Alghofaili F, Freestone P, Yesilkaya H. (2014)** Host stress hormone norepinephrine stimulates pneumococcal growth, biofilm formation and virulence gene expression. *BMC Microbiol.* 4; 14:180.
- Sartor RB. (2008)** Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 134(2):577-94.
- Savage DC. (1977)** Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol.* 31:107-33
- Sayner SL, Frank DW, King J, Chen H, VandeWaa J, Stevens T. (2004)** Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ Res* 95, 196-203.
- Scales BS, Dickson RP, LiPuma JJ, Huffnagle GB. (2014)** Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clin Microbiol Rev.* 27(4):927-48. Review.
- Scarpari LM, Lambais MR, Silva DS, Carraro DM, Carrer H. (2003)** Expression of putative pathogenicity-related genes in *Xylella fastidiosa* grown at low and high cell density conditions in vitro. *FEMS Microbiol Lett.* 16; 222 (1):83-92.
- Schaller A, Kuhn R, Kuhnert P, Nicolet J, Anderson TJ, MacInnes JI, Segers RP, Frey J. (1999)** Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology.* 145 (Pt 8):2105-16.
- Schleifer KH, Kilpper-Bälz R (1984)** Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:31-34.
- Schumann A, Nutten S, Donnicola D, Comelli EM, Mansourian R, Cherbut C, Cortesy-Theulaz I, Garcia-Rodenas C. (2005)** Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome. *Physiol Genomics.* 17; 23(2):235-45.
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. (2010)** Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 90(3):859-904.

Sela S, Hammer-Muntz O, Krifucks O, Pinto R, Weisblit L, Leitner G. (2007) Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from mastitis outbreaks in dairy herds. J Dairy Res 74, 425-429.

Shalaby A. (1996) Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Res. Int., 29, 675-690.

Shankar N, Lockatell CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. (2001) Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. Infect Immun.69 (7):4366-72.

Shimizu M, Shigeri Y, Tatsu Y, Yoshikawa S, Yumoto N. (1999) Enhancement of antimicrobial activity of neuropeptide Y by N-terminal truncation. Antimicrob Agents Chemother. 42(10):2745-6.

Sifri CD, Mylonakis E, Singh KV, Qin X, Garsin DA, Murray BE, Ausubel FM, Calderwood SB. (2002) Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. Infect Immun.70 (10):5647-50.

Silby MW, Winstanley C, Godfrey SA, Levy SB, Jackson RW. (2011) *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. FEMS Microbiol Rev. 35(4):652-80

Silvestre JF, Betlloch MI. (1999) Cutaneous manifestations due to *Pseudomonas* infection. Int J Dermatol. 38(6):419-31. Review.

Singh M, Mukhopadhyay K. (2014) Alpha-melanocyte stimulating hormone: an emerging anti-inflammatory antimicrobial peptide. Biomed Res Int. 2014:874610.

Singhal V, Misra M, Klibanski A. (2014) Endocrinology of anorexia nervosa in young people: recent insights. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 21(1):64-70.

Siragusa S, De Angelis M, Di Cagno R, Rizzello CG, Coda R, Gobbetti M. (2007) Synthesis of gamma-aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. Appl Environ Microbiol. 73(22):7283-90.

Skindersoe ME, Zeuthen LH, Brix S, Fink LN, Lazenby J, Whittall C, Williams P, Diggie SP, Froekiaer H, Cooley M, Givskov M. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules interfere with dendritic cell-induced T-cell proliferation. FEMS Immunol Med Microbiol. 55(3):335-45.

Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ. (2007) Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. Seminars in immunology 19, 59-69.

Soberon-Chavez G, Lepine F, Deziel E. (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol Biotechnol 68, 718-725.

Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A. (2008) Enterococcal infections & antimicrobial resistance. Indian J Med Res 128:111-121.

Spencer H, Karavolos MH, Bulmer DM, Aldridge P, Chhabra SR, Winzer K, Williams P, Khan CM. (2010) Genome-wide transposon mutagenesis identifies a role for host

neuroendocrine stress hormones in regulating the expression of virulence genes in *Salmonella*. J Bacteriol. 192(3):714-24.

Sperandio D, Decoin V, Latour X, Mijouin L, Hillion M, Feuilloley MGJ, Orange N, Merieau A. (2012) Virulence of the *Pseudomonas fluorescens* clinical strain MFN1032 towards *Dictyostelium discoideum* and macrophages in relation with type III secretion system. BMC Microbiol 12: 223.

Sperandio D, Rossignol G, Guerillon J, Connil N, Orange N, Feuilloley MG, Merieau A. (2010) Cell-associated hemolysis activity in the clinical strain of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032. BMC Microbiol 10:124

Sperandio V, Li CC, Kaper JB. (2002) Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. Infect Immun.70 (6):3085-93.

Sperandio V, Torres AG, Kaper JB. (2002) Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. Mol Microbiol. 43(3):809-21.

Stintzi A, Johnson Z, Stonehouse M, Ochsner U, Meyer JM, Vasil ML, Poole K. (1999) The pvc gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa*: role in synthesis of the pyoverdine chromophore and regulation by PtxR and PvdS. J Bacteriol 181(13):4118–4124

Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 406, 959-964.

Strakhovskaia MG, Ivanova EV, Fraïnkina GIa. (1993) Stimulatory effect of serotonin on the growth of the yeast *Candida guilliermondii* and the bacterium *Streptococcus faecalis* Mikrobiologija.62 (1):46-9.

Sturbelle RT, Avila LF, Roos TB, Borchardt JL, de Cássia Dos Santos da Conceição R, Dellagostin OA, Leite FP. (2015) The role of quorum sensing in *Escherichia coli* (ETEC) virulence factors. Vet Microbiol. 21. pii: S0378-1135(15)30005-5.

Sun YY, Sun L. (2015) *Pseudomonas fluorescens*: iron-responsive proteins and their involvement in host infection. Vet Microbiol. 17; 176(3-4):309-20.

Sundin C, Hallberg B, Forsberg A. (2004) ADP-ribosylation by exoenzyme T of *Pseudomonas aeruginosa* induces an irreversible effect on the host cell cytoskeleton *in vivo*. FEMS Microbiol Lett 234, 87-91.

Sutton CL, Kim J, Yamane A, Dalwadi H, Wei B, Landers C, Targan SR, Braun J. (2000) Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. Gastroenterology 119, 23-31.

Swarbrick ET, Kingham JG, Price HL, Blackshaw AJ, Griffiths PD, Darougar S, Buckell NA. (1979) Chlamydia, cytomegalovirus, and *Yersinia* in inflammatory bowel disease. *Lancet*. 2(8132):11-2.

T

Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, Ugarte E, Muñoz-Tamayo R, Paslier DL, Nalin R, Dore J, Leclerc M. (2009) Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol*. 11(10):2574-2584.

Tavano F, di Mola FF, Latiano A, Palmieri O, Bossa F, Valvano MR, Latiano T, Annese V, Andriulli A, di Sebastiano P. (2012) Neuroimmune interactions in patients with inflammatory bowel diseases: disease activity and clinical behavior based on Substance P serum levels. *J Crohns Colitis* 6(5): 563-570.

Teng F, Jacques-Palaz KD, Weinstock GM, Murray BE. (2002) Evidence that the enterococcal polysaccharide antigen gene (epa) cluster is widespread in *Enterococcus faecalis* and influences resistance to phagocytic killing of *E. faecalis*. *Infect Immun*. 70 (4):2010-5.

Teng F, Nannini EC, Murray BE. (2005) Importance of gls24 in virulence and stress response of *Enterococcus faecalis* and use of the Gls24 protein as a possible immunotherapy target. *J Infect Dis*. 1; 191 (3):472-80.

Tennoune N, Chan P, Breton J, Legrand R, Chabane YN, Akkermann K, Järv A, Ouelaa W, Takagi K, Ghouzali I, Francois M, Lucas N, Bole-Feysot C, Pestel-Caron M, do Rego JC, Vaudry D, Harro J, Dé E, Déchelotte P, Fetissov SO. (2014) Bacterial ClpB heat-shock protein, an antigen-mimetic of the anorexigenic peptide α -MSH, at the origin of eating disorders. *Transl Psychiatry*. 7; 4:e458.

Thavasi R, Aparnadevi K, Jayalakshmi S, Balasubramanian T. (2007) Plasmid mediated antibiotic resistance in marine bacteria. *J Environ Biol* 28, 617-621.

Thompson TL, Marth EH. (1986) Changes in Parmesan cheese during ripening: microfloracolonies, enterococci, anaerobes, propionibacteria and staphylococci. *Milchwissenschaft* 41:201-204.

Thurlow LR, Thomas VC, Narayanan S, Olson S, Fleming SD, Hancock LE. (2010) Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*. 78 (11):4936-43.

Tilg H, Adolph TE. (2015) influence of the human intestinal microbiome on obesity and metabolic dysfunction. *Curr Opin Pediatr*. 26(4):496-501.

Tremaroli V, Backhed F. (2012) Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489, 242-249.

Troseid M, Nestvold TK, Rudi K, Thoresen H, Nielsen EW, Lappégard KT. (2013) Plasma lipopolysaccharide is closely associated with glycemic control and abdominal obesity: evidence from bariatric surgery. *Diabetes care* 36, 3627-3632.

Tsai F, Coyle WJ. (2009) The microbiome and obesity: is obesity linked to our gut flora? *Curr Gastroenterol Rep.* 11 (4):307-13. Review.

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI. (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 22; 457 (7228):480-4.

Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. (2008) Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe.* 17; 3 (4):213-23.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 21; 444 (7122):1027-31.

Turvill JL, Farthing MJ. (2000) Role of the neuroendocrine system in pathogenesis of gastroenteritis. *Curr Opin Infect Dis.* 13(5):523-529.

U

Ubeda C, Bucci V, Caballero S, Djukovic A, Toussaint NC, Equinda M, Lipuma L, Ling L, Gobourne A, No D, Taur Y, Jenq RR, van den Brink MR, Xavier JB, Pamer EG. (2013) Intestinal Microbiota Containing *Barnesiella* Species Cures Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Colonization. *Infect Immun.* 81:965–973.

Usher LR, Lawson RA, Geary I, Taylor CJ, Bingle CD, Taylor GW, Whyte MK. (2002) Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *J Immunol* 168, 1861-1868.

Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. (1988) Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1:57-58.

V

Vallès Y, Gosalbes MJ, de Vries LE, Abellán JJ, Francino MP, Van Belkum M, Stiles M, (2000) Metagenomics and development of the gut microbiota in infants. *Clin Microbiol Infect.* 18 Suppl 4:21-6.

Van Delden C. (2007) *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: how should we treat them? *Int J Antimicrob Agents* 30, S71-S75.

Van Schaik W (2015) The human gut resistome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015 Jun 5; 370(1670):20140087.

Vebø HC, Snipen L, Nes IF, Brede DA. (2009) The transcriptome of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecalis* V583 reveals adaptive responses to growth in blood. *PLoS. One.* 4:e7660.

Vergis EN, Shankar N, Chow JW, Hayden MK, Snyderman DR, Zervos MJ, Linden PK, Wagener MM, Muder RR. (2002) Association between the presence of Enterococcal virulence factors gelatinase, haemolysin and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis* 2002; 35:570-5.

Veron W, Orange N, Feuilloley MG, Lesouhaitier O. (2008) Natriuretic peptides modify *Pseudomonas fluorescens* cytotoxicity by regulating cyclic nucleotides and modifying LPS structure. *BMC Microbiol* 8, 114.

Vesper SJ. (1987) Production of Pili (Fimbriae) by *Pseudomonas fluorescens* and Correlation with Attachment to Corn Roots. *Applied and environmental microbiology* 53, 1397-1405.

Visca P, Leoni L, Wilson MJ, Lamont IL. (2002) Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol Microbiol.* 45(5):1177-90. Review.

Vizioli J, Salzet M. (2002) Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends. Pharmacol. Sci.* 23:494-496.

Vouldoukis I, Shai Y, Nicolas P, Mor A. (1996) Broad spectrum antibiotic activity of the skin-PYY. *FEBS Lett.* 19; 380 (3):237-40.

W

Waidmann MS, Bleichrodt FS, Laslo T, Riedel CU. (2011) Bacterial luciferase reporters: the Swiss army knife of molecular biology. *Bioeng Bugs.*2 (1):8-16.

Walter J, Ley R. (2011) The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annu Rev Microbiol.* 2011; 65:411-29.

Walters M, Sperandio V. (2006) Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 74(10):5445-55.

Wang Y, Hay ID, Rehman ZU, Rehm BH. (2015) Membrane-anchored MucR mediates nitrate-dependent regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 29.

Wei B, Huang T, Dalwadi H, Sutton CL, Bruckner D, Braun J. (2002) *Pseudomonas fluorescens* encodes the Crohn's disease-associated I2 sequence and T-cell superantigen. *Infect Immun* 70, 6567-6575.

Wei HL, Zhang LQ. (2006) Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 89(2):267-80.

Weigel WA, Demuth DR. (2015) QseBC, a two component bacterial adrenergic receptor and global regulator of virulence in Enterobacteriaceae and Pasteurellaceae. *Mol Oral Microbiol.* 1. doi: 10.1111/omi.12138. Review.

Wells CL, Jechorek RP, Erlandsen SL. (1990) Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *J. Infect. Dis.* 162:82-90.

Wheeler AL, Hartel PG, Godfrey DG, Hill JL, Segars WI. (2002) Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking. *J. Environ. Qual.* 31:1286-1293.

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9; 95(12):6578-83. Review.

Whorwell PJ, Davidson IW, Beeken WL, Wright R. (1978) Search by immunofluorescence for antigens of Rotavirus, *Pseudomonas maltophilia*, and *Mycobacterium kansasii* in Crohn's disease. *Lancet*. 2(8092 Pt 1):697-8.

Willems RJ, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, Grundmann H, Bonten MJ (2005) Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg. Infect. Dis.* 11:821-828.

Williams BL, Hornig M, Parekh T, Lipkin WI. (2012) Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of *Sutterella* species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. *MBio*. 10;3 (1). pii: e00261-11.

Winzer K, Hardie KR, Williams P. (2003) LuxS and autoinducer-2: their contribution to quorum sensing and metabolism in bacteria. *Adv Appl Microbiol.* 53:291-396.

Woods DE, Straus DC, Johanson WGJr, Berry VK, Bass JA. (1980) Role of pili in adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian buccal epithelial cells. *Infect Immun* 29, 1146-1151.

Wu L, Estrada O, Zaborina O, Bains M, Shen L, Kohler JE, Patel N, Musch MW, Chang EB, Fu YX, Jacobs MA, Nishimura MI, Hancock RE, Turner JR, Alverdy JC. (2005) Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*. 29; 309 (5735):774-7.

Wurtele M, Renault L, Barbieri JT, Wittinghofer A, Wolf E. (2001) Structure of the ExoS GTPase activating domain. *FEBS Lett* 491, 26-29.

X

Xiao G, Déziel E, He J, Lépine F, Lesic B, Castonguay MH, Milot S, Tampakaki AP, Stachel SE, Rahme LG. (2006) MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Mol Microbiol.* 2006 Dec; 62(6):1689-99.

Xiong Y, Wang GZ, Zhou JQ, Xia BQ, Wang XY, Jiang B. (2014) Serum antibodies to microbial antigens for Crohn's disease progression: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 26(7):733-42.

Y

Yahr TL, Vallis AJ, Hancock MK, Barbieri JT, Frank DW. (1998) ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13899-13904.

Yamamoto M, Ina Y, Takada K, Noda M, Morishita M, Senda Y, Torii Y, Kakihara H, Yoshikawa K, Sugiura T. (1991) Therapeutic efficacy of imipenem/cilastatin sodium on respiratory tract infections in lung cancer patients. *Jpn J Antibiot* 44, 388-397.

Yamashita K, Kaneko H, Yamamoto S, Konagaya T, Kusugami K, Mitsuma T. (1998) Inhibitory effect of somatostatin on *Helicobacter pylori* proliferation *in vitro*. *Gastroenterology*, 115, 1123-1130.

Yang Q, Anh ND, Bossier P, Defoirdt T. (2014) Norepinephrine and dopamine increase motility, biofilm formation, and virulence of *Vibrio harveyi*. *Front Microbiol.* 6; 5:584.

Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, Nagler CR, Ismagilov RF, Mazmanian SK, Hsiao EY. (2015) Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell*, Volume 161, Issue 2, Pages 264–276

Yau, Leong, Zeng, Wasinger (2013) Proteomics and Metabolomics in Inflammatory Bowel Disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 28 (7):1076-1086.

Z

Zaborina O, Lepine F, Xiao G, Valuckaite V, Chen Y, Li T, Ciancio M, Zaborin A, Petrof EO, Turner JR, Rahme LG, Chang E, Alverdy JC. (2007) Dynorphin activates quorum sensing quinolone signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 3(3):e35.

Zeng J, Teng F, Weinstock GM, Murray BE. (2004) Translocation of *Enterococcus faecalis* Strains across a Monolayer of Polarized Human Enterocyte-Like T84 Cells *J Clin Microbiol.* 42 (3):1149-54.

Zetterström R, Bennet R, Nord KE. (1994) Early infant feeding and micro-ecology of the gut *Acta Paediatr Jpn.* 36(5):562-71.

Zhang WW, Hu YH, Wang HL, Sun L. (2009) Identification and characterization of a virulence-associated protease from a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain. *Vet Microbiol* 139, 183-188.

Travaux en collaboration

I. Article 3

Cytotoxicité et potentiel inflammatoire de deux souches de *Pseudomonas mosselii* isolées d'échantillons cliniques de patients hospitalisés

Leneveu-Jenvrin C, Madi A, Bouffartigues E, Biaggini K, Feuilloley M, Chevalier S, Connil N.

BMC Microbiol (2013), 13:123.

[BMC Microbiol](#), 2013 May 29;13:123. doi: 10.1186/1471-2180-13-123.

Cytotoxicity and inflammatory potential of two *Pseudomonas mosselii* strains isolated from clinical samples of hospitalized patients.

[Leneveu-Jenvrin C¹](#), [Madi A](#), [Bouffartigues E](#), [Biaggini K](#), [Feuilloley M](#), [Chevalier S](#), [Connil N](#).

⊕ Author information

Abstract

BACKGROUND: The genus *Pseudomonas* includes a heterogeneous set of microorganisms that can be isolated from many different niches and nearly 100 different strains have been described. The best characterized bacterium is *Pseudomonas aeruginosa* which is the primary agent of opportunistic infection in humans, causing both acute and chronic infections. Other species like *fluorescens*, *putida* or *mosselii* have been sporadically isolated from hospitalized patients but their association with the pathology often remains unclear.

RESULTS: This study focuses on the cytotoxicity and inflammatory potential of two strains of *Pseudomonas mosselii* (ATCC BAA-99 and MFY161) that were recently isolated from clinical samples of hospitalized patients. The behavior of these bacteria was compared to that of the well-known opportunistic pathogen *P. aeruginosa* PAO1. We found that *P. mosselii* ATCC BAA-99 and MFY161 are cytotoxic towards Caco-2/TC7 cells, have low invasive capacity, induce secretion of human β -defensin 2 (HBD-2), alter the epithelial permeability of differentiated cells and damage the F-actin cytoskeleton.

CONCLUSIONS: These data bring new insights into *P. mosselii* virulence, since this bacterium has often been neglected due to its rare occurrence in hospital.

Le genre *Pseudomonas* rassemble des bactéries pouvant être retrouvées dans des niches écologiques variées, environ 100 souches différentes ont pu être décrites. La bactérie la mieux caractérisée est *Pseudomonas aeruginosa*, pathogène opportuniste chez l'homme pouvant provoquer à la fois des infections aiguës ou chroniques. D'autres espèces comme *fluorescens*, *putida* ou *mosselii* ont été sporadiquement isolées de patients hospitalisés sans qu'un lien direct avec la pathologie ne soit très clair. Dans cette étude, la cytotoxicité et le potentiel inflammatoire de deux souches de *P. mosselii* (ATCC BAA-99 and MFY161) récemment isolées d'échantillons cliniques de patients hospitalisés ont été évalués. Le comportement de ces bactéries a été comparé à celui de *P. aeruginosa* PAO1. Ces travaux ont montré que les souches de *P. mosselii* ATCC BAA-99 et MFY161 sont cytotoxiques envers les cellules Caco-2/TC7 mais possèdent une capacité d'invasion faible. Ces bactéries induisent la sécrétion de β -defensine 2 humaine (HBD-2), altèrent la perméabilité épithéliale des cellules différenciées et entraînent des dégradations au niveau du cytosquelette d'actine F des cellules Caco-2/TC7. Cette étude a permis de mettre en évidence la virulence potentielle de *P. mosselii*, bactérie souvent négligée en milieu hospitalier en raison de sa faible occurrence.

Ma contribution à ces travaux a consisté principalement à participer, à la culture et à l'entretien des cellules Caco-2/TC7 (passage des cellules, ensemencement sur plaques et inserts), et au dénombrement des bactéries invasives.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Cytotoxicity and inflammatory potential of two *Pseudomonas mosselii* strains isolated from clinical samples of hospitalized patients

Charlène Leneveu-Jenvrin, Amar Madi, Emeline Bouffartigues, Kelly Biaggini, Marc Feuilloley, Sylvie Chevalier and Nathalie Connil*

Abstract

Background: The genus *Pseudomonas* includes a heterogeneous set of microorganisms that can be isolated from many different niches and nearly 100 different strains have been described. The best characterized bacterium is *Pseudomonas aeruginosa* which is the primary agent of opportunistic infection in humans, causing both acute and chronic infections. Other species like *fluorescens*, *putida* or *mosselii* have been sporadically isolated from hospitalized patients but their association with the pathology often remains unclear.

Results: This study focuses on the cytotoxicity and inflammatory potential of two strains of *Pseudomonas mosselii* (ATCC BAA-99 and MFY161) that were recently isolated from clinical samples of hospitalized patients. The behavior of these bacteria was compared to that of the well-known opportunistic pathogen *P. aeruginosa* PAO1. We found that *P. mosselii* ATCC BAA-99 and MFY161 are cytotoxic towards Caco-2/TC7 cells, have low invasive capacity, induce secretion of human β -defensin 2 (HBD-2), alter the epithelial permeability of differentiated cells and damage the F-actin cytoskeleton.

Conclusions: These data bring new insights into *P. mosselii* virulence, since this bacterium has often been neglected due to its rare occurrence in hospital.

Keywords: *Pseudomonas mosselii*, Cytotoxicity, Inflammation, F-actin cytoskeleton damage

Background

The genus *Pseudomonas* is one of the most diverse and ecologically significant bacterial groups on the planet. The large size and the plasticity of their genome explain at least partly their ability to cope with different forms of stresses (physical, chemical or antimicrobial agents) resulting in their widespread distribution [1]. The genus *Pseudomonas* includes more than 100 species, a number that is increasing in time [2]. Nearly each year, a new species is indeed discovered, like *P. duriflava*, *P. batumici* or *P. litoralis* for example, isolated from a desert soil [3], the Caucasus Black sea coast [4] or from Mediterranean seawater [5], respectively. Due to its heterogeneity, the genus *Pseudomonas* has undergone numerous taxonomic

changes depending on the criteria employed for their definition and delineation: phenotypic, physiologic or metabolic characteristics, siderotyping, phylogeny based on 16S rRNA and/or “housekeeping” genes, analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacers (ITS) or the use of functional and ecological genetic markers such as *oprE*, *oprD* or *gacA* [2,6-8].

P. aeruginosa is by far the most studied species in the genus *Pseudomonas*. It is an opportunistic pathogen that provokes nosocomial infection and causes severe acute and chronic infections either in healthy or in immunocompromised individuals [9]. Other *Pseudomonas* species have been suspected in human infections [2]. For example, the very common environmental contaminant *P. fluorescens* has also been associated to various clinical cases [10-14]. This bacterium may particularly colonize the airways, the urinary tract and blood of immunocompromised patients. Recently, some *P. fluorescens* strains

* Correspondence: nathalie.connil@univ-rouen.fr
Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA 4312, Université de Rouen, Normandie Université, 55 rue Saint-Germain, Evreux F-27000, France

were found to behave as human pathogens, since they have a high hemolytic activity and dispose of a complete type three secretion system arsenal [15-18].

P. mosselii is a novel species, which has been characterized in 2002 [19]. It has been linked to *P. putida* clinical strains using 16SrDNA, *oprF* and *oprD* as markers for phylogeny-based studies [7,8]. In 2009, McLellan and Partridge [20] presented a case of prosthetic valve endocarditis caused by *P. mosselii*. These authors proposed that *P. mosselii* should be regarded as a potential pathogen.

In a previous study, we have found that *P. mosselii* strains were able to adhere and to display a necrotic potential on rat glial cells [21]. To get further insights into *P. mosselii* virulence, we investigate in the present work the cytotoxicity and proinflammatory effects of two clinical strains of *P. mosselii* (ATCC BAA-99 and MFY161) on Caco2/TC7 cells, the transepithelial permeability of Caco2/TC7 monolayers and the actin network. The behavior of these bacteria was compared to that of the well-known opportunistic pathogen *P. aeruginosa* PAO1.

Results

Cytotoxicity assay

The cytotoxic effect of *P. mosselii* ATCC BAA-99 and MFY161 on Caco-2/TC7 cells was determined by quantification of lactate dehydrogenase (LDH) released in culture medium (Figure 1). The results show that *P. mosselii* ATCC BAA-99 was the less cytotoxic strain with only 30.1 +/-0.1% of cell lysis after 24 h of infection. *P. mosselii* MFY161 exhibited a cytotoxic activity reaching 64.5 +/-0.1% of lysis and the cytotoxic activity of *P. aeruginosa* PAO1 was higher with 85.6 +/-0.2% of lysis. Enumeration of *P. mosselii* ATCC BAA-99 (5×10^8 CFU.mL⁻¹), *P. mosselii* MFY161 (4.8×10^8 CFU.mL⁻¹) and *P. aeruginosa* PAO1 (4.9×10^8 CFU.mL⁻¹), at the end of the infection period showed that higher cytotoxicity was not due to bacterial overgrowth.

Bacterial invasion assay

The capacity of *P. mosselii* ATCC BAA-99 and MFY161 to enter Caco-2/TC7 cells has been investigated using the gentamicin exclusion test (Figure 2). The results show that the two *P. mosselii* strains studied can have an invasive behavior with $0.5 \pm 0.2 \times 10^5$ and $0.2 \pm 0.2 \times 10^5$ CFU.mL⁻¹ detected intracellularly for *P. mosselii* ATCC BAA-99 and MFY161, respectively. The invasive capacity of *P. aeruginosa* PAO1 was significantly higher with $1.4 \pm 0.1 \times 10^5$ CFU.mL⁻¹ that entered Caco-2/TC7 cells.

Quantification of IL-6, IL-8 and HBD-2 secretion

The bacterial proinflammatory effect of *P. mosselii* ATCC BAA-99, *P. mosselii* MFY161 and *P. aeruginosa* PAO1 was assessed by measuring IL-6 and IL-8 secretion in Caco-2/TC7 after 24 h of infection. The results show that the two strains of *P. mosselii* studied did not induce significant stimulation of IL-6 (Figure 3A) and IL-8 (Figure 3B) secretion in Caco-2/TC7 compared to uninfected cells. On the contrary, the infection of Caco-2/TC7 cells with *P. aeruginosa* PAO1 led to a major secretion of IL-8 with 92 ± 13 pg.mL⁻¹ (Figure 3B).

The human β -defensin-2 (HBD-2) was also quantified in Caco-2/TC7 cells supernatant. The results show that the two strains of *P. mosselii* were able to induce HBD-2 secretion by Caco-2/TC7 cells (Figure 3C). Infection with *P. mosselii* ATCC BAA-99 and MFY161 strains led to a major increase of HBD-2 production by Caco-2/TC7 with 125 ± 26 pg.mL⁻¹ and 136 ± 31 pg.mL⁻¹, respectively, compared to the 4 ± 2 pg.mL⁻¹ basal secretion of HBD-2 in uninfected cells. The induction of HBD-2 by the two *P. mosselii* strains was almost similar to that obtained with *P. aeruginosa* PAO1 (165 ± 14 pg.mL⁻¹).

Transepithelial electrical resistance measurements

The effect of the bacteria on epithelial permeability was evaluated by measuring the TER across differentiated

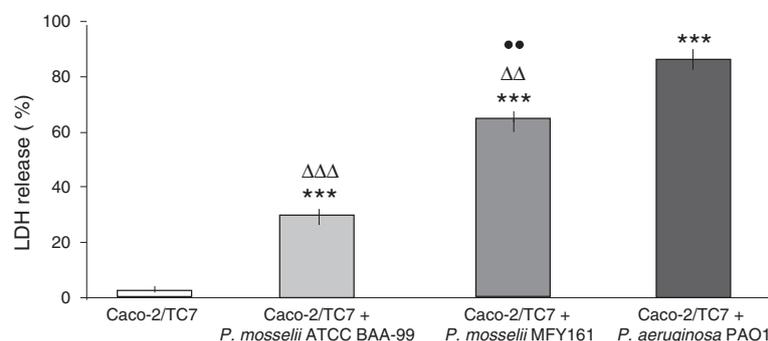


Figure 1 Cytotoxic effects of *P. mosselii* ATCC BAA-99, *P. mosselii* MFY161 and *P. aeruginosa* PAO1 on Caco-2/TC7 cells. Cytotoxicity was determined by LDH release assay after 24 h of infection. Results were calculated as the mean values (+/-SEM) of three independent experiments. *** P < 0.001 versus uninfected Caco-2/TC7 cells, ΔΔΔ P < 0.001 versus *P. aeruginosa* PAO1, ΔΔ P < 0.01 versus *P. aeruginosa* PAO1, ** P < 0.01 versus *P. mosselii* ATCC BAA-99.

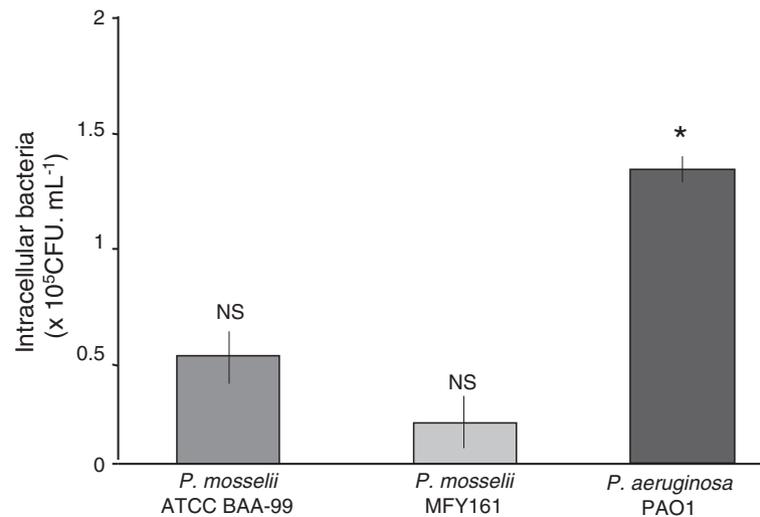


Figure 2 Invasive capacity of *P. mosselii* ATCC BAA-99, *P. mosselii* MFY161 and *P. aeruginosa* PAO1. 4 h after infection of Caco-2/TC7 cells with the bacteria, extracellular germs were killed by gentamicin. Cells were lysed and the intracellular bacteria were enumerated by plating onto nutrient agar medium. Results were calculated as the mean values (+/-SEM) of three independent experiments. * $P < 0.05$ versus *P. mosselii* ATCC BAA-99 and *P. mosselii* MFY161, NS not significant between *P. mosselii* ATCC BAA-99 and *P. mosselii* MFY161.

Caco-2/TC7 monolayers. TER values were measured at the onset of the experiment and at times 3, 6, 9 and 24 h. Up to 9 h after the beginning of the experiment, the TER values of the infected monolayers remained unchanged (data not shown). After 24 h of infection, the TER values of the monolayers exposed to the bacteria were significantly decreased (Figure 4). The decrease of TER induced by *P. mosselii* MFY161 was $20.8 \pm 4.7\%$ compared to uninfected control cells whereas *P. mosselii* ATCC BAA-99 led to a decrease of TER reaching $39 \pm 3.2\%$ and *P. aeruginosa* PAO1 provoked a deeper decrease of the TER value ($55.8 \pm 5.3\%$). These falls in TER cannot be attributed to damages provoked by acidification of the medium since the pH of the medium remained constant over the studies.

Actin visualisation

The effect of *P. mosselii* ATCC BAA-99 and MFY161 on the organization of the sub-membrane F-actin microfilament network was studied and compared to that of *P. aeruginosa* PAO1. Whereas the staining pattern of untreated Caco-2/TC7 cells showed a continuous fine meshwork of microfilaments lining the cell border (Figure 5), the cells exposed for 24 h with *P. mosselii* ATCC BAA-99, *P. mosselii* MFY161 or *P. aeruginosa* PAO1 lost their normal organization. All these bacteria induced a dramatic disruption of F-actin.

Discussion

P. mosselii was formally described as a novel species in 2002 through a polyphasic taxonomic approach including 16SrDNA phylogeny, numerical analysis, DNA-DNA

hybridization, thermal stability of DNA-DNA hybrids and siderophore-typing methodology [19]. The several strains of *P. mosselii* described to date were isolated in hospital and some have been suggested as emerging human pathogens [19-21]. Our study aimed at investigating the virulence potential of two of these strains, namely ATCC BAA-99 and MFY161, belonging to the same cluster strongly related to the hospital-isolated *P. putida* on the basis of both *oprD* or *oprF*-linked phylogenies [22]. Although *P. putida* species is mostly known for its huge capacity in degradation of numerous carbon sources [23], some clinical strains have emerged, causing infections in immunosuppressed hosts and patients with invasive medical devices. More recently, *P. putida* has been involved in war wound infection, and should be considered as a potential human pathogen, for a review see Carpenter et al. [24].

In the present study, we further investigated the cytotoxicity of *P. mosselii* ATCC BAA-99 and MFY161 strains, and show that they provoked the lysis of the intestinal epithelial cells Caco-2/TC7, with a major damage obtained after infection with *P. mosselii* MFY161. The cytotoxic levels were lower compared to the well-known opportunistic pathogen *P. aeruginosa* PAO1 but almost similar to those observed for *P. mosselii* strains on rat glial cells [21], and for the clinical strain *P. fluorescens* MFN1032 on Caco-2/TC7 cells [17]. The gentamicin exclusion test showed that *P. mosselii* ATCC BAA-99 and MFY161 can enter Caco-2/TC7 cells. The invasion capacity of the two *P. mosselii* strains studied was similar and lower than that of the pathogen *P. aeruginosa* PAO1.

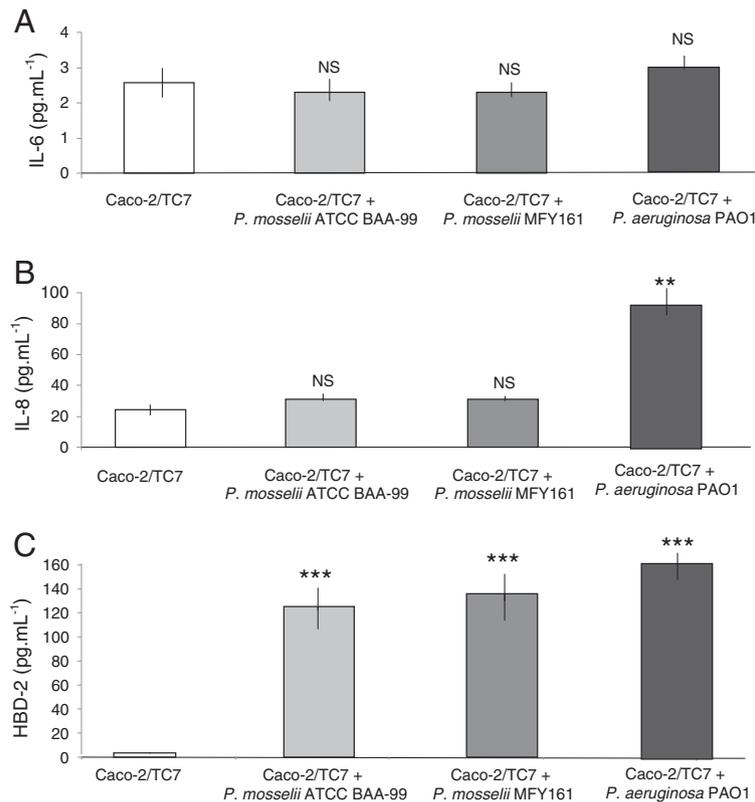


Figure 3 Proinflammatory effects of *P. mosselii* ATCC BAA-99, *P. mosselii* MFY161 and *P. aeruginosa* PAO1 on Caco-2/TC7 cells. IL-6 and IL-8 cytokines, and HBD-2 were measured in Caco-2/TC7 cells supernatant after 24 h of infection. Results were calculated as the mean values (+/-SEM) of three independent experiments. *** P < 0.001 versus uninfected Caco-2/TC7 cells, ** P < 0.01 versus uninfected Caco-2/TC7 cells, NS not significant.

The bacterial proinflammatory effect of *P. mosselii* ATCC BAA-99 and MFY161 was then assessed by measuring the secretion of IL-6 and IL-8 cytokines in Caco-2/TC7 after 24 h of infection. The results showed that the two strains did not induce the production of these proinflammatory cytokines. We hypothesize that this

may serve as a strategy for *P. mosselii* to escape the immune system. However, *P. mosselii* ATCC BAA-99 and MFY161 were found to strongly increase the secretion of HBD-2. Human beta-defensins are known to play a key role in host defense. In fact, in addition to their potent antimicrobial properties against commensal and

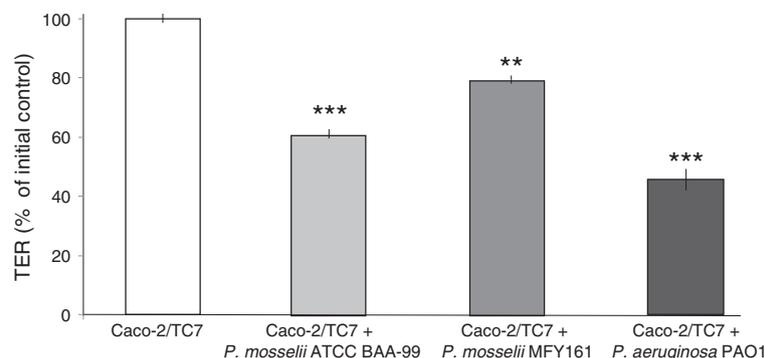


Figure 4 Effects of *P. mosselii* ATCC BAA-99, *P. mosselii* MFY161 and *P. aeruginosa* PAO1 on the transepithelial electrical resistance of Caco-2/TC7 cells. Differentiated Caco-2/TC7 cells were infected for 24 h. The TER was expressed as percentages of the initial control TER measured across each individual cell monolayer at the onset of the experiment. Results are the mean values (+/-SEM) of three independent experiments. *** P < 0.001 versus uninfected Caco-2/TC7 cells, ** P < 0.01 versus uninfected Caco-2/TC7 cells.

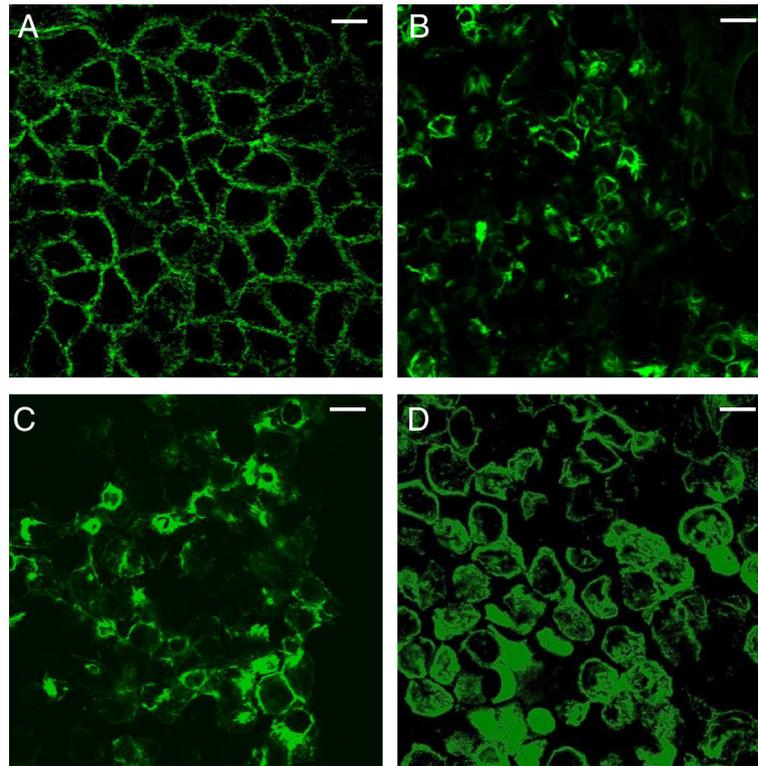


Figure 5 Effects of *P. mosselii* ATCC BAA-99, *P. mosselii* MFY161 and *P. aeruginosa* PAO1 on the F-actin cytoskeleton of Caco-2/TC7 cells. Differentiated Caco-2/TC7 cells were infected for 24 h. F-actin was stained and examined using a confocal laser scanning microscope. (A) Uninfected cells, (B) infection by *P. mosselii* ATCC BAA-99, (C) infection by *P. mosselii* MFY161, (D) infection by *P. aeruginosa* PAO1. Scale bar 100 μ m.

pathogenic bacteria [25], beta-defensins were demonstrated to function as multi-effector molecules capable of enhancing host defense by recruiting various innate as well as adaptive immune cells to the site of infection. Nevertheless, some pathogens can be resistant to HBD-2 [26] and surprisingly can induce and divert HBD-2 secretion in intestinal epithelial cells to enhance its capacity of virulence [27].

The effect of *P. mosselii* ATCC BAA-99 and MFY161 on epithelial permeability was then evaluated by measuring the TER across differentiated Caco-2/TC7 monolayers. The F-actin cytoskeleton was stained with Alexa-488 phalloidin and examined using a confocal laser scanning microscope. We observed that the TER of the monolayers exposed to the bacteria was significantly decreased and that the F-actin cytoskeleton was completely broken. Similar results of TER decrease and F-actin disruption were previously observed with many pathogens including *Salmonella typhimurium*, *P. aeruginosa* and *Escherichia coli* [28-30].

Infections caused by multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacilli have become a growing challenge in hospital [31]. In a recent study, Giani et al. [32] suggested that unusual human opportunistic pathogen like *P. mosselii* may probably play a role as shuttles for acquired

metallo- β -lactamases resistance thus an antibiogram was made for *P. mosselii* ATCC BAA-99 and MFY161 (see Additional file 1: Table S1). We found that the two strains were resistant towards 6 of the 16 antibiotics tested including the ticarcillin beta-lactam, which could support the above hypothesis.

Conclusion

In conclusion, our study demonstrates that *P. mosselii* ATCC BAA-99 and MFY161 are cytotoxic towards Caco-2/TC7 cells, have low invasive capacity, induce secretion of human β -defensin 2 (HBD-2), alter the epithelial permeability of differentiated cells and damage the F-actin cytoskeleton. These strains are less virulent than *P. aeruginosa* PAO1, but their behavior resembles that of cytotoxic strains of *P. fluorescens* [17,18] and by thus may be considered as potential emerging human pathogen.

Methods

Bacterial strains

P. mosselii ATCC BAA-99 is a clinical strain isolated from tracheal aspirate of a patient suffering from pulmonary infections [19]. *P. mosselii* MFY161 was collected from urine of a patient suffering from alcoholic hepatitis in Charles Nicolle hospital (Rouen, France), and characterized

by 16SrDNA, *oprF* and *oprD* sequencing [7,8], and siderotyping [22]. *P. aeruginosa* PAO1 was obtained from an international collection. All the strains were routinely cultivated under vigorous shaking, in ordinary nutrient broth (Merk, Darmstadt, Germany), at their optimal growth temperature, 30°C for *P. mosselii* ATCC BAA-99 and MFY161, 37°C for *P. aeruginosa* PAO1.

Cell line and culture

Caco-2/TC7 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 15% of heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM of L-glutamine, 100 U.mL⁻¹ each of penicillin and streptomycin and 1% of non-essential amino acids. For the experimental assays, the cells were seeded at a density of 10⁵ cells.cm⁻² in 24-wells tissue culture plates, or on inserts (6.4 mm diameter, 3 µm pore size, Falcon) to obtain fully differentiated cells. The cells were cultured at 37°C in 5% CO₂-95% air atmosphere and the medium was changed daily.

Cell infection

Bacteria of overnight culture were harvested by centrifugation (5000 g, 5 min, 20°C) and resuspended at a density of 10⁸ colony forming unit (CFU).mL⁻¹ in cell culture medium without serum and antibiotics. Caco-2/TC7 cells grown on 24-wells culture plates or inserts were washed twice with fresh culture medium and the bacterial suspensions were applied to the cell surface at a concentration of 10⁸ CFU.cm⁻², resulting to a multiplicity of infection (MOI) of 100. Infected cells were then incubated at 37°C in 5% CO₂-95% air during 24 h for all experiments, excepted 4 h of infection for the invasion test. Each assay was conducted in triplicate in independent experiments (successive passages of Caco-2/TC7 cells).

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity assay was performed on confluent Caco-2/TC7 grown in 24-wells culture plates. After 24 h of infection, the supernatants from Caco-2/TC7 monolayers were collected and the concentration of lactate dehydrogenase (LDH), a cytoplasmic enzyme released upon cell death, was determined using an enzymatic assay (Cytotox 96 Promega, Charbonnières, France) as previously described [17]. Caco-2/TC7 cells exposed to Triton ×100 (0.9%) were used as a control of total LDH release (100% dead cells).

Bacterial invasion assay

After 4 h of infection, Caco-2/TC7 monolayers were washed with phosphate-buffered saline (PBS). Adherent bacteria were killed by incubation for 1 h with 300 µg.mL⁻¹ gentamycin, an antibiotic that does not cross the cytoplasmic membrane of eukaryotic cells and then only kills bacteria not internalized in cells. Caco-2/TC7

monolayers were washed 3 times with PBS to remove the antibiotic and dead bacteria. The cells were then lysed by incubation for 15 min with 0.5% Triton ×100 to release the intracellular bacteria and the lysates were plated onto nutrient agar to determine the number of internalized bacteria.

Quantification of IL-6, IL-8 and HBD-2

After 24 h of infection with the bacterial suspensions, the levels of IL-6 and IL-8 cytokines were measured in Caco-2/TC7 cells supernatant using ELISA Quantikine kits (R&D systems). The human β-defensin-2 (HBD-2) was quantified using the Defensin 2, beta (Human) - ELISA Kit (Phoenix Pharmaceuticals inc). These assays were conducted according to the manufacturer's protocols.

Transepithelial electrical resistance measurements

Caco-2/TC7 cells grown on inserts were used at 21 days post-confluence (fully differentiated cells) and the transepithelial electrical resistance (TER) of the monolayers infected or not with the bacterial strains was measured during 24 h using the Millicell Electrical Resistance System (Millipore Corp, Bedford, MA). TER values are expressed as percentages of the pre-infection level of the TER (baseline) measured for each individual cell monolayer in the inserts.

Actin visualisation

Fully differentiated Caco-2/TC7 monolayers were exposed to the bacterial strains for 24 h. At the end of the experiment, the cells were washed with PBS, fixed for 10 min in 3.7% paraformaldehyde and permeabilized for 5 min with 0.1% Triton ×100 at room temperature. The cells were then incubated with 1% bovine serum albumin in PBS for 10 min and the apical F-actin cytoskeleton was stained with Alexa-488 phalloidin (1U/insert) for 45 min at room temperature. Following three washes in PBS, cell monolayers were examined using a confocal laser scanning microscope (Zeiss, LSM710).

Statistical analysis

All experiments were conducted independently at least three times. The results are expressed as means +/- SEM and statistical significance were performed by Student's *t*-test.

Additional file

Additional file 1: Table S1. Antibiotic susceptibility pattern of *P. mosselii* ATCC BAA-99 and *P. mosselii* MFY161. The antibiotics tested were ticarcillin (TIC), piperacillin (PRL), colistin (CT), imipenem (IPM), aztreonam (ATM), tobramycin (TOB), gentamycin (GN), amikacin (AK), ticarcillin + clavulanic acid (TIM), ceftazidime (CAZ), ciprofloxacin (CIP), cefsulodin (CFS), levofloxacin (LEV), trimethoprim-sulphamethoxazole (SXT), fosfomycin (FF) and netilmicine (NET). R, resistant; I, intermediate; S, susceptible.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

EB, MF, SC and NC designed the experiments, supervised the research and wrote the paper. CLJ, AM, KB and NC did the experiments and/or data analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

Charlène Leneveu-Jenvrin is a recipient of a doctoral fellowship from the region Haute-Normandie (GRR-SSE). This study was supported by grants from the Conseil Général de l'Eure, the Grand Evreux Agglomération and FEDER funds. LMSM is a member and is supported by the world's leading centre Cosmetic Valley.

Received: 25 September 2012 Accepted: 24 May 2013

Published: 29 May 2013

References

- Spiers AJ, Buckling A, Rainey PB: The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* 2000, **10**:2345–2350.
- Peix A, Ramirez-Bahena MH, Velazquez E: Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect Genet Evol* 2009, **9**:1132–1147.
- Liu R, Liu H, Feng H, Wang X, Zhang CX, Zhang KY, Lai R: *Pseudomonas duriflava* sp. nov., isolated from a desert soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008, **58**:1404–1408.
- Kiprianova EA, Klochko VV, Zelena LB, Churkina LN, Avdeeva LV: *Pseudomonas batumici* sp. nov., the antibiotic-producing bacteria isolated from soil of the Caucasus Black Sea coast. *Mikrobiol Z* 2011, **73**:3–8.
- Pascual J, Lucena T, Ruvira MA, Giordano A, Gambacorta A, Garay E, Arahal DR, Pujalte MJ, Macian MC: *Pseudomonas litoralis* sp. nov., isolated from Mediterranean seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012, **62**:438–444.
- Costa R, Gomes NC, Krogerrecklenfort E, Opelt K, Berg G, Smalla K: *Pseudomonas* community structure and antagonistic potential in the rhizosphere: insights gained by combining phylogenetic and functional gene-based analyses. *Environ Microbiol* 2007, **9**:2260–2273.
- Bodilis J, Calbrix R, Guerillon J, Merieau A, Pawlak B, Orange N, Barray S: Phylogenetic relationships between environmental and clinical isolates of *Pseudomonas fluorescens* and related species deduced from 16S rRNA gene and OprF protein sequences. *Syst Appl Microbiol* 2004, **27**:93–108.
- Chevalier S, Bodilis J, Jaouen T, Barray S, Feuilloley MG, Orange N: Sequence diversity of the OprD protein of environmental *Pseudomonas* strains. *Environ Microbiol* 2007, **9**:824–835.
- Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R: Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy* 2005, **25**:1353–1364.
- Wei B, Huang T, Dalwadi H, Sutton CL, Bruckner D, Braun J: *Pseudomonas fluorescens* encodes the Crohn's disease-associated I2 sequence and T-cell superantigen. *Infect Immun* 2002, **70**:6567–6575.
- Sutton CL, Kim J, Yamane A, Dalwadi H, Wei B, Landers C, Targan SR, Braun J: Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000, **119**:23–31.
- Dalwadi H, Wei B, Kronenberg M, Sutton CL, Braun J: The Crohn's disease-associated bacterial protein I2 is a novel enteric t cell superantigen. *Immunity* 2001, **15**:149–158.
- Feuilloley MGJ, Mezghani-Abdelmoula S, Picot L, Lesouhaitier O, Merieau A, Guerillon J, Boujedaini N, Cazin L, Orange N: Involvement of *Pseudomonas* and related species in central nervous system infections. *Res. Dev. Microbiol.* 2002, **7**:55–71.
- Bernstein DI, Lummus ZL, Santilli G, Siskosky J, Bernstein IL: Machine operator's lung. A hypersensitivity pneumonitis disorder associated with exposure to metalworking fluid aerosols. *Chest* 1995, **108**:636–641.
- Hsueh PR, Teng LJ, Pan HJ, Chen YC, Sun CC, Ho SW, Luh KT: Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients. *J Clin Microbiol* 1998, **36**:2914–2917.
- Rosignol G, Merieau A, Guerillon J, Veron W, Lesouhaitier O, Feuilloley MG, Orange N: Involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of a clinical strain of *Pseudomonas fluorescens*. *BMC Microbiol* 2008, **8**:189.
- Madi A, Lakhdari O, Blottiere HM, Guyard-Nicodeme M, Le Roux K, Groboillot A, Svinareff P, Dore J, Orange N, Feuilloley MG, Connil N: The clinical *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 strain exerts a cytotoxic effect on epithelial intestinal cells and induces Interleukin-8 via the AP-1 signaling pathway. *BMC Microbiol* 2010, **10**:215.
- Madi A, Svinareff P, Orange N, Feuilloley MG, Connil N: *Pseudomonas fluorescens* alters epithelial permeability and translocates across Caco-2/TC7 intestinal cells. *Gut Pathog* 2010, **2**:16.
- Dabboussi F, Hamze M, Singer E, Geoffroy V, Meyer JM, Izard D: *Pseudomonas mosselii* sp. nov., a novel species isolated from clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002, **52**:363–376.
- McLellan E, Partridge D: Prosthetic valve endocarditis caused by *Pseudomonas mosselii*. *J Med Microbiol* 2009, **58**:144–145.
- Chapalain A, Rossignol G, Lesouhaitier O, Merieau A, Gruffaz C, Guerillon J, Meyer JM, Orange N, Feuilloley MG: Comparative study of 7 fluorescent *pseudomonad* clinical isolates. *Can J Microbiol* 2008, **54**:19–27.
- Bodilis J, Hedde M, Orange N, Barray S: OprF polymorphism as a marker of ecological niche in *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* 2006, **8**:1544–1551.
- Poblete-Castro I, Escapa IF, Jager C, Puchalka J, Lam CM, Schomburg D, Prieto MA, Martins dos Santos VA: The metabolic response of *Pseudomonas putida* KT2442 producing high levels of polyhydroxyalkanoate under single- and multiple-nutrient-limited growth: highlights from a multi-level omics approach. *Microb Cell Fact* 2012, **11**:34.
- Carpenter RJ, Hartzell JD, Forsberg JA, Babel BS, Ganesan A: *Pseudomonas putida* war wound infection in a US Marine: a case report and review of the literature. *J Infect* 2008, **56**:234–240.
- Eckmann L: Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol* 2005, **21**:147–151.
- Moranta D, Regueiro V, March C, Llobet E, Margareto J, Larrarte E, Garmendia J, Bengoechea JA: *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of beta-defensins by airway epithelial cells. *Infect Immun* 2010, **78**:1135–1146.
- Madi A, Alnabhani Z, Leneveu C, Mijouin L, Feuilloley M, Connil N: *Pseudomonas fluorescens* can induce and divert the human β -defensin-2 secretion in intestinal epithelial cells to enhance its virulence. *Arch Microbiol.* 2013, **195**:189–195.
- Fu Y, Galan JE: The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* 1998, **27**:359–368.
- Garrity-Ryan L, Kazmierczak B, Kowal R, Comolli J, Hauser A, Engel JN: The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages. *Infect Immun* 2000, **68**:7100–7113.
- Strauman MC, Harper JM, Harrington SM, Boll EJ, Nataro JP: Enteroaggregative *Escherichia coli* disrupts epithelial cell tight junctions. *Infect Immun* 2010, **78**:4958–4964.
- Curcio D: Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections: Are you ready for the challenge? *Curr Clin Pharmacol.* 2013 [Epub ahead of print].
- Giani T, Marchese A, Coppo E, Kroumova V, Rossolini GM: VIM-1-producing *Pseudomonas mosselii* isolates in Italy, predating known VIM-producing index strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012, **56**:2216–2217.

doi:10.1186/1471-2180-13-123

Cite this article as: Leneveu-Jenvrin et al.: Cytotoxicity and inflammatory potential of two *Pseudomonas mosselii* strains isolated from clinical samples of hospitalized patients. *BMC Microbiology* 2013 **13**:123.

I. Article 4

***Pseudomonas fluorescens* altère la fonction de la barrière intestinale en modulant l'expression de l'IL-1 β via la voie de signalisation NOD2**

Alnabhani Z, Montcuquet N, **Biaggini K**, Dussaillant M, Roy M, Ogier-Denis E, Madi A, Jallane A, Feuilleley M, Hugot JP, Connil N, Barreau F.

Inflamm Bowel Dis (2015), 21(3):543-55

[Inflamm Bowel Dis](#), 2015 Mar;21(3):543-55. doi: 10.1097/MB.0000000000000291.

Pseudomonas fluorescens alters the intestinal barrier function by modulating IL-1 β expression through hematopoietic NOD2 signaling.

[Alnabhani Z](#)¹, [Montcuquet N](#), [Biaggini K](#), [Dussaillant M](#), [Roy M](#), [Ogier-Denis E](#), [Madi A](#), [Jallane A](#), [Feuilleley M](#), [Hugot JP](#), [Connil N](#), [Barreau F](#).

⊕ Author information

Abstract

BACKGROUND: Ileal Crohn's disease is related to NOD2 mutations and to a gut barrier dysfunction. *Pseudomonas fluorescens* has also been associated with ileal Crohn's disease. The aim of this study was to determine the impact of *P. fluorescens* on the paracellular permeability in ileum and Peyer's patches.

METHODS: To explore this question, *in vivo* and *ex vivo* experiments were performed in wild-type, Nod2, Nod2, and IL-1R mice together with *in vitro* analyses using the Caco-2 (epithelial) and the THP-1 (monocyte) human cell lines.

RESULTS: *Pseudomonas fluorescens* increased the paracellular permeability of the intestinal mucosa through the secretion of IL-1 β by the immune cell populations and the activation of myosin light chain kinase in the epithelial cells. Induction of the IL-1 β pathway required the expression of Nod2 in the hematopoietic compartment, and muramyl dipeptide (a Nod2 ligand) had an inhibitory effect.

CONCLUSIONS: *Pseudomonas fluorescens* thus alters the homeostasis of the epithelial barrier function by a mechanism similar to that previously observed for *Yersinia pseudotuberculosis*. This work further documents a putative role of psychrotrophic bacteria in Crohn's disease.

La maladie de Crohn est associée à des mutations de NOD2 et à un dysfonctionnement de la barrière intestinale. L'implication de *Pseudomonas fluorescens* ayant été également suspectée dans la maladie de Crohn, le but de cette étude a été de déterminer l'impact de cette bactérie sur la perméabilité paracellulaire de l'iléum et au niveau des plaques de Peyer. Des expériences *in vivo* et *ex vivo* ont permis de montrer que *P. fluorescens* augmente la perméabilité paracellulaire de la muqueuse intestinale grâce à la sécrétion d'IL-1 β par les cellules immunitaires et l'activation de la MLCK (Myosin light-chain kinase) des cellules épithéliales. L'induction de la voie de signalisation IL-1 β requiert l'expression de Nod2 dans le compartiment hématopoïétique, le muramyl dipeptide (un ligand de Nod2) ayant un effet inhibiteur. *P. fluorescens* peut ainsi altérer l'homéostasie de la fonction de barrière intestinale par un mécanisme similaire à celui précédemment observé chez *Yersinia pseudotuberculosis*. Ce travail permet de confirmer l'hypothèse du rôle potentiel des bactéries psychrotrophes dans la maladie de Crohn.

Dans le cadre de ce projet, j'ai pu participer principalement à la culture des différentes lignées cellulaires et à la réalisation des mesures de perméabilité paracellulaire après infection avec *P. fluorescens*.

Pseudomonas fluorescens Alters the Intestinal Barrier Function by Modulating IL-1 β Expression Through Hematopoietic NOD2 Signaling

Ziad Alnabhani, PhD,^{*,†,‡} Nicolas Montcuquet, PhD,^{§,||} Kelly Biaggini, PhD,[¶] Monique Dussillant, PhD,^{*,†,‡} Maryline Roy,^{*,†,‡} Eric Ogier-Denis, PhD,^{*,†,‡} Amar Madi, PhD,[¶] Abdelhak Jallane, PhD,^{*,†,‡} Marc Feuilloley, PhD,[¶] Jean-Pierre Hugot, MD, PhD,^{*,†,‡,**} Nathalie Connil, PhD,[¶] and Frédérick Barreau, PhD^{*,†,‡,††}

Background: Ileal Crohn's disease is related to *NOD2* mutations and to a gut barrier dysfunction. *Pseudomonas fluorescens* has also been associated with ileal Crohn's disease. The aim of this study was to determine the impact of *P. fluorescens* on the paracellular permeability in ileum and Peyer's patches.

Methods: To explore this question, in vivo and ex vivo experiments were performed in wild-type, *Nod2*^{-/-}, *Nod2*^{2939iC}, and *IL-1R*^{-/-} mice together with in vitro analyses using the Caco-2 (epithelial) and the THP-1 (monocyte) human cell lines.

Results: *Pseudomonas fluorescens* increased the paracellular permeability of the intestinal mucosa through the secretion of IL-1 β by the immune cell populations and the activation of myosin light chain kinase in the epithelial cells. Induction of the IL-1 β pathway required the expression of *Nod2* in the hematopoietic compartment, and muramyl dipeptide (a *Nod2* ligand) had an inhibitory effect.

Conclusions: *Pseudomonas fluorescens* thus alters the homeostasis of the epithelial barrier function by a mechanism similar to that previously observed for *Yersinia pseudotuberculosis*. This work further documents a putative role of psychrotrophic bacteria in Crohn's disease.

(*Inflamm Bowel Dis* 2015;21:543–555)

Key Words: paracellular permeability, *Pseudomonas fluorescens*, *Nod2*, IL-1 β , Myosin light chain kinase

The intestinal mucosa harbors the highest number and diversity of permanently associated microorganisms.¹ Interactions between the mucosal immune system, the epithelial monolayer, and commensal bacteria elicit basal level immune responses in normal individuals while a defect of the gut barrier is associated with gut inflammation as in the case of Crohn's disease (CD).²

CD is a complex genetic disorder that results in an inappropriate gut immune response, an impaired epithelial barrier

function, and a dysbiosis.^{1,3,4} CD lesions are related to gut-associated lymphoid tissue.^{5,6} Lymphoid follicles are mainly encountered in the colon where they are isolated and in small bowel where they are grouped forming Peyer's patches (PP). Lymphoid follicles are known to be pivotal sites for the host immune response and for the entry of enteropathogenic bacteria.⁷

Barrier defects are reflected by increased paracellular permeability (ParaP) in patients with CD and their healthy asymptomatic first-degree relatives.⁸ The increased ParaP may precede clinical evidence of disease and can serve as a marker of impending disease reactivation. Finally, it correlates with systemic immune activation.^{9,10}

Among the more than 100 known CD-associated polymorphisms, *NOD2* mutations exhibit the highest risks and the highest specificities.^{11,12} They are more frequently found in ileal CD.¹² *NOD2* belongs to the nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat family of cytoplasmic proteins.¹³ When stimulated by muramyl dipeptide (MDP), a moiety of peptidoglycan, *NOD2* activates several proinflammatory pathways including NF- κ B, MAP kinases, and caspase 1.^{14,15} Because MDP is conserved in both gram-positive and gram-negative bacteria, *NOD2* is supposed to detect a wide variety of microorganisms.¹⁶

Nod2 is involved in the regulation of microbiota and the gut homeostasis.^{17–20} Under basal conditions, *Nod2* knockout (*Nod2*^{-/-}) mice are characterized by a hypertrophy of the

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.ibdjournal.org).

Received for publication September 1, 2014; Accepted October 21, 2014.

From the *Université Paris-Diderot, Paris, France; [†]INSERM UMR1149, Paris, France; [‡]Labex inflamex, Sorbonne Paris-Cité, Paris, France; [§]INSERM UMR1163, Laboratory of Intestinal Immunity, Paris, France; ^{||}Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité and Institut Imagine, Paris, France; [¶]LMSM EA 4312, Université de Rouen, Evreux, France; ^{**}Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Robert Debré, Paris, France; and ^{††}INSERM UMR 1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse, Université de Toulouse, Toulouse, France.

Supported by INSERM, the Université Paris-Diderot, the ANR Labex inflamex, and the Association François Aupetit.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Reprints: Frédérick Barreau, PhD, INSERM U843, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France (e-mail: frederick.barreau@inserm.fr).

Copyright © 2015 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc.

DOI 10.1097/MIB.0000000000000291

Published online 5 February 2015.

gut-associated lymphoid tissue in presence of the gut microbiota.¹⁹ In more detail, *Nod2* modulates the cross talk between T CD4⁺ cells and the epithelial cells of the follicle-associated epithelium covering PP and thus maintains the homeostasis of the intestinal barrier function.¹⁹ In human, CD patients with *NOD2* mutations have altered epithelial cell–cell contacts evidenced by an increase of intestinal ParaP.^{21,22} Despite a higher basal ParaP, when infected with *Yersinia pseudotuberculosis*, *Nod2*^{-/-} mice limit the early phases of bacterial colonization of the gut mucosa.²³

Nod2^{-/-} mice do not develop spontaneous ileocolitis, suggesting that *Nod2* dysregulation alone is not sufficient to induce CD.¹⁸ Thus, environmental risk factors linked with the modern western way of life are supposed to be required for the development of CD.^{1,3,24} Among them, a relation between exposure to psychrotrophic bacteria and CD is suggested by the parallel emergence of the disease in western countries and the development of refrigeration.^{25,26} Thus, *Yersinia*, *Listeria*, or *Pseudomonas* has been suspected to play a role in CD.^{27–29} It is to note that *Yersinia* and *Listeria* species exhibit a tropism for PP by invading the M cells present in the follicle-associated epithelium of the PP, and they are able to alter the ParaP of the ileal mucosa.^{23,30–33}

Pseudomonas fluorescens is present at low numbers in the intestinal lumen and in many ecological niches including soil and water but also in refrigerated food products where it can grow.³⁴ Although, *P. fluorescens* has long been considered as a psychrotrophic microorganism, some clinical strains have been able to adapt at a growth temperature of 37°C.³⁵ Recently, clinical strains of *P. fluorescens* were shown to increase the ParaP and induce cytotoxic and cytokine responses in Caco-2/TC7 cells.^{36–38} This event confers an increase of virulence, in the range of the well-known opportunistic pathogen *P. aeruginosa*. Furthermore, a highly specific antigen of *P. fluorescens*, designated as I2, was detected in the serum of 54% of patients with CD, and a correlation between the severity of the disease and the level of the circulating I2 antigen has been evidenced.^{29,39} Moreover, the increase of I2 levels in serum is linked with the presence of CD lesions in the ileum.²⁹ Nevertheless, the effect of *P. fluorescens* on the destabilization of the gut barrier function has not been studied in vivo. Here, we have investigated the molecular mechanisms by which *P. fluorescens* alters the intestinal epithelial barrier with specific reference to *Nod2* function.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All the animals were on the C57BL/6 background. Wild-type (WT), *Nod2*-deficient (*Nod2*^{-/-}), *Nod2*^{2939iC} mice (carrying the mutation homologous to the 3020insC human mutation), and interleukin (IL)-1 receptor deficient (*IL-1R*^{-/-}) mice were generated in the animal facility at Robert Debré Hospital.^{18,19,40} All mice were housed in pathogen-free conditions with free access to food and water. Pathogen-free conditions were monitored every 6 months in accordance with the full set of Federation of Laboratory Animal

Science Associations high standards recommendations. Housing and experiments adhered to institutional animal health care guidelines, and experiments were approved by the institutional committee for animal use.

Bacterial Strains and Growth Condition

P. fluorescens MFN1032 (biovar I) was collected in a hospital of Haute-Normandie (France). It was characterized by polyphasic identification, 16S RNA sequencing, and siderotyping.³⁵ *P. fluorescens* MF37 is a spontaneous rifampicin-resistant mutant of the strain MF0 (biovar V), originally identified in crude milk.⁴¹ *P. aeruginosa* PAO1 was obtained from an international collection. All the strains were cultivated in an ordinary nutrient broth, at 28°C for the 2 strains of *P. fluorescens* or 37°C for *P. aeruginosa* PAO1.

Cell Lines

Caco-2 cells were purchased from the DSMZ collection (Braunschweig, Germany). Caco-2 cells were grown at 37°C in a 5% CO₂ water-saturated atmosphere in GlutaMAX DMEM (Gibco, Saint Aubin, France) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (Biowest, Nuaillé, France), 1% nonessential amino acids, and 1% antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin; Gibco). Cells were seeded in Transwell inserts (CoStar, Paris, France) and grown for 14 days. THP-1 cells were obtained from the ATCC collection (Molsheim, France). They were grown at 37°C in a 5% CO₂ water-saturated atmosphere in RPMI-1640 (Gibco) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% L-glutamine (Gibco) supplemented with 1% antibiotics, and 0.01% of β-mercaptoethanol (Sigma, St. Quentin Fallavier, France).

Bone Marrow-derived Macrophagic Cells

Macrophagic cells (MΦ) and bone marrow stem cells (BMSC) were cultured for 6 days in a medium supplemented with macrophage colony-stimulating factor containing supernatants from the L929 cell line.⁴²

Animal Infections

Mice were intragastrically (ig) inoculated with a single dose of *P. fluorescens* MFN1032 or *P. aeruginosa* PAO1 (10⁸ colony-forming unit [CFU]/100 μL of sterile water). At day 7, gut permeability and cytokine concentrations were assessed in the ileal mucosa and in PP. To test the effect of IL-1β and myosin light chain kinase (MLCK), mice were intraperitoneally pretreated with Anakinra (300 μg per mice per d), Z-YVAD-FMK (100 μg per mice per d; Kamiya Biomedical, Seattle, WA), MDP (100 μg per mice per d; Sigma), and ML-7 (2 mg/kg; Sigma), respectively, for 2 consecutive days before experimentation.

Ex vivo Infection

After mouse was killed, PP were mounted in Ussing chamber (UC). 10⁸ CFU of *P. fluorescens* MFN1032 or MF37 strains or *P. aeruginosa* PAO1 were added into the mucosal compartment. When indicated, Anakinra (50 μg/mL), Z-YVAD-FMK (20 μg/mL), MDP (10 μg/mL), and ML-7 (20 μg/mL), or alternatively

the same amount of vehicles, were used in the mucosal compartment of UC.

Cell Infections

MΦ or THP-1 cells were infected by adding *P. fluorescens* MFN1032 or *P. aeruginosa* PAO1 strains (multiplicity of infection [MOI], 10). After 2, 6, or 24 hours, extracellular bacteria were killed by gentamycin (100 μg/mL; Sigma), and cytokine (IL-1β, IL-8, IL-12, tumor necrosis factor [TNF]-α, or interferon γ) levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay in the supernatants.

Measures of Permeability

In Vivo Experiments

Mice were gavaged with fluorescein isothiocyanate-labeled dextran 4 kDa (FD4; 15 mg/100 μL per mice; Sigma) 6 hours before the sacrifice. Whole serum FD4 levels were determined with a fluorometer (PerkinElmer, Courtaboeuf, France).

Ex Vivo Experiments

After mouse was killed, biopsies from ileal mucosa or PP were mounted in UC and maintained in circulating oxygenated Ringer's solution at 37°C throughout the experiment. ParaP was assessed 2 hours after infection by measuring the mucosal-to-serosal flux of FD4.

Coculture Experiments

FD4 (10^{-5} M) were added into the apical compartment of the transwell system (TS). The permeability was monitored by sampling 400 μL from the basolateral compartment 24 hours after addition of 10^6 THP-1 cells, infected or not by *Pseudomonas*, in the basolateral chamber. When indicated, Caco-2 cells were preincubated 24 hours with Anakinra (50 μg/mL), MDP (10 μg/mL), or ML-7 (20 μg/mL).

Chimeric Mice

BMSC were isolated from WT Ly5.1 or *Nod2*^{-/-} Ly5.2 mice. Five million cells were injected intravenously either into *Nod2*^{+/+}Ly5.1 or *Nod2*^{-/-}Ly5.2 lethally irradiated recipients. Chimerism was assessed at week 12 by flow cytometry using the Ly5.1 and Ly5.2 markers.

Cytokines

In vivo, 7 days after infection, PP and ileal mucosa from WT, *NOD2*^{-/-}, and *IL-1R*^{-/-} mice were removed, washed, and homogenized in phosphate-buffered saline containing protease inhibitor (Roche, Boulogne-Billancourt, France), and IL-1β levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). In vitro, cytokine concentrations were determined in the supernatant 2, 6, and 24 hours after infection of macrophages (MOI, 10) and THP-1 cells (MOI, 10).

Real-Time PCR

After extraction by the NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France), total RNA was converted to complementary

DNA using random hexonucleotides. Polymerase chain reaction was performed using QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Applied Biosystems, Saint Aubin, France), sense and antisense primers specific for Claudin-2, Claudin-5, Claudin-8, Occludin, and G3PDH and for the long isoform of MLCK. Sequences are shown in Table, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/IBD/A689>. After amplification, we determined the cycle threshold (Ct) to obtain expression values of $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Small Interfering RNAs

The ON-TARGET plus SMARTpool small interfering RNAs targeting NOD2, Rick, TLR-2 (L-005120-01-0005), and TLR-4 (L-008088-01) and nontargeted control small interfering RNA were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO). THP-1 cells were transfected according to manufacturer's instructions (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Transfections were done 48 hours before experiments as it has been previously shown in Refs. 23 and 30.

MLCK Protein

Caco-2 cells were washed with phosphate-buffered saline and lysed. MLCK concentrations were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (Cusabio, Paris, France) according to the manufacturer's instructions. For more details, see article in Ref. 30.

Statistical Analysis

Multigroup comparisons were performed using a 1-way analysis of variance followed by a Bonferroni correction for multiple tests. Two-group comparisons were performed using an unpaired *t* test assuming the Gaussian distribution. The Gaussian distribution was tested by Kolmogorov-Smirnov test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 4.00 (GraphPad software, San Diego, CA). A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. All *P* values were 2-sided.

Study Approval

Housing and experiments were led following institutional animal healthcare guidelines and were approved by the local ethical committee for animal experimentation (Comité Régional d'Éthique en matière d'Expérimentation Animale n°4).

RESULTS

Pseudomonas Species Alter the Gut ParaP

P. fluorescens MFN1032 (a clinical strain), *P. fluorescens* MF37 (originally identified in crude milk), and *P. aeruginosa* PAO1 have previously been reported to increase the ParaP of polarized Caco-2/TC7 cells.³⁸ To determine whether *Pseudomonas* species also alters the intestinal barrier in vivo, C57BL/6j mice were ig inoculated with 10^8 CFU of *P. fluorescens* MFN1032, *P. fluorescens* MF37, or *P. aeruginosa* PAO1. Seven days after infection, 4 kDa of FITC-dextran (FD4) was ig inoculated and the marker concentration was measured in the serum. The levels of FD4 were higher after *Pseudomonas* infection than in uninfected mice, demonstrating an increase of ParaP (Fig. 1A). To investigate the

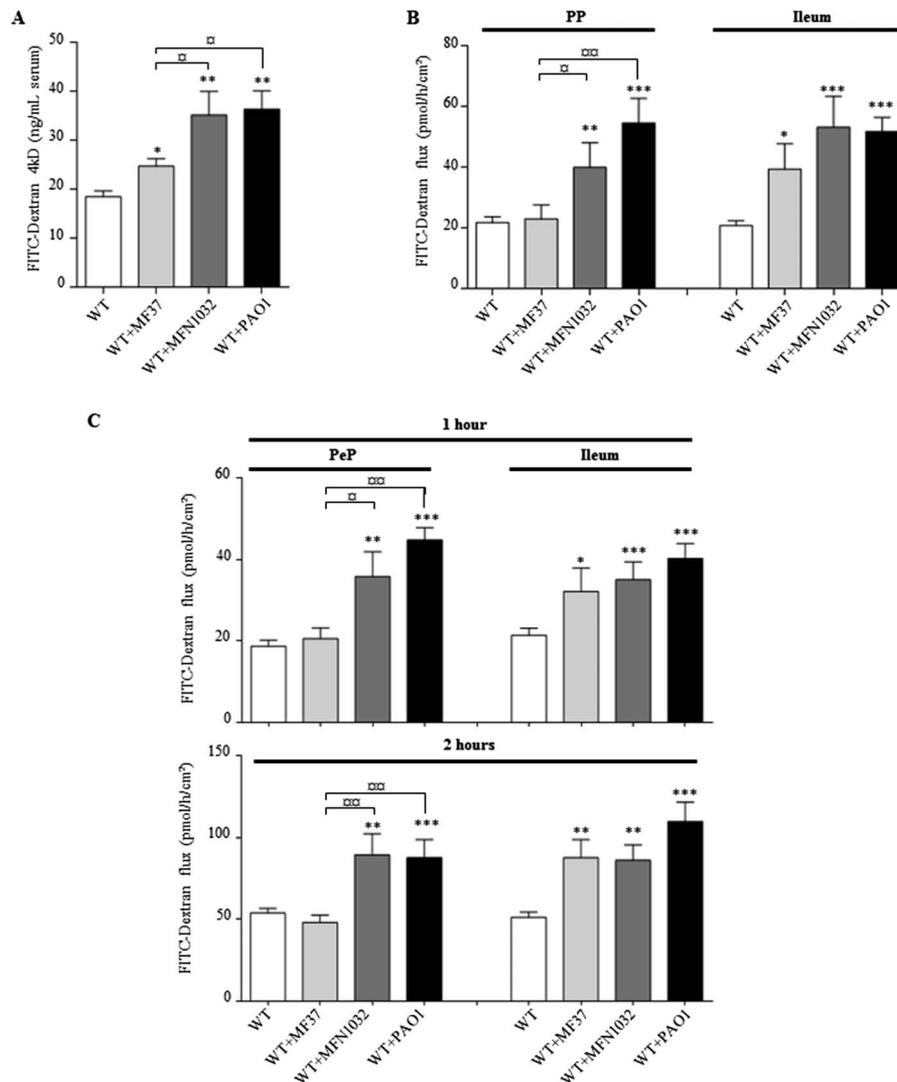


FIGURE 1. *Pseudomonas* alters the ParaP of the intestinal mucosa. A and B, WT mice were ig inoculated with 10^8 CFU of *P. fluorescens* MF37 or MFN1032 strains or *P. aeruginosa* PAO1 during 7 days. A, ParaP was investigated by measuring the accumulation of dextran-FITC 4 kDa (FD4) in the serum 6 hours after intragastrical exposure. B, Biopsies from PP or ileal mucosa were mounted in UC, and the ParaP was measured for 1 hour. C, Biopsies of PP or ileal mucosa from WT uninfected mice were mounted in UC and exposed to 10^8 CFU of different strains of *P. fluorescens* or *P. aeruginosa*. Then, ParaP was measured by monitoring the flux of FD4 for 1 or 2 hours. At least $n = 10$ per group; 3 independent experiments; mean \pm SEM; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus WT uninfected mice; □ $P < 0.05$ and □□ $P < 0.01$ versus MF37 group.

segment of the intestine mostly affected by *Pseudomonas* infection, UC experiments were performed on ileal biopsies centered or not by PP formations. Biopsies were collected 7 days after intragastrical inoculation. The ParaP of both PP and ileal mucosa was higher in WT mice infected with *P. fluorescens* MFN1032 and *P. aeruginosa* PAO1 compared with controls (Fig. 1B). In contrast, *P. fluorescens* MF37 altered only the ParaP outside of PP formations (Fig. 1B). Finally, similar conclusions were drawn when biopsies obtained from uninfected mice were exposed to *Pseudomonas* species ex vivo and tested in UC (Fig. 1C). Altogether, these data evidenced that *Pseudomonas* species alter the gut barrier of the small intestine.

Pseudomonas Species Trigger IL-1 β and TNF- α Synthesis

Cytokine production may affect the function of the epithelial barrier.^{43,44} Thus, the levels of IL-1 β and TNF- α in PP and ileal biopsies were determined 7 days after infection. IL-1 β and TNF- α levels were increased after infection by *P. fluorescens* MFN1032 and *P. aeruginosa* PAO1 (Fig. 2A). *P. aeruginosa* PAO1 also increased the levels of interferon γ and IL-12 (see Fig. A and B, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/IBD/A690>).

To determine the cytokine production in response to *Pseudomonas* in vitro, BMSC from WT mice were

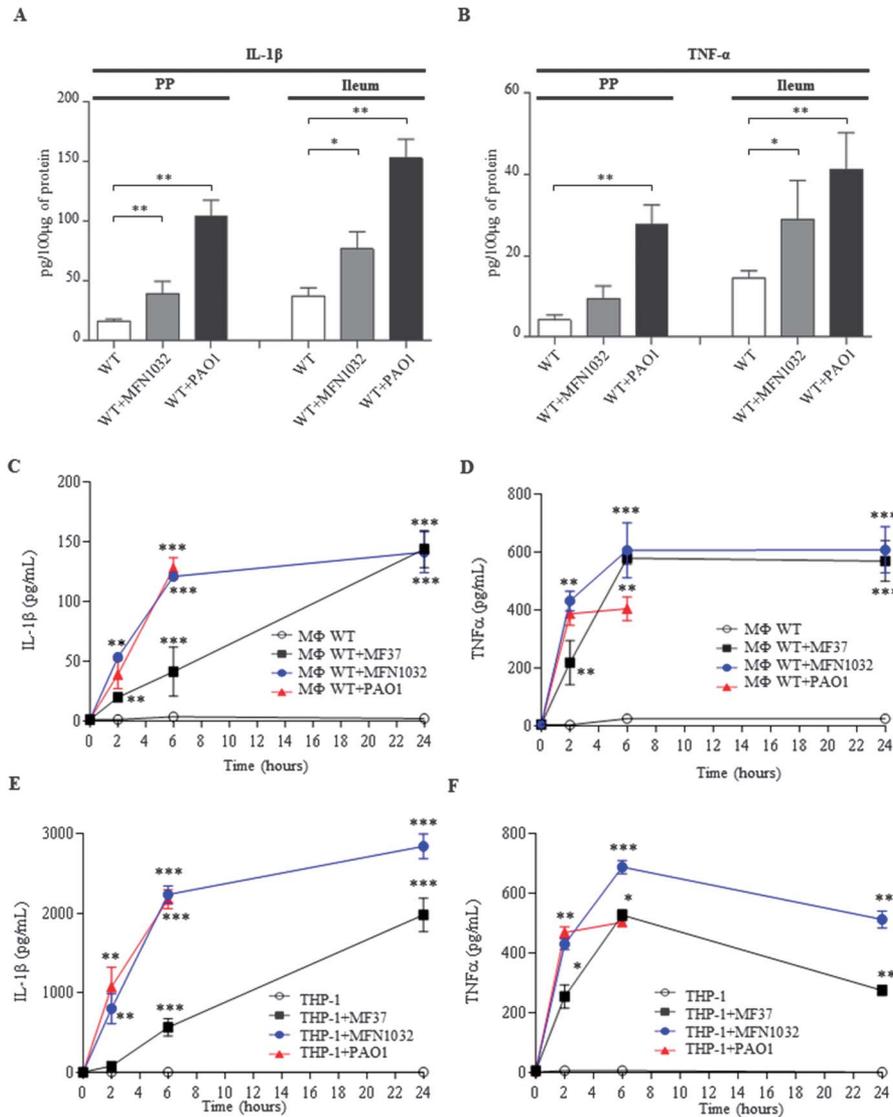


FIGURE 2. *Pseudomonas* triggers IL-1 β and TNF- α synthesis. A and B, WT mice were ig inoculated with 10⁸ CFU of *P. fluorescens* MFN1032 or *P. aeruginosa* PAO1 and killed 7 days after infection. A and B, Biopsies of PP or ileal mucosa were removed and (A) IL-1 β and (B) TNF- α levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. C and D, Bone marrow stem cells from WT mice were differentiated into M Φ cells and infected (MOI = 10) with *P. fluorescens* MFN1032, *P. fluorescens* MF37, or *P. aeruginosa* PAO1 for 2, 6, or 24 hours. Then (C) IL-1 β or (D) TNF- α levels into the supernatant were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay. E and F, THP-1 cells were exposed (MOI = 10) to *P. fluorescens* MFN1032, *P. fluorescens* MF37, or *P. aeruginosa* for 2, 6, or 24 hours. After centrifugation, the levels of (E) IL-1 β or (F) TNF- α were measured in the supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay. At least n = 10 per group; 3 independent experiments; mean \pm SEM; *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 versus control.

differentiated into macrophagic cells (M Φ). Then M Φ were infected (MOI = 10) with *Pseudomonas* species for 2, 6, and 24 hours. Since 2 hours after infection by *P. fluorescens* MFN1032 or *P. aeruginosa* PAO1, IL-1 β and TNF- α levels increased (Fig. 2C, D). Similarly, 2 hours after infection (MOI = 10) of the human monocyte-derived THP-1 cell line, *P. fluorescens* MFN1032 and *P. aeruginosa* PAO1 induced the secretion of IL-1 β and TNF- α (Fig. 2E, F). Most often, the effect of *P. fluorescens* MF37 was less marked (Fig. 2C, D). Six hours after infection, *P. aeruginosa* PAO1 killed more

efficiently M Φ and THP-1 cells than *P. fluorescens* MFN1032 (data not shown).

IL-1 β Expression Induced by *P. fluorescens* MFN1032 Disrupts Intestinal Barrier Function

Because IL-1 β is known to increase the gut ParaP,⁴³ to document its role in the case of *Pseudomonas* infection, WT or IL-1 receptor knockout (*IL-1R*^{-/-}) mice were ig inoculated with *P. fluorescens* MFN1032 during 7 days. In vivo, *P. fluorescens* MFN1032 did not alter the ParaP in *IL-1R*^{-/-} mice (Fig. 3A).

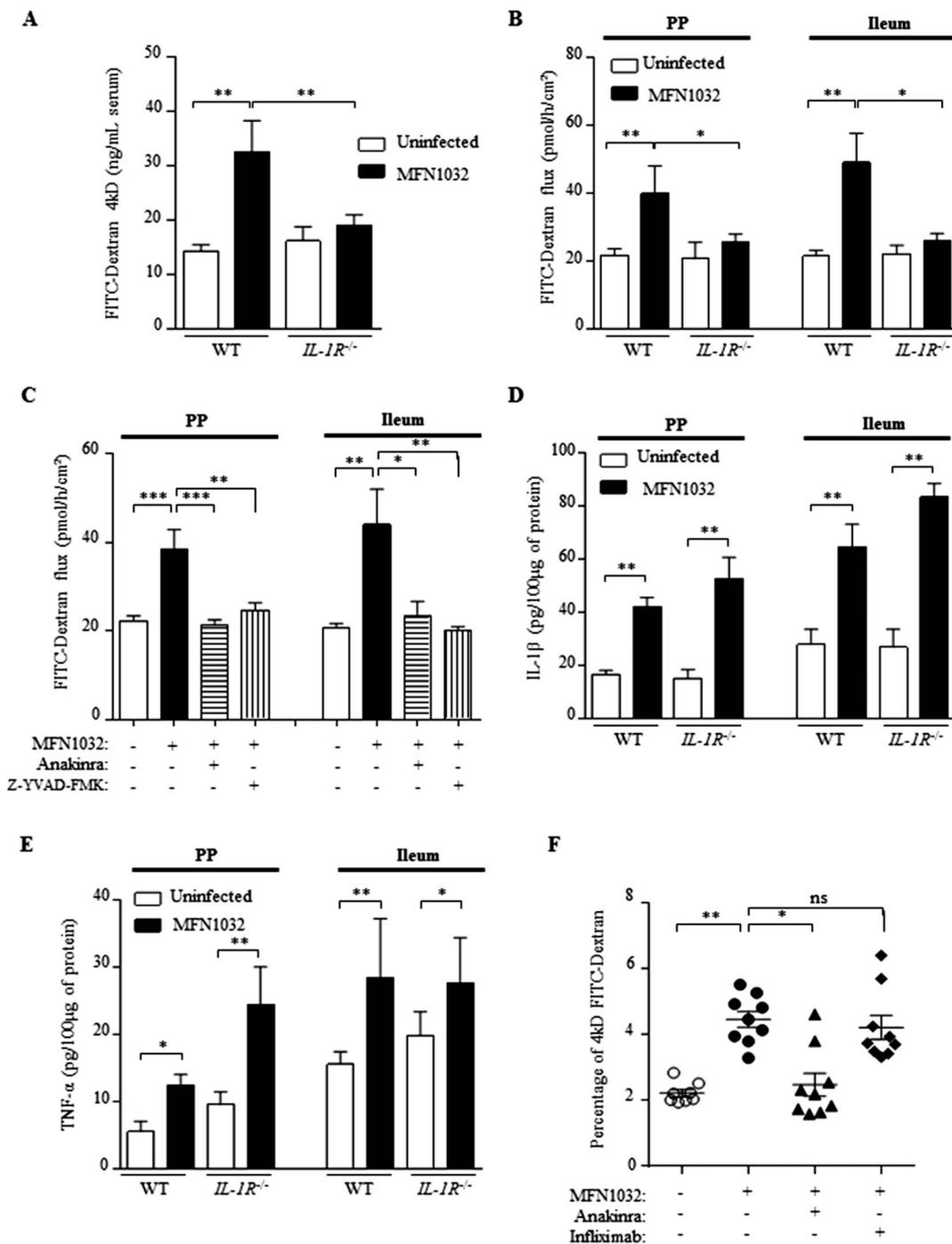


FIGURE 3. IL-1β expression induced by *P. fluorescens* MFN1032 disrupts intestinal barrier function. A–D, WT or *IL-1R*^{-/-} mice were ig inoculated with 10⁸ CFU of *P. fluorescens* MFN1032 for 7 days. A, ParaP was investigated by measuring the quantity of FD4 in the serum. B, After mice were killed, biopsies of PP or ileal mucosa were mounted in UC, and the ParaP was measured for 1 hour. C, Biopsies of PP or ileum from uninfected WT mice were mounted in UC and incubated with *P. fluorescens* MFN1032. Where indicated, WT mice were intraperitoneally treated with Anakinra (an IL-1 receptor antagonist; 300 μg/mice) or with Z-YVAD-FMK (a caspase-1 inhibitor, 100 μg/mice) 2 days before experimentation. During experimentation, Anakinra (50 μg/mL) or Z-YVAD-FMK (20 μg/mL) was added into UC. Then, ParaP was measured for 1 hour. D, IL-1β and (E) TNF-α levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay in PP or in ileal mucosa. F, Caco-2 cells were cultivated on TSs. THP-1 cells infected by *P. fluorescens* MFN1032 for 6 hours were then added into the basolateral compartment, and ParaP was monitored. To investigate the involvement of IL-1β receptor or TNF-α in the increase of ParaP, Caco-2 cells were treated for 24 hours with Anakinra (50 μg/mL) or infliximab (100 μg/mL) (data are expressed as mean ± SEM; **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001; n = 8–10 per group; 3 separate experiments).

Measurements of the FD4 fluxes in UC experiments after in vivo or ex vivo exposures confirmed that IL-1R is required for the effect of *P. fluorescens* MFN1032 (Fig. 3B and see Fig. A, Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/IBD/A691>). WT mice infected with *P. fluorescens* MFN1032 were treated with Anakinra, an IL-1R antagonist. In this model, gut ParaP was also preserved in case of *Pseudomonas* infection (Fig. 3C). As expected, IL-1R deficiency did not alter the IL-1 β and TNF- α levels measured in the PP and ileal biopsies after infection by *P. fluorescens* MFN1032 (Fig. 3D, E). Finally, WT mice were treated with a caspase-1 inhibitor (Z-YVAD-FMK), an enzyme involved in the conversion of pro-IL-1 β into the mature form of IL-1 β . Here too, gut ParaP remained unchanged (Fig. 3C).

These experiments suggested that the gut barrier dysfunction was the result of the stimulation of epithelial cells by IL-1 β produced by macrophagic cells. To further dissect the cross talk between immune and epithelial cells, epithelial Caco-2 cells were cocultivated with THP-1 cells in TSs. Before coculture, THP-1 cells were infected or not with *P. fluorescens* MFN1032 for 6 hours and then treated with gentamycin (to kill the extracellular bacteria). Infected THP-1 cells were then added into the basolateral compartment of the TS, and the ParaP of the Caco-2 monolayers was monitored. FD4 flux across Caco-2 monolayers was significantly higher when epithelial cells were cultivated with infected THP-1 cells than with uninfected cells (Fig. 3F). Anakinra reversed the effect of THP-1 infected cells, when added into the basolateral compartment of the TS. By contrast, a pretreatment by infliximab, an anti-TNF monoclonal antibody, did not significantly affect the ParaP (Fig. 3F). As expected, IL-1 β and TNF- α secretions by THP-1 cells in response to *P. fluorescens* MFN1032 were not affected by the 2 tested inhibitors (see Fig. B, Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/IBD/A691>). Altogether, these data indicated that IL-1 β carried the effect of *P. fluorescens* MFN1032 on the epithelial permeability.

P. fluorescens MFN1032 Increases MLCK Expression and Activity, Which in Turn Disrupt the Epithelial Barrier

MLCK has been previously reported to play a central role in the regulation of ParaP in response to IL-1 β and pathogens.^{23,30} We thus investigated its role in case of infection by *P. fluorescens* MFN1032. After infection, the ileal mucosa from WT mice exhibited increased mRNA levels of MLCK (Fig. 4A). In contrast, no increase of MLCK mRNA expression was observed in *IL-1R*^{-/-} mice (Fig. 4A). In vitro, Caco-2 cells cocultured with *P. fluorescens* MFN1032-infected THP-1 cells triggered an increased expression of MLCK protein (Fig. 4B). Treatment with ML-7, a MLCK inhibitor, suppressed the effect of *P. fluorescens* MFN1032 on gut ParaP in vivo (Fig. 4C). Similarly, Caco-2 cells treated with ML-7 failed to exhibit an increased ParaP when cocultured with THP-1 cells infected by *P. fluorescens* MFN1032 (Fig. 4D). As expected, IL-1 β and TNF- α secretions

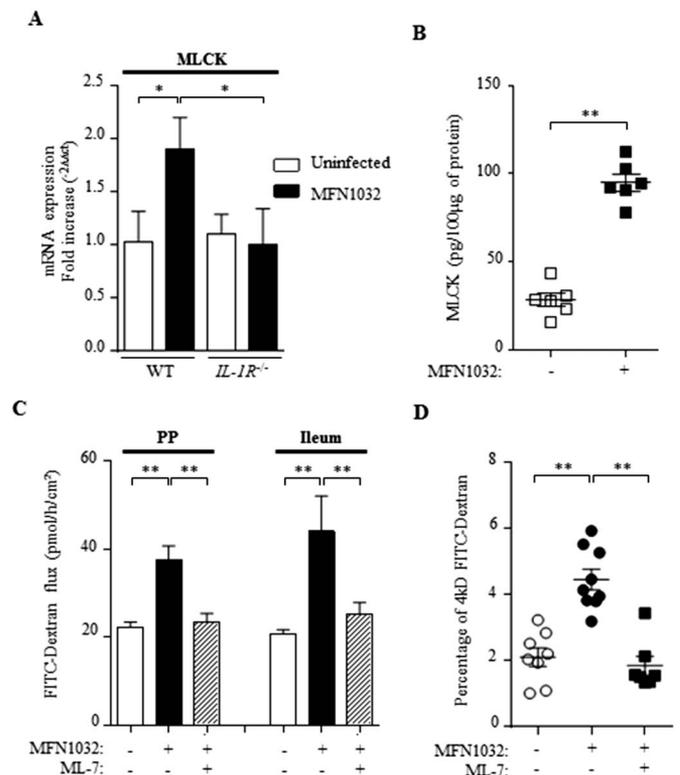


FIGURE 4. *P. fluorescens* MFN1032 increases MLCK expression and activity, which in turn disrupt the epithelial barrier function by a mechanism that is IL-1R-dependent. A, MLCK mRNA expression from ileal mucosa was determined by real-time PCR in WT or *IL-1R*^{-/-} mice previously inoculated with 10⁸ CFU of *P. fluorescens* MFN1032 for 7 days. B, Caco-2 cells were cultivated on TSs. THP-1 cells infected by *P. fluorescens* MFN1032 were then added into the basolateral compartment, and MLCK expression was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. C, WT or *IL-1R*^{-/-} mice were intraperitoneally treated with ML-7 (2 mg/kg), an inhibitor of MLCK, for 2 consecutive days before experimentation. Then, biopsies from ileal mucosa and PP were mounted in UC and incubated with *P. fluorescens* MFN1032. ParaP was monitored by measuring the flux of FD4 for 1 hour. D, Caco-2 cells were cultivated on TSs. THP-1 cells infected with *P. fluorescens* MFN1032 were then added into the basolateral compartment, and ParaP was measured. To investigate the involvement of myosin light chain kinase in the increase of ParaP, Caco2 cells were treated for 24 hours with ML-7 (50 μ g/mL). Data are expressed as mean \pm SEM; **P* < 0.05, and ***P* < 0.01; n = 7–9 per group; 3 separate experiments.

by THP-1 cells in response to *P. fluorescens* MFN1032 were not affected by the MLCK inhibitor (see Fig. B, Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/IBD/A691>). Together, these results evidenced that *P. fluorescens* strain MFN1032 increases the ParaP by upregulating the activity and expression of MLCK.

IL-1 β Secretion by *P. fluorescens* MFN1032-Infected Macrophages is Nod2 Dependent

Because *NOD2* polymorphisms are characterized by an ileal barrier dysfunction⁴⁵ and the presence of I2 into the serum

is associated with the presence of CD ileal lesions,³⁹ we investigated the role of *Nod2* in case of infection by *P. fluorescens* MFN1032. WT, *Nod2*^{-/-} and mice carrying a mutation homologous to the human 1007 frame shift CD-associated mutation (*Nod2*^{2939iC}) were inoculated with 10⁸ CFU of *P. fluorescens* MFN1032 during 7 days. Next, the ParaP was determined by measuring the FD4 level in the serum. As previously shown, increased levels of FD4 were observed in infected WT mice (Fig. 5A). In *Nod2*^{-/-} and *Nod2*^{2939iC} mice, the basal levels of FD4 were high as previously reported.¹⁹ They did not increase after infection by *P. fluorescens* MFN1032 (Fig. 5A). Similar results were obtained by ex vivo measurement of the ParaP through ileal biopsies mounted in UC (Fig. 5B and see Fig. A, Supplemental Digital Content 4, <http://links.lww.com/IBD/A692>). In *Nod2*^{-/-} and *Nod2*^{2939iC} mice, unlike to WT mice, *P. fluorescens* MFN1032 failed to increase the secretions of IL-1 β and TNF- α in the PP and ileum (Fig. 5C).

To confirm the defect of IL-1 β secretion in case of *Nod2* deficiency, BMSC from WT or *Nod2*^{-/-} mice were differentiated into M Φ and infected with the clinical bacterial strain. *P. fluorescens* MFN1032 induced a lower expression of IL-1 β and TNF- α in *Nod2*^{-/-} M Φ (Fig. 5D). To further confirm this finding, *Nod2* was inhibited by RNA silencing in THP-1 cells. We observed a suppression of IL-1 β synthesis after exposure to *P. fluorescens* MFN1032 (Fig. 5E and see Fig. B, Supplemental Digital Content 4, <http://links.lww.com/IBD/A692>). In contrast, TNF- α secretion was not affected by *Nod2* RNA silencing (Fig. 5F). In contrast, TLR-2 and TLR-4 inhibition did not affect IL-1 β or TNF- α synthesis (Fig. 5E, F and see Fig. B, Supplemental Digital Content 4, <http://links.lww.com/IBD/A692>). These results showed that *Nod2* expression is required for the secretion of IL-1 β by macrophages in response to *P. fluorescens* MFN1032.

To further explore the role of *Nod2*, WT and *Nod2*^{2939iC} mice were intraperitoneally inoculated with MDP every 2 days during the infection by *P. fluorescens* MFN1032. PP and ileal biopsies were mounted in UC to measure the ParaP. MDP abolished the increase of ParaP induced by *P. fluorescens* MFN1032 in WT mice (Fig. 6A). In contrast and as expected, no impact of MDP treatment was observed in *Nod2*^{2939iC}-deficient mice infected with *P. fluorescens* MFN1032 (Fig. 6A).

MDP treatment also reduced the secretion of IL-1 β (but not TNF- α) in response to *P. fluorescens* MFN1032 in BMSC differentiated into M Φ or in THP-1 cells infected with *P. fluorescens* MFN1032 (Fig. 6B–D). As expected, when *Nod2* (or its downstream ligand RICK) was inhibited by RNA silencing, the effect of MDP was abrogated in THP-1 cells (Fig. 6D and see Fig. C, Supplemental Digital Content 4, <http://links.lww.com/IBD/A692>). Altogether, these results evidenced that MDP inhibited the production of IL-1 β in response to *P. fluorescens* MFN1032.

Hematopoietic *Nod2* Mediates *P. fluorescens* MFN1032 Epithelial Barrier Dysfunction

Nod2 is expressed in both hematopoietic and nonhematopoietic cells lineages. To determine whether the increased ParaP

depends on *Nod2* expression in epithelial cells or in immune cells, we constructed chimeric mice by bone marrow transplantation. Three months after bone marrow transfer, the expressions of CD45.Ly1 (donors) and CD45.Ly2 (recipients) indicated about 95% efficiency of bone marrow reconstitution for CD3⁺, CD19⁺, and CD11c⁺ cells in both spleen and PP (data not shown). *Nod2* deletion in the hematopoietic compartment was sufficient to increase the ileal ParaP under basal condition (Fig. 7A). After infection by *P. fluorescens* MFN1032, ParaP of the ileal mucosa was increased only when *Nod2* was expressed in the hematopoietic cell lineage (WT \rightarrow WT and WT \rightarrow *Nod2*^{-/-}) (Fig. 7A). Conversely, when *Nod2* was deleted within the hematopoietic compartment (*Nod2*^{-/-} \rightarrow *Nod2*^{-/-} and *Nod2*^{-/-} \rightarrow WT), the gut ParaP was similar regardless of the presence or not of *P. fluorescens* MFN1032 (Fig. 7A).

Chimeric mice were then treated with MDP and infected with *P. fluorescens* MFN1032. *Nod2* stimulation in chimeric mice expressing *Nod2* in their hematopoietic compartment (WT \rightarrow WT and WT \rightarrow *Nod2*^{-/-}) reduced the increase of ParaP (Fig. 7B). We thus concluded that *Nod2* expression in the hematopoietic cell lineages was responsible for the barrier dysfunction after *P. fluorescens* MFN1032 infection.

DISCUSSION

An abnormal host–microbial interaction affecting preferentially the terminal segment of the small bowel is supposed to contribute to ileal CD.⁶ However, the nature of the causative bacteria playing a role in CD remains a subject of debate. While many groups work on the dysbiosis hypothesis (mainly based on the observation that the gut microbiota is different in patients with CD when compared with controls), others explore the role of more specific microbial agents. Among them, *Mycobacterium avium paratuberculosis*, *Escherichia coli*, *Yersinia* species, or *P. fluorescens* (and others) is on the list of proposed candidates. *Yersinia* and *E. coli* LF82 are known to alter the barrier function of the intestinal mucosa.^{23,30,33,46} However, little is known about the impact of *P. fluorescens* on the intestinal barrier.

P. fluorescens is present at low level in the gut, and it has been linked to CD with ileal lesions.^{29,39} Because CD has been related to abnormal host–microbial interactions affecting preferentially the terminal segment of the small bowel at PP location,⁶ we have determined the ability of *P. fluorescens* strains to disrupt the epithelial barrier of the ileal mucosa and PP. For that, we have selected 2 strains of *P. fluorescens*: a classical psychrotrophic strain (MF37) able to grow at low temperatures and a characterized clinical strain (MFN1032) adapted to grow at 37°C. The behavior of these bacteria was compared to the opportunistic pathogen *P. aeruginosa* (PAO1). All the *Pseudomonas* species were able to alter the gut permeability, suggesting that the increased permeability is a general property of *Pseudomonas* colonization in the digestive tract. This result extends the previous report showing that *Pseudomonas* species increase the ParaP of polarized Caco-2/TC7 monolayers.³⁸

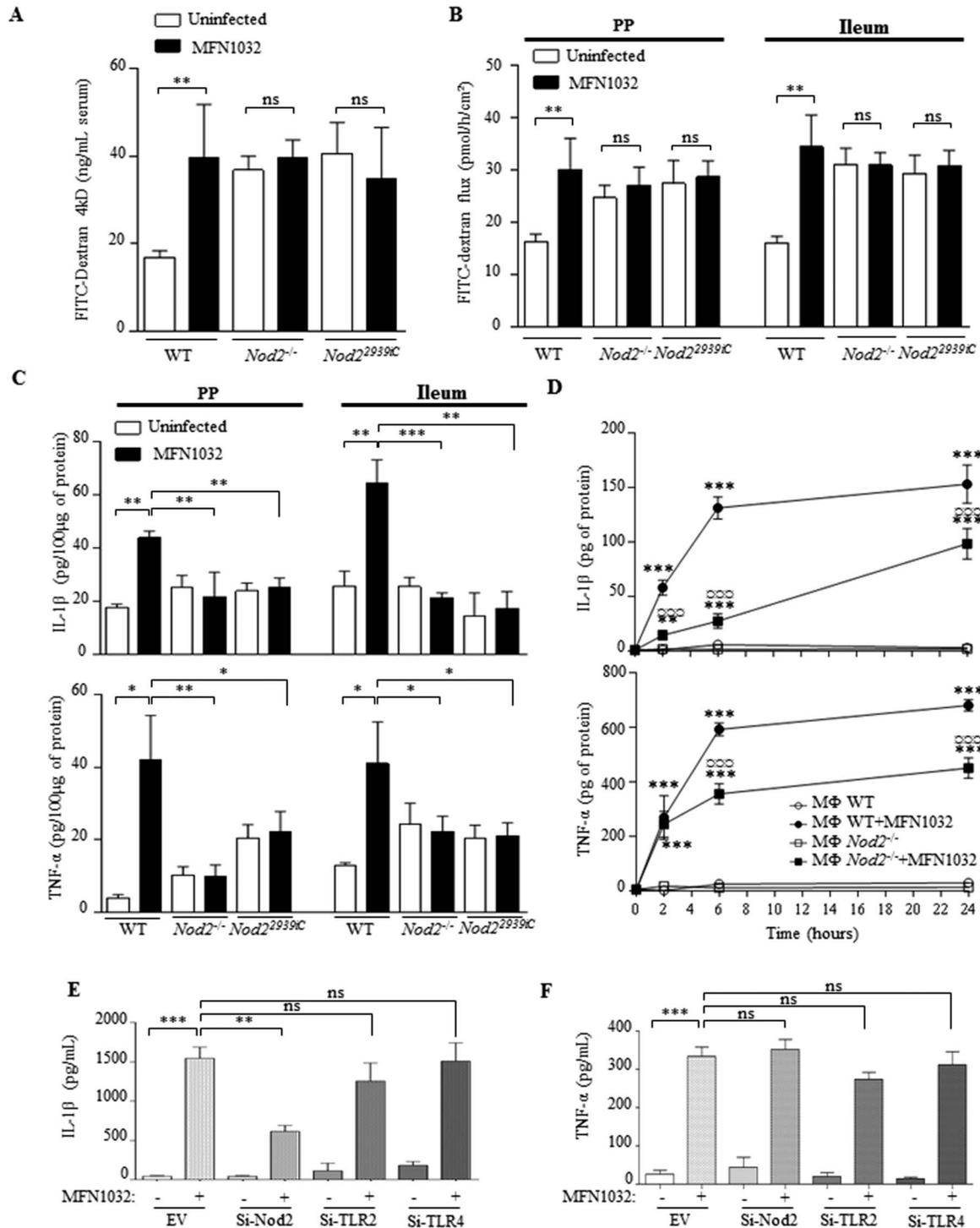


FIGURE 5. Nod2 is required to alter the epithelial barrier function. A–C, WT, *Nod2*^{-/-}, and *Nod2*^{2939C} mice were ig inoculated with 10⁸ CFU of *P. fluorescens* MFN1032 for 7 days. A, ParaP was investigated by measuring the quantity of FD4 in the serum after 6 hours of FD4 oral inoculation. After mice were killed, biopsies from PP or ileum were mounted in UC, and (B) the ParaP was measured together with (C) IL-1β and TNF-α levels (enzyme-linked immunosorbent assay). D, Bone marrow stem cells from WT and *Nod2*^{-/-} mice were differentiated into MΦ and infected with *P. fluorescens* MFN1032 for 2, 6, or 24 hours. Then, IL-1β and TNF-α levels were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay in the supernatant. E and F, THP-1 cells were transfected with siRNA against NOD2, TLR-2, TLR-4, or not targeting siRNA (NT) and infected by *P. fluorescens* MFN1032. After centrifugation, the levels of (E) IL-1β and (F) TNF-α were measured in the supernatant. Data are expressed as mean ± SEM; ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001; ns*P* < 0.05 versus MΦ WT + MFN1032; n = 6–14 per group; 3 separate experiments.

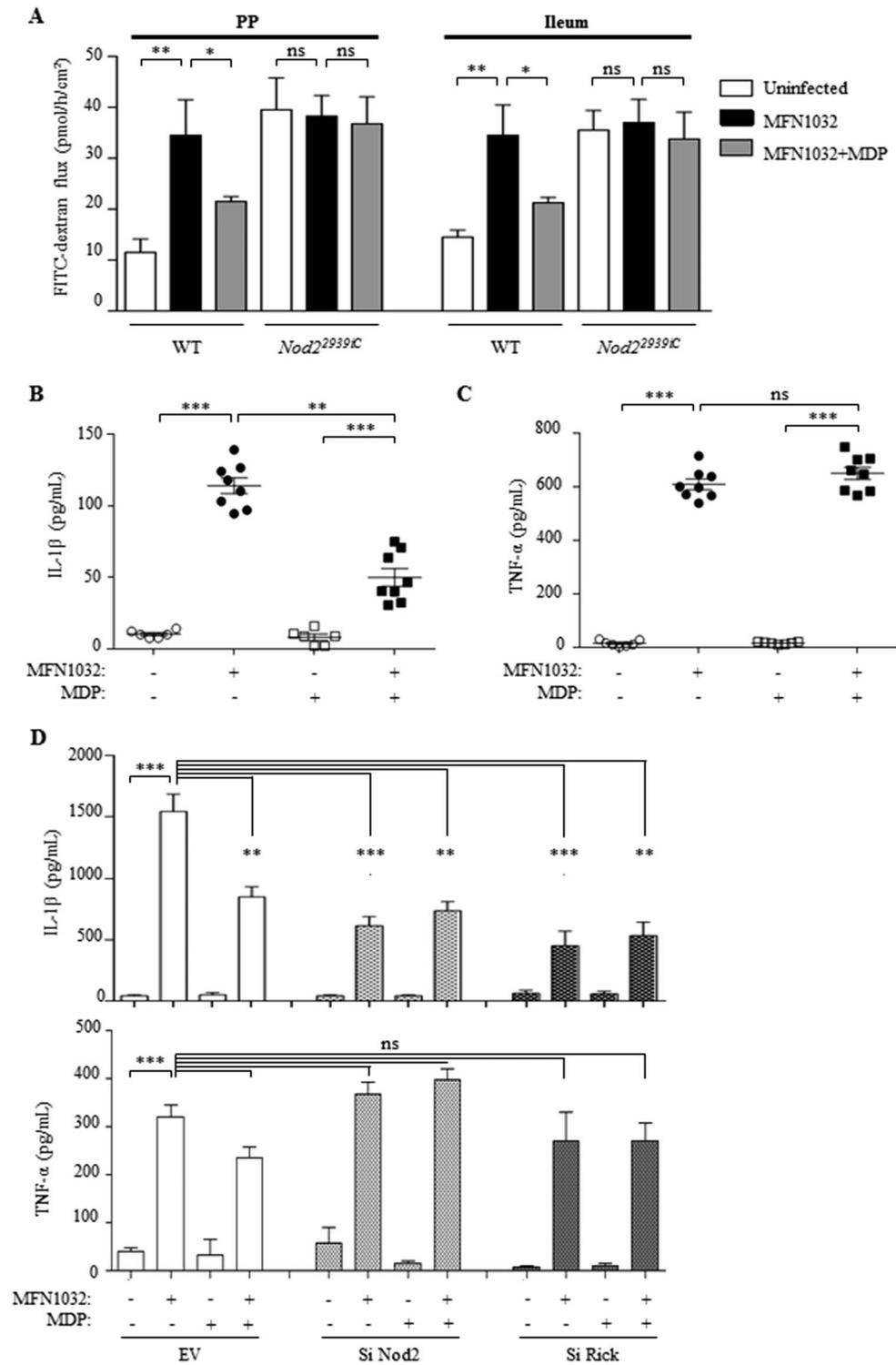
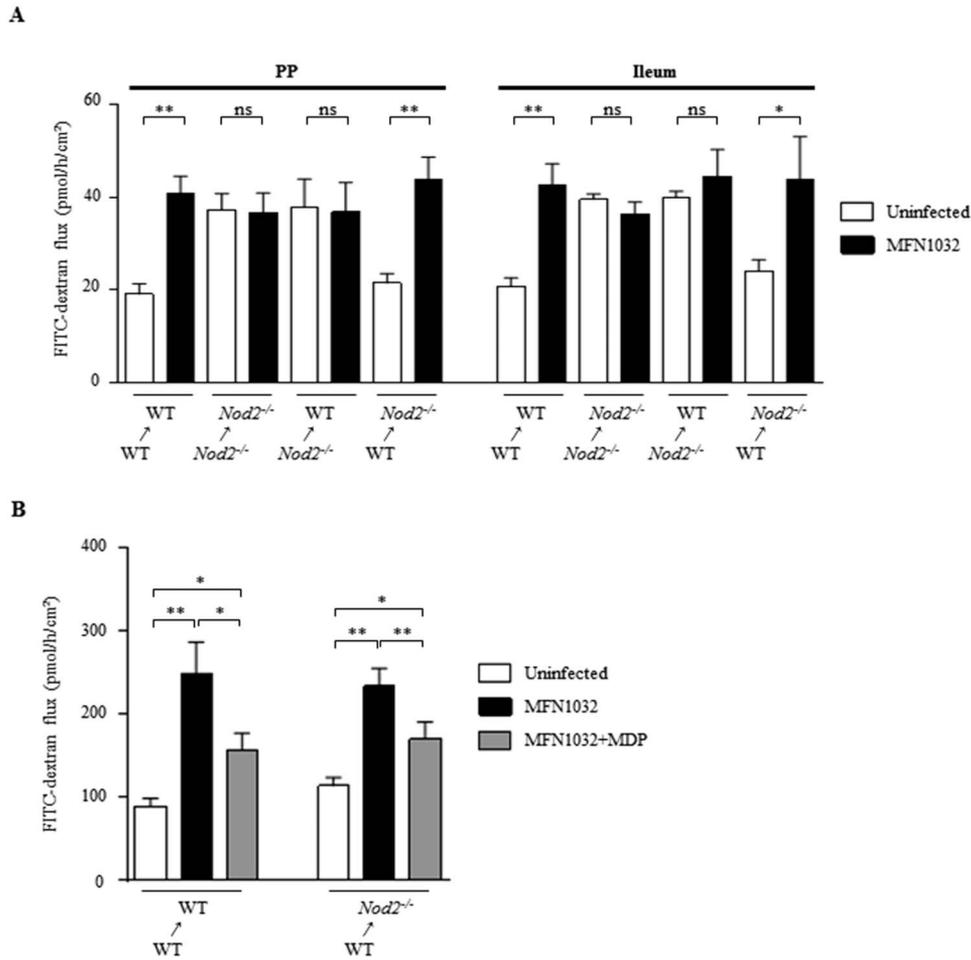


FIGURE 6. MDP treatment abrogates the increase of ParaP and IL-1 β synthesis. A, WT and *Nod2*^{2939C} mice were ig inoculated with 10⁸ CFU of *P. fluorescens* MFN1032 for 7 days and treated with MDP (100 μ g) every 2 days. After mice were killed, biopsies from PP and ileal mucosa were mounted in UC, and the ParaP was measured for 1 hour. B and C, BMSC from WT mice were differentiated into M Φ cells and treated with MDP (20 μ g/mL) 24 hours before infection by *P. fluorescens* MFN1032. After 6 hours, IL-1 β (B) and TNF- α (C) levels in the supernatant were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay. D, THP-1 cells were transfected with siRNA against NOD2 or Rick or NT siRNA and treated with MDP (20 μ g/mL) 24 hours before infection by *P. fluorescens* MFN1032. After 6 hours, the levels of IL-1 β and TNF- α were measured in the supernatant. Data are expressed as mean \pm SEM; * P < 0.05, ** P < 0.01, and *** P < 0.001; n = 6–14 per group; 3 separate experiments.



However, the different strains used in this study did not exhibit the same amplitude of barrier dysfunction. Unsurprisingly, *P. aeruginosa* PAO1 had the higher impact, whereas *P. fluorescens* MF37 (a nonpathogenic strain) had the less marked effect. It was outside the scope of this study to explore the virulence factors explaining these differences. However, we can note that some differences have yet been reported between these strains. For example, *P. fluorescens* MF37 and *P. fluorescens* MFN1032 displayed similar adhesion potential to Caco-2/TC7, but *P. fluorescens* MFN1032 exhibits a higher cytotoxic effect.³⁷

Several proinflammatory cytokines including IL-1β, TNF-α, and interferon γ are known to alter the gut barrier.^{44,47} Dissecting the mechanisms of the gut barrier dysfunction during *Pseudomonas* infection, we found that it was mainly related to the production of IL-1β. This cytokine is known to increase the gut ParaP in mice^{23,30} and in cell culture models.⁴⁷ It has also been proposed to contribute to the intestinal barrier defect in patients with CD.⁴⁸

As a consequence, IL-1β seems to play a dual role. On one hand, it helps to control the infection by participating in the host inflammatory response. On the other hand, it allows the entry of the luminal content, which may favor a vicious circle and an uncontrolled inflammation.⁴⁹

The mechanism by which IL-1β increases the gut ParaP is the upregulation of both the expression and the activity of epithelial MLCK.⁵⁰ In mouse, IL-1β increases the MLCK mRNA expression in epithelial cells by a mechanism depending on the activation and nuclear translocation of the NF-κB p65 subunit.⁵⁰ In vitro studies based on polarized Caco-2 monolayers suggest that the effect of IL-1β on MLCK expression is mediated by the activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway.⁵¹ The activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 triggers nuclear translocation of Elk-1, which is able to bind a cis-binding motif on the MLCK promoter, promoting MLCK transcription.^{51,52} Noteworthy, *P. aeruginosa* PAO1 is able to stimulate NF-κB activity,

but it has no effect on the activator protein 1 pathway. In contrast, *P. fluorescens* MFN1032 stimulates the activator protein 1 pathway but does not enhance the NF- κ B pathway.^{37,38} Thus, additional studies are requested to further dissect the signaling pathway of MLCK stimulation in the epithelial cells.

Whatever be the signaling cascade involved in the regulation of MLCK expression, the inhibition of MLCK activity abrogates the effect of *Pseudomonas* on the permeability and more generally on IL-1 β -mediated gut dysfunction.⁵⁰ In CD, the pathophysiologic importance of MLCK is supported by the observation that MLCK expression and activity are increased in enterocytes of biopsied patients.⁵³ The impact of MLCK on gut permeability has been studied previously.⁵⁴ Activated MLCK increases the width of epithelial tight junctions, a phenotype that is also reported in CD.⁵⁵

As shown here, the capacity of numerous pathogens to disrupt the epithelial barrier function facilitates not only its own translocation within the gut mucosa but also the passage of the luminal content within the internal milieu. One of the major features of CD pathophysiology is an excess of both ParaP and bacterial translocation.^{2,21} As a result, an overreactivity against several antigens present in the gut lumen (including against *P. fluorescens*) is a key finding in CD.^{29,39}

NOD2 mutations, including a 1007 frame shift mutation, are frequently encountered in patients with ileal CD.⁴⁵ Furthermore, several results indicate that NOD2 is directly linked to the regulation of IL-1 β synthesis.^{56,57} We thus questioned the relationship between *P. fluorescens* and NOD2 deficiency. In both *Nod2* knockout mice and mice carrying a mutation homologous to the human 1007 frame shift mutation, *P. fluorescens* was no more able to alter the gut barrier. The presence of functional Nod2 in the hematopoietic compartment is required for *P. fluorescens* MFN1032 to increase the ParaP by IL-1 β secretion. RICK (adownstream partner of Nod2) was also involved in the synthesis of IL-1 β .²³ In contrast, TLR-2 and TLR-4 were not involved in the IL-1 β synthesis in response to *P. fluorescens* MFN1032. Finally, IL-1 β production may be prevented by MDP, a Nod2 ligand.

A similar mechanism has been reported for *Y. pseudotuberculosis*.²³ In that case, the acetylation of RICK (a Nod2 downstream effector) by the *Yersinia* virulence factor YopJ reduces its affinity for NOD2.²³ This effect is reversible by MDP pretreatment, suggesting that it is a dynamic process. When RICK is inhibited, NOD2 is able to form a complex with caspase 1 and consequently to produce mature IL-1 β . In this model, NOD2 is in equilibrium with its 2 partners: RICK and caspase 1. Under MDP activation, NOD2/RICK interaction is favored, resulting in NF- κ B and MKK signaling while in case of bacterial infection by *Y. pseudotuberculosis*, Nod2 is free to activate caspase 1, resulting in IL-1 β secretion. All the data presented here suggest that a similar model may be proposed for *P. fluorescens*. Interestingly, *Salmonella* species also take advantage of IL-1 β secretion and of a low grade of mucosal inflammation.⁵⁸ This effect is mediated by the effector SopE, which activates caspase-1 and IL-1 β synthesis.⁵⁹

The role of *P. fluorescens* in CD has been initially supported by the presence of antibodies directed against the I2

sequence, which is specific to the bacteria.^{29,39} The cold chain hypothesis also points out *P. fluorescens* as a candidate bacteria for CD because it is able to grow at low temperatures.²⁵ According to this hypothesis, refrigerated food may carry bacteria (like *Pseudomonas* or *Yersinia* species), which triggers the inflammation in genetically at-risk patients. In the present state of our knowledge, the absence of functional Nod2 in the host is characterized by a gut barrier dysfunction at the basal level.^{19,22} We show here that in case of infection by *P. fluorescens*, MDP stimulation is not able to restore the barrier function in case of Nod2 mutation. As a result, the antigenic load of the mucosa is increased and may result in a chronic inflammation.

REFERENCES

- Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134:577–594.
- Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, et al. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med*. 1986;105:883–885.
- Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448:427–434.
- Kaser A, Lee AH, Franke A, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*. 2008;134:743–756.
- Van Kruiningen HJ, West AB, Freda BJ, et al. Distribution of Peyer's patches in the distal ileum. *Inflamm Bowel Dis*. 2002;8:180–185.
- Fujimura Y, Kamoi R, Iida M. Pathogenesis of aphthoid ulcers in Crohn's disease: correlative findings by magnifying colonoscopy, electron microscopy, and immunohistochemistry. *Gut*. 1996;38:724–732.
- Jung C, Hugot JP, Barreau F. Peyer's patches: the immune sensors of the intestine. *Int J Inflam*. 2010;2010:823710.
- Clayburgh DR, Shen L, Turner JR. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest*. 2004;84:282–291.
- Irvine EJ, Marshall JK. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology*. 2000;119:1740–1744.
- Yacyszyn BR, Meddings JB. CD45RO expression on circulating CD19+ B cells in Crohn's disease correlates with intestinal permeability. *Gastroenterology*. 1995;108:132–137.
- Jostins L, Ripke S, Weersma RK, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012;491:119–124.
- Lesage S, Zouali H, Cezard JP, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*. 2002;70:845–857.
- Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity*. 2008;28:285–287.
- Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*. 2003;278:5509–5512.
- Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. 2003;278:8869–8872.
- Traub S, von Aulock S, Hartung T, et al. MDP and other muropeptides—direct and synergistic effects on the immune system. *J Endotoxin Res*. 2006;12:69–85.
- Mondot S, Barreau F, Al Nabhani Z, et al. Altered gut microbiota composition in immune-impaired Nod2(-/-) mice. *Gut*. 2012;61:634–635.
- Barreau F, Meinzer U, Chareyre F, et al. CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PLoS One*. 2007;2:e523.
- Barreau F, Madre C, Meinzer U, et al. Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches. *Gut*. 2010;59:207–217.
- Biswas A, Liu YJ, Hao L, et al. Induction and rescue of Nod2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation of the ileum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:14739–14744.

21. Kosovac K, Brenmoehl J, Holler E, et al. Association of the NOD2 genotype with bacterial translocation via altered cell-cell contacts in Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:1311–1321.
22. Buhner S, Buning C, Genschel J, et al. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut*. 2006;55:342–347.
23. Meinzer U, Barreau F, Esmiol-Welterlin S, et al. Yersinia pseudotuberculosis effector YopJ subverts the Nod2/RICK/TAK1 pathway and activates caspase-1 to induce intestinal barrier dysfunction. *Cell Host Microbe*. 2012;11:337–351.
24. Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:458–466.
25. Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, et al. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet*. 2003;362:2012–2015.
26. Malekzadeh F, Alberti C, Nouraei M, et al. Crohn's disease and early exposure to domestic refrigeration. *PLoS One*. 2009;4:e4288.
27. Lamps LW, Madhusudhan KT, Havens JM, et al. Pathogenic Yersinia DNA is detected in bowel and mesenteric lymph nodes from patients with Crohn's disease. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:220–227.
28. Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, et al. Immunocytochemical evidence of Listeria, Escherichia coli, and Streptococcus antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1995;108:1396–1404.
29. Sutton CL, Kim J, Yamane A, et al. Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2000;119:23–31.
30. Jung C, Meinzer U, Montcuquet N, et al. Yersinia pseudotuberculosis disrupts intestinal barrier integrity through hematopoietic TLR-2 signaling. *J Clin Invest*. 2012;122:2239–2251.
31. Corr S, Hill C, Gahan CG. An in vitro cell-culture model demonstrates internalin- and hemolysin-independent translocation of Listeria monocytogenes across M cells. *Microb Pathog*. 2006;41:241–250.
32. Koo OK, Amalaradjou MA, Bhunia AK. Recombinant probiotic expressing Listeria adhesion protein attenuates Listeria monocytogenes virulence in vitro. *PLoS One*. 2012;7:e29277.
33. Barreau F, Hugot J. Intestinal barrier dysfunction triggered by invasive bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2014;17C:91–98.
34. Rajmohan S, Dodd CE, Waites WM. Enzymes from isolates of Pseudomonas fluorescens involved in food spoilage. *J Appl Microbiol*. 2002;93:205–213.
35. Chapalain A, Rossignol G, Lesouhaitier O, et al. Comparative study of 7 fluorescent pseudomonad clinical isolates. *Can J Microbiol*. 2008;54:19–27.
36. Sperandio D, Rossignol G, Guerillon J, et al. Cell-associated hemolysis activity in the clinical strain of Pseudomonas fluorescens MFN1032. *BMC Microbiol*. 2010;10:124.
37. Madi A, Lakhdari O, Blottiere HM, et al. The clinical Pseudomonas fluorescens MFN1032 strain exerts a cytotoxic effect on epithelial intestinal cells and induces Interleukin-8 via the AP-1 signaling pathway. *BMC Microbiol*. 2010;10:215.
38. Madi A, Svinareff P, Orange N, et al. Pseudomonas fluorescens alters epithelial permeability and translocates across Caco-2/TC7 intestinal cells. *Gut Pathog*. 2010;2:16.
39. Dalwadi H, Wei B, Kronenberg M, et al. The Crohn's disease-associated bacterial protein I2 is a novel enteric T cell superantigen. *Immunity*. 2001;15:149–158.
40. Labow M, Shuster D, Zetterstrom M, et al. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *J Immunol*. 1997;159:2452–2461.
41. Burini JF, Gugi B, Merieau A, et al. Lipase and acidic phosphatase from the psychrotrophic bacterium Pseudomonas fluorescens: two enzymes whose synthesis is regulated by the growth temperature. *FEMS Microbiol Lett*. 1994;122:13–18.
42. Rousseau C, Winter N, Pivert E, et al. Production of phthiocerol dimycocerosates protects Mycobacterium tuberculosis from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. *Cell Microbiol*. 2004;6:277–287.
43. Al-Sadi RM, Ma TY. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol*. 2007;178:4641–4649.
44. Wang F, Graham WV, Wang Y, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol*. 2005;166:409–419.
45. Hugot JP, Chamailard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411:599–603.
46. Denizot J, Sivignon A, Barreau F, et al. Adherent-invasive Escherichia coli induce claudin-2 expression and barrier defect in CEABAC10 mice and Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18:294–304.
47. Al-Sadi R, Ye D, Dokladny K, et al. Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol*. 2008;180:5653–5661.
48. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J, et al. Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. *Lancet*. 1999;353:459–461.
49. Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G, et al. IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:13249–13254.
50. Al-Sadi R, Guo S, Dokladny K, et al. Mechanism of interleukin-1beta induced-increase in mouse intestinal permeability in vivo. *J Interferon Cytokine Res*. 2012;32:474–484.
51. Al-Sadi R, Guo S, Ye D, et al. Mechanism of IL-1beta modulation of intestinal epithelial barrier involves p38 kinase and activating transcription factor-2 activation. *J Immunol*. 2013;190:6596–6606.
52. Al-Sadi R, Ye D, Said HM, et al. IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by MEKK-1 activation of canonical NF-kappaB pathway. *Am J Pathol*. 2010;177:2310–2322.
53. Blair SA, Kane SV, Clayburgh DR, et al. Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. *Lab Invest*. 2006;86:191–201.
54. Su L, Shen L, Clayburgh DR, et al. Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. *Gastroenterology*. 2009;136:551–563.
55. Hollander D. Crohn's disease—a permeability disorder of the tight junction? *Gut*. 1988;29:1621–1624.
56. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature*. 2008;456:264–268.
57. Villani AC, Lemire M, Fortin G, et al. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet*. 2009;41:71–76.
58. Stecher B, Robbiani R, Walker AW, et al. Salmonella enterica serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007;5:2177–2189.
59. Muller AJ, Hoffmann C, Galle M, et al. The S. Typhimurium effector SopE induces caspase-1 activation in stromal cells to initiate gut inflammation. *Cell Host Microbe*. 2009;6:125–136.

CURRICULUM VITAE

KELLY BIAGGINI

Née le 08 Janvier 1988 à Nîmes

ADRESSE: 9 rue Saint Sauveur 27000 Evreux

PORTABLE: 06.17.50.57.18

E-mail: kelly.biaggini@hotmail.fr

EMPLOI ACTUEL

Doctorante en Biologie Cellulaire, Microbiologie 3^{ème} année

Laboratoire LMSM (Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, Evreux)
Unité INSERM UMR 1073 (Nutrition, inflammation et dysfonction de l'axe intestin-cerveau, Rouen)
sous la direction du Dr Nathalie Connil et du Pr Pierre Déchelotte

Sujet de thèse

Etude du dialogue entre le système entéroendocrinien et le microbiote intestinal

Compétences Acquises

physiologie bactérienne, croissance, mobilité, translocation, invasion et adhésion bactériennes
culture cellulaire, tests de perméabilité cellulaire
dosage de facteurs de virulence bactériens et de molécules eucaryotes
identification bactérienne (MALDI TOF BIOTYPER)
microscopie confocale

Formations suivies internes au laboratoire

Transcriptomique et utilisation de la qPCR ; logiciel BIOTYPER (MALDI), expression orale en anglais

FORMATION

Université de Rouen depuis 2012

Université des Sciences de Montpellier II (2009-2011)

Université des Sciences de Nîmes mention Biologie (2006-2009)

Conservatoires de musique (Avignon, Montpellier, Nîmes, 1996-2010)

DIPLOMES OBTENUS

Etudes Générales:

MASTER II : DEA BIOLOGIE juin 2011 (BIOMED recherche)

Parcours interactions hôtes-agents infectieux et mécanismes de défense

MASTER I: MAITRISE BIOLOGIE SANTE 2010 (Université de Montpellier II)

LICENCE DE BIOLOGIE 2009 (Université de Nîmes)

DEUG DE BIOLOGIE 2008 (Université de Nîmes)

BACCALAUREAT SECTION LITTERATURE OPTION MUSIQUE 2006

(diplôme obtenu après une formation au CNED)

STAGES

***Janvier à Juin 2011:** stagiaire au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Lapeyronnie Montpellier.

"Etude fonctionnelle du mécanisme d'action d'une petite protéine G impliquée dans la biogenèse du flagelle des leishmanies"

culture cellulaire de parasites, clonage, PCR et PCR chevauchantes, microscopie à fluorescence, techniques ADN (gel d'agarose, purification...), électroporation, analyse des résultats de séquençage

***Février à Mars 2010:** stagiaire à l'INSERM Nîmes

" Etude de l'interaction d'une protéine bactérienne de *Brucella suis* avec la protéine eucaryote CSN6"

communication au sein d'un laboratoire et pratique de l'anglais

culture cellulaire, western blot, extraction de protéines, immunomarquage de cellules, microscopie à fluorescence

***Janvier à Février 2009:** stagiaire au Laboratoire de Microbiologie (AQMC) structure privée de prestation de service Montpellier

"Mise en place d'un nouveau plan de nettoyage/désinfection et sécurité chimique"

(service qualité et audit de laboratoire)

AUTRES FORMATIONS

*Octobre 2014 à Mai 2015

formations variées dans le cadre du monitorat et pour l'enseignement dispensées par l'école doctorale EdNBISE et l'ESPE Rouen

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

Monitrice à l'IUT d'Evreux (Université de Rouen)

enseignements dispensés : TP et TD en Biologie Cellulaire, Histologie, Microbiologie, Physiologie ... première et seconde année DUT (génie biologique)

Coencadrements de stagiaires (2014-2015)

Alexis Dupuis, stagiaire Master 1 (2 mois)

Siham Bouhelbane stagiaire de licence 3ème année (2 mois)

Rikki Knowlton, stagiaire ERASMUS niveau licence, encadrement et formation technique en anglais (3 mois)

Valérie Borrel, stagiaire Master 2 (6 mois)

Constant Guillet BTS (1mois)

Technicienne supérieure au LSM (Janvier-Septembre 2012)

Projet : Tests sur un actif de synthèse cosmétique

*impact sur le microbiote cutané (croissance et physiologie bactérienne) et sur la peau :évaluation de l'irritation (modèle RHE), de sensibilisation et de génotoxicité

*traitements, communication et présentation orales des résultats

COMMUNICATIONS ORALES ECRITES

Poster Juillet 2013 Journées de l'école doctorale EdNBISE Caen

Effect of substance P, epinephrin and serotonin on growth and virulence of intestinal bacteria

Biaggini K, Connil N, Coëffier M, Déchelotte P, Feuilloy M.

Poster Septembre 2013 14th international conference on *Pseudomonas*, Lausanne

Switzerland Cytotoxicity and inflammatory potential of two *Pseudomonas mosselii* strains on Caco-2 intestinal cells.

Leneveu- Jenvrin C, Madi A, Bouffartigues E, Biaggini K, Orange N, Feuilloy MGJ, Chevalier S, Connil N.

Communication orale Novembre 2013 Colloque Sésa GRR Chimie-Biologie Santé Rouen

Implication des facteurs intestinaux locaux dans l'expression de la virulence bactérienne.

Biaggini K

Communication orale Mars 2014 CECED Paris

Effet de la substance P, de la sérotonine, de l'épinephrine sur la croissance et la virulence bactérienne. **Biaggini K**

Poster Avril 2014 Journées de l'école doctorale EdNBISE Le Havre

The virulence behavior of *Pseudomonas* can be modulated by gut secretion

Biaggini K, Connil N, Coëffier M, Déchelotte P, Feuilloy M

Poster Juin 2014 IRIB Caugé

The virulence behavior of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 can be modulated by gut secretion

Biaggini K, Connil N, Coëffier M, Déchelotte P, Feuilloy M

Communication orale Mars 2015 CECED Nantes

Les catécholamines modulent la cytotoxicité, l'adhésion/invasion et la translocation des bactéries intestinales. **Biaggini K**

Communication orale Avril 2015 ECCMID Copenhague (Danemark)

The pathogenic potential of *Pseudomonas fluorescens* can be modulated by serotonin, substance P and epinephrine. **Biaggini K**

Poster Mars 2013 Pultusk, Pologne

Another paradigm in antibacterial treatments: Why a diplomatic approach should be more efficient than weapons of mass destruction. ESF-EMBO Symposium Bacterial Networks

Hillion M, Mijouin L, Dagorn A, Leneveu C, Blier AS, Madi A, Jaouen T, Rosay T, Biaggini K, Connil N, Poc C, Groboillot A, Hulen C, Lomri N, Lesouhaitier O, Orange N, Feuilloy MGJ

PUBLICATIONS

Leneveu-Jenvrin C, Madi A, Bouffartigues E, Biaggini K, Feuilloy M, Chevalier S, Connil N. (2013) Cytotoxicity and inflammatory potential of two *Pseudomonas mosselii* strains isolated from clinical samples of hospitalized patients. BMC Microbiol.13:123.

Alnabhani Z, Montcuquet N, Biaggini K, Dussaillant M, Roy M, Ogier-Denis E, Madi A, Jallane A, Feuilloy M, Hugot JP, Connil N, Barreau F. (2015) *Pseudomonas fluorescens* Alters the Intestinal Barrier Function by Modulating IL-1 β Expression Through Hematopoietic NOD2 Signaling. Inflamm Bowel Dis. 21(3):543-55.

Biaggini K, Barbey C, Borrel V, Feuilloy M, Déchelotte P, Connil N. (2015) The pathogenic potential of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 on enterocytes can be modulated by serotonin, substance P and epinephrine. Arch. Microbiol. 197, 983-990.

Biaggini K, Borrel V, Szunerits S, Boukherroub R, N'Diaye A, Bonnin-Jusserand M, Duflos G, Feuilloy MGF, Drider D, Déchelotte D Connil N (2015) Substance P promotes acid lactic production and virulence in *Enterococcus faecalis* V583 soumis à Frontiers in microbiology

ABSTRACT

The human gastrointestinal tract is colonized by approximately 10^{14} commensal bacteria which are in contact with the enteroendocrine system and its hormonal mediators. The influence of these eukaryotic factors on the gut microbiota is not very well known. Therefore, in the present work, we investigated the effect of serotonin (5HT), substance P (SP) and epinephrine (Epi) on the growth and virulence of *P. fluorescens*. The results showed that bacterial growth of *P. fluorescens* was not mainly affected by these factors. But interestingly, enteroendocrine factors can lead to a modulation of bacterial virulence depending on the eukaryotic substances tested and the origin of bacterial strain (clinical or environmental).

Epinephrine is involved in interkingdom signaling and activates expression of virulence genes in several Gram negative pathogens bacteria such as *Salmonella* and *Escherichia coli*. Thus, in further work, we decided to study the impact of this neurotransmitter on two intestinal bacteria and opportunistic pathogens: *P. aeruginosa* PAO1 (Gram negative bacteria) and *E. faecalis* V583 (Gram positive bacteria). We showed that epinephrine can modulate the cytotoxic potential and adhesion of these bacteria on Caco-2/TC7 cells, and the proinflammatory capacity of *E. faecalis* V583 was also enhanced. The initial biofilm formation was increased in *P. aeruginosa* PAO1 after epinephrine exposure, as well as bacterial translocation, and the ability of the germ to alter the permeability, and invade Caco-2/TC7 cells. We thus conclude that epinephrine is able to act on both Gram negative and Gram positive bacteria. Our work suggests that *P. aeruginosa* and *E. faecalis* could have sensors to epinephrine even if their nature still has to be determined.

Substance P is known to display antimicrobial activity against several germs such as *E. coli*. Interestingly, in our study, we could highlight that substance P promotes aggregation of *E. faecalis* V583, increases the cytotoxic potential and hydrophobicity of this bacteria, and its ability to produce tyramine and lactic acid. Finally, all these observations show that SP enhances virulence in *E. faecalis* V583.

To evaluate the global effect of hormonal imbalances on the composition of intestinal microbiota, caecal contents of activity-Based anorexia (ABA) mice were compared to control and limited food access (LFA) mice. This study showed an increase of the Firmicutes phylum concomitantly with a decrease of Proteobacteria, in ABA and LFA mice. We can suggest that this may be partly explained by the reduction of their diet. However, we also observed that several bacterial genera appeared or disappeared among the gut microbiota of ABA mice, such as for example *Psychrobacillus*.

Taken together, our study demonstrates that intestinal factors may be sensed by the gut microbiota and could probably participate in health and disease. Enteroendocrine factors can modulate bacterial virulence while precisely hormonal imbalances are noticed in pathologies such as Crohn disease or anorexia. This work opens new perspectives for a better understanding of diseases linked to the gut/brain axis.

Key words: intestinal microbiota, enteroendocrine system, interkingdom signaling, bacterial virulence

Résumé

La lumière intestinale héberge 10^{14} bactéries qui sont en contact permanent avec le système entéro-endocrinien et les médiateurs qu'il délivre. L'impact de ces facteurs eucaryotes sur les bactéries de l'intestin n'est pas bien connu. Dans ce contexte, nous avons recherché si *Pseudomonas fluorescens* était capable ou non de percevoir certains facteurs entéro-endocriniens tels que la sérotonine, l'épinéphrine, la substance P, l'alpha-melanocyte-stimulating-hormone ou le peptide YY, et si ceux-ci pouvaient avoir un impact sur la croissance et la virulence de cette bactérie. Les résultats ont montré que la croissance de *P. fluorescens* est faiblement affectée par ces molécules, qui sont capables au contraire d'entraîner une modulation de la virulence bactérienne, dépendante du facteur entéro-endocrinien considéré et de l'origine de la souche testée (clinique ou environnementale). L'épinéphrine joue un rôle très important dans le dialogue inter-règne et augmente l'expression des gènes de virulence chez certaines bactéries pathogènes à Gram négatif, notamment chez *Salmonella* et *Escherichia coli*. Dans la suite de mon travail de thèse, nous avons donc décidé d'étudier l'impact de ce neurotransmetteur sur deux bactéries commensales de l'intestin, *P. aeruginosa* PAO1 (bactérie à Gram négatif) et *E. faecalis* V583 (bactérie à Gram positif). Nous avons pu montrer que l'épinéphrine module le pouvoir cytotoxique et l'adhésion de ces bactéries sur les cellules intestinales Caco-2/TC7. Le potentiel proinflammatoire d'*E. faecalis* V583 augmente aussi sous l'effet de l'épinéphrine. Chez *P. aeruginosa* PAO1, nous avons pu observer une accélération de la formation de biofilm, une augmentation de la capacité à transloquer, à altérer la perméabilité et à envahir les cellules Caco-2/TC7. L'épinéphrine est donc capable d'agir à la fois sur des bactéries à Gram négatif et positif, ces dernières ayant été beaucoup moins étudiées jusqu'à présent. Notre travail suggère que *P. aeruginosa* et *E. faecalis* pourraient posséder des récepteurs à l'épinéphrine dont la nature reste à déterminer. La substance P est connue pour présenter une activité antimicrobienne contre certains germes dont *E. coli*. Nous avons pu montrer au contraire que ce neuropeptide module la virulence d'*E. faecalis* V583. Il favorise l'agglutination de la bactérie, augmente son hydrophobicité, son pouvoir cytotoxique, et sa production de tyramine et acide lactique, entraînant ainsi une augmentation de sa pathogénicité.

Dans le but d'apprécier ensuite l'effet global de perturbations hormonales sur la composition du microbiote intestinal, les contenus caecaux de souris modèle d'anorexie (ABA) ont été comparés à des souris contrôle, et des souris soumises à une restriction alimentaire (RA). Cette étude a montré une augmentation de la proportion des Firmicutes, et une diminution du phylum des Proteobacteries chez les souris ABA, mais aussi chez les souris RA, ce qui laisse supposer une modification surtout liée à la diminution de leur alimentation. En revanche, chez les souris ABA, nous avons également pu mettre en évidence l'apparition ou la disparition de certains genres bactériens, comme par exemple *Psychrobacillus*.

L'ensemble de ce travail de thèse montre que certaines bactéries intestinales sont capables de percevoir des facteurs entéro-endocriniens, et que ceux-ci sont capables de moduler la virulence bactérienne, alors que dans le cas de pathologies variées telles que la maladie de Crohn, ou l'anorexie par exemple, des déséquilibres hormonaux sont également constatés. Cette thèse ouvre donc de nouvelles perspectives pour une meilleure compréhension des pathologies liées à l'axe intestin/cerveau.

Mots clefs : microbiote intestinal, système entéro-endocrinien, dialogue inter-règne, virulence bactérienne