



HAL
open science

**Etude en systèmes digestifs artificiels de la survie et de
la pathogénicité des Escherichia Coli
entérohémorragiques (EHEC). Influence de la matrice
alimentaire et de l'administration de souches
probiotiques.**

Jonathan Thevenot

► **To cite this version:**

Jonathan Thevenot. Etude en systèmes digestifs artificiels de la survie et de la pathogénicité des Escherichia Coli entérohémorragiques (EHEC). Influence de la matrice alimentaire et de l'administration de souches probiotiques.. Microbiologie et Parasitologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2014. Français. NNT : 2014CLF1PP04 . tel-01657398

HAL Id: tel-01657398

<https://theses.hal.science/tel-01657398>

Submitted on 6 Dec 2017

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

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

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL

UNIVERSITÉ D'AUVERGNE

Année 2014

N° d'ordre : 04-DOC-PH

ÉCOLE DOCTORALE

des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement

N° d'ordre : 04-DOC-PH

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne

Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Biotechnologie, Microbiologie et Santé

Soutenue le 21 novembre 2014

Jonathan THÉVENOT

**Étude en systèmes digestifs artificiels de la survie et de la pathogénicité
des *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC)**

-

**Influence de la matrice alimentaire et de l'administration
de souches probiotiques**

Rapporteurs : Pr. Hubert Brugère

Pr. Tom Van de Wiele

Membres : Dr. Delphine Thevenot-Sergentet

Dr. Frédérique Chaucheyras-Durand (membre invité)

Pr. Valérie Livrelli (Directrice de thèse)

Dr. Stéphanie Blanquet-Diot (Directrice de thèse)

Conception Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament,
EA-CIDAM 4678, Université d'Auvergne
28 place Henri Dunant - 63001 Clermont-Ferrand Cedex
Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte,
M2iSH, UMR Insem/Université d'Auvergne U1071, USC-INRA 2018
28 place Henri Dunant - 63001 Clermont-Ferrand Cedex

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL

UNIVERSITÉ D'Auvergne

Année 2014

N° d'ordre : 04-DOC-PH

ÉCOLE DOCTORALE

des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement

N° d'ordre : 04-DOC-PH

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne

Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Biotechnologie, Microbiologie et Santé

Soutenue le 21 novembre 2014

Jonathan THÉVENOT

**Étude en systèmes digestifs artificiels de la survie et de la pathogénicité
des *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC)**

-

**Influence de la matrice alimentaire et de l'administration
de souches probiotiques**

Rapporteurs : Pr. Hubert Brugère

Pr. Tom Van de Wiele

Membres : Dr. Delphine Thevenot-Sergentet

Dr. Frédérique Chaucheyras-Durand (membre invité)

Pr. Valérie Livrelli (Directrice de thèse)

Dr. Stéphanie Blanquet-Diot (Directrice de thèse)

Conception Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament,
EA-CIDAM 4678, Université d'Auvergne
28 place Henri Dunant - 63001 Clermont-Ferrand Cedex
Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte,
M2iSH, UMR Insem/Université d'Auvergne U1071, USC-INRA 2018
28 place Henri Dunant - 63001 Clermont-Ferrand Cedex

À mon grand-père

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont des pathogènes zoonotiques responsables de toxi-infections alimentaires pouvant évoluer vers des atteintes potentiellement mortelles chez l'Homme. La survie des EHEC et l'expression des gènes de virulence dans l'environnement digestif humain sont des facteurs essentiels dans la physiopathologie de ces infections mais sont mal connus, essentiellement par manque de modèles d'études adaptés. L'absence de traitement spécifique a conduit à s'intéresser à des moyens préventifs et/ou curatifs alternatifs, comme l'utilisation de probiotiques. L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier le comportement de souches EHEC dans l'ensemble du tractus digestif et l'influence de souches probiotiques, en utilisant des approches *in vitro* et *in vivo* complémentaires.

In vitro, dans le tractus gastro-intestinal supérieur, on observe une mortalité bactérienne dans l'estomac, suivie d'une reprise de croissance dans les parties distales de l'intestin grêle. De plus, la survie des EHEC dépend à la fois de la souche/sérotype étudié et de la matrice alimentaire dans laquelle les bactéries sont ingérées. En conditions coliques humaines simulées, les EHEC sont progressivement éliminés du milieu colique et leurs principaux gènes de virulence (*stx1* codant la Shiga-toxine 1 et *eae* codant l'intimine) sont surexprimés dans les heures suivant l'inoculation du pathogène. L'ajout de levures probiotiques du genre *Saccharomyces* ne modifie pas la survie du pathogène dans l'environnement colique, que celles-ci soient administrées en traitement « curatif » ou « prophylactique ». Par contre, l'administration de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 permet (i) de moduler favorablement l'activité fermentaire du microbiote intestinal, en augmentant la production d'acétate et en réduisant celle du butyrate et (ii) de diminuer significativement l'expression de *stx1*. Par ailleurs, l'effet du pathogène et des probiotiques sur le microbiote colique est individu dépendant, confortant l'hypothèse que des facteurs associés à l'hôte, comme le microbiote, pourraient conditionner l'évolution clinique des infections à EHEC et l'efficacité d'une stratégie probiotique. Enfin, dans un modèle murin d'anses iléales, l'administration préventive de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 limite significativement l'interaction d'O157:H7 avec les plaques de Peyer et les lésions hémorragiques associées.

Ces résultats confirment donc l'intérêt d'une stratégie probiotique dans le contrôle des infections à EHEC. Une étude plus approfondie du transcriptome du pathogène dans l'environnement digestif humain, en présence ou non de probiotiques, permettrait de mieux comprendre la physiopathologie des infections à EHEC et les mécanismes associés à l'effet antagoniste des probiotiques.

The enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are zoonotic pathogens that cause food-borne infection with which leads to life-threatening damage in humans. EHEC survival and expression of virulence genes in the human digestive track are key factors in the pathogenesis of these infections, but little is known, mainly due to lack of appropriate study models. The absence of specific treatment has led to an interest in preventive and/or alternative measures healing, such as the use of probiotics. The objective of this study is the behavior of EHEC strains in the entire digestive tract and the influence of probiotic strains, using *in vitro* and *in vivo* complementary approaches.

In vitro, in the upper gastrointestinal tract, a bacterial mortality was observed in the stomach, followed by a bacterial resumption in the distal segment of the small intestine. Moreover, survival depends on both the EHEC strain/serotype studied and the food matrix in which the bacteria are ingested. In simulated human colon conditions, EHEC was progressively eliminated from the bioreactor and the major virulence genes (*stx1* encoding Shiga-toxin 1 and *eae* encoding intimin) are overexpressed in the hours following the inoculation of pathogen. Probiotic yeasts *Saccharomyces* genus does not modify the survival of the pathogen in the *in vitro* colonic environment, that they be administered in treatment "curative" or "prophylactic". Still, the administration of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 allows (i) to favorably modulate fermentation activity of the intestinal microbiota, by increasing the production of acetate and reducing that of butyrate and (ii) reduce significantly the expression of *stx1*. Furthermore, the effect of pathogenic and probiotic on colonic microbiota is donor-dependent, supporting the hypothesis that factors associated with the host, as the microbiota could condition the clinical course of EHEC and efficiency a probiotic strategy. Finally, in a murine model of ileal loops, preventive administration of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 significantly limits the interaction of O157:H7 with the Peyer's patches and results hemorrhagic lesions.

These results confirms the interest of probiotic strategy in controlling EHEC infections. Further transcriptome studies are warranted for the pathogen in the human digestive environment, with or without probiotics for the better understanding of the pathophysiology of EHEC and so on the mechanisms involved in the antagonistic effect of probiotics.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement Messieurs les Professeurs Hubert Brugère et Tom Van de Wiele d'avoir accepté la charge de rapporteur. Je remercie également le Docteur Delphine Thevenot-Sergentet et le Docteur Frédérique Chaucheyras-Durand d'avoir bien voulu juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mes co-directeurs de thèse Stéphanie Blanquet-Diot – *chef n°1* – et Valérie Livrelli – *chef n°2* –. Je leur adresse mes plus sincères remerciements pour la confiance qu'elles m'ont accordée pendant ces trois ans et demi – *dont un loin du nid* –, leur disponibilité, leurs précieux conseils dans l'écriture de ce manuscrit – parce que *cependant* n'a jamais été un synonyme de *de plus* – et surtout leur patience.

Ce travail est le fruit de nombreuses collaborations, aussi je remercie nos collègues lyonnais et espagnols et plus particulièrement Stéphane et Noé pour leur gentillesse. Je remercie également les membres de l'Unité de recherche Microbiologie située sur le site de l'INRA de Theix pour leur accueil chaleureux durant ces longs mois d'hiver – *enfin de printemps, mais en Mai il neigeait toujours...* – à fermenter dans votre P2... Mais aussi les membres du plateau technique de l'Unité de recherche CALITYSS localisé sur le site de VetAgro Sup à Lempdes – *votre cantine me manque* – pour les derniers mois passés en votre compagnie dans ce P2+ tout neuf... Et encore désolé pour la surcharge de travail avec mes bouteilles sales et pour les désagréments olfactifs...

Je remercie également l'ensemble du laboratoire d'Immunologie de la faculté de Pharmacie de Clermont-Ferrand pour ces trois années de monitorat et de l'opportunité que vous m'avez offerte en me donnant mon « premier emploi ».

Par pudeur littéraire, et votre grand nombre... je préfère ne pas faire d'impair en omettant accidentellement l'un d'entre vous, ainsi j'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres passés et présents du 5^e, du 3^e et du rez-de-chaussée pour le temps passé en votre compagnie, nos discussions de haut vol et celles aux ras des pâquerettes, nos pauses « passerelle » et nos apéros du soir dans le patio.

REMERCIEMENTS

Un grand Merci à mes compagnons de chambrée et/ou de bureau – Lili et Mika – pour leur présence et leur soutien pendant nos longues nuits d'écriture. Et puisque j'ai le droit après avoir eu les mains dedans pendant assez longtemps...un grand « Merde » pour la fin de la rédaction de vos pavés et surtout pour le commencement de vos carrières respectives.

Un autre grand – *très grand même* – Merci à toi mon binôme de thèse. Merci à toi Charlotte pour ton aide et ton soutien pendant notre exil à l'INRA et VetAgro. Merci pour nos manips à la chaîne sans trop râler. Merci pour tes belles figures et ton implication générale dans mon travail. Et plus simplement Merci de m'avoir supporté. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Enfin, Merci au parisien, qui a préféré rester à Paris,
d'avoir permis à un auvergnat de ne pas partir d'Auvergne
et à un normand de découvrir la Bretagne puis l'Auvergne.

De façon plus personnelle, je souhaite adresser mes remerciements :

À Michelle, ma mère, – *et oui la Mère Michelle ou Miche-Muche* – pour ton soutien sans faille, et pour avoir toujours cru en moi et dans mes choix, même si le chemin a été long.

À mes frères et leurs chéries, pour leur curiosité pour comprendre mon travail de recherche. Et plus particulièrement à toi Gaël pour l'année passée ensemble à rénover la maison qui nous est si chère. J'espère bientôt pouvoir t'aider à finir la tienne...

À tous les membres de ma famille pour le soutien qu'ils ont su m'apporter pendant ces années.

Et à tous mes amis pour nos moments de vie partagés.

Enfin, ces remerciements ne seraient pas complets sans adresser ces quelques mots à celle qui partage ma vie :

Maîtresse... j'ai FINI!!!!

*On ne doit pas s'attendre à ce qu'une application fonctionne
dans un environnement dans lequel ses hypothèses ne sont pas valides*

Eliyahu M. Goldratt

Table des matières

Résumé – Abstract	
Remerciements	iii
Table des figures	xi
Liste des tableaux	xiii
Liste des sigles et abréviations	xv
Avant-propos	xvii
I Synthèse bibliographique	1
1 La digestion humaine et sa modélisation	3
1.1 Le tractus gastro-intestinal humain	4
1.1.1 Physiologie générale de la digestion humaine	4
1.1.1.1 La digestion buccale	4
1.1.1.2 La digestion gastrique	5
1.1.1.2.1 Anatomie de l'estomac	5
1.1.1.2.2 Sécrétions gastriques et rôle dans la digestion	6
1.1.1.3 La digestion intestinale	8
1.1.1.3.1 Anatomie de l'intestin grêle	8
1.1.1.3.2 Sécrétions des glandes annexes et rôles dans la digestion	9
1.1.1.3.2.1 Suc pancréatique	9
1.1.1.3.2.2 Sécrétions biliaires	10
1.1.1.3.3 Cellules de l'épithélium intestinal	11
1.1.1.4 La digestion colique	12
1.1.1.4.1 Anatomie et physiologie du côlon	12
1.1.1.4.2 Rôles du côlon dans la digestion	14
1.1.2 L'écosystème microbien digestif	15

TABLE DES MATIÈRES

1.1.2.1	Établissement du microbiote intestinal	15
1.1.2.2	Caractérisation du microbiote intestinal	16
1.1.2.3	Diversité et abondance microbienne dans le tractus digestif humain . . .	16
1.1.2.4	Fonctions et activités métaboliques du microbiote intestinal	17
1.2	Les systèmes de digestion artificielle	21
1.2.1	Modélisation de la digestion humaine	21
1.2.1.1	Estomacs artificiels	22
1.2.1.2	Modèles gastro-intestinaux multi-compartimentés	24
1.2.1.2.1	TNO Gastrointestinal Model 1 : TIM 1	24
1.2.1.2.2	Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem : SHIME®	30
1.2.1.3	Modèles utilisés pour l'étude de l'écosystème colique	30
1.2.1.3.1	Modèle <i>in vivo</i>	31
1.2.1.3.2	Modèle <i>in vitro</i> de l'environnement colique	31
1.2.1.3.2.1	Systèmes de fermentation en « batch »	31
1.2.1.3.2.2	Systèmes de fermentation en semi-continu ou continu . . .	32
1.2.2	Avantages et limites des systèmes de digestion <i>in vitro</i>	46
2	Les <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques	49
2.1	<i>Escherichia coli</i> : Taxonomie et définitions	50
2.1.1	Caractères généraux	50
2.1.2	Classification antigénique	50
2.1.3	Différents pathovars	51
2.2	Aspects cliniques et épidémiologiques des infections à <i>E. coli</i> entérohémorragiques	55
2.2.1	Historique	55
2.2.2	Réservoirs et vecteurs	56
2.2.3	Aspects cliniques	56
2.2.3.1	SHU	57
2.2.3.2	PTT	57
2.2.4	Aspects épidémiologiques	58
2.2.4.1	Épidémies dans le monde	58
2.2.4.2	Épidémies en France	60
2.2.4.3	Données épidémiologiques du SHU en France	60
2.2.4.4	Prévalence et classification des STEC	62
2.2.4.4.1	Sérotypes les plus fréquents	62
2.2.4.4.2	Classification des STEC en séropathotypes	62
2.3	Facteurs de virulence et pouvoir pathogène	62
2.3.1	Résistance à l'acidité	63
2.3.2	Shiga-toxines	65

2.3.2.1	Structure	65
2.3.2.2	Variants	65
2.3.2.3	Passage des Shiga-toxines au niveau de l'épithélium intestinal	67
2.3.2.4	Mécanisme d'action des Shiga-toxines au niveau des cellules cibles	68
2.3.3	Facteurs d'adhésion	68
2.3.3.1	Lésion d'attachement-effacement	68
2.3.3.2	Autres facteurs d'adhésion	70
2.3.4	Autres facteurs de virulence	72
2.3.5	Facteurs environnementaux du tractus digestif humain régulant l'expression des gènes de virulence des EHEC	72
2.3.5.1	Acidité	74
2.3.5.2	Sels biliaires	74
2.3.5.3	Éthanolamine	74
2.3.5.4	Microbiote intestinal et métabolites fermentaires	75
2.3.5.5	Adrénaline et noradrénaline	77
2.3.5.6	Concentration en oxygène	77
2.3.5.7	Monoxyde d'azote	78
2.4	Diagnostic et stratégies thérapeutiques des infections à EHEC	78
2.4.1	Diagnostic	78
2.4.1.1	Recherche microbiologique	78
2.4.1.2	Recherche de gènes de virulence	79
2.4.1.3	Recherche de Shiga-toxines dans les selles	79
2.4.1.4	Sérodiagnostic	80
2.4.2	Stratégies thérapeutiques	80
3	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques et probiotiques	83
3.1	Les probiotiques	83
3.1.1	Historique et définitions	83
3.1.2	Caractéristiques et nature des probiotiques	84
3.1.2.1	Critères de sélection d'un probiotique	84
3.1.2.2	Micro-organismes probiotiques	84
3.1.3	Mode d'action des probiotiques bactériens	86
3.1.3.1	Exclusion	87
3.1.3.1.1	Amélioration de la fonction de barrière intestinale	87
3.1.3.1.2	Exclusion compétitive de micro-organismes pathogènes	88
3.1.3.2	Antagonisme direct	88
3.1.3.3	Immunomodulation	88
3.1.4	Mode d'action des probiotiques à base de levures	88

TABLE DES MATIÈRES

3.1.5	Risques associés aux stratégies probiotiques	89
3.2	Stratégie probiotique dans la prévention et/ou le traitement des infections à EHEC	90
3.2.1	EHEC et probiotique : Exclusion	90
3.2.2	EHEC et probiotique : Antagonisme direct	96
3.2.3	EHEC et probiotique : Immunomodulation	100
II	Travaux expérimentaux	105
1	Survie et pathogénicité de STEC dans le tractus digestif supérieur en présence d'une matrice fromagère au lait cru	107
	Évaluation <i>in vitro</i> de la survie d' <i>Escherichia coli</i> O26 :H11 et d'O157 :H7 dans la lumière gastro-intestinale en présence d'une matrice fromagère au lait cru	107
	Introduction à la publication n°1	107
	Commentaires de la publication n°1	119
2	Survie et pathogénicité des EHEC dans l'environnement colique et influence d'un traitement probiotique	123
	Influence d'un traitement probiotique sur la survie et la pathogénicité des EHEC dans un environnement colique humain simulé et sur la translocation du pathogène dans un modèle murin d'anses iléales	123
	Introduction aux publications n°2 et 3	123
	Commentaires des publications n°2 et 3	186
III	Discussion générale et conclusion	193
	Bibliographie	219
	Annexe	261

Table des figures

1	Organisation générale du système digestif humain et des glandes annexes	4
2	Organisation générale de l'estomac	5
3	Organisation générale de l'intestin grêle	9
4	Organisation générale des organes digestifs annexes	10
5	Localisation et mécanismes de l'absorption intestinale	12
6	Organisation générale du côlon humain	13
7	Distribution des temps de transit colique chez l'enfant	14
8	Analyse métagénomique de séquences d'ADN extraites de fèces de nourrissons en fonction du temps	16
9	Diversité et abondance bactérienne du microbiote intestinal et fécal humain	18
10	Activité métabolique du microbiote intestinal humain	20
11	Principaux modèles d'estomacs artificiels	22
12	Représentation schématique du système digestif artificiel TIM 1	25
13	Représentation schématique du système SHIME®	30
14	Représentation schématique du système ARCOL	33
15	Modélisation de l'environnement mucosal et des interactions hôte-bactéries	47
16	Arbre phylogénétique des <i>E. coli</i> entéropathogènes	53
17	Flux de STEC et voies de contamination de l'Homme par des EHEC	56
18	Évolution clinique des infections à <i>E. coli</i> entérohémorragiques	57
19	Distribution géographique et mensuelle du nombre de cas de SHU en France chez l'enfant de moins de 15 ans	61
20	Systèmes de résistance à l'acidité chez <i>E. coli</i>	64
21	Représentation en ruban de la structure cristalline des Shiga-toxines	65
22	Nouveau modèle d'infection par les EHEC	69
23	Lésions d'attachement et d'effacement chez les EHEC	71
24	Représentation simplifiée de la cartographie du génome <i>E. coli</i> O157 :H7 EDL 933 et de ses plasmides	73
25	Régulation des gènes flagellaires et du LEE par les AGCC	76
26	Cascade de signalisation QseC et QseE adrénérgique et noradrénérgique chez les EHEC .	77

TABLE DES FIGURES

27	Diagnostic d'une infection à EHEC	79
28	Mécanismes d'action des probiotiques et leur fréquence	87
29	Probiotiques et exclusion des EHEC	91
30	Antagonisme direct des probiotiques vis-à-vis des EHEC	97
31	Effet immunomodulateur des probiotiques sur les EHEC	101
32	Représentation schématique de la régulation du système de décarboxylation du glutamate	121
33	Influence de la matrice alimentaire sur la survie d' <i>E. coli</i> O157 :H7 dans le TIM 1	203
34	Influence des <i>E. coli</i> commensaux sur la production de Shiga-toxines	208
35	Classification des échantillons des trois donneurs sur la base des résultats de qPCR obtenus pour les grands groupes bactériens	209
36	Interactions indirectes hôte/microbiote dans le module HMI	211

Liste des tableaux

1	Facteurs influençant la motilité et la vidange gastrique	7
2	Études microbiologiques, nutritionnelles, pharmacologiques et toxicologiques utilisant le modèle <i>in vitro</i> TIM 1	27
3	Les principaux modèles <i>in vitro</i> coliques en mode semi-continu et leurs caractéristiques	35
4	Les principaux modèles <i>in vitro</i> coliques en mode continu et leurs caractéristiques	36
5	Les principaux modèles <i>in vitro</i> coliques semi-continu et leurs applications	37
6	Les principaux modèles <i>in vitro</i> coliques continu et leurs applications	40
7	Principaux caractères biochimiques permettant la différenciation des espèces du genre <i>Escherichia</i>	51
8	Les huit classes d' <i>E. coli</i> responsables de diarrhées chez l'homme	52
9	Liste non exhaustive des principales épidémies à <i>Escherichia coli</i> producteurs de Shiga-toxines survenues dans le monde depuis 2005	59
10	Classification des sérotypes de STEC en séropathotypes	63
11	Nomenclature actuelle des différents sous-types de Shiga-toxines	66
12	Critères de sélection des souches probiotiques	85
13	Exemples de souches probiotiques bactériennes et de levures et effets rapportés	86
14	Stratégie probiotique dans les infections à EHEC : l'exclusion	92
15	Stratégie probiotique dans les infections à EHEC : l'antagonisme direct	98
16	Stratégie probiotique dans les infections à EHEC : l'immunomodulation	102
17	Paramètres digestifs reproduits dans le système digestif TIM 1 et conditions expérimentales employées	202
18	Variables expérimentales pour les deux études réalisées dans ARCOL	207

Liste des sigles et abréviations

<i>B.</i>	<i>Bifidobacterium</i>	DAEC	<i>E. coli</i> à adhésion diffuse
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>	DGM	Dynamic Gastric Model
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>	EA CIDAM	Équipe d'Accueil « Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament »
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>	EAggEC	<i>E. coli</i> entéroagréatifs
A/E	Attachement et Effacement	EAST	entéroagréative <i>E. coli</i> heat stable enterotoxin
AAF/1	Aggregative Adherence Fimbriae 1	ECL	cellules entérochromaffine-like
ADN	acide désoxyribonucléique	ECSIM	Environmental Control System for Intestinal Microbiota
ADNr 16S	gènes codant l'ARN ribosomique 16S	EF	Facteurs d'élongation
AGCC	Acides Gras à Chaîne Courte	EFSA	European Food Standard Agency
AI	AutoInducteur	EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragiques
AIDA-1	Adhesin Involved in Diffuse Adherence	EIEC	<i>E. coli</i> entéroinvasifs
AIEC	<i>E. coli</i> adhérents et invasifs	ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
AR	résistance à l'acidité	EPEC	<i>E. coli</i> entéro-pathogènes
ARCOL	ARtificial COLon	Esp	<i>E. coli</i> -secreted protein
ARN	acide ribonucléique	ETEC	<i>E. coli</i> entérotoxinogènes
BARDOT	BActerial Rapid Detection using Optical scattering Technology	ExPEC	<i>E. coli</i> pathogènes extra-intestinaux
BFP	Bundle Forming Pili	FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
Cah	Calcium-binding antigen 43 homologue	FDA	Federal Drug Administration
cAMP	Adenosine MonoPhosphate cyclique	GAD	AR dépendant de la décarboxylation du glutamate
CEACAM6	CarcinoEmbryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6	Gb3	récepteur cellulaire Globotriosyl Céramide 3
CFA	Colonization Factor Antigen	GIP	Glucose-dependent Inulinotropic peptide
CIQUAL	Centre d'Information sur la Qualité des Aliments	GRAS	Generally Recognized As Safe
CLR	C-type Lectin Receptors		

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

HGS	Human Gastric Simulator	PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
HMI	Host-Microbiota Interaction	PCR	Polymerase Chain Reaction
I κ B	Inhibitor of κ B	pH	potentiel Hydrogène
Ig	Immuno-globuline	PRR	Pattern Recognition Receptor
Iha	<i>Vibrio cholerae</i> IrgA homologue	PTT	Purpura Thrombotique Thrombocytopénique
IL	InterLeukine	QPS	Qualified Presumption of Safety
InPEC	<i>E. coli</i> pathogènes intestinaux	redox	potentiel d'oxydo-réduction
LEE	Locus d'Effacement des Entérocytes	Saa	STEC autoagglutinating adhesin
ler	LEE-encoded-regulator	SHIME	Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem
Lpf	Long polar fimbriae	SHU	Syndrome Hémolytique et Urémique
Lrp	Leucine-responsive regulatory protein	STEAEC	<i>E. coli</i> entéroagrégatifs producteurs de Shiga-toxines
M-SHIME	Mucosal SHIME	STEC	<i>E. coli</i> producteurs de Shiga-toxines
M2iSH	Équipe « Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte »	Stx	Shiga-toxine
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases	TIM 1	TNO Gastrointestinal Model 1
MNEC	<i>E. coli</i> associés à des méningites	TIM 2	TNO Gastrointestinal Model 2
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B	TIM-agc	TIM-advanced gastric compartment
NLR	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein-Like Receptors	Tir	Translocated intimin receptor
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization domain-containing Protein	TLR	Toll-Like Receptors
OI	O Islands	TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
OmpA	Outer membrane protein A	TSB	Tryptic Soy Broth
OMS	Organisation Mondiale de la Santé	UFC	Unité Formant Colonies
		UPEC	<i>E. coli</i> uropathogènes

Avant-propos

Découverts en 1982 aux États-Unis, les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont devenus en une trentaine d'années un problème majeur de santé publique avec un impact important pour les industries agro-alimentaires. Les STEC isolés lors d'infections chez l'Homme sont appelés *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC). Ils sont responsables de toxi-infections alimentaires pouvant évoluer vers des atteintes systémiques potentiellement mortelles comme le syndrome hémolytique et urémique (SHU) et le purpura thrombotique thrombocytopenique (PTT). La contamination par ces bactéries résulte principalement de l'ingestion de produits alimentaires contaminés, crus ou très peu cuits. Le sérotype O157:H7 est le plus fréquemment impliqué dans les épidémies. La pathogénicité de ces bactéries est principalement due à la production de Shiga-toxines. La survie des EHEC et la régulation des gènes de virulence dans l'environnement digestif humain sont des facteurs importants dans la physiopathologie de ces infections mais sont mal connus, essentiellement par manque de modèles d'études adaptés. De plus, l'absence de traitement spécifique et le fait que l'antibiothérapie augmente le risque de SHU ont conduit à s'intéresser à des moyens préventifs et/ou curatifs alternatifs comme l'utilisation de probiotiques.

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont été effectués au sein de l'Équipe d'Accueil « Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament » (EA-CIDAM 4678), dirigée par le Professeur Monique Alric et l'Unité M2iSH « Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte » (UMR Inserm U1071, USC INRA 2018) dirigée par le Professeur Arlette Darfeuille-Michaud jusqu'en 2014 puis par le Docteur Nicolas Barnich. Ces deux laboratoires sont rattachés à l'Université d'Auvergne.

L'EA-CIDAM possède depuis près de vingt ans une expertise et un savoir-faire reconnus internationalement dans le domaine de la digestion artificielle. Elle a ainsi développé un plateau technologique autour de l'environnement digestif associant des outils *in vitro* de digestion, fermentation et absorption à des technologies de formulation et des outils génomiques et moléculaires. En particulier, elle possède le système digestif artificiel TIM 1 (TNO Gastrointestinal Model 1) simulant l'environnement luminal de l'estomac et l'intestin grêle et différents fermenteurs (ARCOL : ARtificial COLon, ECSIM : Environmental Control System for Intestinal Microbiota) permettant de reproduire l'environnement colique. Les outils *in vitro* de l'EA-CIDAM reproduisent aussi bien l'environnement digestif de l'homme que

celui de l'animal monogastrique (veau pré-ruminant, porcelet) et ce dans des conditions physiologiques ou pathologiques. L'objectif de l'équipe est de développer des produits ou des concepts innovants en Nutrition et Santé Humaine ou Animale. Actuellement, l'EA-CIDAM s'intéresse plus particulièrement à trois conditions physiopathologiques dans l'environnement digestif associées (i) au vieillissement, (ii) à la présence de polluants d'origine alimentaire et (iii) à la présence de bactéries pathogènes comme les EHEC. Dans chacune de ces situations, elle évalue l'intérêt de stratégies basées sur l'utilisation de souches probiotiques.

L'Unité M2iSH mène depuis une quinzaine d'années des travaux consistant à analyser la relation hôte-pathogène en étudiant les *Escherichia coli* (*E. coli*) pathogènes. Trois thèmes de recherche principaux sont développés dans le laboratoire : (i) l'étude de l'implication d'*E. coli* dans les maladies inflammatoires chroniques du tube digestif, en particulier la maladie de Crohn, (ii) l'étude de la piste infectieuse à *E. coli* dans le développement du cancer colorectal et (iii) l'étude du comportement des EHEC dans l'environnement digestif humain (survie et expression des facteurs de virulence) en partenariat avec l'EA-CIDAM. L'équipe « EHEC » s'est spécialisée dans l'étude des facteurs de pathogénicité de ces bactéries et dispose d'une collection de souches isolées de bovins, d'aliments et de malades. À l'heure actuelle, les travaux de l'équipe s'orientent vers l'étude du comportement des EHEC dans l'environnement digestif (survie, régulation des facteurs de virulence, interactions avec l'hôte) en utilisant (i) des outils moléculaires (ii) des modèles *in vitro* (lignées de cellules épithéliales, de macrophages, modèle original de cellules M) (iii) des modèles animaux *ex vivo* (chambres de Ussing) et *in vivo* (modèles murins d'anses iléales).

Les travaux précédents réalisés pendant la thèse de Lucie Etienne-Mesmin ont permis (i) d'évaluer la survie de la souche de référence *E. coli* O157:H7 EDL 933 – isolée lors de l'épidémie de 1982 aux États-Unis liée à la consommation de hamburgers contaminés – et (ii) de montrer l'effet antagoniste d'une souche probiotique (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856) dans le tractus digestif supérieur humain simulé (TIM 1). En effet, une mortalité cellulaire d'EDL 933 est observée dans l'estomac et l'intestin grêle proximal puis, les bactéries se divisent à nouveau dans les parties distales de l'intestin grêle (jéjunum et iléon). La co-administration de levures *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 permet l'inhibition de la reprise de croissance des EHEC dans l'intestin grêle.

Mes travaux de thèse, réalisés sous la direction du Docteur Stéphanie Blanquet-Diot (EA-CIDAM) et du Professeur Valérie Livrelli (M2iSH), s'inscrivent dans la continuité des études entreprises précédemment. Ainsi, les objectifs du travail de thèse qui m'ont été confiés étaient, dans un premier temps, de poursuivre l'étude le comportement de souches EHEC dans l'environnement digestif humain supérieur en examinant la survie de différents sérotypes de STEC présents dans différentes matrices alimentaires à l'aide du système digestif artificiel dynamique TIM 1. Puis dans un second temps, le comportement (survie et pathogénicité) de la souche EDL 933 en conditions coliques humaines simulées (ARCOL) et

l'influence du pathogène sur le microbiote colique humain ont été déterminés. Parallèlement, les propriétés antagonistes de *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856, ainsi que les mécanismes d'actions mis en jeu dans l'environnement digestif ont été évalués lors de traitements « curatif » et « prophylactique ». Enfin, dans le but de compléter les données obtenues *in vitro*, l'effet antagoniste des probiotiques vis-à-vis de la translocation des EHEC au travers de l'épithélium intestinal a également été testé en modèle murin.

La première partie de ce manuscrit présente le contexte scientifique général. Cette synthèse bibliographique s'articule autour de trois chapitres. Un premier chapitre introductif décrit la physiologie générale du tube digestif humain, les conditions rencontrées dans la lumière gastro-intestinale chez l'Homme ainsi que les principaux systèmes *in vitro* permettant de modéliser l'environnement digestif. Un second chapitre est consacré à la description des EHEC et leurs facteurs de virulence. Enfin, un dernier chapitre s'intéresse à l'utilisation des probiotiques dans le cadre des infections à EHEC. Les résultats expérimentaux sont exposés sous la forme de trois publications puis commentés dans la seconde partie de ce manuscrit. Enfin, dans la partie discussion générale et conclusion, l'ensemble des résultats de cette thèse sera discuté et des perspectives concernant l'ensemble de ce travail seront proposées.

Première partie

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

La digestion humaine et sa modélisation

Sommaire

1.1	Le tractus gastro-intestinal humain	4
1.1.1	Physiologie générale de la digestion humaine	4
1.1.2	L'écosystème microbien digestif	15
1.2	Les systèmes de digestion artificielle	21
1.2.1	Modélisation de la digestion humaine	21
1.2.2	Avantages et limites des systèmes de digestion <i>in vitro</i>	46

L'alimentation permet l'apport de nutriments indispensables à la vie. Le catabolisme de ces nutriments conduit à la production de l'adénosine triphosphate essentielle aux activités cellulaires. Les nutriments fournissent également les matériaux nécessaires au renouvellement et à la croissance des tissus. L'alimentation est principalement constituée de macromolécules organiques (hydrates de carbone, protéines et lipides), d'eau et d'ions inorganiques. L'ingestion d'aliments ne suffit pas à rendre les molécules organiques utilisables par les cellules en tant que sources d'énergie ou matériaux de construction. Pour assurer les besoins métaboliques et énergétiques de l'organisme, les aliments doivent être déglutis et fragmentés. Les nutriments ainsi relargués peuvent-être absorbés à travers la muqueuse intestinale et utilisés par les cellules.

La digestion humaine désigne l'ensemble des phénomènes mécaniques et chimiques liés au fonctionnement de l'appareil digestif, et consiste en une succession d'étapes permettant la transformation des aliments en nutriments, où chaque partie du tractus digestif a un rôle spécifique. L'appareil digestif contribue à l'homéostasie en transférant des nutriments, de l'eau et des électrolytes de l'environnement extérieur vers le milieu intérieur. Afin de mieux appréhender par la suite les avantages et les limites des différents systèmes digestifs artificiels, les paramètres essentiels de la digestion humaine, *i.e.* les phénomènes chimiques, mécaniques et l'écosystème microbien digestif, seront détaillés.

1.1 Le tractus gastro-intestinal humain

1.1.1 Physiologie générale de la digestion humaine

L'appareil digestif est constitué de différents organes : le tube digestif (bouche, oropharynx, œsophage, estomac, intestin grêle – duodénum, jéjunum et iléon –, gros intestin – cæcum et appendice, côlon ascendant, côlon transverse, côlon descendant, côlon sigmoïde et rectum – et anus) et des organes digestifs annexes (glandes salivaires, pancréas exocrine, foie et vésicule biliaire). Les organes exocrines sont situés à l'extérieur du tube digestif et déversent leurs sécrétions par des canaux sécréteurs dans la lumière de celui-ci (Figure 1). La structure générale de la paroi du tube digestif est pratiquement la même sur toute sa longueur de l'œsophage à l'anus, avec des particularités régionales. On distingue quatre tuniques concentriques qui sont, de la lumière intestinale vers les couches plus externes : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (SHERWOOD, 2006).

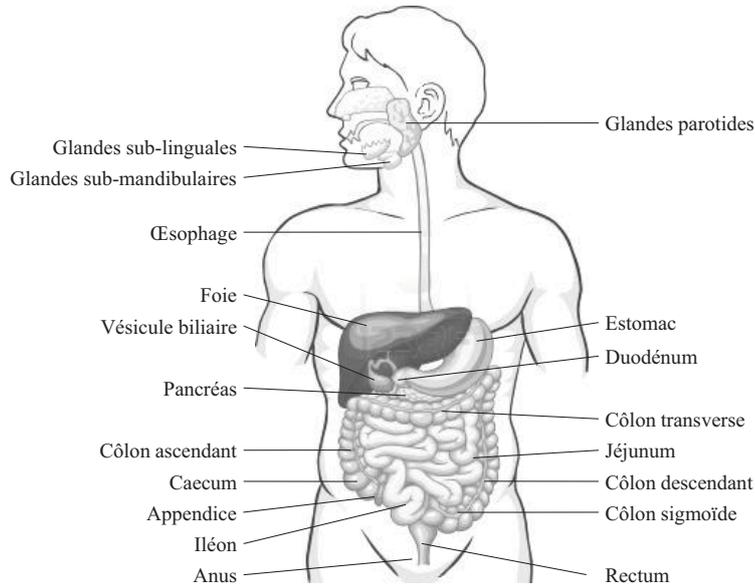


FIGURE 1. Organisation générale du système digestif humain et des glandes annexes

Le système digestif humain est composé de la bouche, l'oropharynx, l'œsophage, l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléon, le cæcum et l'appendice, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant, le côlon sigmoïde, le rectum et l'anus. Des organes et glandes annexes sont également associés à ce système : les glandes salivaires, le pancréas exocrine, le foie et la vésicule biliaire.

1.1.1.1 La digestion buccale

Le système digestif débute par la cavité orale qui sert de réceptacle à la nourriture. Elle est le siège des premières étapes de la digestion, avec la mastication (par l'action des dents, des joues et de la langue) et la sécrétion de salive par trois paires de glandes salivaires (glandes parotides, sub-mandibulaires et sub-linguales). La salive est constituée d'environ 99% d'eau, contenant des électrolytes (sodium, potassium,

calcium, chlorure, magnésium, bicarbonate, phosphate), des protéines comme des enzymes ou encore des immuno-globulines, de l'urée et de l'ammoniaque (DE ALMEIDA *et al.*, 2008). La mastication est le premier acte mécanique de la digestion (mouvements complexes de la mâchoire impliquant les dents, les muscles oro-faciaux et la langue) qui prépare les aliments en réduisant la taille des particules. Elle forme ainsi le bol alimentaire et favorise l'action des enzymes digestives dans l'intestin grêle. Les substances alimentaires sont partiellement dissoutes dans la salive, contribuant à l'efficacité des enzymes digestives. La digestion buccale est limitée à l'hydrolyse de polysaccharides en dextrine (et éventuellement en maltose) par l' α -amylase salivaire (ou ptyaline). L'action de cette enzyme se poursuit dans l'estomac tant que l'acidité gastrique n'a pas pénétré le bol alimentaire. Enfin, la déglutition est déclenchée quand le bol alimentaire est poussé volontairement par la langue de l'arrière de la cavité buccale dans le pharynx. La déglutition est un acte réflexe qui englobe l'ensemble des phénomènes moteurs qui font passer les aliments de la bouche à l'estomac (SHERWOOD, 2006).

1.1.1.2 La digestion gastrique

1.1.1.2.1 Anatomie de l'estomac

L'estomac est un réservoir d'environ 15 cm de haut en forme de « J » situé entre l'œsophage et l'intestin grêle où règne, à l'état à jeun, un potentiel hydrogène (pH) médian de 1,55 (0,95 à 2,6). Le pH du contenu gastrique après un repas n'est pas statique dans le temps. En effet, le pH gastrique augmente dans les premières minutes post-ingestion pour atteindre une valeur comprise entre 5 et 6, puis atteint un pH inférieur à 2 dans les deux heures (MALAGELADA *et al.*, 1979 ; VAN WEY *et al.*, 2014). D'un point de vue anatomique et fonctionnel, l'estomac peut être séparé en (i) estomac proximal correspondant au fundus et au corps anatomique et (ii) estomac distal correspondant à l'antra anatomique (Figure 2).

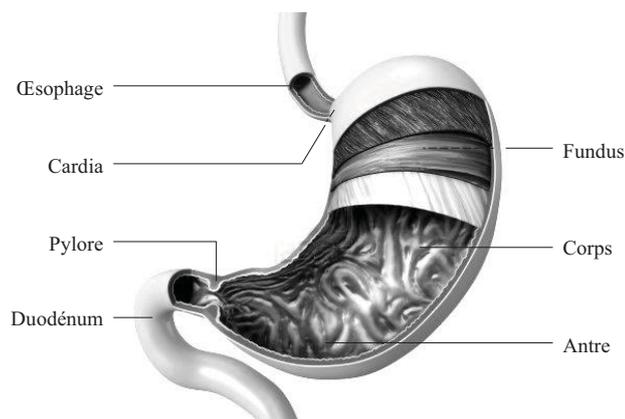


FIGURE 2. Organisation générale de l'estomac

L'estomac, composé de trois parties : le fundus, le corps et l'antra, est un réservoir débutant au niveau du cardia et se terminant au pylore, permettant la jonction avec l'intestin grêle. Son épithélium de surface comporte des invaginations régulières (plis gastriques) où se trouvent les glandes gastriques.

L'estomac proximal joue le rôle de réservoir des aliments déglutis et possède une activité sécrétoire importante alors que l'estomac distal assure la fragmentation et l'homogénéisation des solides et régule la vidange du produit de la digestion gastrique (chyme) dans le duodénum. Au pôle supérieur, l'estomac succède à l'œsophage par le cardia, qui fait suite au sphincter inférieur de l'œsophage et sert de valve anti-reflux. Au pôle inférieur, le pylore ferme l'estomac en jouant le rôle d'un sphincter plus ou moins permissif et constitue, avec l'antrum, l'unité fonctionnelle responsable du contrôle du passage du chyme dans le duodénum (KHAN *et al.*, 2009). En effet, la fermeture du pylore n'est pas totale et les liquides peuvent être expulsés vers le duodénum. En revanche, sa fermeture est suffisante pour empêcher le passage de particules solides dont la taille est supérieure à 2 mm et entraîne un jet rétrograde favorisant le mélange du contenu en réponse à la motricité gastrique. La quantité de chyme dans l'estomac est le principal facteur gastrique influençant la force de la contraction de l'antrum. Un temps de transit gastrique médian de 56 minutes (5 à 133 min) a été déterminé par WORSÖE *et al.* (2011) par suivi magnétique (Magnet Tracking System 1). La vitesse d'évacuation de l'estomac est proportionnelle à la quantité de chyme qu'il contient mais elle dépend également de facteurs duodénaux. En effet, une composition du chyme arrivant dans le duodénum riche en lipides peut induire la libération d'entérogastrones¹ s'opposant à la motilité et à la vidange gastrique tant que persistent dans le duodénum les facteurs en cause (Tableau 1).

1.1.1.2.2 Sécrétions gastriques et rôle dans la digestion

La production de suc gastrique est d'environ de deux litres par jour. Les cellules responsables de sa sécrétion font partie de la muqueuse gastrique. Les glandes gastriques comportent : (i) les cellules pariétales sécrétant de l'acide chlorhydrique (HCl) responsable de la chute du pH gastrique et de la dénaturation des protéines en brisant les ponts disulfures et les liaisons hydrogènes ; et le facteur intrinsèque qui permet l'absorption de la vitamine B₁₂ au niveau intestinal, (ii) les cellules principales sécrétant le pepsinogène, précurseur d'une endopeptidase (la pepsine) activée par l'HCl, et la lipase gastrique impliquée dans la digestion des lipides, (iii) des cellules endo/paracrines (cellules G, cellules entérochromaffine-like (ECL) et cellules D) sécrétant la gastrine, l'histamine, la somatostatine et la ghréline afin de réguler les sécrétions des cellules principales et pariétales et (iv) les cellules à mucus sécrétant du mucus et du bicarbonate de sodium (NaHCO₃) qui protègent la muqueuse gastrique des agressions mécaniques, de l'auto-digestion et de l'acidité gastrique (SHERWOOD, 2006).

Sur le plan temporel, la production de suc gastrique chez l'Homme présente trois phases successives, (i) la phase céphalique, (ii) gastrique et (iii) intestinale. Ainsi, la sécrétion gastrique est influencée par des facteurs précédant l'arrivée d'aliments dans l'estomac (réflexe de Pavlov), des facteurs liés à la présence d'aliments dans l'estomac et des facteurs duodénaux après la libération du chyme dans

1. Hormones peptidiques gastro-intestinales.

TABLEAU 1. Facteurs influençant la motilité et la vidange gastrique

Facteurs	Mode d'action	Effets sur la motilité et la vidange gastrique
Intra-gastrique		
Volume du chyme	La distension de l'estomac stimule la motricité gastrique par l'effet direct de l'éirement des muscles lisses et indirectement par l'intermédiaire de l'innervation intrinsèque, du pneumogastrique et de la gastrine	L'augmentation du volume stimule la motilité et la vidange
Fluidité du chyme	Effet direct ; le contenu gastrique doit être homogénéisé et transformé en un liquide épais pour être évacué	L'augmentation de la fluidité accélère l'évacuation
Intra-duodénaux		
Présence de lipides et d'acides, hyperosmolarité, distension	Stimulation du réflexe entéro-gastrique ou libération d'entéro-gastrones (cholécytokinine, sécrétine)	Ces facteurs duodénaux s'opposent à la motilité et à l'évacuation gastrique tant que persistent dans le duodénum les facteurs en cause
Extra-digestifs		
Émotion	Modification de l'équilibre neurovégétatif	Stimulation ou inhibition de la motilité et de l'évacuation gastrique
Douleur vive	Augmentation de l'activité du système sympathique	Inhibition de la motilité et de l'évacuation

D'après SHERWOOD, 2006

l'intestin grêle. La phase céphalique est d'origine vagale et induit une sécrétion d'HCl par les cellules pariétales responsable de l'activation de la pepsine. La phase gastrique est déclenchée par la présence de nourriture dans l'estomac et est liée à la libération d'HCl et de gastrine, rétrocontrôlée négativement par la somatostatine lorsque les valeurs de pH atteignent 3 à 4. L'arrivée du chyme dans l'intestin grêle stimule le système nerveux entérique ralentissant la motilité et la sécrétion gastrique. Trois hormones intestinales renforcent le signal de rétrocontrôle : (i) la sécrétine, (ii) la cholécystokinine et (iii) l'hormone incrétine GIP (glucose-dependent insulintropic peptide).

1.1.1.3 La digestion intestinale

Le chyme entrant dans l'intestin grêle a subi une digestion relativement peu importante. La quasi totalité de la digestion et de l'absorption a lieu dans l'intestin grêle. Celui-ci assure ainsi l'essentiel du processus de digestion par ses propres sécrétions et par celles des deux glandes annexes (pancréas et foie) qui lui sont associées. Les processus d'absorption sont le résultat du flux de l'eau et des produits de digestion à travers l'épithélium intestinal.

1.1.1.3.1 Anatomie de l'intestin grêle

Sur le plan anatomique, l'intestin grêle s'étend du pylore à la valvule iléo-cæcale et mesure environ 4 mètres de long pour un diamètre moyen de 3 cm. Il est divisé en trois parties : (i) le duodénum, où se mélangent le chyme gastrique et les sécrétions pancréatiques et biliaires, (ii) le jéjunum et (iii) l'iléon (Figure 3(a)). Après une période de jeûne d'au moins huit heures, les pH médians de ces trois sections anatomiques sont respectivement de 6,4 (5,9 à 6,8) ; 7,1 (6,6 à 7,9) et 7,4 (6,6 à 8,1) chez l'Homme (FALLINGBORG *et al.*, 1998). La grande capacité d'absorption de l'intestin grêle est liée à la structure de son épithélium (valvules, villosités, microvillosités) formant une bordure en brosse et permettant d'augmenter la surface d'absorption pour aboutir à une surface totale d'échanges d'environ 200 m² (Figure 3(b)). De plus, la progression du chyme doit être suffisamment lente pour permettre une digestion et une absorption optimales (KHAN *et al.*, 2009). En effet, les principaux mouvements de l'intestin grêle au cours de la digestion d'un repas sont des contractions de segmentation induisant des divisions du contenu intestinal et des mouvements de va-et-vient (GANONG, 2005). Ces contractions assurent une progression lente du chyme vers le côlon permettant d'augmenter son exposition avec la surface de l'épithélium. Lorsque la plus grande partie des nutriments a été absorbée, les contractions de segmentations sont remplacées par une activité péristaltique, le complexe moteur migrant. Un temps de transit médian dans l'intestin grêle de 255 minutes (209 à 398 min) a été déterminé par suivi magnétique (WORSÖE *et al.*, 2011). Ce temps de transit peut varier entre 4 et 8 heures en fonction du contenu du chyme et des individus (YUEN, 2010).

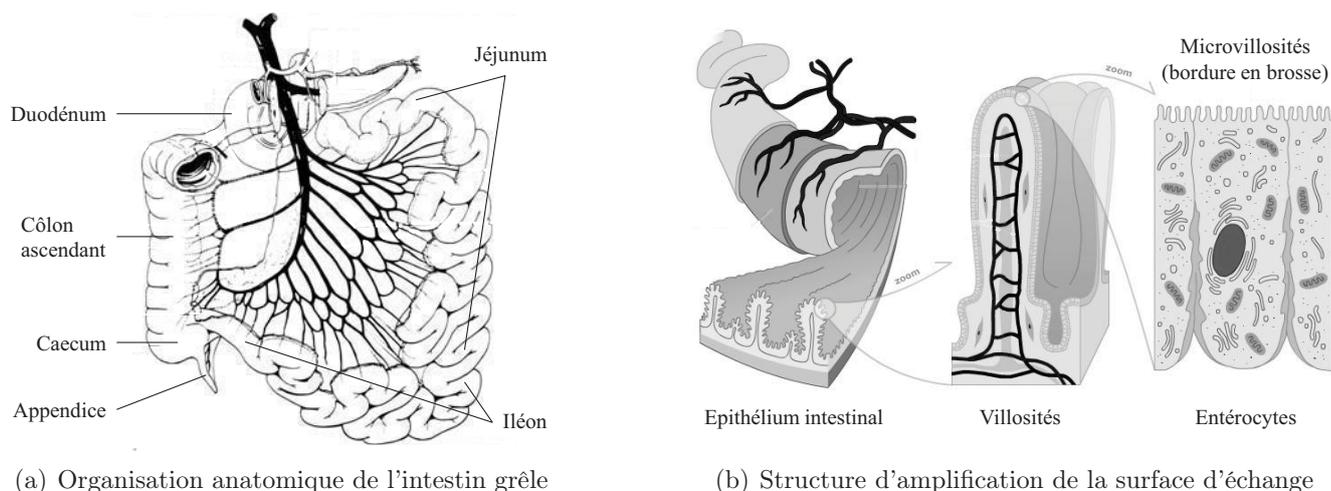


FIGURE 3. Organisation générale de l'intestin grêle

(a) L'intestin grêle est la partie de l'appareil digestif humain située entre l'estomac et le côlon. Il comprend un segment fixe, le duodénum, suivi de deux segments mobiles intra-péritonéaux, le jéjunum et l'iléon. (b) La topologie complexe de la paroi interne de l'intestin grêle lui confère une très grande surface d'absorption. La surface épithéliale de l'intestin grêle est principalement composée d'entérocytes assurant une fonction de barrière mécanique vis-à-vis du contenu luminal grâce aux jonctions serrées. La face apicale des entérocytes présente de très nombreuses évaginations, les microvillosités, formant du côté de la lumière intestinale la bordure en brosse.

1.1.1.3.2 Sécrétions des glandes annexes et rôles dans la digestion

La digestion chimique dans l'intestin grêle est sous la dépendance du fonctionnement des organes digestifs annexes (pancréas, foie et vésicule biliaire) à l'origine des sécrétions pancréatiques et biliaires (Figure 4).

1.1.1.3.2.1 Suc pancréatique

Le pancréas est un organe mixte endocrine et exocrine. Le tissu endocrine est constitué des îlots de Langerhans sécrétant l'insuline et le glucagon. Le tissu exocrine, le plus abondant, est formé de cellules acineuses dont les canaux excréteurs confluent pour former le canal pancréatique principal (canal de Wirsung) qui débouche dans le duodénum. Le volume quotidien de suc pancréatique sécrété par le pancréas exocrine et entrant dans l'intestin grêle est d'environ 1500 mL par jour (SHERWOOD, 2006). Ce dernier est constitué : (i) d'enzymes pancréatiques digestives sécrétées par les cellules acineuses et (ii) d'une solution aqueuse alcaline riche en NaHCO_3 sécrétée par les cellules de la paroi des canaux pancréatiques permettant de neutraliser le chyme acide entrant dans l'intestin grêle (SILVERTHORN *et al.*, 2007).

Les principales enzymes protéolytiques sécrétées sous forme inactive par les cellules acineuses sont le trypsinogène, le chymotrypsinogène et la procarboxypeptidase. L'activation de ces enzymes débute par

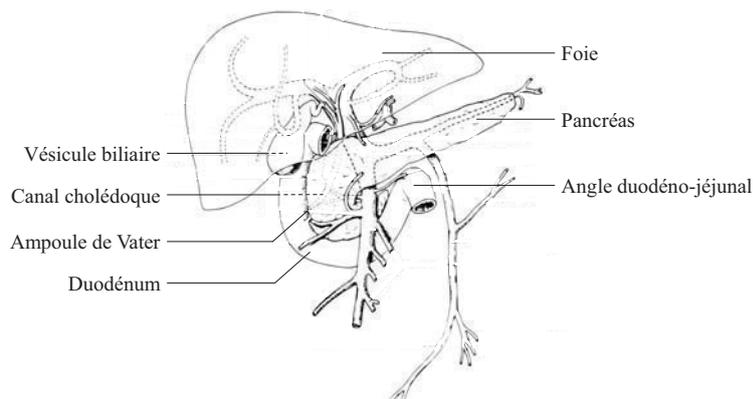


FIGURE 4. Organisation générale des organes digestifs annexes

Les organes annexes du tube digestif assurent la synthèse de diverses sécrétions indispensables à la digestion au niveau de l'intestin grêle. Le pancréas sécrète le suc pancréatique, déversé dans le duodénum via le canal de Wirsung. Le foie synthétise la bile, stockée dans la vésicule biliaire et déversée dans le duodénum via le canal cholédoque. L'ampoule de Vater est une cavité formée par la réunion du canal cholédoque et du canal de Wirsung. Elle est enveloppée d'un anneau musculaire, le sphincter d'Oddi, qui contrôle le passage des sécrétions biliaires et pancréatiques arrivant au duodénum.

la conversion du trypsinogène en trypsine active dans la lumière duodénale par l'action d'une enzyme sécrétée par les cellules épithéliales de la muqueuse duodénale : l'entéropeptidase (ou entérokinase). Le chymotrypsinogène et la procarboxypeptidase sont convertis par la trypsine dans la lumière duodénale en chymotrypsine et carboxypeptidase actives. Chacune des protéases pancréatiques rompt différentes liaisons peptidiques (i) la trypsine et la chymotrypsine sont des endopeptidases et (ii) les carboxypeptidases sont des exopeptidases (KHAN *et al.*, 2009).

La lipase pancréatique est la seule enzyme intestinale capable de digérer les lipides. Elle est sécrétée sous forme active et hydrolyse les triglycérides des aliments en leur forme absorbable, les monoglycérides et les acides gras libres.

L'amylase pancréatique est sécrétée sous forme active et complète l'activité de l'amylase salivaire. Cependant, elle a une activité plus forte et transforme l'amidon en dextrine puis en maltose en coupant les liaisons $\alpha(1-4)$ glucosidiques.

1.1.1.3.2.2 Sécrétions biliaires

Le foie est avant tout le plus important des organes ayant une activité métabolique. Il accomplit différentes tâches qui ne sont pas de nature digestive (i) en participant à la mise en réserve et à la distribution des nutriments absorbés par l'intestin, (ii) en jouant un rôle clé dans la biotransformation et l'élimination des déchets endogènes et des médicaments et toxines exogènes, (iii) en régulant le flux

sanguin et (iv) en éliminant les bactéries et globules rouges âgés (la durée de vie d'un globule rouge est d'environ 120 jours) grâce aux macrophages résidents.

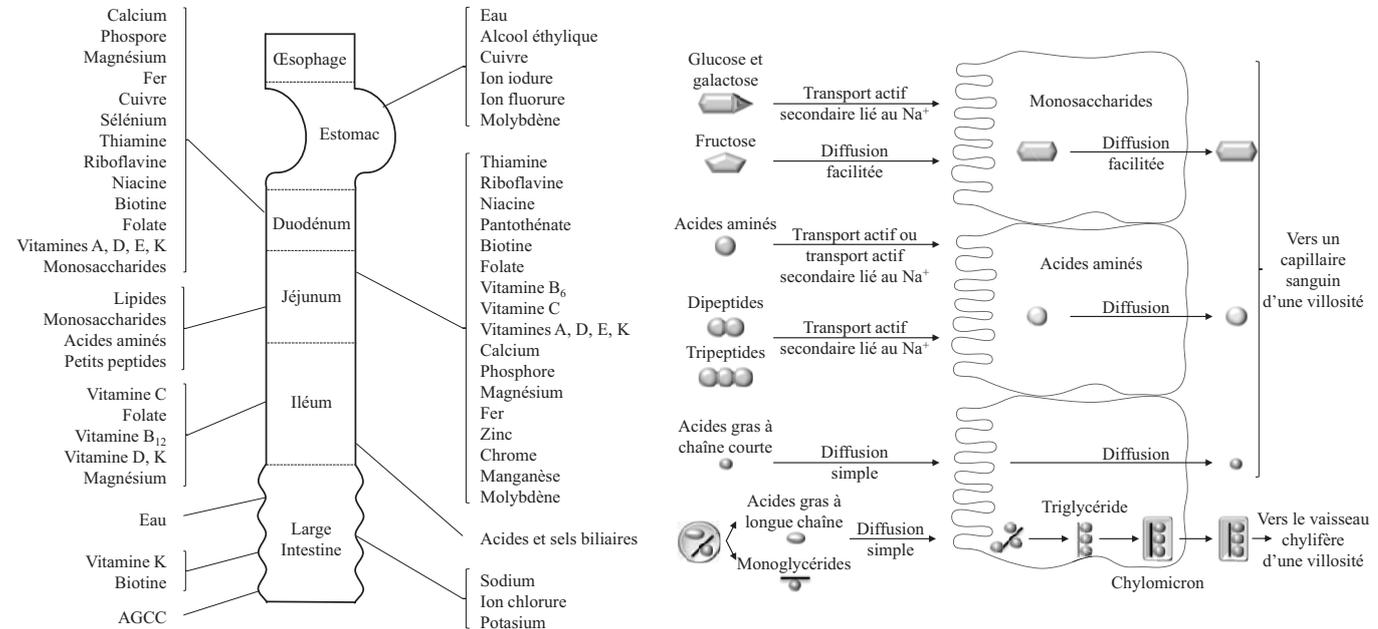
Le foie a également un rôle important dans la digestion. En effet, la bile sécrétée par le foie et stockée dans la vésicule biliaire est ensuite déversée dans la lumière duodénale à raison d'environ 500 mL par jour (SHERWOOD, 2006). Les sécrétions biliaires sont composées d'eau, de sels minéraux, de cholestérol, de lécithine, de pigments biliaires (bilirubine et biliverdine) et de sels biliaires (molécules amphiphiles dérivées du cholestérol). Au cours de la digestion, les sels biliaires jouent un rôle important dans la digestion des lipides par la formation de micelles favorisant l'activité de la lipase pancréatique. Les acides biliaires suivent un cycle entéro-hépatique. En effet, après avoir contribué à la digestion et à l'absorption des lipides, 95% sont réabsorbés vers le sang grâce à un système de transport actif situé dans la partie terminale de l'iléon et retournent au foie par la veine porte où ils seront à nouveau sécrétés dans la bile. Les concentrations en sels biliaires dans le duodénum sont initialement de 10 à 15 mmol/L pour diminuer progressivement pendant les deux premières heures après le repas jusqu'à approximativement 5 mmol/L. Dans le jéjunum et l'iléon, des concentrations respectives de 10 mmol/L et de 2 à 4 mmol/L sont relevées (NORTHFIELD et MCCOLL, 1973).

1.1.1.3.3 Cellules de l'épithélium intestinal

La digestion dans la lumière de l'intestin grêle est complète pour les lipides mais incomplète pour les glucides et les protéines. C'est dans la bordure des cellules épithéliales que la digestion est achevée. Différents types cellulaires composent cette muqueuse intestinale : (i) les entérocytes, représentant 80% des cellules au niveau des villosités, ayant essentiellement un rôle dans l'absorption mais assurant également un rôle digestif en produisant différentes enzymes digestives (entérokinases, disaccharidases et aminopeptidases) sur leur face apicale, (ii) les cellules caliciformes sécrétant un mucus, participant à la formation d'un gel muqueux tapissant entièrement l'épithélium, prédominantes au niveau des cryptes, (iii) les cellules de Paneth, également dans les cryptes, sécrétant du lysozyme (enzyme spécialisée dans la dégradation des parois bactériennes Gram+) et des peptides antibactériens (α -défensines) et (iv) au niveau de l'iléon, l'épithélium recouvrant les plaques de Peyer contenant des cellules hautement spécialisées dans le transport des antigènes vers le tissu lymphoïde, les cellules M (microfolds cells) jouant un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire (KHAN *et al.*, 2009).

L'absorption au niveau duodénal intéresse surtout les glucides, l'eau et les électrolytes. Le jéjunum est le principal site d'absorption intestinale des macro- et micro-nutriments. L'iléon assure, quant à lui, un complément à l'absorption jéjunale et l'absorption de la vitamine B₁₂ et des sels biliaires (Figure 5(a)). En fonction de leur nature, les produits de digestion peuvent être absorbés par trois mécanismes différents : (i) la diffusion simple à travers la membrane des entérocytes ou au niveau de la jonction entre deux cellules, selon un gradient de concentration, (ii) la diffusion facilitée où les molécules sont trans-

portées à travers la membrane des entérocytes grâce à des transporteurs, toujours selon un gradient de concentration et (iii) un transport actif grâce à des transporteurs membranaires utilisant l'énergie de la cellule ou un transport couplé à d'autres molécules (Figure 5(b)).



(a) Principaux sites d'absorption des nutriments au niveau du tractus gastro-intestinal humain

(b) Mécanismes de transport membranaire des nutriments

FIGURE 5. Localisation et mécanismes de l'absorption intestinale

(a) La digestion et l'absorption des nutriments diffèrent selon leur nature. L'absorption est principalement le fait du duodénum et du jéjunum (Modifié d'après GROPPER et J. L. SMITH, 2012). (b) L'absorption des nutriments au niveau de l'intestin grêle fait intervenir trois mécanismes : la diffusion simple selon un gradient de concentration, la diffusion facilitée grâce à des transporteurs membranaires selon un gradient de concentration et un transport actif par des transporteurs membranaires utilisant l'énergie de la cellule (Modifié d'après SHERWOOD, 2006). AGCC : acides gras à chaîne courte

1.1.1.4 La digestion colique

1.1.1.4.1 Anatomie et physiologie du côlon

Le côlon constitue la partie terminale du tube digestif. Il s'étend de la jonction iléo-cæcale à l'anus sur environ 100 cm et compte sept régions : (i) le cæcum doté d'un prolongement, l'appendice, (ii) le côlon ascendant, (iii) le côlon transverse, (iv) le côlon descendant, (v) le côlon sigmoïde, (vi) le rectum et (vii) l'anus (GANONG, 2005). Cependant, il est admis d'utiliser le terme « côlon » pour désigner les parties ascendante, transversale et descendante. D'un point de vue embryonnaire et morphologique, le côlon peut être décrit en deux parties (LARSEN, 2003) :

- le côlon proximal - dérivé de l'intestin primitif moyen - (cæcum, côlon ascendant et moitié droite du

côlon transverse), vascularisé par l'artère mésentérique supérieure, dont le rôle est essentiellement l'absorption de l'eau et des électrolytes.

- le côlon distal – dérivé de l'intestin primitif postérieur – (moitié gauche du côlon transverse, côlon descendant, sigmoïde et rectum), vascularisé par l'artère mésentérique inférieure possédant une fonction de stockage et d'évacuation des déchets de l'alimentation.

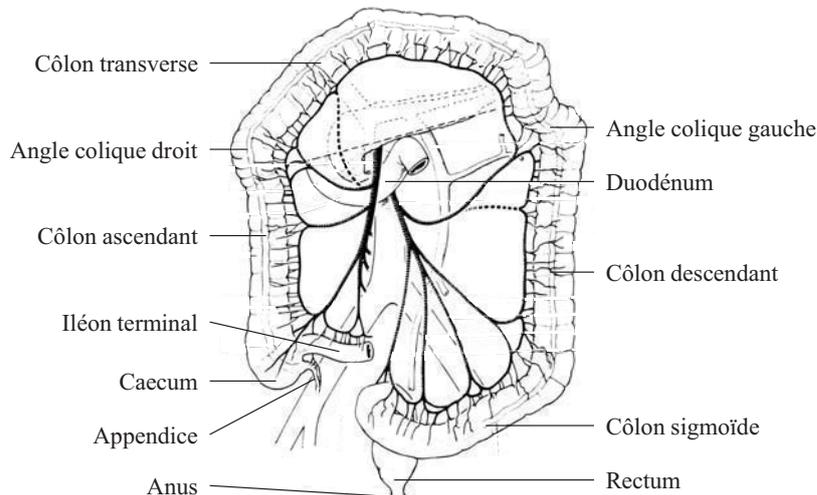


FIGURE 6. Organisation générale du côlon humain

Le côlon humain est divisé en trois parties anatomiques : le côlon ascendant, le côlon transverse et le côlon descendant. Le côlon sigmoïde et le rectum lui font suite. Les différentes parties du côlon sont le siège d'activités fermentaires différentes.

L'épithélium colique se distingue de celui de l'intestin grêle par l'absence de plis et de villosités. Les cellules absorbantes (ou colonocytes) sont relativement peu nombreuses et présentent des microvillosités nettement plus courtes et moins nombreuses que dans l'intestin grêle. Les cellules à mucus sont plus nombreuses et sécrètent un gel muqueux favorisant le glissement des particules alimentaires non digérées et des fèces.

Le mélange du chyme se poursuit dans le côlon grâce aux contractions de segmentation permettant d'engendrer un mouvement en masse des selles. Le temps de transit est fonction du segment colique considéré et de l'alimentation, de 3 à 5 heures dans le côlon ascendant, de 0,2 à 4 heures dans le côlon transverse et de 5 à 72 heures dans le côlon descendant et sigmoïde (WILSON, 2010). La définition de valeurs de temps de transit normal² n'est pas aisée puisqu'elle fait intervenir, entre autre, l'alimentation et l'activité physique. WAGENER *et al.* (2004) ont tenté de définir des valeurs anormales dans la constipation de l'enfant par suivi de marqueurs radio-opaques. La distribution des temps de transit est bimodale (Figure 7). Ainsi, la moyenne centrale et ses écarts-types ne peuvent pas être utilisés pour définir un temps de transit normal. La distribution des temps de transit chez l'adulte n'est pas connue mais des valeurs moyennes sont souvent citées (WILSON, 2010).

2. Données suivant une loi normale.

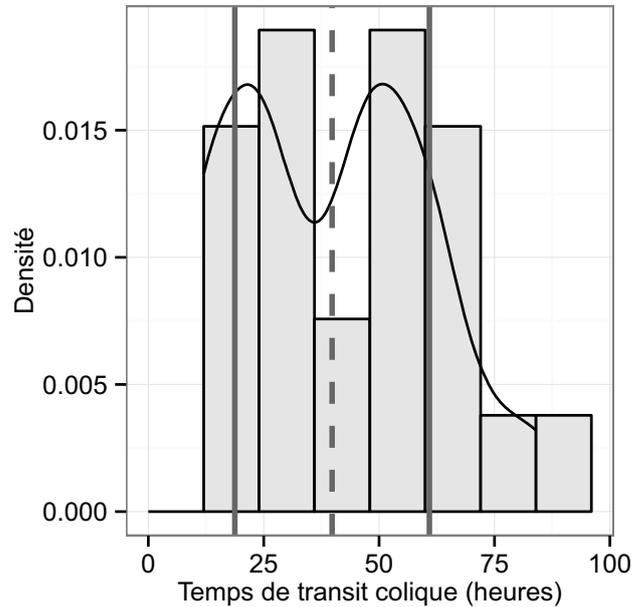


FIGURE 7. Distribution des temps de transit colique chez l'enfant

La distribution des temps de transit chez des enfants (âge médian de 10 ans (4 à 15) ; $n=22$) relevés par WAGENER *et al.*, 2004 est bimodale. L'utilisation de la moyenne centrale (ligne verticale en pointillés) et ses écarts-types (lignes verticales pleines) n'est pas justifiable pour déterminer un temps de transit normal mais néanmoins souvent utilisée en pratique (Modifié d'après WAGENER *et al.*, 2004).

En raison de ses mouvements lents, un écosystème bactérien peut se mettre en place dans le côlon (l'établissement, la composition et les fonctions métaboliques de ce microbiote seront détaillés en 1.1.2). L'activité bactérienne du microbiote évolue le long du côlon et influence deux paramètres physico-chimiques, le pH et le potentiel d'oxydo-réduction. Les pH médians et les potentiels d'oxydo-réduction (redox) moyens du contenu colique sont respectivement de 5,9 (5,3 à 6,7) et $-415 \text{ mV} \pm -72$ dans le côlon proximal et de 6,1 (5,2 à 7,0) et $-380 \text{ mV} \pm -110$ dans le côlon distal (PRESS *et al.*, 1998 ; STIRRUP *et al.*, 1990).

1.1.1.4.2 Rôles du côlon dans la digestion

La motricité colique assure le brassage du chyme intestinal pour permettre la réabsorption d'eau et de sodium, et permet la progression des matières fécales vers l'anus et leur stockage temporaire entre deux défécations. En effet, le côlon joue un rôle essentiel dans le contrôle du volume et de la composition ionique des selles. En situation physiologique, le côlon absorbe les ions sodium et chlorure et sécrète les ions potassium et bicarbonate (KHAN *et al.*, 2009). De plus, le côlon humain héberge une communauté microbienne dense exerçant de nombreuses fonctions physiologiques (détaillées en 1.1.2.4). Parmi ces fonctions, la fermentation des substrats exogènes (glucides non digérés ou non absorbés par l'intestin

grêle) et endogènes (protéines issues de la desquamation cellulaire, enzymes digestives, mucus) produit une grande diversité de métabolites. Ces derniers sont principalement absorbés et utilisés par l'hôte. Ainsi, les interactions entre l'alimentation, le microbiote intestinal et l'hôte sont fondamentales pour le maintien de l'homéostasie de l'écosystème colique (BERNALIER-DONADILLE, 2010).

1.1.2 L'écosystème microbien digestif

Le tube digestif héberge des micro-organismes dans tous les compartiments qui le composent. Le microbiote intestinal se caractérise par sa complexité et sa diversité. En effet, il est actuellement admis que ce consortium bactérien est composé de centaines d'espèces atteignant une densité maximale dans le côlon de 10^{11} bactéries par gramme de contenu (DORÉ et CORTIER, 2010 ; WALKER *et al.*, 2014).

1.1.2.1 Établissement du microbiote intestinal

In utero, le tube digestif est stérile. Dès la naissance, des micro-organismes colonisent le tube digestif du nouveau-né sur toute sa longueur avec un gradient croissant dans le sens oro-anal. Ces micro-organismes sont issus principalement de la flore vaginale, intestinale et cutanée de la mère par un transfert vertical. Cependant, de nombreuses pratiques modernes (césarienne, allaitement artificiel, antibiothérapie précoce, hygiène excessive) peuvent réduire ces flux d'organismes (ADLERBERTH et WOLD, 2009 ; CHO et BLASER, 2012 ; SCHMIDT *et al.*, 2011). La biomasse au niveau gastrique est généralement faible en raison d'un pH acide et d'un temps de transit court. Le passage rapide des matières digestives dans l'intestin grêle ne permet pas une croissance bactérienne importante, mais le nombre de micro-organismes augmente le long de l'intestin grêle parallèlement à une diminution de la concentration en sels biliaires. La vitesse de déplacement du contenu intestinal se ralentit dans le côlon, ce qui facilite le développement de communautés bactériennes complexes (MACFARLANE et L. MACFARLANE, 2010). La composition du microbiote intestinal s'équilibre après cette période d'implantation (Figure 8) et suit une cinétique montrant une augmentation progressive de la diversité microbienne au fil du temps corrélée à un gradient d'anaérobiose. Les communautés microbiennes varient le long du tractus gastro-intestinal, mais aussi transversalement entre leurs parties luminale et mucosale. En fonction de l'organe digestif considéré, une flore différente est retrouvée, correspondant à des niches écologiques spécifiques (COLLIGNON et BUTEL, 2004). Une homéostasie s'établit au sein du tractus digestif vers l'âge de deux ans. Cependant au cours de la vie, la composition du microbiote peut être affectée par l'alimentation, l'activité du système immunitaire de l'hôte et par des changements physiologiques en particulier chez les personnes âgées (O'TOOLE et CLAEISSON, 2010). Ainsi, la composition de la flore digestive se caractérise par des variations temporelles et spatiales au sein d'un même individu (HAYASHI *et al.*, 2005).

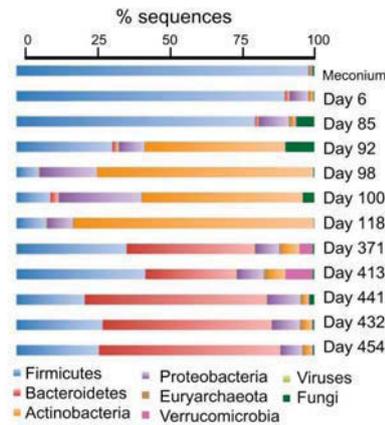


FIGURE 8. Analyse métagénomique de séquences d'ADN extraites de l'ADN fécal de nourrissons en fonction du temps

La colonisation du tube digestif suit une cinétique d'implantation montrant une augmentation progressive de la diversité microbienne au fil du temps associée à une diminution progressive du nombre des Firmicutes et une augmentation du nombre des Actinobacteria et des Bacteroidetes (D'après KOENIG *et al.*, 2011).

ADN : acide désoxyribonucléique

1.1.2.2 Caractérisation du microbiote intestinal

La caractérisation du microbiote intestinal basée sur les techniques culturales ne permet de prendre en compte que 30% de la diversité des micro-organismes car la plupart des espèces bactériennes n'est ni cultivable, ni identifiable avec les méthodes fondées sur les caractéristiques morphologiques et biochimiques. L'essor des techniques moléculaires, basées principalement sur le séquençage des gènes codant l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), a permis une meilleure caractérisation des communautés microbiennes (FRAHER *et al.*, 2012). Les microbiotes de l'œsophage humain, de l'estomac et de l'intestin grêle sont relativement peu étudiés. En effet, la majorité des études concernent la caractérisation des communautés microbiennes de la cavité buccale et du côlon. Cependant, pour simplifier l'échantillonnage, les études sur la diversité du microbiote intestinal sont le plus souvent basées sur les résultats obtenus à partir d'échantillons de selles, or la flore fécale est significativement différente de la flore colique (MARTEAU *et al.*, 2001). Enfin, des communautés microbiennes dans le tractus gastro-intestinal sont à discerner : (i) les membres autochtones, communs à la majorité des hôtes et (ii) les membres allochtones provenant de sources extérieures, non présents dans la majorité des hôtes, mais pouvant être abondants (WALTER et R. LEY, 2011).

1.1.2.3 Diversité et abondance microbienne dans le tractus digestif humain

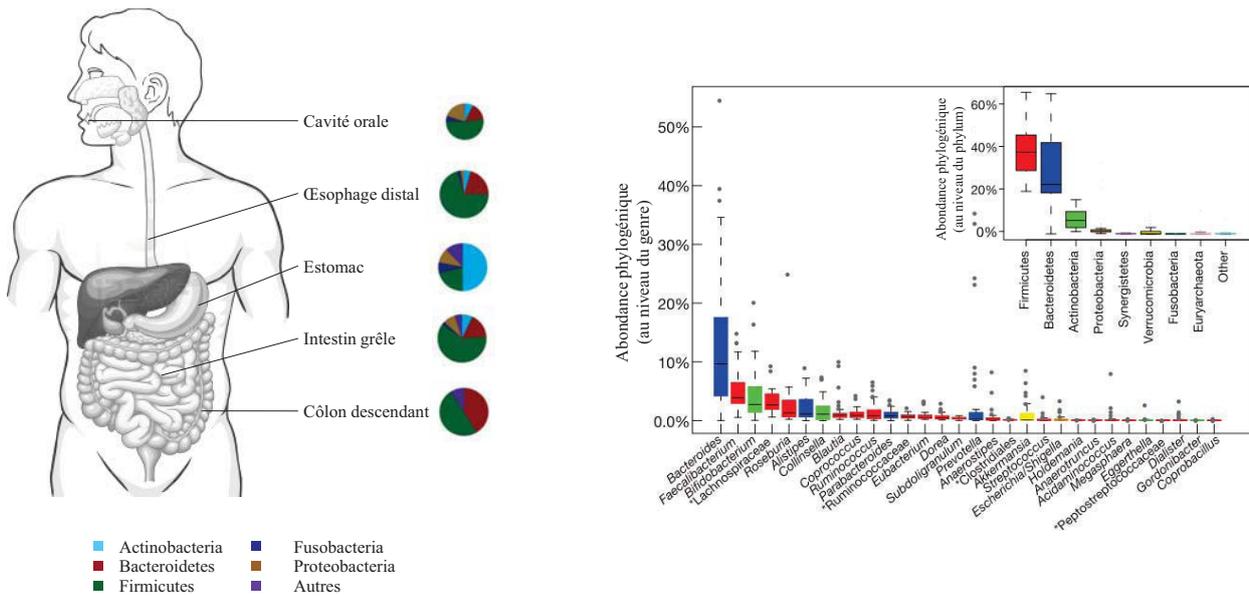
Les principaux membres des communautés bactériennes dans les différents segments du tube digestif humain sont illustrés dans la Figure 9(a). La biomasse bactérienne dans les différents compartiments a été estimée à environ : 10^{8-9} , 10^{2-3} , 10^{3-4} , 10^{4-5} , 10^8 et 10^{11} unités formant colonies par millilitre (UFC/mL) dans la cavité buccale, l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le côlon respectivement (WALTER

et R. LEY, 2011). La cavité buccale et l'œsophage distal sont colonisés à 99% par des membres des phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria et Fusobacteria (AHN *et al.*, 2011 ; PEI *et al.*, 2004). En raison des conditions drastiques, il était classiquement admis que l'estomac pouvait accueillir transitoirement quelques espèces bactériennes mais ne possédait pas de microbiote complexe. Or cette idée a été bouleversée avec la découverte d'*Helicobacter pylori* (MARSHALL et WARREN, 1984) et plus récemment par l'identification d'une communauté de 128 phylotypes (BIK *et al.*, 2006). La majorité des séquences ont été assignées aux phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria et Fusobacteria. Cette communauté est significativement différente des microbiotes bucaux et œsophagiens et n'est pas affectée par la présence d'*Helicobacter pylori*. Dans l'intestin grêle, le pH redevient neutre et l'oxygène se raréfie permettant à la flore bactérienne qui a survécu au passage gastrique d'augmenter progressivement du duodénum à l'iléon. La flore du duodénum et du jéjunum est composée d'espèces aérobie-anaérobies facultatives (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*) appartenant à la flore transitoire (COLLIGNON et BUTEL, 2004). Le microbiote luminal de l'iléon est constitué majoritairement d'espèces anaérobies strictes, appartenant au phylum Bacteroidetes, et d'espèces anaérobies facultatives (HAYASHI *et al.*, 2005). Les populations bactériennes associées à la muqueuse de l'iléon terminal comprennent des membres du phylum Bacteroidetes et de *Clostridium* cluster XIVa (WANG *et al.*, 2003). Au niveau colique, le microbiote présente une grande variabilité inter-individuelle et est composé de plus de 1000 espèces appartenant à neuf phyla bactériens (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Spirochaetes et VadinBE97) et deux *Archaea* (*Methanobrevibacter smithii* et *Methanosphaera stadtmanae*). Les phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria et Verrucomicrobia sont relativement peu représentés dans le microbiote colique. La faible abondance de séquences de Proteobacteria (y compris *Escherichia coli*) n'est pas surprenante, étant donné que les espèces anaérobies facultatives représentent environ 0,1% des bactéries dans l'environnement anaérobie stricte du côlon (Figure 9(b)). Les Firmicutes et les Bacteroidetes représentent à eux seuls plus de 98% de la totalité des séquences ADNr 16S présentes dans l'environnement intestinal (ARUMUGAM *et al.*, 2011 ; DAVE *et al.*, 2012 ; ECKBURG *et al.*, 2005 ; R. E. LEY *et al.*, 2006 ; LOZUPONE *et al.*, 2012 ; MORGAN *et al.*, 2013). Ainsi, ARUMUGAM *et al.* (2011) ont démontré l'existence de trois entérotypes³ différents dans le microbiote fécal humain, *i.e.* *Bacteroides* (Bacteroidetes), *Prevotella* (Bacteroidetes) et *Ruminococcus* (Firmicutes) malgré une grande diversité d'espèces. Enfin, dans l'étude de ECKBURG *et al.* (2005), 95% des Firmicutes étaient membres des *Clostridia* dont un nombre important appartenant à *Clostridium* cluster IV, XIVa et XVI (Figure 9(c)).

1.1.2.4 Fonctions et activités métaboliques du microbiote intestinal

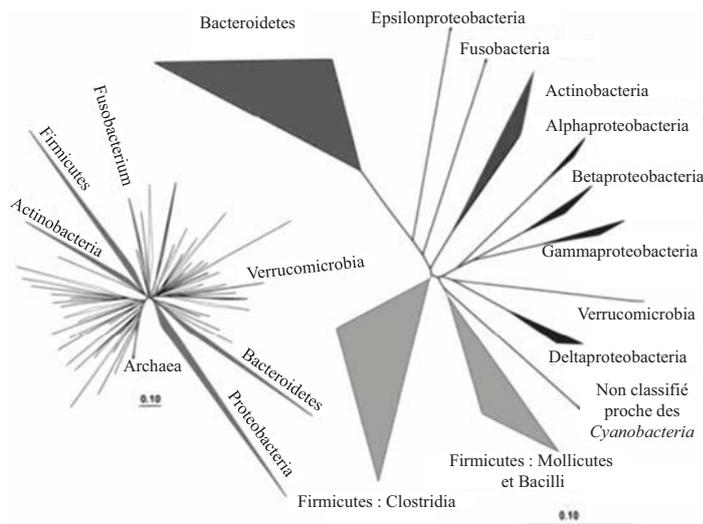
Le microbiote intestinal exerce de nombreuses fonctions physiologiques ayant des répercussions sur la nutrition et la santé de l'hôte. Le microbiote colique est impliqué notamment dans le métabolisme des glucides et des protéines, la synthèse des vitamines B et K, la biotransformation des acides biliaires

3. Genre majoritaire chez un individu.



(a) Diversité et abondance bactérienne dans les différents segments du tube digestif humain

(b) Abondance bactérienne au niveau du genre et du phylum du microbiote fécal humain



(c) Profil phylogénique du microbiote intestinal humain

FIGURE 9. Diversité et abondance bactérienne du microbiote intestinal et fécal humain

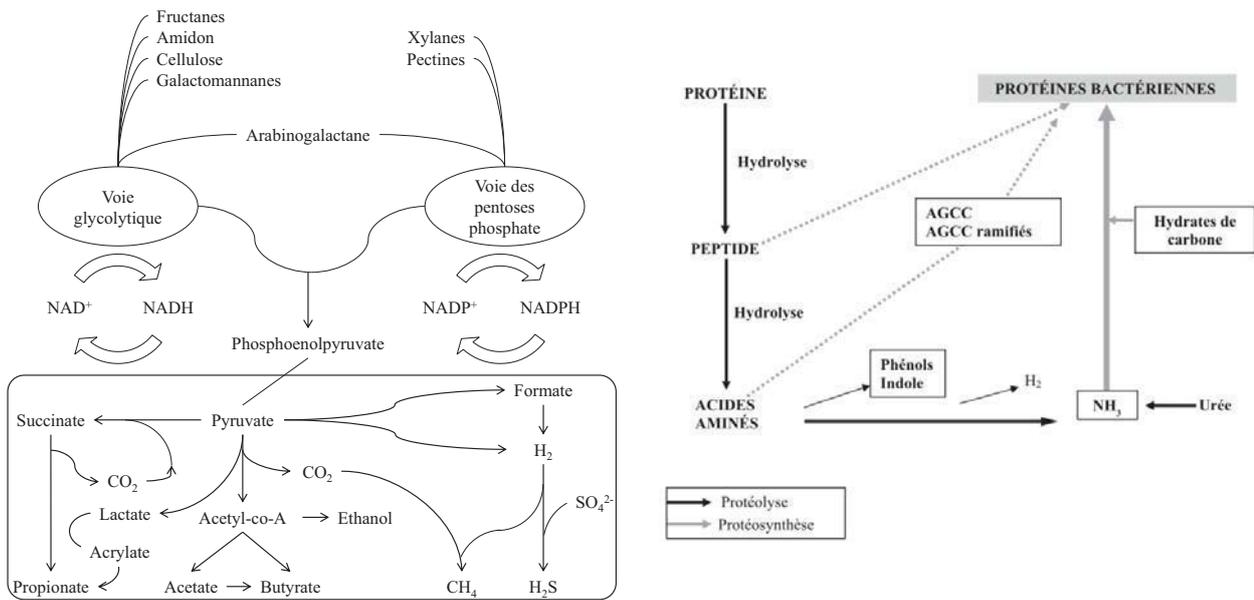
(a) L'abondance relative des principaux phyla est représentée pour les différents segments du système digestif humain (Modifié d'après DAVE *et al.*, 2012). (b) L'abondance des 30 genres les plus abondants du microbiote fécal est représentée. Chaque box-plot est coloré par phylum (Modifié d'après ARUMUGAM *et al.*, 2011). (c) Arbre phylogénétique basé sur l'ADNr 16S de l'ensemble des données de séquences du microbiote intestinal humain de l'étude de ECKBURG *et al.*, 2005. L'angle où chaque triangle se joint à l'arbre représente l'abondance relative des séquences et les longueurs des deux côtés adjacents indiquent la profondeur de la ramification (Modifié d'après ECKBURG *et al.*, 2005).

conjugués, la dégradation de complexes à base d'oxalate. Par ailleurs, il a également un rôle dans la maturation du système immunitaire et a un effet trophique sur l'épithélium intestinal (MONTALTO *et al.*, 2009).

Les bactéries des genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Roseburia* ainsi que certaines espèces de *Clostridium*, *Eubacterium* et *Enterococcus* sont dotées d'une activité hydrolytique permettant de dégrader les polysaccharides. En dépit de la vaste diversité des hydrates de carbone disponibles et du grand nombre d'espèces capables d'en assurer la fermentation, le nombre de voies métaboliques par lesquelles ces substrats sont catabolisés est relativement limité. La majorité des espèces bactériennes utilisent la glycolyse, également connue sous le nom de voie d'Embden-Meyerhof-Parnas, pour convertir les hydrates de carbone en pyruvate (BERNALIER-DONADILLE, 2010). Les principaux produits du métabolisme des glucides sont des acides gras à chaîne courte (AGCC). Les AGCC majoritairement produits à partir des fermentations bactériennes sont l'acétate, le propionate et le butyrate. Le métabolisme des glucides conduit également à la production de métabolites intermédiaires, comme le succinate, le lactate, l'éthanol, le formate, l'hydrogène et le dioxyde de carbone (Figure 10(a)). La majorité des genres qui prédominent dans le côlon (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*) produisent de l'acétate. La principale voie de biosynthèse de l'acétate est la décarboxylation oxydative du pyruvate. Une partie de l'acétate peut être utilisée au cours de la formation du butyrate. Le propionate est principalement synthétisé par *Bacteroides*, *Propionibacterium* et *Veillonella*. La principale voie de biosynthèse du propionate est la décarboxylation du succinate par *Bacteroides* (voie du succinate). Une seconde voie peut être empruntée par *Clostridium* cluster IX (voie de l'acrylate) qui produit de l'acrylate à partir du lactate. Le butyrate peut être biosynthétisé par *Clostridium* cluster IV, XIVa et XVI selon deux voies métaboliques, (i) la voie de la butyrate kinase et (ii) celle utilisant l'acétate comme co-substrat (BERNALIER-DONADILLE, 2010).

Les protéines et les peptides sont les principales sources d'azote dans le côlon. Un grand nombre de genres bactériens du côlon humain est doté d'une activité protéolytique (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*). La désamination des acides aminés est réalisée par les espèces bactériennes coliques conduisant principalement à la formation d'AGCC majoritaires et d'ammoniac. Ce dernier est absorbé par la muqueuse colique et transporté par la veine porte jusqu'au foie, où il est converti en urée, qui est excrétée dans l'urine. L'ammoniac est également une source d'azote pour un grand nombre d'espèces bactériennes dans le côlon. Au sein des cellules bactériennes, des amino-transférases permettent aussi, grâce au transfert de l'ammoniac sur les squelettes carbonés, la synthèse d'acides aminés (BERNALIER-DONADILLE, 2010). La décarboxylation des acides aminés forme essentiellement des amines. L'histamine, la pipéridine, la tyramine, la cadavérine, la pyrrolidine, la 5-hydroxytryptamine, l'agmatine et la putrescine ont été trouvées *in vivo* dans les selles humaines (SAARINEN, 2002). La production d'amines par les bactéries coliques peut conduire à la formation de N-nitrosamines potentiellement cancérigènes. En effet, bien que ces dernières soient es-

sentiellement produites par la condensation d'une amine secondaire avec du nitrite dans les conditions acide de l'estomac (CUMMINGS et G. T. MACFARLANE, 1991), le microbiote intestinal (*Escherichia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*) participe, dans une moindre mesure, à leur formation (MASSEY *et al.*, 1988 ; SCOTT *et al.*, 2013). Cependant, une large gamme d'autres composés sont également formés au cours du métabolisme des acides aminés, comme les phénols, les acides dicarboxyliques et les acides gras ramifiés (isobutyrate, isovalérate). La figure 10(b) représente le métabolisme général des protéines par le microbiote intestinal humain.



(a) Principales voies métaboliques de la fermentation des polysaccharides par le microbiote intestinal humain (b) Métabolisme des protéines par le microbiote intestinal humain

FIGURE 10. Activité métabolique du microbiote intestinal humain

(a) Le métabolisme des glucides par le microbiote intestinal conduit majoritairement à la production d'acétate, de propionate et de butyrate (Modifié d'après S. MACFARLANE et G. T. MACFARLANE, 2003). (b) La désamination des acides aminés est utilisée par les espèces bactériennes coliques conduisant essentiellement à la formation d'acides gras à chaîne courte et d'ammoniac (Modifié d'après BERNALIER-DONADILLE, 2010).

AGCC : acides gras à chaîne courte, CO₂ : dioxyde de carbone, CH₄ : méthane, H₂ : hydrogène, NAD⁺ : forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide, NADH : forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide, NADP⁺ : forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, NADPH : forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, NH₃ : ammoniac, H₂S : sulfure d'hydrogène, SO₄²⁻ : ion sulfate

Jusqu'à 99% des AGCC sont absorbés au niveau de l'épithélium colique et servent de substrats énergétiques à la muqueuse colique (butyrate) et au foie (acétate, propionate) après passage par la veine porte. Ainsi, les concentrations en AGCC totales décroissent entre les différentes parties anatomiques du côlon. CUMMINGS *et al.* (1987) ont montré des concentrations allant de 127 mmol/L dans le côlon ascendant (acétate 57%, propionate 22%, butyrate 21%) à 90 mmol/L dans le côlon descendant (acétate 57%, propionate 21%, butyrate 22%). L'hydrogène (H₂) formé lors des processus fermentaires est ma-

généralement métabolisé par les espèces hydrogénotrophes, le reste étant éliminé par voie anale et par voie pulmonaire après passage dans le sang. Trois voies d'utilisation de l' H_2 ont été mises en évidence : (i) la méthanogénèse chez les individus porteurs d'*Archaea* méthanogènes, conduisant à la formation de méthane (CH_4), (ii) l'acétogénèse réductrice conduisant à la production d'acétate à partir d' H_2 et de dioxyde de carbone (CO_2) et (iii) la sulfato-réduction consistant en une production de sulfure par réduction des sulfates (BERNALIER-DONADILLE, 2010 ; GÉRARD et BERNALIER-DONADILLE, 2007 ; G. T. MACFARLANE et CUMMINGS, 1991).

Chez l'homme, il a été montré que certains membres du microbiote intestinal sont capables de synthétiser la vitamine K ainsi que la plupart des vitamines hydrosolubles du groupe B, telles que la biotine, la cobalamine, les folates, l'acide nicotinique, l'acide pantothénique, la pyridoxine, la riboflavine et la thiamine (M. HILL, 1997). Par ailleurs, certaines espèces du genre *Bifidobacterium* sont connues pour leur capacité à sur-produire les folates (POMPEI *et al.*, 2007). Avec la disponibilité croissante de séquences du génome bactérien, il est possible d'identifier le potentiel de production de vitamines par ces souches, mais aussi de comprendre les mécanismes de leur biosynthèse (LEBLANC *et al.*, 2013 ; ROTH *et al.*, 1996).

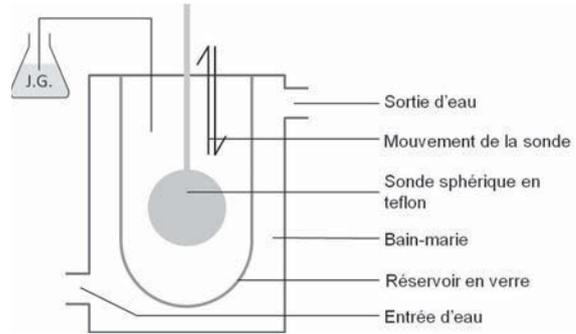
1.2 Les systèmes de digestion artificielle

1.2.1 Modélisation de la digestion humaine

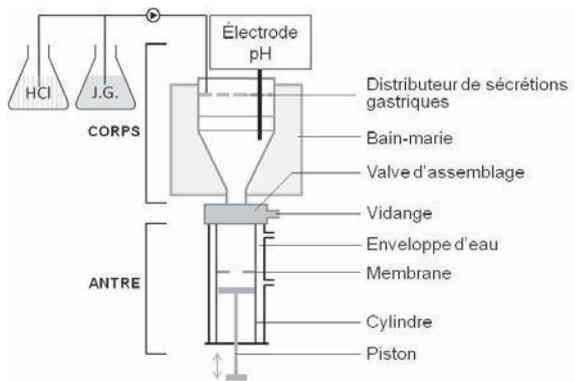
Pour des raisons réglementaires, budgétaires, techniques, scientifiques, de délai et/ou d'éthique, les méthodes de digestion *in vitro* s'avèrent être des compléments de plus en plus utiles à l'expérimentation animale et humaine, à condition que la pertinence de ces méthodes soit du niveau de celle des expériences *in vivo*. De très nombreux systèmes digestifs artificiels modélisant les conditions physico-chimiques et/ou microbiologiques rencontrées dans l'environnement digestif humain ont été développés par différentes équipes. Ces systèmes peuvent être classés selon leur degré de complexité, mais aussi selon le fait qu'ils soient mono- ou multi-compartmentés, statiques ou dynamiques. Les potentialités de ces outils sont nombreuses et intéressent aussi bien le domaine de l'agroalimentaire, de la pharmacologie que des biotechnologies. Ainsi, ils peuvent être utilisés dans le cadre d'études nutritionnelles, toxicologiques, pharmaceutiques ou encore microbiologiques.

Dans cette section, seront présentés les principaux modèles *in vitro* simulant la digestion humaine au niveau gastrique, intestinal et colique. La mastication est une étape essentielle dans la digestion et, à ce titre, différents masticateurs artificiels ont été développés (WODA *et al.*, 2010). Néanmoins, ces systèmes ne seront pas détaillés dans ce manuscrit, ce travail de thèse n'ayant pas porté sur la mastication. De plus, seuls sont répertoriés ici les systèmes *in vitro* permettant l'étude des réactions ayant lieu dans la lumière du tractus digestif. Les modèles simulant l'absorption intestinale, comme les chambres de Ussing

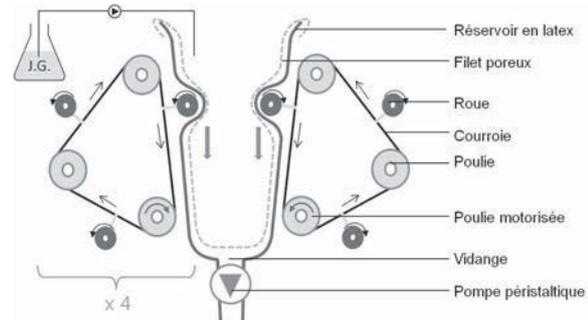
(CLARKE, 2009), ne seront donc pas décrits.



(a) Système statique mono-compartmenté (J. CHEN *et al.*, 2011)



(b) Système DGM (MERCURI *et al.*, 2011)



(c) Système HGS (F. KONG et SINGH, 2010)

FIGURE 11. Principaux modèles d'estomacs artificiels

D'après BLANQUET-DIOT *et al.*, 2013.

DGM : Dynamic Gastric Model, HCl : acide chlorhydrique, HGS : Human Gastric Simulator, J.G. : jus gastrique

1.2.1.1 Estomacs artificiels

L'utilisation de modèles gastriques permet de déterminer les changements physiques et/ou chimiques subis par les aliments dans l'estomac. Les modèles les plus simples consistent en une hydrolyse peptidique d'aliments homogénéisés (37°C, pH 1-2 pendant 1 à 2 heures). D'autres modèles statiques intègrent des paramètres supplémentaires, comme celui développé par J. CHEN *et al.* (2011) qui reproduit à la fois le mélange des aliments avec le suc gastrique et les forces de compression auxquelles ils sont soumis (Figure 11(a)).

Cependant, ces modèles ne simulent pas certaines fonctions très importantes de la digestion gastrique comme l'acidification progressive du contenu stomacal ou la vidange de l'estomac. Pour pallier ces limites, des modèles gastriques dynamiques intégrant ces paramètres ont été mis au point. Le plus

simple est celui développé par HOEBLER *et al.* (2002), qui permet le contrôle de la température et du pH et reproduit l'ajout de pepsine et la vidange gastrique. Un autre modèle plus complexe, le DGM (Dynamic Gastric Model) mimant les deux régions fonctionnelles de l'estomac a été décrit par MERCURI *et al.* (2011) : (i) la partie supérieure modélise l'arrivée des sécrétions gastriques et leur mélange aux aliments et (ii) la partie inférieure simule les forces de cisaillement et de broyage (Figure 11(b)). Malgré la sophistication de ce modèle, les forces mécaniques mises en jeu restent différentes de celles observées *in vivo*. Or, par des modèles mathématiques et leur implémentation informatique (modèles *in silico*), il a été montré que les ondes de contraction antrales avaient un rôle clé dans le mélange gastrique et un rôle indirect dans la vidange gastrique par des modifications locales de la pression dans le corps anatomique (PAL *et al.*, 2004). Ces forces mécaniques sont prises en compte dans le modèle de F. KONG et SINGH (2010), le HGS (Human Gastric Simulator) qui reproduit le plus fidèlement possible les mouvements péristaltiques de l'estomac, en respectant leur amplitude, leur intensité et leur fréquence (Figure 11(c)). Récemment, un nouveau modèle a été développé : le TIM-agc (TIM-advanced gastric compartment) simulant les profils de pression observés *in vivo* au cours du transit gastrique. Ce dernier est composé de trois parties qui peuvent être contractées de façon indépendante. La partie supérieure mime le corps de l'estomac avec une paroi souple qui se contracte progressivement afin de simuler la réduction du volume lors de la vidange gastrique. L'antrum est divisé en deux parties successives, l'antrum proximale et distale. Les contractions de ces deux sections sont synchronisées pour simuler les vagues antrales. Enfin, une valve est synchronisée avec une onde antrale afin de simuler l'ouverture du sphincter pylorique lors de la vidange gastrique (MINEKUS *et al.*, 2013).

Les modèles gastriques sont des outils de choix pour l'étude des cinétiques de dégradation des aliments dans l'estomac et de la libération de composés d'intérêt. Ils permettent notamment d'étudier l'influence sur ces processus de facteurs physiologiques (*i.e.* le pH, les enzymes et les forces de contraction), de la structure des aliments et des procédés de transformation (BLANQUET-DIOT *et al.*, 2013). Les modèles gastriques permettent également d'étudier l'influence de l'acidité gastrique sur la survie de micro-organismes (BERGHOLZ et WHITTAM, 2007).

Bien que ces systèmes soient particulièrement pertinents pour étudier la digestion gastrique, ils ne fournissent qu'un aperçu partiel de la digestion dans le tractus gastro-intestinal. *In vivo*, l'estomac et l'intestin grêle forment des compartiments séparés dédiés à une fonction spécifique de la digestion. Afin d'étudier avec précision le devenir d'un composé digéré, il est donc particulièrement important de simuler chaque étape de la digestion et les temps de transit associés. En réponse, les systèmes dynamiques multi-compartimentés ont été développés.

1.2.1.2 Modèles gastro-intestinaux multi-compartmentés

De nombreux systèmes gastro-intestinaux simulant l'estomac et/ou l'intestin grêle sont disponibles. Les plus simples sont des modèles mono-compartmentés et statiques reproduisant, dans un unique récipient, une phase gastrique (pepsine, pH 1-2) éventuellement précédée d'une étape de digestion buccale (salive, pH 6,5) et suivie d'une phase pancréatique (enzymes pancréatiques, en présence ou non de bile, pH 6-7). Parmi ces systèmes, les plus connus sont ceux d'ENGLYST *et al.* (1996), de GARRETT *et al.* (1999) et d'OOMEN *et al.* (2003), qui ont été utilisés pour évaluer, respectivement, la digestibilité de l'amidon, la bioaccessibilité des caroténoïdes et celle de polluants. Ces systèmes sont particulièrement bien adaptés pour des approches préliminaires de pré-screening. Cependant, ces modèles mono-compartmentés sont loin de reproduire la complexité des processus de digestion *in vivo* puisqu'ils ne simulent pas la succession des compartiments digestifs observée chez l'Homme, les temps de transit associés et les fonctions propres à chacun de ces compartiments (*i.e.* le brassage, la dégradation des macromolécules et l'absorption des nutriments). Pour pallier ces limites, des systèmes bi- et multi-compartmentés dynamiques ont été développés (BLANQUET-DIOT *et al.*, 2013; GUERRA *et al.*, 2012). Parmi les modèles bi-compartmentés, on peut citer ceux décrits par YVON *et al.* (1992), VATIER *et al.* (1994) et MAINVILLE *et al.* (2005) simulant, en fonction des données *in vivo*, l'estomac et l'intestin grêle proximal humain. Récemment, MÉNARD *et al.* (2014) ont également développé un système bi-compartmenté permettant de reproduire la digestion du lait chez l'enfant. Les systèmes gastro-intestinaux alliant multi-compartmentation et dynamisme sont rares. À ce jour, seuls le TIM 1 (TNO Gastrointestinal Model 1; MINEKUS *et al.*, 1995) et le SHIME® (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem; MOLLY *et al.*, 1994, 1993) répondent à ce critère et ont été validés par des corrélations *in vitro/in vivo*.

1.2.1.2.1 TNO Gastrointestinal Model 1 : TIM 1

Le système digestif artificiel TIM 1 (MINEKUS *et al.*, 1995), développé par le TNO Nutrition and Food Research Institute (Zeist, Pays-Bas), a été optimisé et validé en collaboration avec l'EA-CIDAM. Il comprend l'ensemble des compartiments du tractus digestif supérieur, à savoir l'estomac et les trois parties de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et reproduit de la façon la plus physiologique possible les conditions rencontrées dans la lumière gastrique et intestinale (Figure 12). Ainsi, il permet de simuler, en fonction des données *in vivo*, les paramètres essentiels de la digestion chez l'homme, *i.e.* la température, l'évolution du pH gastrique et intestinal, le brassage du chyme, l'arrivée séquentielle des enzymes digestives, les vidanges gastriques et iléales, le temps de transit gastro-intestinal et l'absorption passive de l'eau et des produits de digestion.

Le TIM 1 est constitué de quatre compartiments en verre contenant des parois internes flexibles reproduisant l'estomac et les trois parties de l'intestin grêle. La température est maintenue à 37°C par

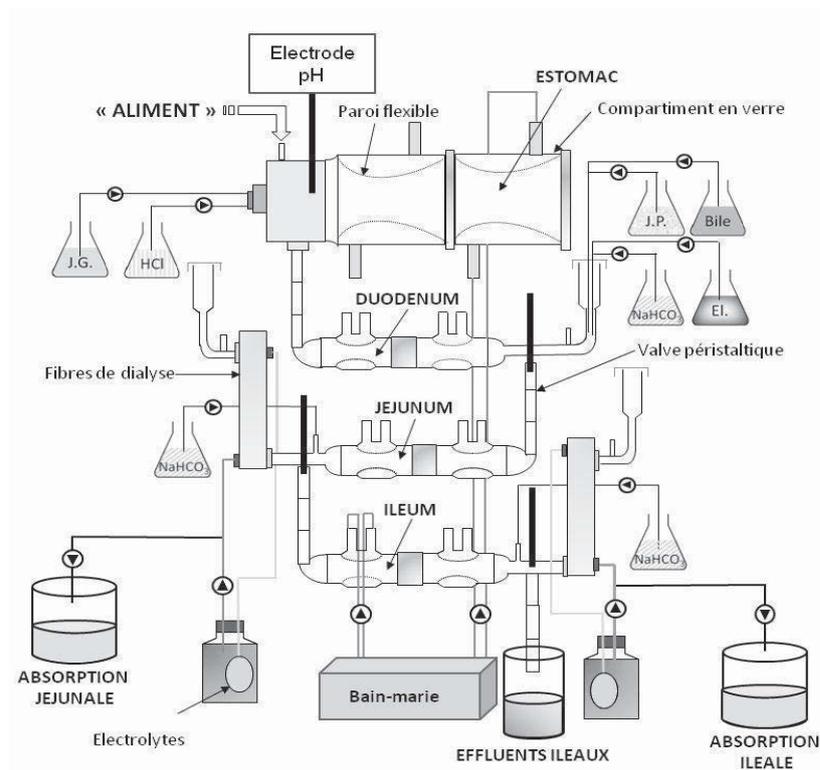


FIGURE 12. Représentation schématique du système digestif artificiel TIM 1

Le système TIM 1 (TNO Gastrointestinal Model 1) est constitué de quatre compartiments simulant l'estomac et les trois parties de l'intestin grêle (D'après BLANQUET-DIOT *et al.*, 2013).

El : électrolytes, HCl : acide chlorhydrique, J.G. : jus gastrique, J.P. : jus pancréatique, NaHCO_3 : bicarbonate de sodium

passage d'eau thermostatée entre les parois en verre et les membranes internes flexibles. Le brassage du chyme est reproduit par compression des parois flexibles grâce à un système d'eau sous pression. Les différents compartiments sont reliés entre eux par des valves péristaltiques, lesquelles sont composées de trois tubes en « T » possédant chacun une membrane flexible interne. L'ouverture et la fermeture de ces valves sont pilotées informatiquement, permettant le passage d'une partie du chyme d'un compartiment à un autre, de façon à suivre une courbe de transit définie. Les vidanges gastrique et iléale sont modélisées par l'équation A (ELASHOFF *et al.*, 1982) :

$$f = 1 - 2^{-\left(\frac{t}{t_{1/2}}\right)^\beta} \quad (\text{A})$$

où f représente la fraction de repas délivrée, t le temps de vidange, $t_{1/2}$ le temps de demi-vidange et β un coefficient décrivant l'allure de la courbe.

Le volume des différents compartiments est contrôlé en continu par des capteurs de niveau. Parallèlement, un système de dialyse (seuil de coupure de 10 kDa) simule l'absorption passive de l'eau et des produits de digestion dans les compartiments jéjunal et iléal. Les quatre compartiments sont équipés d'électrodes à pH permettant de vérifier le pH du chyme et, si besoin, d'activer différentes pompes afin de délivrer de l'HCl dans le compartiment stomacal et du NaHCO₃ dans les compartiments simulant l'intestin grêle.

Les solutions d'enzymes digestives et d'acides biliaires sécrétés *in vivo* sont intégrées dans le système TIM 1 au cours de la digestion. Ainsi, des solutions de (i) lipase et pepsine et (ii) pancréatine et bile sont respectivement apportées dans les compartiments stomacal et duodéal. De plus, des résidus gastrique, duodéal, jéjunal et iléal sont introduits dans le TIM 1 en début de digestion, afin de reproduire les conditions du jeûne. Le résidu duodéal contient de la trypsine qui activera les enzymes pancréatiques apportées au niveau duodéal.

L'ensemble des paramètres du système TIM 1 peuvent être contrôlés et ajustés. Il est alors possible de simuler aussi bien la digestion de l'Homme (nourrisson, adulte, personne âgée) que celle d'animaux monogastriques, et ce dans des conditions physiologiques ou pathologiques (hypo- ou hyper-acidité gastrique, insuffisance pancréatique). Le système TIM 1 a notamment été utilisé dans le cadre d'études nutritionnelles, pharmacologiques et microbiologiques. Une liste des publications dans lesquelles le système TIM 1 a été utilisé depuis 2009 est présentée dans le Tableau 2.

TABLEAU 2. Études microbiologiques, nutritionnelles, pharmacologiques et toxicologiques utilisant le modèle *in vitro* TIM 1

	Objectifs de l'étude	Références
Microbiologie		
Micro-organismes probiotiques		
Bactériens	Influence de la matrice alimentaire sur la survie de probiotique	ARROYO-LÓPEZ <i>et al.</i> , 2014 ; JEDIDI <i>et al.</i> , 2014 ; KHALF <i>et al.</i> , 2010 ; MARTINEZ <i>et al.</i> , 2011
	Sélection de souches probiotiques d'origine fécale en fonction de leur survie	MÄKIVUOKKO <i>et al.</i> , 2012
	Activité métabolique de souches probiotiques	FERNANDEZ <i>et al.</i> , 2014 ; KHEADR <i>et al.</i> , 2010 ; A. J. MAATHUIS <i>et al.</i> , 2010
	Survie et taux de germination de <i>Bacillus subtilis</i>	HATANAKA <i>et al.</i> , 2012
Levuriens	Influence de la formulation sur la survie de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BLANQUET-DIOT <i>et al.</i> , 2012
Micro-organismes pathogènes		
<i>Escherichia coli</i> entérotoxigène	Influence de la digestion de tempe et de tofu sur leur propriété anti-adhésive contre des pathogènes	MO <i>et al.</i> , 2012
<i>Escherichia coli</i> entérohémorragique	Survie d' <i>E. coli</i> O157:H7 et influence d'un probiotique	ÉTIENNE-MESMIN <i>et al.</i> , 2011b
	Influence de la matrice alimentaire sur la survie de souche STEC/EHEC	ARROYO-LÓPEZ <i>et al.</i> , 2014 ; MISZCZYCHA <i>et al.</i> , 2014
Nutrition		
Digestibilité de macro-nutriments		
Glucides	Influence du sécrétome de <i>Penicillium funiculosum</i> sur la digestibilité des glucides du blé	LAFOND <i>et al.</i> , 2011
	Micro-structure et hydrolyse de l'amidon dans des boissons fermentées à base d'orge et d'avoine	ALMINGER <i>et al.</i> , 2012

TABLEAU 2. Études microbiologiques, nutritionnelles, pharmacologiques et toxicologiques utilisant le modèle *in vitro* TIM 1 - suite

Objectifs de l'étude	Références
Lipides	<p>Bioaccessibilité des acides gras issus de produits laitiers et de poissons DOMOTO <i>et al.</i>, 2013; GERVAIS <i>et al.</i>, 2009; MAESTRE <i>et al.</i>, 2013</p> <p>Digestibilité des lipides issus d'émulsions stabilisées par des isolats protéiques de lactosérum HELBIG <i>et al.</i>, 2013</p>
Protéines	<p>Digestibilité des protéines du lait HAVENAAR <i>et al.</i>, 2013b; NABIL <i>et al.</i>, 2011</p>
Bioaccessibilité de minéraux, vitamines ou phytoconstituants	
Minéraux	<p>Libération du sel contenu dans des fromages de type pâte pressée non cuite LVOVA <i>et al.</i>, 2012</p>
Vitamines	<p>Influence du procédé de transformation sur la bioaccessibilité de vitamines DÉAT <i>et al.</i>, 2009; MO <i>et al.</i>, 2013; ÖHRVIK <i>et al.</i>, 2010</p>
Caroténoïdes	<p>Influence de la matrice alimentaire sur la bioaccessibilité du β-carotène et de lycopène BLANQUET-DIOT <i>et al.</i>, 2009; DÉAT <i>et al.</i>, 2009; RICHELLE <i>et al.</i>, 2010; VAN LOO-BOUWMAN <i>et al.</i>, 2014</p>
Composés phénoliques	<p>Influence de la matrice céréalière et du procédé de transformation sur la bioaccessibilité de composés phénoliques ANSON <i>et al.</i>, 2009a,b; HEMERY <i>et al.</i>, 2010</p> <p>Capacité anti-oxydante et anti-inflammatoire de composés phénoliques bioaccessibles issus des différentes fractions du grain de blé ANSON <i>et al.</i>, 2010</p> <p>Influence de la matrice alimentaire sur la bioaccessibilité d'anthocyanes de myrtille LILA <i>et al.</i>, 2011; RIBNICKY <i>et al.</i>, 2014</p>

TABLEAU 2. Études microbiologiques, nutritionnelles, pharmacologiques et toxicologiques utilisant le modèle *in vitro* TIM 1 - suite

Objectifs de l'étude	Références
Hydrolyse de composés phénoliques par des estérases et un probiotique	BEL-RHLID <i>et al.</i> , 2009, 2012
Pharmacologie	
Évaluation de formulations pour l'encapsulation de composés nutraceutiques	L. CHEN <i>et al.</i> , 2010 ; HÉBRARD <i>et al.</i> , 2009
Influence de la formulation sur la survie de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BLANQUET-DIOT <i>et al.</i> , 2012
Absorption de substances actives	DICKINSON <i>et al.</i> , 2012 ; HAVE-NAAR <i>et al.</i> , 2013a
Interactions aliments/médicaments	BROUWERS <i>et al.</i> , 2011
Toxicologie	
Bioaccessibilité des métaux lourds	TORRES-ESCRIBANO <i>et al.</i> , 2011
Bioaccessibilité et transformation d'éther glycidyle d'origine alimentaire	FRANK <i>et al.</i> , 2013
Formation de N-nitrosodiméthylamine issus de la consommation de poissons et de végétaux riches en nitrate	ZEILMAKER <i>et al.</i> , 2010

1.2.1.2.2 Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem : SHIME®

Le système SHIME® développé à l'origine par MOLLY *et al.* (1993) de l'Université de Ghent (Gand, Belgique) est le seul modèle gastro-intestinal dynamique « complet ». Il est composé de cinq bioréacteurs qui simulent de façon séquentielle l'estomac, l'intestin grêle et les trois régions du côlon (*i.e.* côlon ascendant, transverse et descendant). Un filtre de dialyse est utilisé pour mimer le processus d'absorption qui se produit dans l'intestin grêle, mais aucune absorption n'est simulée dans les compartiments coliques (VERMEIREN *et al.*, 2011). Les bioréacteurs sont caractérisés par leur pH, leur volume réactionnel et leur temps de résidence. Les sécrétions gastriques et duodénales sont apportées dans les compartiments appropriés. Ainsi, il permet de simuler, en fonction des données *in vivo*, la température, le pH gastrique et intestinal, les sécrétions d'enzymes digestives (pancréatine, bile), le temps de transit et les communautés microbiennes associées aux différentes régions du côlon humain (Figure 13). Alors que le système TIM 1 apparaît comme le simulateur le plus approprié pour mimer le tractus digestif supérieur, le système SHIME® s'avère particulièrement pertinent pour étudier le devenir métabolique de composés alimentaires et de produits pharmaceutiques sur plusieurs semaines et leur interaction avec le microbiote intestinal. Ses applications seront donc décrites dans le paragraphe 1.2.1.3 et le Tableau 6, mais le modèle ne sera pas détaillé à nouveau dans cette partie.

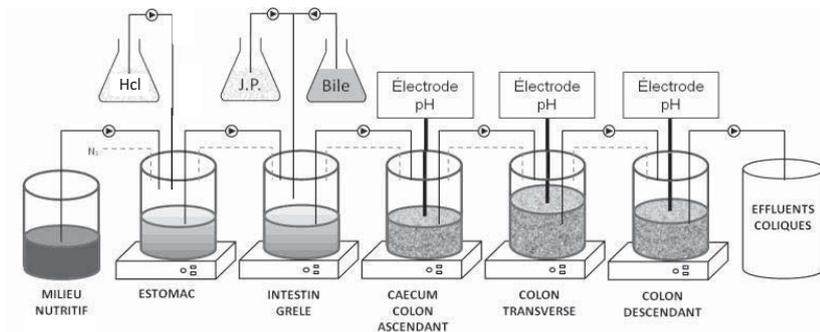


FIGURE 13. Représentation schématique du système SHIME®

Le système SHIME® (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem) est composé de cinq bioréacteurs qui simulent de façon séquentielle l'estomac, l'intestin grêle et les trois régions du côlon (Modifié d'après VERMEIREN *et al.*, 2011).

HCl : acide chlorhydrique, J.P. : jus pancréatique

1.2.1.3 Modèles utilisés pour l'étude de l'écosystème colique

Le microbiote colique est un écosystème complexe difficile à étudier pour des raisons évidentes d'accessibilité et d'éthique. Pour contourner ces difficultés, des modèles animaux et *in vitro* ont été développés afin d'acquérir de nouvelles connaissances sur cet écosystème.

1.2.1.3.1 Modèle *in vivo*

Les modèles animaux conventionnels les plus fréquemment utilisés sont la souris, le rat, le lapin et le porc. Ils permettent d'effectuer différentes études sur le microbiote et la muqueuse intestinale. Cependant, en raison de différences entre la composition du microbiote intestinal humain et animal, des modèles animaux gnotobiotiques ont été développés.

Les animaux gnotobiotiques sont des animaux axéniques, microbiologiquement stériles, inoculés expérimentalement. Les animaux inoculés avec des souches bactériennes spécifiques rendent possible l'étude des interactions hôte/bactéries et des interactions bactéries/bactéries. Quant aux animaux inoculés par une flore complexe issue de matière fécale, ces modèles permettent de maintenir un microbiote donné dans un environnement *in vivo* proche des conditions retrouvées dans le côlon humain. Cependant, l'utilisation de modèles gnotobiotiques présente des limites physiologiques (*i.e.* les conditions physico-chimiques rencontrées dans ces modèles diffèrent de celles de l'Homme) et logistiques (*i.e.* coût élevé, équipement, personnels qualifiés). Pour offrir une alternative aux expérimentations animales, des modèles *in vitro* ont été développés.

1.2.1.3.2 Modèle *in vitro* de l'environnement colique

De nombreux modèles de fermentation *in vitro* ont été développés afin de reproduire l'environnement colique humain : des modèles « batch » aux modèles mono- ou multi-étagés semi-continu et continu. Il n'existe pas de consensus dans la préparation de l'inoculum fécal, ce dernier pouvant être issu de selles (fraîches ou congelées) d'un seul donneur ou d'un mélange de selles de plusieurs donneurs (PAYNE *et al.*, 2012b). Récemment, il a été montré que les profils bactériens et l'activité fermentaire obtenus en utilisant un mélange de selles de plusieurs donneurs sont comparables à ceux observés avec les selles des donneurs pris indépendamment (AGUIRRE *et al.*, 2014). L'anaérobiose est maintenue au sein des réacteurs soit par un flux d'azote ou de dioxyde de carbone, soit uniquement par la production des gaz issus de l'activité fermentaire du microbiote. L'absorption passive de l'eau et des métabolites fermentaires est reproduite dans certains systèmes pour empêcher l'accumulation de ces derniers et limiter l'inhibition de l'activité bactérienne (VENEMA et VAN DEN ABEELE, 2013). Afin de mieux appréhender par la suite les avantages et les limites des différents modèles *in vitro* utilisés pour l'étude de l'écosystème microbien colique, leurs particularités seront détaillées.

1.2.1.3.2.1 Systèmes de fermentation en « batch »

Les cultures en « batch » sont des modèles statiques. Ces modèles sont généralement des systèmes fermés (*i.e.* bouteilles ou réacteurs scellés) contenant des cultures bactériennes ou suspensions de matières

fécales maintenues sous conditions anaérobies (VENEMA et VAN DEN ABBEELE, 2013). Ils permettent de décrire la croissance de cultures bactériennes pures ou en mélange dans un milieu sélectionné sans ajout secondaire de substances nutritives (PAYNE *et al.*, 2012b). Les systèmes de fermentation en « batch » sont bien adaptés pour (i) réaliser un pré-screening de souches potentiellement probiotiques, (ii) déterminer à moindre coût l'impact des prébiotiques et des xénobiotiques sur le microbiote intestinal. Ils permettent l'étude des profils en AGCC découlant du métabolisme actif de substrats par le microbiote colique (B.-S. KIM *et al.*, 2011 ; PAYNE *et al.*, 2012b). Cependant, le processus fermentaire entraîne des changements continus de pH et de potentiel redox et l'accumulation de produits toxiques. De plus, la croissance microbienne dans ces systèmes dépend de la densité d'ensemencement et de la vitesse de consommation du substrat. De tels modèles ne peuvent donc être utilisés que pendant de courtes périodes (24 - 48 h). Pour pallier ces limites, dans le cadre d'expérimentations plus longues, des systèmes de fermentation en semi-continu et continu ont été développés.

1.2.1.3.2.2 Systèmes de fermentation en semi-continu ou continu

L'étude du microbiote colique sur des temps plus longs nécessite de créer un état d'équilibre *in vitro*. Les systèmes de fermentation en continu et semi-continu sont des systèmes renouvelés permettant une culture stable d'un microbiote intestinal pendant une période de temps définie et spécifique au modèle, mais pouvant aller jusqu'à plusieurs mois. Ils sont alimentés par un flux (continu ou discontinu) de milieu nutritif et parallèlement une quantité équivalente de milieu fermentaire est éliminée du système. Ainsi, le milieu fermentaire ne se trouve jamais épuisé en substrats et les produits de fermentations ne s'accumulent pas dans le système. Les solutions nutritives utilisées dans la plupart des études sont des adaptations de celle proposée par G. T. MACFARLANE *et al.* (1998) simulant les conditions nutritionnelles du chyme iléal arrivant au côlon. Les modèles de fermentation en chemostat qui sont décrits dans la littérature possèdent différents niveaux de complexité allant du modèle à un fermenteur au modèle à quatre bioréacteurs en série. Le taux de dilution (équation B) est un paramètre important afin de mimer le temps de transit colique. Le pH, la température, la pression, l'agitation et l'anaérobiose sont également contrôlés et maintenus constants. Parallèlement, le potentiel d'oxydo-réduction peut être suivi.

$$D = Q/V \quad (B)$$

où D est le taux de dilution (min^{-1}), Q le débit d'entrée ou de sortie (mL/min) et V le volume constant du bioréacteur (mL).

La majorité des systèmes de fermentation en semi-continu utilisés pour modéliser l'environnement colique humain sont adaptés du système décrit par MILLER et WOLIN (1981). L'un de ces modèles a été développé au sein de l'EA-CIDAM : ARCOL (pour ARtificial COLon) et a été retenu comme modèle

d'étude dans le cadre de cette thèse. Le principe de ce modèle repose sur la culture d'un microbiote fécal, dans un système mono-étagé parfaitement agité. Il est destiné à simuler le côlon dans son ensemble à partir d'un inoculum fécal frais d'un unique donneur. Le pH, la température et le temps de transit sont contrôlés, et la pression et le potentiel d'oxydo-réduction sont mesurés. L'anaérobiose est maintenue au sein du réacteur uniquement par la production des gaz issus de l'activité fermentaire du microbiote. Ce système possède également une fibre de dialyse, immergée dans le milieu fermentaire, permettant de reproduire l'absorption passive de l'eau et des produits de fermentation (Figure 14). Le système ARCOL a été développé et validé pour des applications chez l'animal (GÉRARD-CHAMPOD *et al.*, 2010) et chez l'Homme (BLANQUET-DIOT *et al.*, 2012).

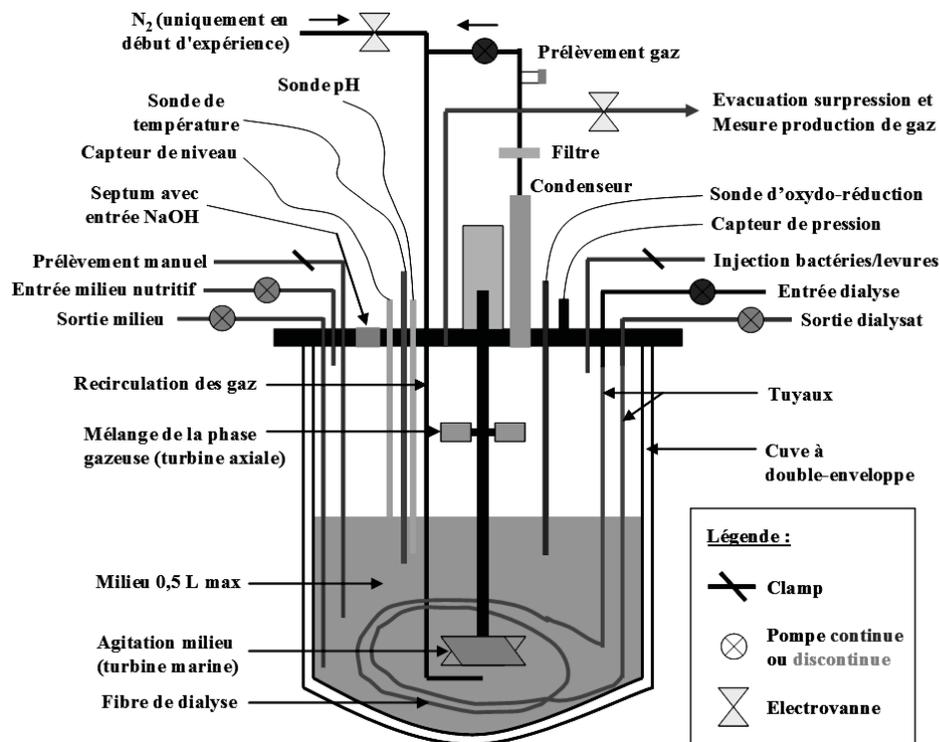


FIGURE 14. Représentation schématique du système ARCOL

Le système ARCOL (ARTificial COLon) est un système de fermentation semi-continu mono-étagé permettant de simuler le côlon dans son ensemble. Il reproduit l'absorption de l'eau et des métabolites fermentaires par une fibre de dialyse immergée dans le milieu fermentaire et le maintien de l'anaérobiose résulte uniquement de l'activité du microbiote.

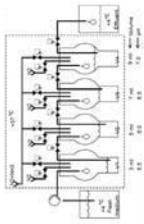
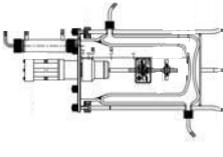
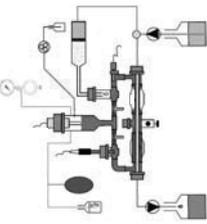
Le développement d'un modèle de fermentation continu multi-étagé par GIBSON *et al.* (1988) a permis de simuler les conditions physico-chimiques et la disponibilité en substrats présents dans les différentes régions du côlon humain, *i.e.* les régions ascendante, transverse, descendante. Par la suite, ce système a été validé pour les études du métabolisme du microbiote colique humain (G. T. MACFARLANE *et al.*, 1998). Parallèlement, d'autres équipes ont conçu leur modèle. Parmi les systèmes développés, les plus populaires sont : le SHIME[®] (détaillé dans le paragraphe 1.2.1.2.2, MOLLY *et al.*, 1993), le modèle « Lacroix » (CINQUIN *et al.*, 2004), l'EnteroMix[®] (MAKIVUOKKO *et al.*, 2005) et le TIM 2 (MINEKUS *et al.*, 1999).

Le modèle « Lacroix » conçu à l'Eidgenössische Technische Hochschule (Zurich, Suisse) a la particularité d'utiliser un microbiote immobilisé, essentiellement issu de selles d'enfants, sur des billes de gommages gellane et xanthane. L'EnteroMix[®] développé par Danisco (Kantvik, Finlande) est composé de quatre bioréacteurs mimant respectivement les régions ascendante, transverse, descendante et sigmoïde. Enfin, l'EA-CIDAM a récemment validé un système tri-étagé : l'ECSIM pour Environmental Control System for Intestinal Microbiota (FERIA-GERVASIO *et al.*, 2014). Ce modèle est basé sur celui de G. T. MACFARLANE *et al.* (1998) mais son anaérobiose est maintenue au sein du réacteur uniquement par la production des gaz issus de l'activité fermentaire du microbiote. Parallèlement au développement de modèles en bioréacteurs, MINEKUS *et al.* (1999) ont conçu un modèle simulant l'environnement colique sur le même modèle que le système digestif artificiel TIM 1. Le TIM 2 pour TNO Gastrointestinal Model 2 (Zeist, Pays-Bas) a la particularité de mimer les mouvements péristaltiques et l'absorption passive de l'eau et des produits de fermentation via une fibre de dialyse.

Les caractéristiques des principaux modèles de fermentation semi-continus et continus sont détaillées respectivement dans les tableaux 3 et 4. Chacun de ces systèmes présente des caractéristiques particulières, mais les critères de conception (*i.e.* le nombre de bioréacteurs, le mode d'administration du milieu nutritif et l'inclusion d'un microbiote immobilisé et de mucus) n'ont pas d'effet mesurable sur les performances des modèles par rapport à la modélisation de la composition de la biomasse théorique (MOORTHY et EBERL, 2014).

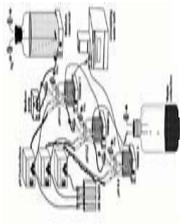
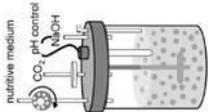
L'ensemble des paramètres de ces systèmes peuvent être contrôlés et ajustés. Il est alors possible de simuler aussi bien l'environnement colique de l'Homme (enfant, adulte, personne âgée) que celle d'animaux (porc, veau pré-ruminant). Ces modèles de fermentation sont utilisés dans le cadre d'études nutritionnelles, pharmacologiques, toxicologiques et microbiologiques. Ils permettent d'étudier sur plusieurs semaines le devenir métabolique de composés alimentaires, pharmaceutiques ou de xénobiotiques, la survie de micro-organismes et leur interaction avec le microbiote intestinal. Les publications dans lesquelles sont utilisés des modèles coliques semi-continus et continus depuis 2009 sont présentées respectivement dans les Tableaux 5 et 6.

TABLEAU 3. Les principaux modèles *in vitro* coliques en mode semi-continu et leurs caractéristiques

Systèmes fermentaires en mode semi-continu						
Caractéristiques						
Nombre de compartiments	Agitation	Anaérobie	Inoculum	Dialyse		
EnteroMix® (MAKIVUOKKO <i>et al.</i>, 2005)						
4 bioréacteurs	Non communiqué	Flux de N ₂	Selle fraîche d'un unique donneur	Non		
						
ARCOL (BLANQUET-DIOT <i>et al.</i>, 2012; GÉRARD-CHAMPOD <i>et al.</i>, 2010)						
1 bioréacteur	Module d'agitation avec doubles hélices pour brassage de l'atmosphère et du milieu fermentaire	Activité fermentaire microbiote	Selle fraîche d'un unique donneur	Oui		
						
TIM 2 (MINEKUS <i>et al.</i>, 1999)						
1 à 3 compartiments	Brassage par jeu de pression sur une paroi flexible	Flux de N ₂	Mélange de selles fraîches	Oui		
						

Les paramètres permettant de différencier les systèmes sont présentés dans l'onglet « Caractéristiques ». Ne sont pas notés les paramètres communs à tous les systèmes (*i.e.* le contrôle de la température, du pH et du temps de transit).
 ARCOL : ARtificial COLon, N₂ : azote, TIM 2 : TNO Gastrointestinal Model 2

TABLEAU 4. Les principaux modèles *in vitro* coliques en mode continu et leurs caractéristiques

Systèmes fermentaires en mode continu					
Caractéristiques					
	Nombre de compartiments	Agitation	Anaérobie	Inoculum	Dialyse
<p>SHIME® (MOLLY <i>et al.</i>, 1993)</p> 	5 bioréacteurs	Barreau magnétique	Flux de N ₂	Selle fraîche d'un unique donneur	Non
<p>Macfarlane et Gibson (G. T. MACFARLANE <i>et al.</i>, 1998)</p> 	3 bioréacteurs	Barreau magnétique	Flux de CO ₂	Mélange de selles fraîches	Non
<p>Lacroix (CINQUIN <i>et al.</i>, 2004)</p> 	1 à 3 bioréacteurs	Barreau magnétique	Flux de CO ₂	Selles immobilisées (essentiellement d'enfants sur billes de gommex gellane et xanthane)	Non

Les paramètres permettant de différencier les systèmes sont présentés dans l'onglet « Caractéristiques ». Ne sont pas notés les paramètres communs à tous les systèmes (*i.e.* le contrôle de la température, du pH et du temps de transit).

CO₂ : dioxyde de carbone, N₂ : azote, SHIME : Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem

TABLEAU 5. Les principaux modèles *in vitro* coliques semi-continu et leurs applications

	Objectifs de l'étude	Référence
EnteroMix® (MAKIVUOKKO <i>et al.</i> , 2005)		
Nutrition		
Humaine		
Prébiotiques	Influence des xylo-oligosaccharides sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	MÄKELÄINEN <i>et al.</i> , 2010
	Évaluation de la capacité à induire l'apoptose de cellules coliques cancéreuses par des métabolites fermentaires de poly-dextrose	PUTAALA <i>et al.</i> , 2011
Microbiologie		
Micro-organismes probiotiques		
Bactériens	Influence de la matrice alimentaire sur la survie de Lactobacilles et sur l'effet du probiotique sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	MÄKELÄINEN <i>et al.</i> , 2009 ; MÄKI-VUOKKO <i>et al.</i> , 2010
Symbiotiques	Effet de symbiotiques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	VAN ZANTEN <i>et al.</i> , 2012
ARCOL (BLANQUET-DIOT <i>et al.</i> , 2012 ; GÉRARD-CHAMPOD <i>et al.</i> , 2010)		
Nutrition		
Animale		
Additif alimentaire	Validation du modèle pour l'étude d'additifs alimentaires sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	GÉRARD-CHAMPOD <i>et al.</i> , 2010

TABLEAU 5. Les principaux modèles *in vitro* coliques semi-continu et leurs applications (suite)

	Objectifs de l'étude	Référence
Microbiologie		
Micro-organismes probiotiques		
Levuriens	Influence du mode et de la fréquence d'administration sur la survie de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BLANQUET-DIOT <i>et al.</i> , 2012
Micro-organismes pathogènes		
<i>Escherichia coli</i> entéro-hémorragique	Survie d' <i>E. coli</i> O157:H7 et influence de souches probiotiques	THÉVENOT <i>et al.</i> , 2013
TIM 2 (MINEKUS <i>et al.</i>, 1999)		
Nutrition		
Humaine		
Prébiotique	Effet de prébiotiques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	A. J. MAATHUIS <i>et al.</i> , 2012 ; VAN DEN ABEELE <i>et al.</i> , 2013
Composés phénoliques	Métabolisme de composés phénoliques non-bioaccessibles	ANSON <i>et al.</i> , 2009a
Glycosides	Bioconversion des ginsenosides par le microbiote intestinal humain	H. KONG <i>et al.</i> , 2009
Fibres	Effet des fibres alimentaires sur la composition du microbiote intestinal et la production d'AGCC	ANSON <i>et al.</i> , 2011 ; A. MAATHUIS <i>et al.</i> , 2009 ; TABERNERO <i>et al.</i> , 2011
Microbiologie		
Micro-organismes probiotiques		
Bactériens	Effet de probiotiques associés à la claudamycine sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	REHMAN <i>et al.</i> , 2012
Symbiotiques	Effet de symbiotiques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	MARTINEZ <i>et al.</i> , 2013

TABLEAU 5. Les principaux modèles *in vitro* coliques semi-continu et leurs applications (suite)

	Objectifs de l'étude	Référence
Métabolisme		
	Étude de la diversité du microbiote intestinal humain	RAJLIĆ-STOJANOVIĆ <i>et al.</i> , 2010
	Identification des bactéries fermentant l'amidon dans l'environnement colique humain	KOVATCHEVA-DATCHARY <i>et al.</i> , 2009
	Effet des glucides sur la production d'AGCC	DE GRAAF <i>et al.</i> , 2010
Santé		
	Syndrome du côlon irritable	Effet de micro-sphères d'amidon sur le microbiote intestinal de patients atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin
		ROSE <i>et al.</i> , 2010

AGCC : acides gras à chaîne courte, ARCOL : Artificial COLon, TIM 2 : TNO Gastrointestinal Model 2

TABEAU 6. Les principaux modèles *in vitro* coliques continus et leurs applications

SHIME® (MOLLY <i>et al.</i> , 1993)	
Microbiologie	
Micro-organismes probiotiques	
Bactériens	Influence de <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 sur la composition du microbiote intestinal et la production d'AGCC SIVIERI <i>et al.</i> , 2011
	Influence de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL 1014 sur la composition du microbiote intestinal et la production d'AGCC SIVIERI <i>et al.</i> , 2013
	Influence de la matrice alimentaire sur la libération de probiotiques micro-encapsulés POSSEMIERS <i>et al.</i> , 2010
Levuriens	Effet d'un dérivé de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sur la composition du microbiote intestinal POSSEMIERS <i>et al.</i> , 2013
Micro-organismes pathogènes	
<i>Bacillus cereus</i>	Survie de <i>Bacillus cereus</i> , capacité à sporuler et à produire des toxines dans l'environnement gastro-intestinal et influence sur la composition du microbiote intestinal CEUPPENS <i>et al.</i> , 2010, 2012a,b,c
Colonisation et composition du microbiote	
	Étude du processus de colonisation du système par une microflore stable VAN DEN ABEELE <i>et al.</i> , 2010
	Étude du processus de colonisation du mucus par les lactobacilles VAN DEN ABEELE <i>et al.</i> , 2012b
	Étude de la composition du microbiote muco-sal et son rôle dans la production du butyrate VAN DEN ABEELE <i>et al.</i> , 2012a, 2009
	Influence du temps de transit sur le microbiote intestinal RODES <i>et al.</i> , 2011
Activité métabolique du microbiote	
	Étude des interactions entre les bactéries productrices d'équol, les méthano-gènes et les bactéries sulfato-réductrices BOLCA et VERSTRAETE, 2010
	Effet des glucides sur le métabolisme du glycérol DE WEIRDY <i>et al.</i> , 2010
	Mise en évidence de la voie métabolique impliquée dans la formation d'oxyde nitrique par le microbiote VERMEIREN <i>et al.</i> , 2009
	Effet de composés alimentaires sur la production d'oxyde nitrique par le microbiote VERMEIREN <i>et al.</i> , 2012a

TABLEAU 6. Les principaux modèles *in vitro* coliques continus et leurs applications (suite)

Objectifs de l'étude		Référence
Nutrition		
Humaine		
Prébiotiques	Effet de prébiotiques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	GROOTAERT <i>et al.</i> , 2009 ; MARZORATI <i>et al.</i> , 2013a, 2010 ; POLLET <i>et al.</i> , 2012 ; SANCHEZ <i>et al.</i> , 2009 ; TERPEND <i>et al.</i> , 2013 ; VAN DEN ABBEELE <i>et al.</i> , 2013
Polyphénols	Dégradation de polyphénols par le microbiote et production d'AGCC Impact de <i>Lactobacillus plantarum</i> sur la bioaccessibilité de polyphénols alimentaires	VAN DORSTEN <i>et al.</i> , 2012 BARROSO <i>et al.</i> , 2014 ; BARROSO <i>et al.</i> , 2013 KEMPERMAN <i>et al.</i> , 2013
Acides gras	Effet de l'acide linoléique sur la prévalence et la survie de <i>Lactobacillus reuteri</i> dans le mucus	DE WEIRDT <i>et al.</i> , 2013
Pharmacologie		
Galénique	Évaluation de la libération de composés micro-encapsulés	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2011 ; H. CHEN <i>et al.</i> , 2010 ; RODES <i>et al.</i> , 2014
Santé		
Rectocolite hémorragique	Étude de la composition du microbiote intestinal pour comprendre l'éthiologie de la rectocolite hémorragique	VERMEIREN <i>et al.</i> , 2012b ; VIG-SNAES <i>et al.</i> , 2013
	Effet de l'inuline sur la bioactivation d'un agent carcinogène (2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine) par le microbiote	VANHAECKE <i>et al.</i> , 2009
	Activité anti-cancéreuse de fructanes dans l'environnement colique humain	ALLSOPP <i>et al.</i> , 2013

TABLEAU 6. Les principaux modèles *in vitro* coliques continus et leurs applications (suite)

Objectifs de l'étude		Référence
Toxicologie		
Métaux lourds	Bioaccessibilité des métaux lourds dans l'environnement colique humain	LAIRD <i>et al.</i> , 2010, 2009 ; WRAGG <i>et al.</i> , 2011
	Volatilisation des métaux lourds par le microbiote	DIAZ-BONE et T. R. VAN DE WIELE, 2009
	Biotransformation de l'arsenic dans l'environnement colique humain	ALAVA <i>et al.</i> , 2014 ; ALAVA <i>et al.</i> , 2012 ; T. VAN DE WIELE <i>et al.</i> , 2010
HAP	Bioaccessibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques	M. R. CAVE <i>et al.</i> , 2010 ; SICI- LIANO <i>et al.</i> , 2010
Insecticides	Effet des insecticides sur le microbiote	JOLY <i>et al.</i> , 2013
Autres xénobiotiques	Influence de la matrice alimentaire sur la bioaccessibilité des polybromodiphényléthers	YU <i>et al.</i> , 2009
Mycotoxines	Biodégradation des mycotoxines dans l'environnement colique humain et son influence sur le microbiote et la production d'AGCC	OUETHRANI <i>et al.</i> , 2013
Recherche et développement		
	Optimisation d'une méthode de cytométrie en flux pour évaluer la viabilité de bactéries du microbiote	GROOTAERT <i>et al.</i> , 2011
	Simulation de l'environnement mucosal grâce à des microcosmes couverts de mucine	VAN DEN ABEELE <i>et al.</i> , 2012b

TABLEAU 6. Les principaux modèles *in vitro* coliques continus et leurs applications (suite)

Objectifs de l'étude		Référence
Macfarlane et Gibson (G. T. MACFARLANE <i>et al.</i> , 1998)		
Microbiologie		
Micro-organismes probiotiques		
Bactériens	Effet de probiotiques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC et sur la sporulation de <i>Clostridium difficile</i>	HONDA <i>et al.</i> , 2011
	Effet de probiotiques bactériens sur la capacité du microbiote intestinal à adhérer et à réguler la synthèse de cytokines	BAHRAMI <i>et al.</i> , 2011
	Effet anti-bactérien de probiotiques bactériens combinés avec des galactosides	FIGUEROA-GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2010
Levuriens	Effet de probiotiques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	MACCAFERRI <i>et al.</i> , 2012a
Symbiotiques	Effet de symbiotiques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	LIKOTRAFITI <i>et al.</i> , 2014
Micro-organismes pathogènes		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Effet de <i>Staphylococcus aureus</i> sur le microbiote intestinal	SANNASIDDAPPA <i>et al.</i> , 2011
<i>Clostridium difficile</i>	Capacité de <i>Clostridium difficile</i> à coloniser le microbiote intestinal	BAINES <i>et al.</i> , 2013
	Effet des antibiotiques sur la survie de <i>Clostridium difficile</i> , la germination et la production de toxines	BAINES <i>et al.</i> , 2011, 2009b; CHILTON <i>et al.</i> , 2014a,b; CROW- THER <i>et al.</i> , 2013; FREEMAN <i>et al.</i> , 2012; SAXTON <i>et al.</i> , 2009
	Capacité d'un polymère (tolevamer) à neutraliser les cytotoxines de <i>Clostridium difficile</i>	BAINES <i>et al.</i> , 2009a
	Étude de l'effet d'un bactériophage sur <i>Clostridium difficile</i>	MEADER <i>et al.</i> , 2013

TABLEAU 6. Les principaux modèles *in vitro* coliques continus et leurs applications (suite)

Objectifs de l'étude		Référence
Nutrition		
Humaine		
Prébiotiques	Effet de prébiotiques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	HOBDEN <i>et al.</i> , 2013 ; HONGPAT-TARAKERE <i>et al.</i> , 2012 ; MACCAFERRI <i>et al.</i> , 2012b ; NAKASHI-MADA <i>et al.</i> , 2011 ; SARBINI <i>et al.</i> , 2013 ; SHEN <i>et al.</i> , 2012
Composés phénoliques	Effet de composés phénoliques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	FOGLIANO <i>et al.</i> , 2011
Colonisation et composition du microbiote		
	Influence du pH sur le microbiote intestinal	DUNCAN <i>et al.</i> , 2009
Activité métabolique du microbiote		
	Métabolisme du lactate dans l'environnement colique humain	BELENGUER <i>et al.</i> , 2011
Santé		
Maladie de Crohn	Effet de la rifaximine sur le microbiote intestinal de patients atteints de la maladie de Crohn	MACCAFERRI <i>et al.</i> , 2010
Lacroix (CINQUIN <i>et al.</i>, 2004)		
Nutrition		
Humaine		
Prébiotiques	Effet des fructanes sur le microbiote intestinal de l'enfant	LE BLAY <i>et al.</i> , 2010

TABLEAU 6. Les principaux modèles *in vitro* coliques continus et leurs applications (suite)

Objectifs de l'étude		Référence
Minéraux	Effet du fer sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	DOSTAL <i>et al.</i> , 2013
Régimes alimentaires	Influence de l'apport énergétique du régime alimentaire sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	PAYNE <i>et al.</i> , 2012a
Microbiologie		
Micro-organismes probiotiques		
Bactériens	Effet de <i>Bifidobacterium thermophilum</i> RBL67 et d' <i>Escherichia coli</i> L1000 sur la survie de <i>Salmonella typhimurium</i>	ZIHLER <i>et al.</i> , 2010, 2011
	Effet anti-oxydant de Lactobacilli et leur influence sur le microbiote intestinal	SUN <i>et al.</i> , 2010a
Micro-organismes pathogènes		
<i>Salmonella typhimurium</i>	Effet de l'amoxicilline sur la survie de <i>Salmonella typhimurium</i> et influence sur la composition du microbiote intestinal et la production d'AGCC	LE BLAY <i>et al.</i> , 2009
	Effet de <i>Bifidobacterium thermophilum</i> RBL67 et d' <i>Escherichia coli</i> L1000 sur la survie de <i>Salmonella typhimurium</i>	ZIHLER <i>et al.</i> , 2010, 2011
	Effet du fer sur l'adhésion et l'invasion de <i>Salmonella typhimurium</i>	DOSTAL <i>et al.</i> , 2014
<i>Listeria ivanovii</i>	Effet de bactériocines produits par <i>Pediococcus acidilactici</i> UL5 sur <i>Listeria ivanovii</i>	LE BLAY <i>et al.</i> , 2012
Colonisation et composition du microbiote		
	Processus de transfert horizontal de gènes impliqués dans l'antibio-résistance dans l'environnement colique humain	HAUG <i>et al.</i> , 2011
	Effet du pH sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	ZIHLER BERNER <i>et al.</i> , 2013
Recherche et développement		
Animal	Adaptation du modèle pour simuler le côlon proximal du porc	TANNER <i>et al.</i> , 2014

AGCC : acides gras à chaîne courte, HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques, SHIME : Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem

1.2.2 Avantages et limites des systèmes de digestion *in vitro*

Suite à la mise en place dans l'Union Européenne de la règle des 3 R (réduire, raffiner, remplacer) constituant le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale, les pressions du législateur comme celles de l'opinion publique encouragent le développement de méthodes dites « alternatives » (COMBRISSE, 2014).

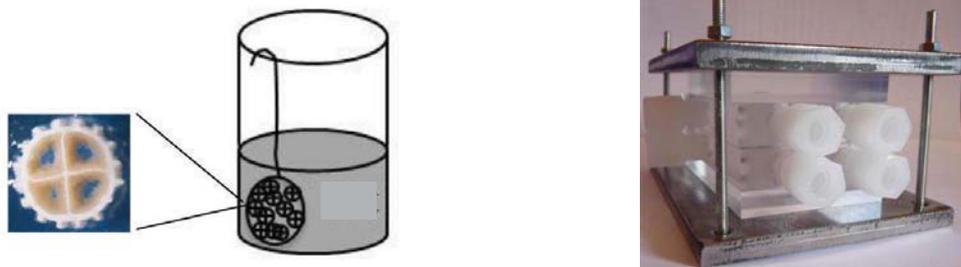
Les outils *in vitro* permettent de réaliser des expériences préliminaires, de contourner ou de compléter des expériences *in vivo*. Ainsi, les modèles de digestion artificielle présentent l'avantage de permettre (i) une reproductibilité des expériences, (ii) la réalisation d'études techniquement ou éthiquement impossibles chez l'Homme (*i.e.* études portant sur des substances toxiques ou des micro-organismes pathogènes), (iii) la conduite d'études de pré-screening lors du développement de nouveaux produits.

Néanmoins, la digestion est un processus extrêmement complexe faisant intervenir plusieurs facteurs impossibles à modéliser dans un modèle *in vitro*. En effet, il n'est pas possible de reproduire *in vitro* les phénomènes immunologiques, le contrôle nerveux et hormonal de la digestion ou encore l'absorption active des produits de digestion. Une des principales limites des systèmes *in vitro* simulant le tractus digestif supérieur humain, à l'exception du SHIME[®], est l'absence de microbiote au sein des compartiments reproduisant l'intestin grêle. Actuellement, des expériences visant à implanter et stabiliser un microbiote iléal dans le système TIM 1 sont en cours de développement (STOLAKI, 2010). De plus, la plupart des systèmes coliques développés reproduisent uniquement l'environnement de la lumière intestinale. En réponse à cette limite, S. MACFARLANE *et al.* (2005) ont introduit, dans les bioréacteurs du système de Macfarlane et Gibson, des tubes en verre contenant un gel de mucine porcine afin de reproduire l'adhésion bactérienne à la couche de mucus de la paroi intestinale. Parallèlement, VAN DEN ABEELE *et al.* (2012b) ont développé le M-SHIME (pour Mucosal SHIME) en incorporant un environnement mucosal dans le système SHIME[®] à l'aide de microcosmes couverts de mucine introduits dans chaque bioréacteur colique (Figure 15(a)).

Par ailleurs, certains modèles ont été couplés avec des cellules intestinales en culture, comme le système TIM 1 (DÉAT *et al.*, 2009), le système de Macfarlane et Gibson (BAHRAMI *et al.*, 2011), le modèle « Lacroix » (DOSTAL *et al.*, 2014) et le SHIME[®] (MARZORATI *et al.*, 2013b) dans le but d'étudier la biodisponibilité de composés d'intérêt ou les interactions hôte-microbiote. En particulier, un modèle bi-compartimenté, le HMI (pour Host-Microbiota Interaction) a été développé, afin de se rapprocher davantage des conditions *in vivo*, pour étudier l'interaction hôte-microbe indirecte dans le tractus gastro-intestinal (Figure 15(b)). Le compartiment inférieur est en aérobiose et contient une culture d'entérocytes simulant l'épithélium colique de l'hôte, tandis que le compartiment supérieur simule le côté luminal du tractus digestif couplé en continu avec le milieu fermentaire sous anaérobiose. Les deux compartiments sont séparés par une double couche fonctionnelle composée d'une couche de mucus disposée

sur une membrane de polyamide semi-perméable. Cette double couche permet : (i) de fournir une zone muqueuse pouvant être colonisée par les bactéries intestinales, (ii) le transport bilatéral de métabolites de faible poids moléculaire, (iii) le transport de l'oxygène de la partie inférieure à la partie supérieure de la couche muqueuse dans le but de créer des conditions microaérophiles et (iv) de protéger les entérocytes de l'exposition directe du microbiote colique et de ses effets toxiques. Ce nouveau module a été testé pendant une période de 48 h maximum en combinaison avec le SHIME® mais, en principe, il peut également être combiné avec d'autres simulateurs de tractus gastro-intestinal disponibles sur le marché (MARZORATI *et al.*, 2013b, 2014; VERMEIREN *et al.*, 2011).

Ainsi, la sélection du modèle approprié exige une évaluation soigneuse des objectifs de l'étude étant donné les avantages et les limites exposés par chacun des systèmes (PAYNE *et al.*, 2012b; VENEMA et VAN DEN ABBEELE, 2013).



(a) Microcosme du M-SHIME (VAN DEN ABBEELE *et al.*, 2012b)

(b) Module HMI (MARZORATI *et al.*, 2014)

FIGURE 15. Modélisation de l'environnement mucosal et des interactions hôte-bactéries

(a) Des microcosmes (9 mm de diamètre) couverts d'un mélange d'agar et de mucine de type II sont ajoutés dans chaque bioréacteur colique pour simuler l'environnement mucosal. (b) Le compartiment supérieur du module HMI est couplé en continu avec le milieu fermentaire des bioréacteurs. Le compartiment inférieur est en aérobiose et contient une culture d'entérocytes simulant de l'hôte. Les deux compartiments sont séparés par une membrane semi-perméable sur laquelle une mince couche de mucine-agar est coulée (D'après MARZORATI *et al.*, 2012).

HMI : Host-Microbiota Interaction, M-SHIME : Mucosal SHIME

Chapitre 2

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques

Sommaire

2.1	<i>Escherichia coli</i> : Taxonomie et définitions	50
2.1.1	Caractères généraux	50
2.1.2	Classification antigénique	50
2.1.3	Différents pathovars	51
2.2	Aspects cliniques et épidémiologiques des infections à <i>E. coli</i> entérohémorragiques	55
2.2.1	Historique	55
2.2.2	Réservoirs et vecteurs	56
2.2.3	Aspects cliniques	56
2.2.4	Aspects épidémiologiques	58
2.3	Facteurs de virulence et pouvoir pathogène	62
2.3.1	Résistance à l'acidité	63
2.3.2	Shiga-toxines	65
2.3.3	Facteurs d'adhésion	68
2.3.4	Autres facteurs de virulence	72
2.3.5	Facteurs environnementaux du tractus digestif humain régulant l'expression des gènes de virulence des EHEC	72
2.4	Diagnostic et stratégies thérapeutiques des infections à EHEC	78
2.4.1	Diagnostic	78
2.4.2	Stratégies thérapeutiques	80

Le microbiote intestinal humain constitue un écosystème complexe et sa composition présente une grande variabilité inter-individuelle. Cependant, la diversité des espèces dominantes est stable dans le temps pour un individu donné. Cette homéostasie permet de définir l'état normal du microbiote

intestinal humain ou normobiose. Des écarts à la normobiose (dysbioses) peuvent être observés dans certaines maladies immunitaires, métaboliques, dégénératives ou infectieuses.

Ainsi, l'exploration de la composition et/ou de la diversité du microbiote a permis de suspecter une dysbiose dans (i) le syndrome de l'intestin irritable, (ii) les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, (iii) l'obésité, (iv) le diabète de type I et II, (v) la maladie coéliqua, (vi) l'allergie et (vii) des cas d'infections à *Clostridium difficile* (DORÉ et CORTIER, 2010). Néanmoins, d'autres pathogènes intestinaux comme les EHEC pourraient être concernés. Afin de mieux comprendre le comportement des EHEC dans l'ensemble de l'environnement digestif humain et d'appréhender le concept de normobiose/dysbiose et l'influence des facteurs abiotiques dans le cas des infections à EHEC, les mécanismes impliqués dans leur physiopathologie seront détaillés.

2.1 *Escherichia coli* : Taxonomie et définitions

2.1.1 Caractères généraux

En 1885, le pédiatre allemand Théodore Escherich isole et décrit pour la première fois le bacille *Bacterium coli commune*, fréquemment présent dans les selles des nourrissons. En 1919, Castellani et Chalmers proposent de renommer cette bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) en hommage aux travaux d'Escherich (SHULMAN *et al.*, 2007). Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les bactéries qui constituent cette famille sont des bacilles à Gram négatif non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs et oxydase négatif. En plus de l'espèce *E. coli*, le genre *Escherichia* comprend quatre autres espèces : *E. albertii*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* et *E. vulneris*. Chaque espèce d'*Escherichia* présente des caractéristiques biochimiques propres permettant de les différencier (Tableau 7).

Les bactéries de l'espèce *E. coli* font partie du sous-groupe des γ -protéobactéries commensales du microbiote intestinal humain et de la plupart des animaux à sang chaud. *E. coli* colonise le tractus digestif des nourrissons dès les premières heures suivant l'accouchement. L'abondance des *Protéobacteria* (incluant les *E. coli*) dans le microbiote intestinal humain est d'environ 0,1% des bactéries totales (ECKBURG *et al.*, 2005). *E. coli* est considéré comme un hôte normal du microbiote intestinal des mammifères et des oiseaux et est, à ce titre, recherché dans les aliments comme indicateur de contamination fécale.

2.1.2 Classification antigénique

Développée dès 1947, la technique de sérotypage a permis de distinguer les différentes souches d'*E. coli*. Une classification antigénique a été établie sur la base des antigènes lipopolysaccharidiques de paroi O (permettant de définir l'appartenance à un sérotype), des antigènes polysaccharidiques de capsule K et des antigènes protéiques flagellaires H, les différents sérotypes résultant des combinaisons O:H.

TABLEAU 7. Principaux caractères biochimiques permettant la différenciation des espèces du genre *Escherichia*

Caractéristiques	Espèces d' <i>Escherichia</i>				
	<i>E. coli</i>	<i>E. albertii</i>	<i>E. hermannii</i>	<i>E. vulneris</i>	<i>E. fergusonii</i>
Production d'indole	+	-	+	-	+
Pigment jaune	-	-	+	+/-	-
Lysine décarboxylase	+/-	+	-	+	+
Ornithine décarboxylase	+/-	+	+	-	+
Tétrathionate réductase	-	+/-	+	-	-
β -xylosidase	-	-	-	+	-
β -glucuronidase	+/-	-	-	-	-
Malonate	-	-	-	+	-
Adonitol	-	-	-	-	+
Sorbitol	+/-	-	-	-	-

Modifié d'après ABBOTT *et al.*, 2003 ; GRIMONT, 1987 ; LIVRELLI *et al.*, 2014 ; STOCK *et al.*, 2005.

+ : positif pour la majorité des souches, - : négatif pour la majorité des souches, +/- : variable selon les souches

2.1.3 Différents pathovars

Bien que *E. coli* soit considéré comme un hôte normal du microbiote intestinal, certaines souches d'*E. coli* ont acquis des facteurs de virulence ou des mutations pathoadaptatives les rendant pathogènes pour l'Homme. Les souches d'*E. coli* à l'origine d'infections extra-intestinales sont regroupées sous le terme de ExPEC (*E. coli* pathogènes extra-intestinaux), qui comportent les *E. coli* uropathogènes (UPEC) responsables d'infections du tractus urinaire, et les *E. coli* associés à des méningites et/ou à des septicémies (MNEC).

D'autres souches d'*E. coli*, regroupées sous le terme de InPEC (*E. coli* pathogènes intestinaux), peuvent être à l'origine d'infections intestinales. Parmi les souches responsables de diarrhées, huit pathovars d'*E. coli* peuvent être décrits sur la base de leurs facteurs de pathogénicité et des signes cliniques engendrés (Tableau 8), *i.e.* *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC), *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC), *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), *E. coli* entéroagrégatifs (EAggEC), *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC), *E. coli* adhérents et invasifs (AIEC), *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et *E. coli* entéroagrégatifs producteurs de Shiga-toxines (STEAEC). L'analyse phylogénétique des *E. coli* a permis de les classer en cinq groupes majeurs (A, B1, B2, D et E ; Figure 16).

- les ***E. coli* entéro-pathogènes (EPEC)** sont responsables de diarrhées infantiles (enfants de moins de 3 ans). Le mécanisme du pouvoir pathogène des EPEC comprend : (i) la capacité d'adhérer aux entérocytes de l'intestin grêle et (ii) l'induction de lésions histopathologiques au niveau des entérocytes. L'adhésion des EPEC à la surface des entérocytes au niveau de la bordure en brosse grâce à des pili BFP (bundle forming pili) est suivie d'une désorganisation du cytosquelette de

TABLEAU 8. Les huit classes d'*E. coli* responsables de diarrhées chez l'homme

Classe	Signes cliniques	Facteurs de pathogénicité
<i>E. coli</i> entéropathogènes (EPEC)	Diarrhée aqueuse	Facteurs d'adhésion (BFP) Lésions d'attachement-effacement
<i>E. coli</i> entérotoxigènes (ETEC)	Diarrhée aqueuse (<i>tourista</i>)	Facteurs d'adhésion (CFA) Entérotoxines thermolabiles Entérotoxines thermostables
<i>E. coli</i> entéroinvasifs (EIEC)	Diarrhée dysentérique	Invasion des cellules épithéliales
<i>E. coli</i> entéroagrégatifs (EA _g EC)	Diarrhée persistante	Facteurs d'adhésion (AAF/1) Entérotoxines (EAST)
<i>E. coli</i> à adhésion diffuse (DAEC)	Diarrhée aqueuse	Facteurs d'adhésion (F1845, AIDA-1)
<i>E. coli</i> adhérents et invasifs (AIEC)	Diarrhée chronique Maladie de Crohn	Adhésion et invasion
<i>E. coli</i> entérohémorragiques (EHEC)	Diarrhée aqueuse puis colites hémorragiques SHU PTT	Toxines (Stx1 et/ou 2) Lésions d'attachement-effacement
<i>E. coli</i> entéroagrégatifs producteurs de Shiga-toxines (STEAEC)	SHU	Toxines (Stx2) Facteur d'adhésion

AAF/1 : adhesin involved in diffuse adherence, AIDA-1 : adhesin involved in diffuse adherence, BFP : bundle forming pili, CFA : colonization factor antigen, EAST : enteroaggregative *E. coli* heat stable enterotoxin, PTT : purpura thrombotique thrombocytopenique, SHU : syndrome hémolytique et urémique, Stx : Shiga-toxine

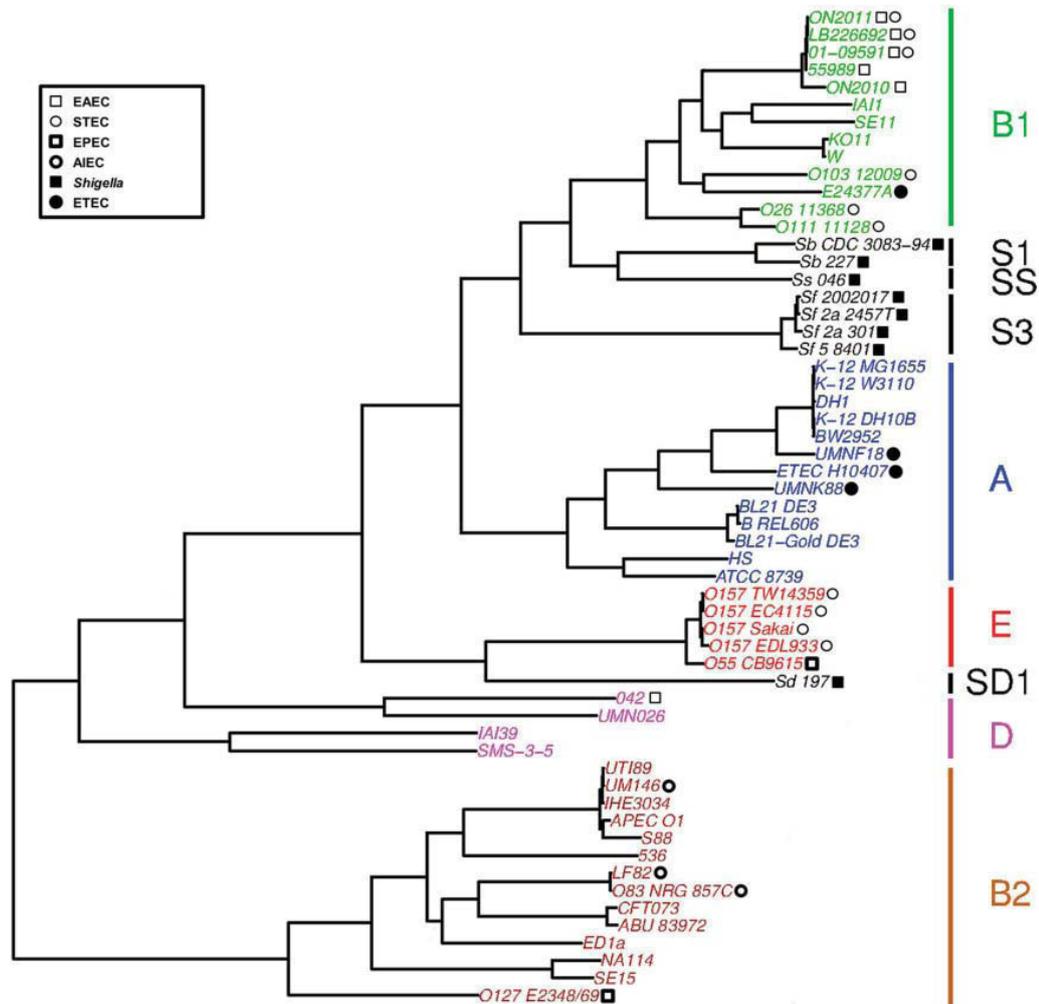


FIGURE 16. Arbre phylogénétique des *E. coli* entéropathogènes

Les souches d'*E. coli* entéropathogènes peuvent être regroupées en 5 groupes phylogénétiques majeurs : A (bleu), B1 (vert), B2 (brun), D (rose), et E (rouge). Les *Shigella* et les *E. coli* entéroinvasifs sont dans des groupes phylogénétiques supplémentaires en noir (D'après CROXEN *et al.*, 2013).

AIEC : *E. coli* adhérents et invasifs, EAEC : *E. coli* entéroagrégatifs, EPEC : *E. coli* entéropathogènes, ETEC : *E. coli* entérotoxigènes, STEC : *E. coli* producteurs de shiga-toxines

la cellule hôte permettant une zone étroite de contact entre les EPEC et l'épithélium intestinal. Ces lésions d'attachement et d'effacement sont sous la dépendance d'un ensemble de gènes dont le gène *eae* codant l'intimine. Ces gènes sont localisés au niveau d'un îlot de pathogénicité : le locus d'effacement des entérocytes (LEE).

- les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) sont responsables de la diarrhée du voyageur. Le mécanisme du pouvoir pathogène des ETEC comprend : (i) la capacité à coloniser la partie proximale de l'intestin grêle et (ii) la sécrétion de toxines. L'adhésion des ETEC à la bordure entérocytaire résulte de facteurs d'origine fimbriaire spécifique d'espèce, les CFA (colonization factor antigen) n'induisant pas de destruction des microvillosités, et conduit à la sécrétion des entérotoxines thermostables et/ou thermostables.
- les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) sont responsables de diarrhées aqueuses pouvant évoluer vers un syndrome dysentérique. Le pouvoir pathogène des EIEC est dû essentiellement à leur capacité à envahir les cellules épithéliales intestinales. La stratégie d'infection et le mécanisme de virulence sont similaires à ceux des Shigelles, *i.e.* translocation via les cellules M, invasion et multiplication dans les entérocytes puis atteinte de la *lamina propria*.
- les *E. coli* entéroagrégatifs (EAggEC) sont responsables d'infections digestives analogues à celles dues aux EPEC mais plus persistantes. Ces souches sont caractérisées par un phénotype d'adhésion agrégatif en formant des « amas en mur de brique ». Cette adhésion est associée à la présence de gènes plasmidiques codant des structures fimbriales flexibles, les AAF/1 (aggregative adherence fimbriae 1). De plus, certaines souches produisent l'entérotoxine thermostable EAST (enteroaggregative *E. coli* heat stable enterotoxin).
- les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) sont responsables de diarrhées pouvant être aqueuses et contenir du mucus, essentiellement chez les jeunes enfants (entre 1 et 5 ans). Deux groupes de facteurs d'adhésion confèrent un phénotype d'adhésion « diffuse », (i) les adhésines du groupe Afa/Dr dont l'adhésine fimbriale F1845 et (ii) une protéine de membrane externe, AIDA-1 (adhesin involved in diffuse adherence).
- les *E. coli* adhérents et invasifs (AIEC) ont été isolés de biopsies de muqueuse iléale chez des patients atteints de la maladie de Crohn. Ces bactéries sont capables d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales. L'adhésion des AIEC à la surface des entérocytes est possible grâce à la reconnaissance du récepteur CEACAM6 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6) par les pili de type 1. Ces souches présentent non seulement la capacité de survivre mais également de se multiplier dans les macrophages, sous le contrôle des gènes impliqués dans l'autophagie, en induisant une forte sécrétion de TNF- α (tumor necrosis factor α).

- les ***E. coli* entérohémorragiques (EHEC)** sont responsables de troubles allant de la diarrhée aqueuse à la colite hémorragique. Dans les cas les plus graves, ces signes digestifs peuvent être associés à une insuffisance rénale sévère, le SHU, ou à un PTT parfois accompagné d’une atteinte du système nerveux central. Le pouvoir pathogène des EHEC est dû essentiellement à l’adhésion aux cellules épithéliales intestinales via l’intimine et à la production de Shiga-toxines 1 et/ou 2. Par ailleurs, les EHEC sont définis comme étant le sous-groupe pathogène pour l’Homme des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). Les facteurs de virulence et le pouvoir pathogène des EHEC seront détaillés dans la partie 2.3.
- les ***E. coli* entéroagrégatifs producteurs de Shiga-toxines (STEAEC)** ont été décrits suite à l’épidémie allemande de 2011 impliquant des graines germées de fenugrec contaminées par la souche O104:H4. Le pouvoir pathogène des STEAEC est dû essentiellement à une très forte adhésion aux cellules de l’épithélium intestinal sous la dépendance du gène *aggR* codant un facteur de régulation de l’expression de *fimbriae* et à la production de Shiga-toxine 2. Cette souche a la particularité de ne pas posséder dans son génome les gènes *eae* (codant l’intimine), *hlyA* (codant l’hémolysine A) et *astA* (codant l’EAST). Les STEAEC ne semblent pas présenter de nouveaux facteurs de virulence mais plutôt une combinaison de ceux des EHEC et des EAggEC ; ils résulteraient de l’insertion des phages portant les gènes *stx* dans le génome d’une souche EAggEC. Par ailleurs, cette souche présente un profil de multi-résistance aux antibiotiques.

2.2 Aspects cliniques et épidémiologiques des infections à *E. coli* entérohémorragiques

2.2.1 Historique

La classification des EHEC comme un pathovar distinct au sein des *E. coli* pathogènes résulte d’observations épidémiologiques et cliniques. En 1982, deux épidémies de colites hémorragiques survenues dans le Nord des États-Unis ont été associées à l’ingestion de hamburgers insuffisamment cuits. Une souche d’*E. coli* de sérotype alors inhabituel (O157:H7) a été isolée à la fois dans les selles des patients et dans la viande de bœuf du lot des hamburgers incriminés (KARMALI *et al.*, 1983 ; RILEY *et al.*, 1983). En 1985, la relation entre la présence d’*E. coli* O157:H7 produisant des Shiga-toxines dans les selles d’enfants et les signes cliniques, *i.e.* les colites hémorragiques et le SHU, est établie (KARMALI *et al.*, 1985). Ainsi, deux observations microbiologiques et cliniques clés, l’une basée sur une bactérie *E. coli* de sérotype rare et l’autre basée sur la production d’une cytotoxine spécifique, ont conduit à la reconnaissance d’une nouvelle classe d’agents pathogènes entériques responsable d’une maladie caractérisée par des signes intestinaux et rénaux.

2.2.2 Réservoirs et vecteurs

Le tube digestif des ruminants domestiques, et plus particulièrement des bovins, est le principal réservoir des STEC. Chez ces animaux, le portage est asymptomatique et ils participent à la contamination de l'environnement via leurs fèces. Dans une moindre mesure, d'autres animaux d'élevage (agricole et zoo) ou sauvages peuvent être porteurs sains de STEC (FERENS et HOVDE, 2011 ; HAMZAH *et al.*, 2013). Une étude épidémiologique menée sur une année en Auvergne a montré que plus de 70% des bovins hébergent des STEC (PRADEL *et al.*, 2000b). La majorité des épidémies recensées à ce jour est liée à l'ingestion de denrées animales ou d'origine animale contaminées par des EHEC. En effet, entre 0,4 et 3% des carcasses bovines seraient contaminées par *E. coli* O157:H7 dans les abattoirs eurasiens (CARNEY *et al.*, 2006 ; GUN *et al.*, 2003 ; GUYON *et al.*, 2001 ; RHOADES *et al.*, 2009). Bien que la viande de bœuf insuffisamment cuite constitue la principale source de contamination, d'autres aliments ont été incriminés tels que les produits laitiers et jus de fruits non pasteurisés, légumes crus et graines germées (GOUALI et WEILL, 2013). Les autres modes de transmission des infections à EHEC chez l'Homme sont la transmission interhumaine, l'ingestion d'eau contaminée et le contact direct avec des animaux porteurs et excréteurs de ces bactéries (Figure 17).

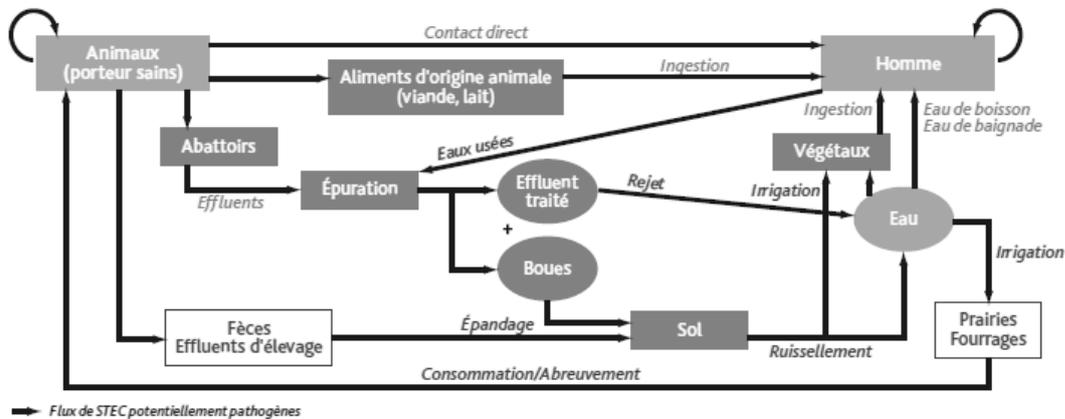


FIGURE 17. Flux de STEC et voies de contamination de l'Homme par des EHEC
D'après BRUGÈRE *et al.*, 2012.

2.2.3 Aspects cliniques

L'évolution clinique des infections à EHEC est schématisée dans la Figure 18. La période d'incubation est de deux à dix jours. La principale manifestation clinique est la colite hémorragique se caractérisant par des crampes abdominales et une diarrhée initialement aqueuse puis sanglante. Des complications pouvant mettre en jeu le pronostic vital des patients apparaissent dans environ 10% des cas, en moyenne

une semaine après le début des symptômes digestifs. Elles se présentent sous forme de microangiopathies thrombotiques de deux types, (i) le SHU particulièrement chez l'enfant âgé de moins de 15 ans et les personnes âgées et (ii) le PTT chez l'adulte.

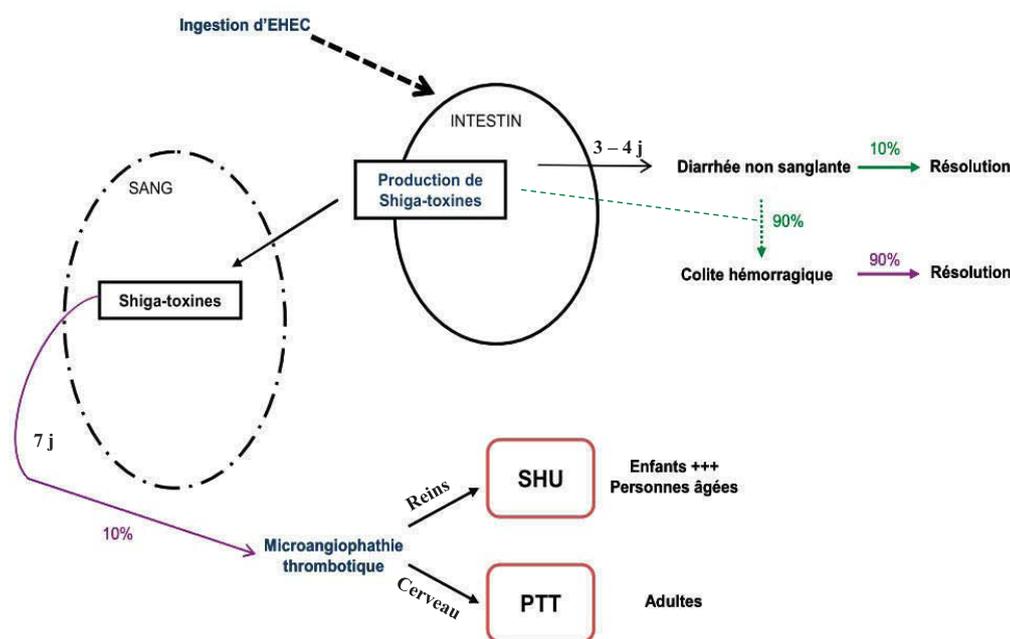


FIGURE 18. Évolution clinique des infections à *E. coli* entérohémorragiques

Adapté de MARIANI-KURKDJIAN et BINGEN, 2012.

EHEC : *E. coli* entérohémorragique, SHU : syndrome hémolytique et urémique, PTT : purpura thrombotique thrombocytopénique

2.2.3.1 SHU

Chez les enfants âgés de moins de 15 ans, la colite hémorragique peut évoluer dans 2 à 7% des cas en un SHU (ESPIÉ *et al.*, 2008). Ce syndrome est caractérisé par une triade de symptômes associant une anémie hémolytique, une thrombopénie et une insuffisance rénale aiguë. Les lésions rénales les plus fréquentes sont une microangiopathie thrombotique glomérulaire caractérisée par un épaississement des parois capillaires glomérulaires et/ou des artérioles et la présence de micro-agrégats plaquettaires dans les capillaires et les artérioles. Le traitement du SHU est symptomatique et fonction de la sévérité des symptômes (nutrition parentérale, transfusion, dialyse).

2.2.3.2 PTT

Le PTT touche principalement l'adulte. Il est caractérisé par une anémie hémolytique microangiopathique, une thrombocytopénie, de la fièvre, des troubles neurologiques avec une insuffisance rénale aiguë. Les signes neurologiques sont observés dans 90% des cas d'évolution létale. Un traitement par

exsanguinotransfusion⁴ ou plasmaphérèse⁵ associée à la perfusion de plasma frais congelé permet une évolution favorable dans plus de la moitié des cas (ESPIÉ *et al.*, 2008).

2.2.4 Aspects épidémiologiques

Depuis la découverte des EHEC aux États-Unis au début des années 1980, de nombreuses épidémies et cas sporadiques ont été recensés au niveau mondial. Parmi les pays industrialisés, les États-Unis, le Canada et le Royaume-Uni sont les plus concernés par ce type d'infection (BEUTIN, 2006 ; NATARO et KAPER, 1998 ; RANGEL *et al.*, 2005). Parallèlement, des cas ont aussi été recensés dans des pays en développement (EFFLER *et al.*, 2001). Il est à noter que les taux d'infection à EHEC peuvent être sous-estimés dans les pays manquant de capacités de diagnostic (TARR *et al.*, 2005).

Chaque pays possède un système de surveillance qui lui est propre et les méthodes de détection utilisées sont variables. En France, les infections à EHEC ne figurent pas sur la liste des maladies à déclaration obligatoire. En l'absence de recherche systématique de ces bactéries en routine par les laboratoires d'analyses biologiques et médicales, la surveillance de ces infections repose sur la détection du SHU post-diarrhéique chez l'enfant âgé de moins de 15 ans par un réseau de néphrologues pédiatres. Depuis 2002, elle est complétée par celle du Centre National de Référence des *E. coli* et *Shigella*. Cette surveillance permet de suivre l'évolution des tendances spatio-temporelles du SHU chez l'enfant, de déterminer les caractéristiques cliniques, microbiologiques et épidémiologiques des malades et de détecter des cas groupés de SHU ou d'infections à EHEC (ESPIÉ *et al.*, 2008). Conjointement, des réseaux internationaux participent à l'harmonisation des protocoles de détection et de déclaration (BEUTIN, 2006).

2.2.4.1 Épidémies dans le monde

Les épidémies à EHEC sont d'importance variable, elles peuvent se présenter sous la forme de petites épidémies de moins d'une dizaine de cas ou d'épidémies de plus grande ampleur avec plusieurs centaines, voire plusieurs milliers de cas (Tableau 9). D'une manière générale, les EHEC constituent la cause majeure des diarrhées hémorragiques et des SHU dans les pays à climat tempéré. Dans l'hémisphère Nord, il existe une corrélation entre la distance par rapport à l'équateur et la fréquence des SHU. Cependant cette corrélation n'est pas absolue, e.g. l'Écosse a une forte incidence de SHU contrairement au Danemark (TARR *et al.*, 2005). Le continent Nord-Américain est le plus touché : entre 1982 et 2002, 350 épidémies ont été recensées avec 8600 cas, 4% de SHU et 0,5% de décès (MARIANI-KURKDJIAN et BINGEN, 2012 ; RANGEL *et al.*, 2005). En 1996, le Japon a été le siège de la plus grande épidémie répertoriée à ce jour avec 9451 cas, 1808 hospitalisations, 101 SHU et 12 décès. D'autres épidémies de

4. Remplacement de la plus grande partie du sang ou des globules rouges d'un malade par le sang ou les globules rouges de donneurs.

5. Échange plasmatique.

faible ampleur ont également été décrites en Asie et Pacifique Sud (Thaïlande, Malaisie, Corée, Chine et Australie), Amérique du Sud (Argentine) et en Afrique (Afrique du Sud) (REILLY, 1998). En Europe, des épidémies comprenant des centaines de cas d'infection à EHEC ont été signalées au Royaume-Uni entre 1992 et 2002 (GILLESPIE *et al.*, 2005). En 2011, le bilan d'une épidémie en Allemagne fait état de 3816 cas, 845 SHU et 54 décès (EFSA, 2013). Ainsi, un total de 9485 infections confirmées à *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines a été signalé en 2011 dans l'Union Européenne, soit une augmentation d'un facteur 2,6 par rapport à 2010, essentiellement due à l'épidémie allemande (EFSA, 2013).

Bien que le nombre de cas détectés d'infection à EHEC ait augmenté avec le temps, reflétant peut-être de meilleures techniques de détection, le diagnostic de SHU chez les enfants est resté stable au cours des vingt dernières années dans les pays industrialisés, et la mortalité associée a diminué. Cependant, des fluctuations de l'incidence du SHU peuvent se produire lors des épidémies localisées.

TABLEAU 9. Liste non exhaustive des principales épidémies à *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines survenues dans le monde depuis 2005

Sérogroupe/Sérotype	Pays (Année)	Mode de transmission (Origine)	Nombre de cas
O157	France (2013)	Alimentaire (fromage au lait cru)	8
O157:H7	France (2012)	Alimentaire (viande bovine)	4
O111	France (2012)	Transmission interhumaine (crèche)	4
O104:H4	France (2011)	Alimentaire (graines germées)	24
O104:H4	Allemagne (2011)	Alimentaire (graines germées)	3816
O145:H28	Norvège (2009)	Transmission interhumaine (crèche)	16
O157	Angleterre (2009)	Contact avec des animaux de ferme	36
O157:H-	Pays-Bas (2008-2009)	Alimentaire (viande bovine)	20
O157	États-Unis (2008)	Alimentaire (viande de bœuf)	99
O111	États-Unis (2008)	Alimentaire (non précisé)	341
O157:H-	États-Unis (2008)	Alimentaire (lait cru)	14
O157:H-	Pays-Bas ; Islande (2007)	Alimentaire (salade verte)	50
O26:H11	Danemark (2007)	Alimentaire (viande bovine)	20
O26 ; 0145	Belgique (2007)	Alimentaire (glace au lait pasteurisé)	12
O157	Angleterre (2007)	Alimentaire (viande aviaire)	12
O157:H7	États-Unis (2006)	Alimentaire (salade verte)	77
O157:H7	Japon (2006)	Contact avec des animaux de ferme	4
O157:H7	États-Unis (2006)	Alimentaire (épinards)	205
O103	Japon (2006)	Transmission interhumaine (crèche)	8
O103:H25	Norvège (2006)	Alimentaire (viande ovine)	17
O26:H11	Japon (2006)	Transmission interhumaine (crèche)	6
O157:H7	France (2005)	Alimentaire (viande bovine)	69
O26:H11	France (2005)	Alimentaire (fromage au lait cru)	17

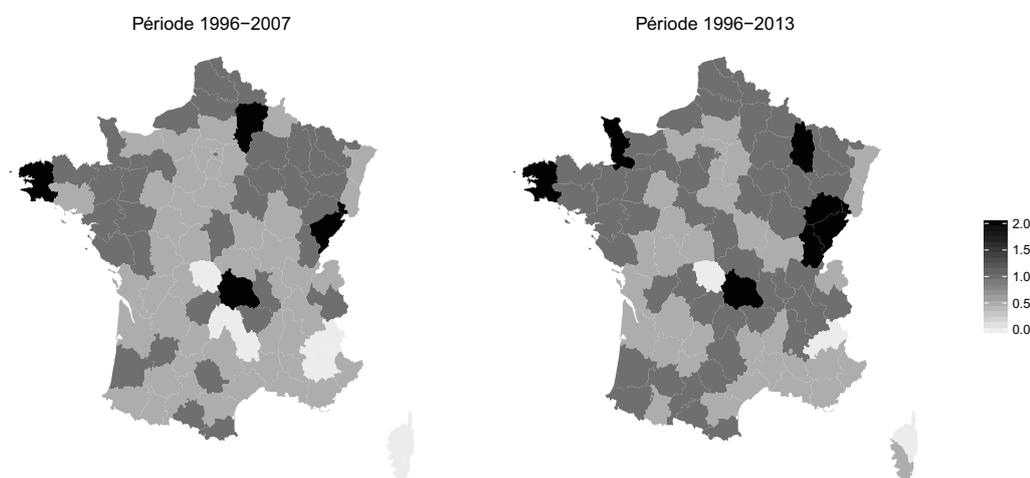
Modifié d'après BRUGÈRE *et al.*, 2012.

2.2.4.2 Épidémies en France

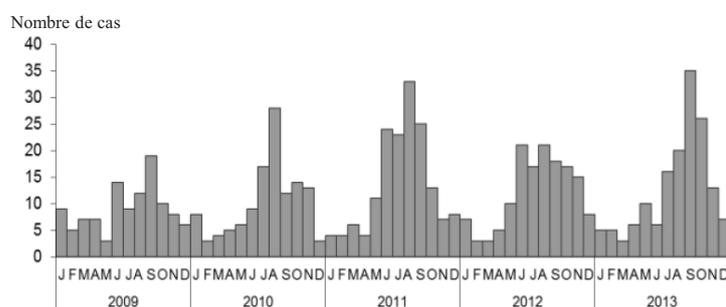
En France, le système de surveillance et son réseau de néphrologues pédiatres ont permis de détecter plusieurs épidémies d'infections à EHEC avec une source alimentaire commune identifiée. Deux épidémies majeures ont été recensées en 2005 : la première (69 cas dont 17 SHU) dans les régions Aquitaine et Midi-Pyrénées liée à la consommation de steaks hachés surgelés, la seconde (17 cas de SHU) en Normandie liée à la consommation de fromages au lait cru – type pâte molle à croûte fleurie – (ESPIÉ *et al.*, 2006b). En 2011, deux épidémies sont survenues : la première (19 cas de SHU) dans le grand quart nord-est du pays, liée à la consommation de steaks hachés et hamburgers surgelés, la seconde (12 cas de diarrhée, 5 cas de diarrhée sanglante et 7 SHU) dans la région de Bègles (Aquitaine) liée à la consommation de graines germées de fenugrec ou résultant d'une transmission inter-humaine (cas secondaires) dans l'entourage d'un individu ayant consommé des graines germées contaminées. Une enquête européenne de traçabilité sur l'origine des graines de fenugrec incriminées a permis d'identifier un producteur et un lot de graines commun entre les épidémies aquitaine et allemande (KING *et al.*, 2012). Deux épidémies à EHEC ont été identifiées en 2012 : une épidémie (4 cas de SHU) en Aquitaine, liée à la consommation de steaks hachés de bœuf et une épidémie (4 cas de SHU) dans une crèche bretonne due à une transmission interhumaine (KING *et al.*, 2013a). Enfin, une épidémie à EHEC O157 a été identifiée en Normandie en mai 2013 (8 cas dont 5 SHU) en lien probable avec la consommation de fromages au lait cru (KING *et al.*, 2014).

2.2.4.3 Données épidémiologiques du SHU en France

En 2013, 152 cas de SHU ont été notifiés par le réseau de surveillance français, 85% des patients (parmi les 149 cas testés) présentaient une infection à STEC (KING *et al.*, 2014). L'incidence annuelle en 2013 du SHU est de 1,2/100000 enfants de moins de 15 ans. Depuis 1996, l'incidence annuelle moyenne la plus élevée a été observée dans les régions de Franche-Comté (1,7/100000) et Bretagne (1,4/100000), et au niveau départemental dans le Finistère (2,4/100000), la Manche (2,1/100000), le Doubs (2,1/100000) et le Puy de Dôme (incidence > 1,5/100000). Les incidences annuelles moyennes départementales du SHU par 100000 enfants de moins de 15 ans pour les périodes 1996-2007 et 1996-2013 sont présentées dans la Figure 19(a). Par ailleurs, depuis le début de la surveillance, une recrudescence estivale du nombre de cas est observée avec 43% des cas survenant entre juillet et septembre (Figure 19(b)). Cette augmentation estivale est également observée dans d'autres pays européens et serait liée à une augmentation de l'excrétion fécale des STEC chez les animaux porteurs (MARIANI-KURKDJIAN et BINGEN, 2012). En 2013, 59% des enfants atteints de SHU étaient âgés de 3 ans et moins (âge médian de 27 mois – 3 semaines à 14 ans –) et 51% des cas notifiés étaient des garçons (KING *et al.*, 2014). La proportion de cas d'infections intestinales à EHEC qui évoluent vers un SHU va de 3 à 9% dans les cas sporadiques (contre 20% dans certaines épidémies) mais les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines ne sont pas recherchés de façon systématique chez les patients atteints de diarrhées. Des facteurs de sensibilité individuelle de l'hôte semblent jouer un rôle déterminant dans le déclenchement de la maladie.



(a) Incidence annuelle moyenne départementale du SHU par 100000 enfants de moins de 15 ans



(b) Distribution mensuelle du nombre de SHU chez l'enfant de moins de 15 ans

FIGURE 19. Distribution géographique et mensuelle du nombre de cas de SHU en France chez l'enfant de moins de 15 ans

(a) Depuis 1996, l'incidence annuelle moyenne la plus élevée a été observée dans les régions de Franche-Comté, Bretagne et Auvergne. (b) Une recrudescence estivale du nombre de cas est observée depuis 1996. En 2012, le pic saisonnier a été moins marqué avec un nombre de notifications élevé jusqu'au mois de novembre. Enfin, en 2013 le pic saisonnier a été important et tardif (40% des notifications reçues en septembre et octobre). D'après KING *et al.*, 2009, 2014.

2.2.4.4 Prévalence et classification des STEC

2.2.4.4.1 Sérotypes les plus fréquents

L'analyse des données épidémiologiques mondiales montre que plus de 200 sérotypes O:H distincts d'*E. coli* peuvent comprendre des souches productrices de Shiga-toxines. Toutes ne sont pas pathogènes pour l'Homme mais certaines sont associées à l'apparition de colites hémorragiques et de SHU. À titre d'exemple, une étude réalisée à Clermont-Ferrand a permis de mettre en évidence une prévalence de 2,5% de STEC chez 394 enfants hospitalisés – motif variable selon l'étiologie – ne présentant pas de diarrhée (PRADEL *et al.*, 2000a). La recherche systématique des EHEC dans les selles et/ou l'écouvillonnage rectal chez les patients atteints de SHU a permis d'améliorer les connaissances sur les sérogroupes d'EHEC en France. Le sérotype O157:H7 est le plus fréquemment retrouvé avec 41,2% des cas européens et 54% des cas français en 2011 (EFSA, 2013; KING *et al.*, 2013b). Mise à part le sérotype O157:H7, seul un nombre restreint d'autres sérotypes a été associé à des épidémies, *i.e.* O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 et leurs dérivés non mobiles (Tableau 9). Les souches de ces cinq sérotypes sont les plus souvent associées à des signes cliniques graves (SHU) et aux épidémies et ont été définis comme des souches « EHEC typiques majeures ». Ces dernières ont la possibilité de provoquer des lésions d'attachement et d'effacement (A/E) des entérocytes (décrites dans le paragraphe 2.3.3.1). Parallèlement, des cas d'infections à EHEC « atypiques » existent, comme celles provoquées par des souches des sérogroupes O91 et O104 ne produisant pas de lésions A/E (BRUGÈRE *et al.*, 2012). En France, les infections à EHEC confirmées en 2013 étaient positives dans 43% des cas pour O157, 19% pour O26, 9% pour O80, 6% pour O121, 6% pour O111, 5% pour O145 et 2% étaient non-sérotypables (KING *et al.*, 2014).

2.2.4.4.2 Classification des STEC en séropathotypes

Une classification des STEC en cinq séropathotypes (de A à E; Tableau 10) basée sur (i) l'incidence relative des sérotypes dans les infections humaines, (ii) leur fréquence d'implication dans des épidémies et (iii) leur association ou non avec des symptômes cliniques sévères a été proposée par KARMALI *et al.* en 2003. Les séropathotypes A et B incluent les souches associées aux épidémies avec SHU, le séropathotype A regroupant les souches de sérotype O157:H7. Le séropathotype C comprend les souches associées aux cas sporadiques de SHU. Le séropathotype D regroupe les souches ayant une faible incidence sur l'Homme et associées à des SHU ou des colites hémorragiques. Enfin, les souches du séropathotype E ne sont pas retrouvées chez l'Homme et sont considérées comme non pathogènes.

2.3 Facteurs de virulence et pouvoir pathogène

La virulence des EHEC est associée à deux processus : la colonisation du tube digestif des patients et la production de Shiga-toxines (N. K. HO *et al.*, 2013; MARIANI-KURKDJIAN et BONACORSI, 2014).

TABLEAU 10. Classification des sérotypes de STEC en séropathotypes

Séropathotype	Incidence relative	Implication dans des épidémies	Association avec les SHU ou les colites hémorragiques	Sérotypes
A	Élevée	Fréquente	Oui	O157:H7, O157:NM
B	Modérée	Non fréquente	Oui	O26:H11, O103:H2, O111:H8, O111:NM, O121:H19, O145:NM
C	Faible	Rare	Oui	O91:H21, O104:H21, O113:H21 et autres sérotypes
D	Faible	Rare	Non	multiples sérotypes
E	Absente chez l'Homme	non applicable	non applicable	multiples sérotypes

D'après BRUGÈRE *et al.*, 2012.

NM : non mobile

La production et la libération des Shiga-toxines est essentielle dans la physiopathologie des infections à EHEC, cependant d'autres facteurs peuvent être impliqués.

2.3.1 Résistance à l'acidité

Une des propriétés communes aux agents bactériens pathogènes associés aux voies de transmission alimentaire et oro-fécale est la capacité à survivre dans un environnement acide. En effet, des acides faibles peuvent être apportés au cours de la fabrication ou de la transformation de l'aliment et/ou produits par sa fermentation. Par conséquent, la résistance à l'acidité peut permettre aux microorganismes pathogènes de survivre dans les aliments jusqu'à leur consommation. Une fois ingéré, l'agent pathogène est confronté à différents types d'exposition acide dans le tractus gastro-intestinal : les sécrétions gastriques acides, considérées comme une barrière bactéricide et les AGCC produits par le microbiote intestinal. Les bactéries entériques ont acquis une vaste gamme de systèmes de réponse au stress acide afin de résister aux environnements acides rencontrés. Ainsi, la dose infectieuse moyenne des différents agents pathogènes entériques reflète leur aptitude relative à résister à cet environnement acide, e.g. 10^9 et 10^2 cellules respectivement pour *Vibrio cholerae* et *Shigella flexneri*. Les EHEC auraient des doses infectieuses similaires à celles de *Shigella* spp. (LIN *et al.*, 1996).

Cinq systèmes de résistance à l'acidité (AR1 à AR5) ont été mis en évidence chez *E. coli* (Figure 20). Le système oxydatif AR1 est encore assez mal connu. Il peut être activé chez des bactéries cultivées dans un milieu minimum à pH 2,5 dépourvu d'acides aminés, après une pré-culture dans un bouillon Luria Bertani à pH 5,5. Ce système est dépendant d'une sous-unité de l'ARN polymérase bactérienne (le facteur σ^S) et de la protéine récepteur du cAMP (adenosine monophosphate cyclique) et est réprimé par le glucose. Les voies AR2 à AR5 sont respectivement basées sur la décarboxylation du glutamate, de l'arginine, de la lysine et de l'ornithine. Toutes ces réactions de décarboxylation consomment un

proton et libèrent du dioxyde de carbone. Les trois principales voies de résistance à l'acidité sont AR2, AR3 et AR4. Les voies AR2 et AR3 permettent aux bactéries de survivre dans des environnements extrêmement acides, *i.e.* pH 2,5. Les voies du AR4 et AR5 permettent aux *E. coli* de survivre dans des environnements modérément acides *i.e.* pH 4,5 (HONG *et al.*, 2012; ZHAO et HOURY, 2010). De plus, les *E. coli* présentent dans leur génome les gènes *hdeA* et *hdeB* codant respectivement les protéines chaperonnes HdeA et HdeB. Ces protéines périplasmiques confèrent une protection indispensable vis-à-vis des dommages provoqués par un environnement acide (pH < 3) compte tenu de la perméabilité de la membrane externe bactérienne (CARTER *et al.*, 2012).

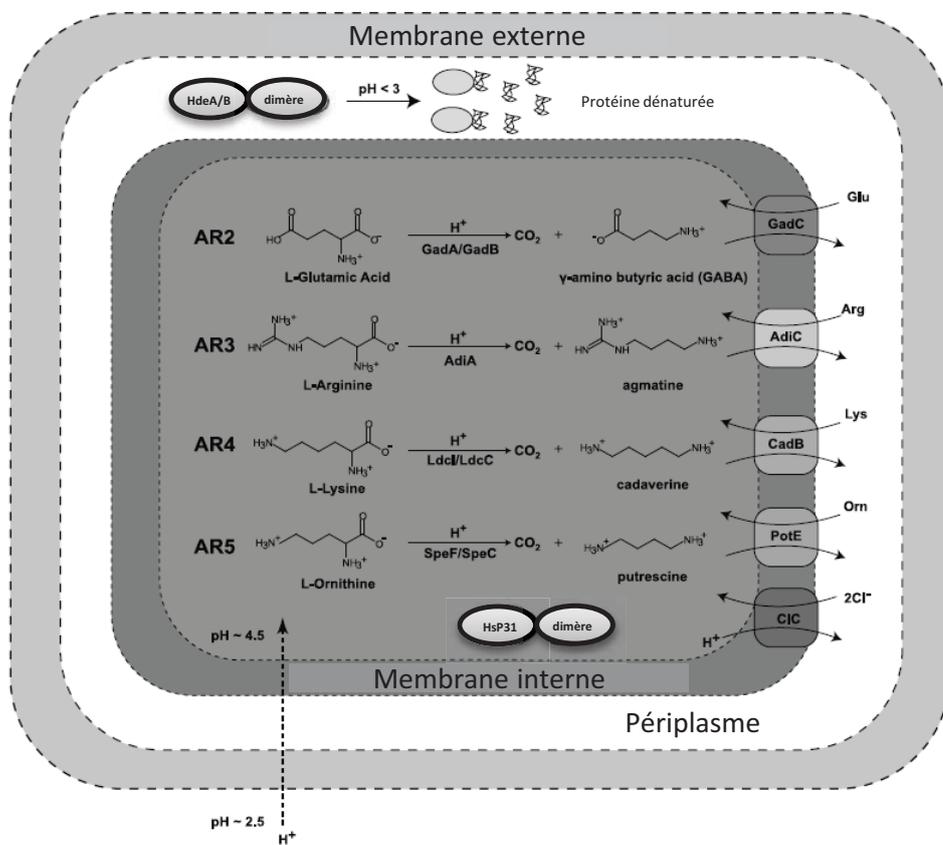


FIGURE 20. Systèmes de résistance à l'acidité chez *E. coli*

Le système AR1, peu caractérisé, n'apparaît pas dans ce schéma. Les réactions de décarboxylation des acides aminés consomment un proton et libèrent du dioxyde de carbone. Les acides aminés et les produits de décarboxylation correspondants sont représentés sous leur formule chimique. Les protéines responsables de la réaction sont indiquées sous les flèches réactionnelles (Modifié d'après ZHAO et HOURY, 2010).

AR2 : système de décarboxylation du glutamate, AR3 : système de décarboxylation de l'arginine, AR4 : système de décarboxylation de la lysine, AR5 : système de décarboxylation de l'ornithine, Arg : arginine, Cl⁻ : ion chlorure, CO₂ : dioxyde de carbone, Glu : glutamate, H⁺ : ion hydrogène, HdeA/B et HsP31 : protéines chaperonnes, Lys : lysine, Orn : ornithine

2.3.2 Shiga-toxines

2.3.2.1 Structure

La virulence des EHEC est associée à la production et la libération de Shiga-toxines (encore appelées vérotoxines). Ces exotoxines ont un effet cytopathogène sur certaines lignées cellulaires (cellules Vero, HeLa, KB) et présentent des homologies de séquence en acides aminés avec la toxine de Shiga produite par *Shigella dysenteriae* type 1. Deux types de Shiga-toxines (Stx) ont été identifiés : Stx1 et Stx2, présentant respectivement 99% et 56% d'homologie avec la toxine de *Shigella*. Elles sont codées par deux gènes, *stx1* et *stx2* portés par des bactériophages de type λ . Les Shiga-toxines sont des hétéropolymères de 70,5kDa constitués d'une sous-unité enzymatique A de 32kDa et de 5 sous-unités B de 7,7kDa chacune permettant la liaison des toxines au récepteur cellulaire globotriosyl céramide 3 ou Gb3 (galactose- α (1-4), galactose- β (1-4) glucose céramide). Les données cristallographiques montrent que les sous-unités forment un anneau pentamérique dans lequel s'insère l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité A (JOHANNES et RÖMER, 2010). Une représentation en ruban de la structure cristalline des Stx est présentée dans la Figure 21.

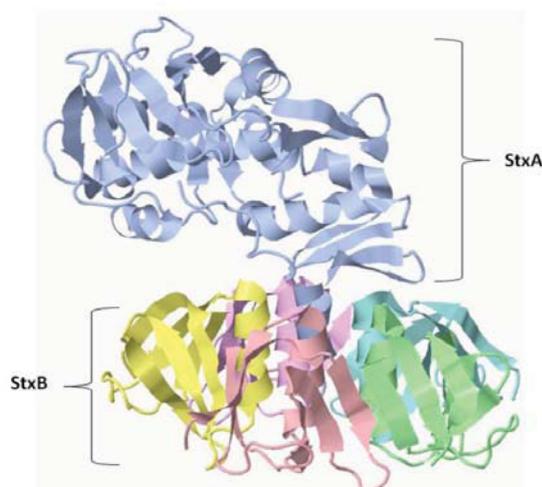


FIGURE 21. Représentation en ruban de la structure cristalline des Shiga-toxines

La sous-unité A, StxA (en bleu), est composée de deux fragments peptidiques liés de manière covalente par une liaison disulfure : A1 (28 kDa) et A2 (4 kDa). Le clivage de ces deux fragments en Cys242-Cys261 dans l'appareil de Golgi est requis pour l'activation du fragment A1. Les sous-unités de StxB (7,7 kDa) s'associent pour former un homopentamère (D'après ODUMOSU *et al.*, 2010).

2.3.2.2 Variants

Des variants des toxines Stx1 et Stx2 ont été identifiés. Ils diffèrent par des substitutions d'acides aminés dans leurs sous-unités A et B, influençant la toxicité et la spécificité des toxines vis-à-vis du récepteur Gb3 (PRAGER *et al.*, 2011). D'après la nomenclature standardisée des variants Stx proposée par SCHEUTZ *et al.* (2012), les groupes Stx1 et Stx2 sont constitués respectivement de trois (Stx1a,

Stx1c et Stx1d) et sept (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f et Stx2g) sous-types (Tableau 11). Bien que les toxines des groupes Stx1 et Stx2 se distinguent par leurs propriétés immunologiques, leur mécanisme d'action et leurs propriétés biochimiques sont similaires. Cependant, l'issue clinique des infections à EHEC dépend, en grande partie, du génotype *stx* de la souche infectante, Stx2 étant la plus souvent associée aux cas pathologiques les plus sévères (BOERLIN *et al.*, 1999 ; SIEGLER *et al.*, 2003). De plus, la présence des sous-types *stx2a* ou *stx2c* est associée aux pathologies les plus sévères comme la colite hémorragique et le SHU, tandis que *stx2e* et *stx2f* sont associés aux diarrhées et au portage asymptomatique (FRIEDRICH *et al.*, 2002 ; ORTH *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'analyse phylogénétique associée au génotypage *stx* de la souche semble être hautement prédictif de la pathogénicité, e.g. le phylogroupe A regroupe des souches non virulentes (GIRARDEAU *et al.*, 2005).

TABLEAU 11. Nomenclature actuelle des différents sous-types de Shiga-toxines

Groupe	Sous-type (gène)	Ancienne dénomination des gènes	Ancienne dénomination des Shiga-toxines
Stx1	Stx1a (<i>stx1a</i>)	<i>stx1,slt-1</i>	SLT-1, VT1
	Stx1c (<i>stx1c</i>)	<i>stx1OX3, stx1c</i>	Stx(1c)
	Stx1d (<i>stx1d</i>)	<i>stx1d</i>	
Stx2	Stx2a (<i>stx2a</i>)	<i>slt-II, stx2</i>	SLT-II, SLT-II/O48, Stx2vhd
	Stx2b (<i>stx2b</i>)	<i>stx2, stx2b, stx2vO111, stx2d</i>	SLT-II/OX3a / VT2d-OX3a, Stx2d-OX3a, SLT-ii/O111 / VT2d-O111, Stx2d-O111, Stx2d / VT2-Ount
	Stx2c (<i>stx2c</i>)	<i>stx2, stx2c, stx2vOX393, stx2v-ha, stx2vhd</i>	SLT-II/OX3b/2 / VT2d-OX3/2, Stx2v / VT2v, SLTIIc, Stx2-OX3b
	Stx2d (<i>stx2d</i>)	<i>stx2vha, stx2d1 / stx2d1, stx2ha, stx2da, stx2v-ha, stx2vhb, stx2d2 / stx2d2, stx2hb, stx2db, stx2v-hb, stx2c2, stx2vhc (stx2d3)</i>	SLT-IIvh / SL-IIvha, Stx2vha / VT2vha, stx2vh-a / VT2vh-a, stx2d1 / VT2d1, VT2v-a, VT2v-b, stx2vhb / vVT2vhb, stxvh-b / VT2vh-b, SL-IIvhb, Stx2c2, Stx2vhc, Stx2cf
	Stx2e (<i>stx2e</i>)	<i>slt-IIv, slt-IIva, slt-IIe, slt-IIera, stx2e-ONT-26725-97 (92), stx2e</i>	SLT-IIv, SLT-IIva, SLT-IIe / VT2e, VT2vp, VT2vp1, Stx2era
	Stx2f (<i>stx2f</i>)	<i>stx2f, stx2ev / stx2ev, slt-IIvhc, slt-IIid</i>	Stx2ev / VT2ev / VTev, Stx2vp2 / VT2vp2, Stx2va / Stx2v, SLTIIvhc, SLT-IIid / VT2d, SLTIIva
	Stx2g (<i>stx2g</i>)	<i>stx2g</i>	

Modifié d'après GERNER-SMIDT, 2013.

2.3.2.3 Passage des Shiga-toxines au niveau de l'épithélium intestinal

Les complications systémiques observées au cours des infections à EHEC résultent d'une liaison entre les Stx et les récepteurs Gb3 situés sur les cellules endothéliales rénales et cérébrales. Il est admis que les Shiga-toxines atteignent les cellules cibles via la circulation sanguine (KARMALI *et al.*, 1985). Des Stx libres ont été détectées en quantité négligeable dans le sérum des patients atteints de SHU mais sont présents en quantité élevée à la surface des leucocytes polynucléaires (BRIGOTTI *et al.*, 2011). Une fois libérées dans la lumière intestinale, les Stx doivent traverser l'épithélium intestinal, qui lorsqu'il est sain, n'exprime pas le récepteur Gb3 ou tout autre récepteur aux Stx sauf dans les cellules de Paneth localisées à la base de cryptes de Lieberkühn dans l'intestin grêle (SCHÜLLER *et al.*, 2007). En revanche, l'expression de Gb3 sur l'épithélium colique humain est associée à une malignité et/ou à la présence de métastases (SCHÜLLER, 2011). Le mécanisme de la translocation des Stx est incertain, les modèles animaux disponibles étant inappropriés pour étudier cet aspect de la physiopathologie des infections à EHEC. En effet, le récepteur Gb3 est présent dans le côlon distal des souris et, chez le lapin l'expression intestinale de Gb3 augmente rapidement avec l'âge (SCHÜLLER, 2011). L'utilisation de xénogreffes intestinale humaines chez la souris pourrait fournir un modèle utile pour l'étude de la translocation des Stx lors d'une infection à EHEC (GOLAN *et al.*, 2011).

Différentes voies possibles de translocation des Stx ont été proposées, *i.e.* Stx1 pourrait utiliser un mécanisme de transcytose Gb3-indépendant, alors que la transmigration des neutrophiles à travers l'épithélium intestinal permettrait le passage des toxines Stx2 par voie paracellulaire (HURLEY *et al.*, 2001; TATEWAKI *et al.*, 2000; YAMASAKI *et al.*, 1999). Par ailleurs, l'infection de cellules épithéliales intestinales par des souches d'EHEC stimule la macropinocytose des Stx (LUKYANENKO *et al.*, 2011). Ce mécanisme est indépendant des lésions A/E et la sécrétion de sérines protéases solubles, comme EspP (*E. coli*-secreted protein P), serait suffisante pour induire un remodelage de l'actine cellulaire et stimuler la macropinocytose et la transcytose transcellulaire des Stx (IN *et al.*, 2013). Parallèlement, il a été montré que l'environnement microaérobie de l'intestin humain favorise la macropinocytose de Stx2 à travers l'épithélium intestinal humain *in vitro* avec des teneurs en oxygène comprises entre 1,4 et 1,7% (TRAN *et al.*, 2014).

Les diarrhées induites par les EHEC s'accompagnent d'une inflammation de la muqueuse et de dommages dans le cæcum et le côlon ascendant (SHIGENO *et al.*, 2002). Par conséquent, il est possible que les Shiga-toxines traversent l'épithélium endommagé à un stade ultérieur de l'infection (SCHÜLLER, 2011).

Par ailleurs, PHILLIPS *et al.* (2000) ont montré, à l'aide de culture *in vitro* de biopsies intestinales humaines, que les EHEC adhèrent principalement à l'épithélium du follicule associé aux plaques de Peyer de l'intestin grêle. Cette zone est particulièrement riche en cellules M spécialisées dans la translocation des antigènes du microbiote intestinal luminal aux cellules présentatrices d'antigènes sous-jacentes. En

raison de leur activité de transcytose, les cellules M sont souvent exploitées par des agents pathogènes intestinaux et ont également été impliquées dans la translocation de toxines bactériennes, comme par exemple l'entérotoxine A staphylococcique (MARESCA *et al.*, 2007; SCHÜLLER, 2011). Récemment, ETIENNE-MESMIN *et al.* (2011a) ont montré que les EHEC sont capables (i) de transloquer à travers les cellules M et (ii) de survivre et produire des Stx dans les macrophages avant d'induire leur apoptose et provoquer un relarguage des toxines dans la *lamina propria* (Figure 22).

2.3.2.4 Mécanisme d'action des Shiga-toxines au niveau des cellules cibles

La première étape du devenir des Stx dans les cellules cibles est la fixation des toxines à la membrane cytoplasmique des cellules endothéliales rénales et cérébrales exprimant le récepteur glycolipidique, le globotriosyl céramide Gb3. C'est le digalactoside terminal, le motif galactose- α (1-4) de ce glycolipide qui est spécifiquement reconnu par les StxB. La toxine est alors internalisée par endocytose avec formation d'une vacuole de clathrine contenant le complexe toxine/Gb3 et subit un transport rétrograde à travers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. La sous-unité A, porteuse de l'activité enzymatique, est constituée du fragment A1 contenant le site enzymatique et du fragment A2 lié par son extrémité carboxy-terminale à trois des cinq sous-unités B (ODUMOSU *et al.*, 2010). Une réduction du pont disulfure reliant ces fragments permet la libération de la sous-unité A1 dans le cytosol. Celle-ci possède une activité N-glycosidase sur l'adénosine 2348 de l'ARN ribosomique 28S, bloquant ainsi la sous-unité 60S du ribosome. La sous-unité 60S du ribosome n'est alors plus capable d'interagir avec les facteurs d'élongation EF1 et EF2, ce qui entraîne un arrêt de la synthèse protéique. L'activation séquentielle de caspases (caspases 3, 8 et 9) induit la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN conduisant à la mort cellulaire par apoptose (JOHANNES et RÖMER, 2010).

2.3.3 Facteurs d'adhésion

L'unique production de Shiga-toxines, sans facteur d'adhésion, est jugée insuffisante pour induire l'ensemble des aspects de la physiopathologie des infections à EHEC. La plupart des souches EHEC ont la possibilité de provoquer des lésions d'attachement et d'effacement (A/E) des entérocytes de l'iléon distal et du côlon (CHONG *et al.*, 2007; SHIGENO *et al.*, 2002), cependant ces dernières (« EHEC typiques ») sont à différencier des EHEC « atypiques » ne produisant pas des lésions A/E mais possédant d'autres mécanismes d'adhésion à la muqueuse colique.

2.3.3.1 Lésion d'attachement-effacement

Les lésions A/E induites par les « EHEC typiques » sont semblables à celles provoquées par les EPEC (Figure 23(a)). Le mécanisme global de l'apparition des lésions A/E résulte de l'action combinée de protéines codées par des gènes localisés sur un îlot de pathogénicité de 43395 pb, le locus d'effacement des entérocytes (LEE) et peut être décomposé en trois étapes, *i.e.* (i) une adhésion intime des bactéries

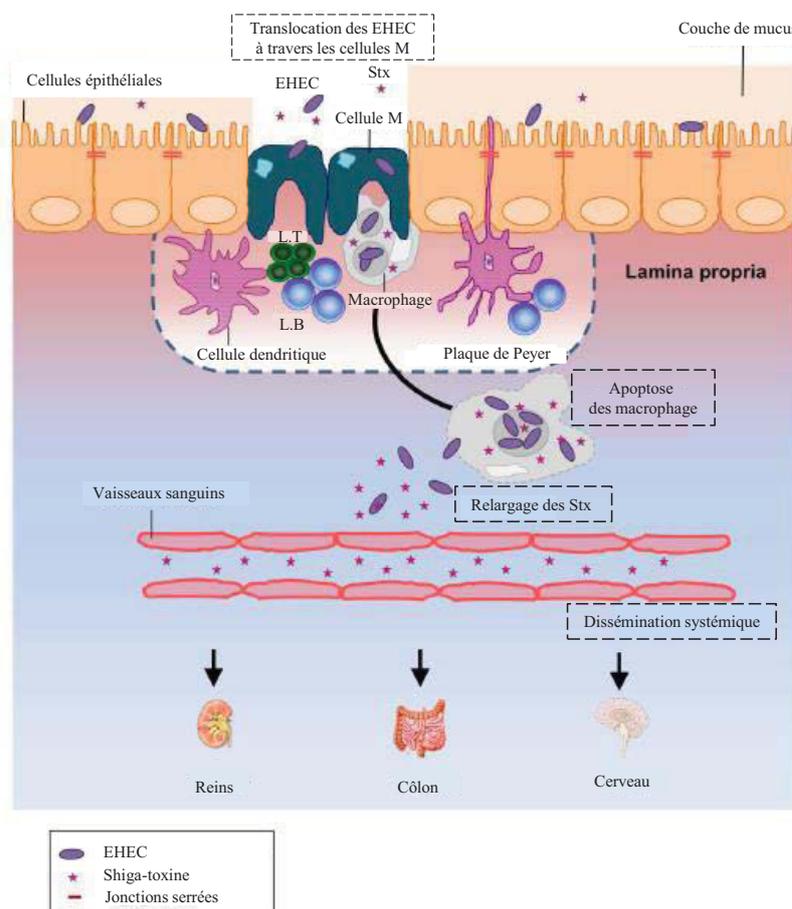


FIGURE 22. Nouveau modèle d'infection par les EHEC

Le devenir des EHEC et de leurs toxines dans les cellules épithéliales de l'intestin est schématisé. Les Shiga-toxines produites dans la lumière intestinale peuvent traverser l'épithélium intestinal humain par macropinocytose et par voie paracellulaire. Parallèlement, les EHEC traversent la barrière intestinale via les cellules M. Dans la *lamina propria*, les EHEC pénètrent, survivent et produisent des Shiga-toxines dans les macrophages résidents et induisent leur mort cellulaire. Les Shiga-toxines libérées pourraient ensuite rejoindre la circulation sanguine et atteindre les organes cibles impliqués dans la physiopathologie des infections à EHEC (Modifié d'après ETIENNE-MESMIN *et al.*, 2011a).

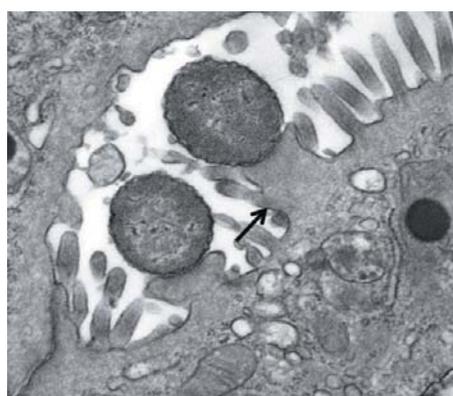
EHEC : *E. coli* entérohémorragique, L.B : Lymphocytes B, L.T : Lymphocytes T, Stx : Shiga-toxine

à la surface des microvillosités intestinales, (ii) une injection dans le cytoplasme des entérocytes, via un système de sécrétion de type III, d'effecteurs provoquant une dépolymérisation de l'actine cellulaire en regard de la zone d'adhésion et (iii) une désorganisation du cytosquelette de l'entérocyte aboutissant à la destruction locale des microvillosités intestinales. Un piédestal constitué d'actine cellulaire sur lequel les bactéries peuvent s'enchâsser de façon étroite est alors constitué (FRANKEL *et al.*, 1998 ; A. R. WONG *et al.*, 2011). Le LEE, organisé en cinq opérons majeurs (Figure 23(b)), contient des gènes codant une protéine de membrane externe (l'intimine) et son récepteur cellulaire spécifique (Tir ou Translocated intimin receptor), un système de sécrétion de type III impliqué dans la translocation des effecteurs dans la cellule hôte (Figure 23(c) et (d)) et des protéines sécrétées (Esp ou *E. coli*-secreted protein) (CROXEN *et al.*, 2013 ; GARMENDIA *et al.*, 2005 ; PERNA *et al.*, 1998 ; PUHAR et SANSONETTI, 2014 ; A. R. WONG *et al.*, 2011). De plus, il a été montré dans un modèle murin que les lésions A/E sont essentielles pour induire la sécrétion d'IgA (Immuno-globuline A) dirigé contre *E. coli* O157:H7, contrairement à celle d'IgM et d'IgG (NAGANO *et al.*, 2014).

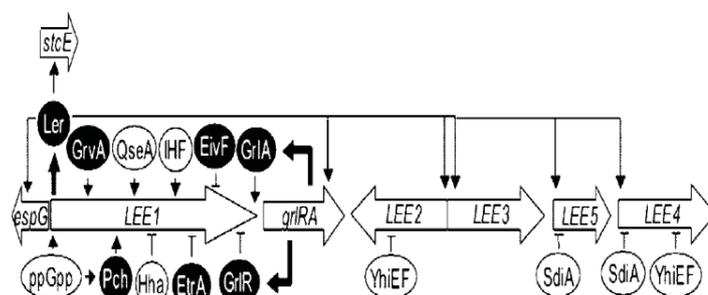
2.3.3.2 Autres facteurs d'adhésion

Des souches LEE-négatives ont été associées à des SHU. Ces souches EHEC « atypiques » possèdent d'autres facteurs d'adhésion permettant une colonisation de la muqueuse colique aussi efficace que l'A/E, comme par exemple l'adhésine Saa (STEC autoagglutinating adhesin) des souches O113:H21 isolées en Australie en 1998 ou les facteurs d'adhésion enteroaggrégants décrits chez *E. coli* O111:H2 en France en 1996 et chez *E. coli* O104:H4 responsable des épidémies allemande et française de 2011 (MARIANI-KURKDJIAN et BINGEN, 2012).

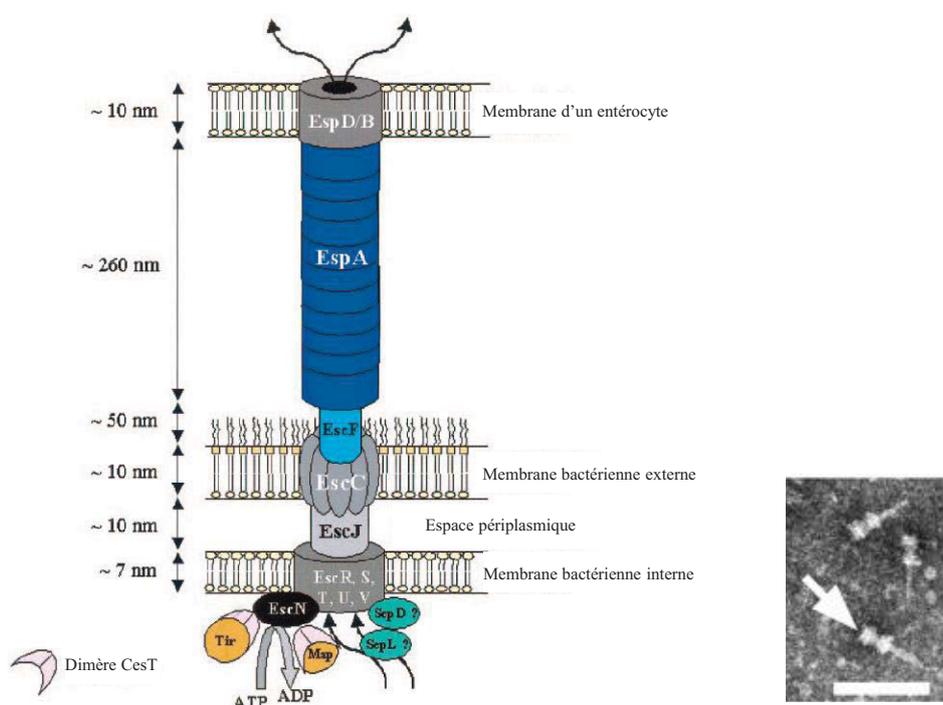
Le séquençage génomique de souches « typiques » EHEC O157:H7 indique qu'au moins douze régions codent des adhésines putatives. Une de ces régions contient des gènes étroitement liés à l'opéron *lpf* (*long polar fimbriae*) de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. En effet, l'analyse du génome de la souche O157:H7 EDL 933 a mis en évidence la présence des opérons *lpf1* et *lpf2*, respectivement dans les îlots de pathogénicité (O Islands, OI) OI₁₄₁ et OI₁₅₄. Les opérons *lpf* regroupent un ensemble de gènes, *i.e.* *lpfABCC'DE* chez *lpf1* et *lpfABCDD'* pour *lpf2*, codant la sous-unité fimbriale majeure (LpfA), une protéine chaperonne (LpfB), des protéines d'ancrage à la membrane (LpfC et LpfC') et des sous-unités fimbriales mineures (LpfD, LpfD' et LpfE). Les Lpf ont été décrits comme étant des facteurs impliqués dans l'adhésion aux cellules de l'épithélium intestinal en modèle cellulaire, mais le rôle des opérons *lpf* dans la pathogénicité des EHEC n'a pas encore été clairement défini (TORRES *et al.*, 2005). Cependant, les données *in vitro* de FARFAN *et al.* (2011) suggèrent que les interactions entre les Lpf et les protéines de la matrice extra-cellulaire du tube digestif (fibronectine, collagène de type IV et laminine) contribuent au processus de colonisation des EHEC dans le tractus intestinal.



(a) Lésion d'attachement et d'effacement



(b) Organisation du locus d'effacement des entérocytes



(c) Représentation schématique du système de sécrétion de type III (d) Seringue moléculaire

FIGURE 23. Lésions d'attachement et d'effacement chez les EHEC

(a) Observation au microscope électronique à transmission des lésions d'attachement et d'effacement chez les EPEC/EHEC. La flèche indique le piédestal, constitué d'actine cellulaire, résultant d'une désorganisation du cytosquelette de l'entérocyte aboutissant à la destruction locale des microvillosités intestinales (D'après A. R. WONG *et al.*, 2011). (b) Le LEE, organisé en cinq opérons majeurs, contient des gènes codant une protéine de membrane externe (l'intimine) et son récepteur cellulaire spécifique (Tir ou Translocated intimin receptor), un système de sécrétion de type III impliqué dans la translocation des effecteurs dans la cellule hôte et des protéines sécrétées Esp (D'après MELLIES *et al.*, 2007). (c) Représentation schématique du système de sécrétion de type III des EHEC (Modifié d'après GARMENDIA *et al.*, 2005). (d) Observation au microscope électronique à transmission d'une seringue moléculaire (au bout de la flèche blanche).

ADP : adénosine diphosphate, ATP : adénosine triphosphate, CesT : Chaperone of *E. coli* secretion T, Esc : *E. coli*-secreted component, Esp : *E. coli*-secreted protein, Map : Mitochondrial-associated protein, Sep : Secretion of *E. coli* proteins, Tir : Translocated intimin receptor

D'autres adhésines potentielles ont également été mises en évidence, comme le facteur codé par le locus chromosomique *efa-1*, des pili de type IV, des médiateurs de l'adhérence sans rôle évident dans la pathogénicité, *i.e.* les adhésines chromosomiques Iha (*Vibrio cholerae* IrgA homologue), Cah (calcium-binding antigen 43 homologue) et OmpA (outer membrane protein A) ou encore une protéine fimbriale mineure (YadK) sur-exprimée après un stress acide (CADONA *et al.*, 2013; CHINGCUANCO *et al.*, 2012; FOSTER *et al.*, 2013). De plus, en ce qui concerne *efa-1*, une version tronquée, *toxB* existe sur le plasmide pO157 de O157:H7. Bien que *toxB* soit utile dans le processus d'adhésion aux cellules épithéliales, la présence de ce gène influence seulement indirectement l'adhésion en modulant la production et la sécrétion des effecteurs, codés par le LEE, requis pour la formation des lésions A/E (TORRES *et al.*, 2005).

Ainsi de nombreux facteurs d'adhésions susceptibles de jouer un rôle dans la colonisation du tube digestif par les EHEC ont été décrits, mais leur implication dans la pathogénicité reste à démontrer.

2.3.4 Autres facteurs de virulence

D'autres facteurs de virulence potentiels, codés par des gènes présents sur le chromosome et/ou sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages ou îlots de pathogénicité), ont été décrits chez les souches EHEC comme l'entérohémolysine Ehx (gène plasmidique *ehxA*) responsable de la formation de pores dans la membrane cytoplasmique, l'entérohémolysine thermostable East-1 (gène chromosomique *astA*) jouant un rôle dans l'induction de la phase initiale de diarrhée aqueuse, la cytotoxine subtilase SubAB, la sérine protéase EspP (gène plasmidique *espP*) capable de cliver le facteur humain V de coagulation humain et contribuant au développement des colites hémorragiques, la catalase peroxydase périplasmique KatP (gène plasmidique *katP*), la métalloprotéase StcE (gène plasmidique *stcE*), des systèmes de captation du fer ou encore des uréases (BRUGÈRE *et al.*, 2012; GOUALI et WEILL, 2013; LAW, 2000). La liste de ces facteurs de virulence potentiels ne cesse de s'allonger mais, à ce jour, leur rôle dans la pathogénie des EHEC n'est pas totalement démontré. Une représentation simplifiée de la cartographie du génome *E. coli* O157:H7 EDL 933 et de ses plasmides est présenté en Figure 24.

2.3.5 Facteurs environnementaux du tractus digestif humain régulant l'expression des gènes de virulence des EHEC

Les agents pathogènes d'origine alimentaire, comme les EHEC, sont soumis à différents stress préalablement à leur ingestion et dans le tractus digestif. Les contraintes les plus courantes lors de la transformation, le stockage et la préparation des aliments sont la température, la pression osmotique et l'acidité de la matrice alimentaire (CHUNG *et al.*, 2006; J. SMITH *et al.*, 2013). Néanmoins, ces facteurs ne seront pas décrits dans ce manuscrit, seuls seront répertoriés les facteurs présents dans l'environnement digestif humain afin de comprendre comment ils peuvent jouer un rôle dans la régulation spatio-temporelle de la virulence des EHEC lors de leur passage dans le tractus gastro-intestinal.

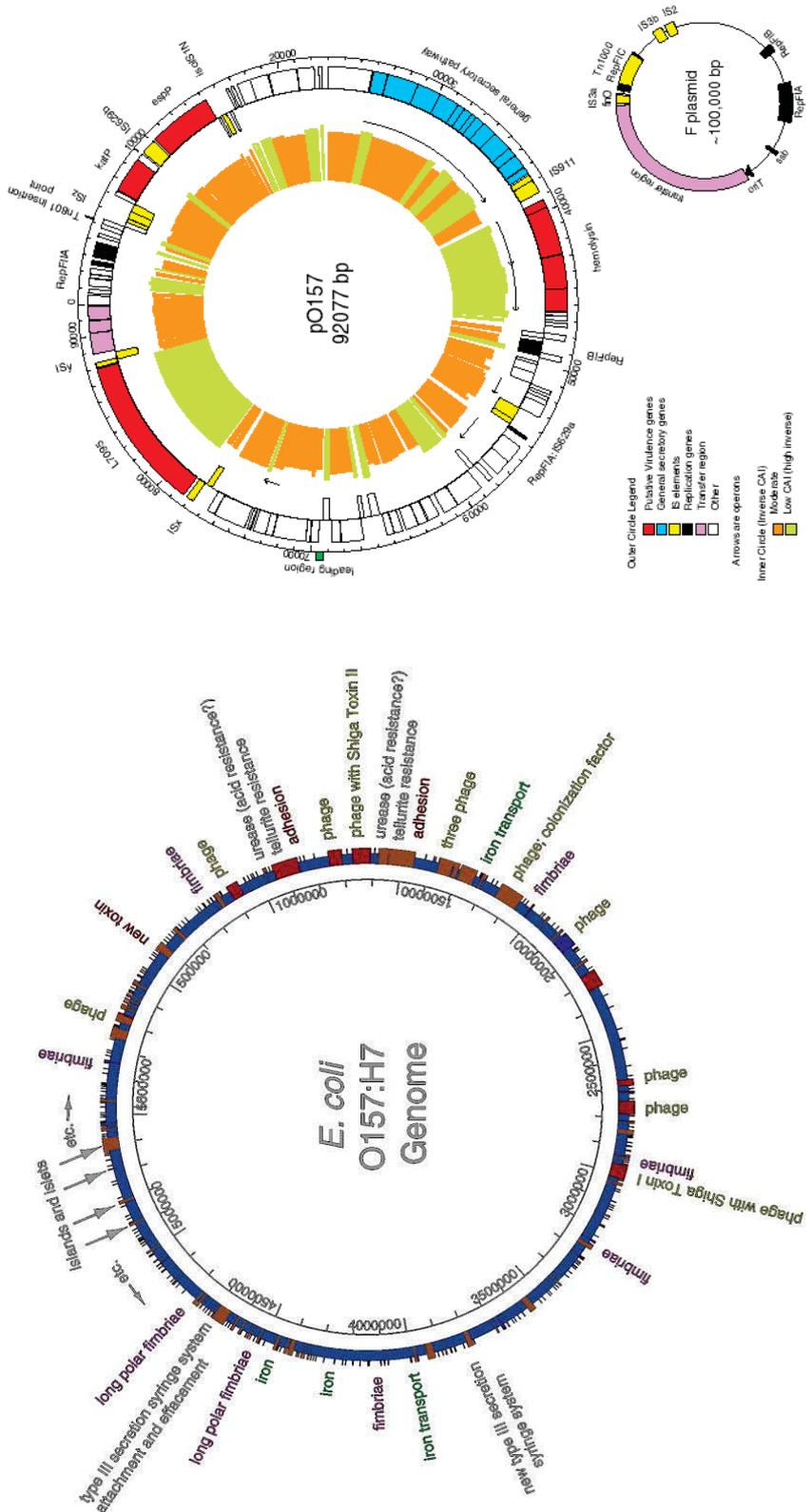


FIGURE 24. Représentation simplifiée de la cartographie du génome *E. coli* O157:H7 EDL 933 et de ses plasmides (2001). (a) Le cercle externe du génome représente l'échelle en nucléotides. Les îlots de pathogénicité sont matérialisés en rouge (D'après PERNA *et al.* (2001)). (b) Le cercle externe de pO157 représente l'échelle en nucléotides. L'orientation de la transcription est dans le sens horaire pour les cadres de lecture extérieurs et dans le sens anti-horaire pour les cadres de lecture internes. Les opérons sont indiqués par des flèches. La cartographie du plasmide F-like est approximative par absence de séquençage complet (D'après BURLAND *et al.* (1998)). La bp : paire de bases, CAI : Codon Adaptation Index

Cependant, les données recueillies à ce jour sont encore restreintes et obtenues dans des conditions expérimentales simples restant éloignées de celles observées dans le tractus digestif de l'Homme.

2.3.5.1 Acidité

Les *E. coli* possèdent différents systèmes de résistance à l'acidité (AR2 à 5, HdeA et B), détaillés au paragraphe 2.3.1, permettant de survivre au transit gastrique. En plus de l'expression de systèmes de résistance à l'acidité, l'exposition à des pH acides peut déclencher l'induction ou la répression de certains gènes de virulence des EHEC. HOUSE *et al.* (2009) ont analysé les profils d'expression génique obtenus par biopuce à ADN, de souches O157:H7 stressées ou non (pH 3 ou pH 7). Aucun changement dans l'expression des gènes *stx* n'a pu être mis en évidence après un stress acide, mais ce dernier induit une augmentation de la motilité et de l'adhésion des EHEC et une diminution de l'expression de gènes impliqués dans le système de sécrétion de type III. De plus, une adhésine putative sur-exprimée lors d'un stress acide, YadK, joue un rôle significatif dans l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales (CHINGCUANCO *et al.*, 2012).

2.3.5.2 Sels biliaires

La bile est un facteur de l'environnement digestif qui contrôle l'expression de facteurs de colonisation et de virulence de plusieurs bactéries entériques, comme *Vibrio cholerae* (HUNG et MEKALANOS, 2005), *Campylobacter jejuni* (MALIK-KALE *et al.*, 2008), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (PROUTY *et al.*, 2004), ou encore les AIEC (CHASSAING *et al.*, 2013). La résistance aux sels biliaires est obtenue grâce à des transporteurs actifs utilisant des pompes à efflux (BEGLEY *et al.*, 2005). L'analyse par biopuce à ADN du transcriptome d'une souche O157:H7 traitée avec des sels biliaires (0,15%) montre une sur-expression des gènes *acrA* et *acrB* impliqués dans la formation du système d'efflux AcrAB-TolC (KUS *et al.*, 2011). Ce dernier est connu comme étant un transporteur des sels biliaires mais il est également capable de transporter au moins cinq classes d'antibiotiques, *i.e.* β -lactames, fluoroquinolones, macrolides, tétracyclines et triméthoprime (MESAROS *et al.*, 2005). KUS *et al.* (2011) ont également rapporté une sous-expression des gènes *stx2* après un stress aux sels biliaires mais aucun changement dans l'expression des facteurs de virulence portés par le LEE n'a pu être mis en évidence.

2.3.5.3 Éthanolamine

Le renouvellement constant des cellules épithéliales intestinales génère un grand nombre de métabolites issus de la membrane lipidique comme le produit de la décomposition de la phosphatidyl-éthanolamine, l'éthanolamine. Cette dernière constitue une source d'azote pour les EHEC dans le contenu intestinal des bovins, en raison de l'induction d'un cluster de gènes *eut* codant entre autre pour une sous-unité de l'enzyme catalysant la libération d'ammoniac à partir de l'éthanolamine (BERTIN *et al.*, 2011). Parallèlement, des études récentes de KENDALL *et al.* (2012) indiquent que l'éthanolamine peut servir

de signal environnemental aux EHEC modulant ainsi l'expression de certains facteurs de virulence. En effet, dans un milieu minimum contenant de l'éthanolamine, les EHEC sur-expriment des gènes codant des régulateurs de virulence comme le ler (LEE-encoded-regulator), ainsi que *stx2a*. De plus, l'éthanolamine favorise l'apparition des lésions A/E dans un modèle cellulaire et conduit à la sur-expression des gènes fimbriaux *i.e.* *loc2* (*yad*), *loc7* (*csg*, *curli*), *loc10* (*stf*), *loc11* (*yra*) et *loc12* (*lpf1*). EutR est un régulateur transcriptionnel qui active l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de l'éthanolamine en réponse à ce dernier et à la vitamine B₁₂ (LUZADER *et al.*, 2013). Les loci fimbriaux régulés par l'éthanolamine sous la dépendance de EutR sont *loc2*, *loc7*, *loc11* et *loc12* (GONYAR et KENDALL, 2014).

2.3.5.4 Microbiote intestinal et métabolites fermentaires

Lors de leur passage dans le tractus digestif, les EHEC sont confrontés au microbiote intestinal et ses produits fermentaires. Les interactions entre le microbiote intestinal et les EHEC sont peu documentées. Le quorum sensing est un système de signalisation inter-cellulaire par lequel une bactérie appréhende la densité de population des bactéries de son environnement, et le cas échéant régule l'expression de certains de ses gènes. Le microbiote intestinal produit des molécules signalisatrices de quorum sensing, dont l'autoinducteur 3 (AI-3). Ce dernier est détecté par les EHEC et induit une augmentation de la synthèse flagellaire et de la motilité. Cette augmentation de la motilité permettrait à l'agent pathogène d'approcher au plus près de l'épithélium intestinal (FOSTER *et al.*, 2013). Cependant, d'autres molécules sécrétées par le microbiote intestinal sembleraient au contraire protéger l'hôte : DE SABLET *et al.* (2009) ont montré, *in vitro* et *ex vivo*, que des facteurs solubles libérés par *Bacteroides thetaiotaomicron* répriment la synthèse de Stx2 indépendamment du quorum-sensing.

Comme cela a été décrit au paragraphe 1.1.2.4, les trois principaux AGCC présents dans le côlon sont l'acétate, le propionate et le butyrate. Les concentrations en AGCC totales décroissent entre les différentes parties anatomiques du côlon : de 127 mmol/L dans le côlon ascendant à 90 mmol/L dans le côlon descendant (CUMMINGS *et al.*, 1987). *In vitro*, des concentrations comprises entre 6,25 et 25 mmol/L d'un mélange de ces trois AGCC augmentent la production des protéines Tir et EspB et la réduisent à des concentrations supérieures. Une concentration de 20 mmol/L d'acétate permet de réduire la production des protéines codées par le LEE et *a contrario* augmente avec du propionate et du butyrate. L'utilisation d'une biopuce à ADN a également permis de montrer que l'augmentation de l'expression des gènes portés par le LEE par le butyrate conduirait à la production d'un système de type III fonctionnel (NAKANISHI *et al.*, 2009).

De plus, les AGCC majoritaires induisent une augmentation de la synthèse flagellaire et de la motilité, mais seul le butyrate active simultanément les gènes du LEE et des gènes flagellaires (Figure 25). En effet, le butyrate, via la protéine régulatrice Lrp (leucine-responsive regulatory protein), active d'une

part les gènes du LEE et d'autre part les gènes régulateurs *flhD* et *flhC*. De plus, les trois AGCC majoritaires peuvent activer la synthèse flagellaire en aval, et indépendamment, de l'activation de *flhD* et *flhC*. Ainsi, en fonction des concentrations en AGCC rencontrées dans l'intestin, les EHEC activent la production et la motilité flagellaire, puis les gènes impliqués dans l'adhésion et le système de sécrétion de type III. Enfin, le régulateur GrlA, codé par le LEE, réprime l'expression des gènes flagellaires des bactéries adhérant aux entérocytes (TOBE *et al.*, 2011).

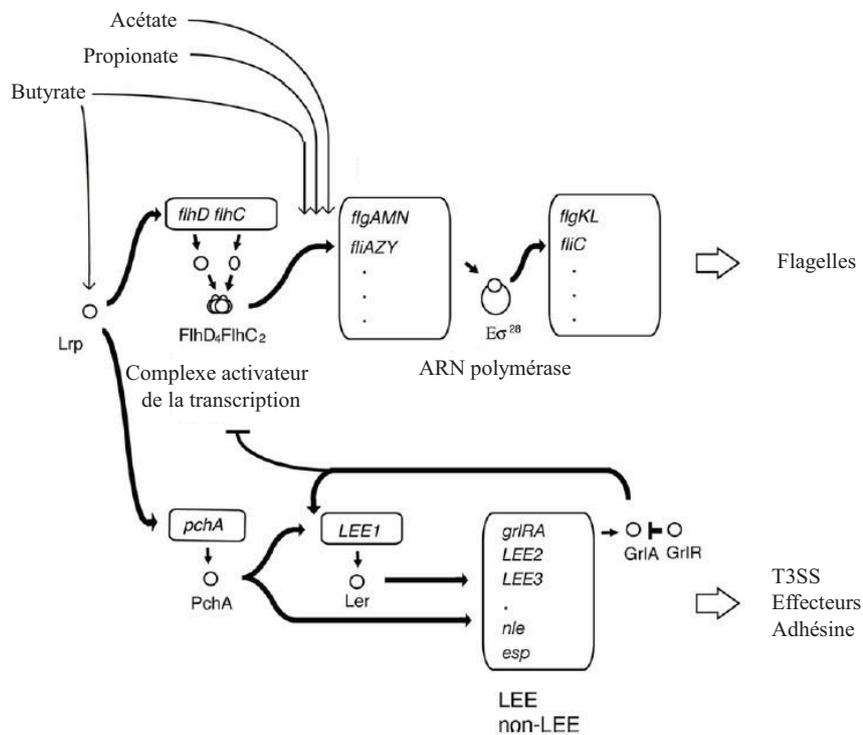


FIGURE 25. Régulation des gènes flagellaires et du LEE par les AGCC

L'acétate et le propionate activent l'expression des gènes flagellaires indépendamment de la protéine régulatrice Lrp. Le butyrate active l'expression des gènes flagellaires via la protéine régulatrice Lrp et/ou indépendamment. Parallèlement, l'expression des gènes du LEE est activée par le butyrate via le Lrp (Modifié d'après TOBE *et al.*, 2011).

esp : *E. coli*-secreted protein, LEE : Locus d'effacement des entérocytes, Ler : LEE-encoded-regulator, Lrp : leucine-responsive regulatory protein, T3SS : système de sécrétion de type III

2.3.5.5 Adrénaline et noradrénaline

L'adrénaline et la noradrénaline peuvent être utilisées par les EHEC comme des signaux de régulation des facteurs de virulence (motilité et formation de lésions A/E). Les EHEC utilisent des senseurs histidine kinases QseC et QseE comme senseurs des deux hormones. QseC, via sa parenté avec le régulateur QseB, régule positivement l'expression des gènes flagellaires et des gènes impliqués dans la motilité. QseF et QseC sont capables d'activer la production de Stx. Enfin, QseC régule les gènes du LEE via KdpE (NJOROGE *et al.*, 2012; NJOROGE et SPERANDIO, 2012). La cascade de signalisation QseC et QseE adrénérique et noradrénérique chez les EHEC est représentée dans la Figure 26. La régulation des gènes de virulence des EHEC par l'adrénaline et la noradrénaline est complexe et n'est pas encore entièrement connue. Néanmoins, il semblerait que les EHEC coordonnent les réponses à l'AI-3 produit par le microbiote intestinal en réponse à l'adrénaline et la noradrénaline pour (i) participer au repérage d'un site de colonisation, (ii) augmenter la production de Stx et (iii) améliorer leur approche de l'épithélium intestinal en augmentant la motilité et la formation de lésions A/E (FOSTER *et al.*, 2013; HUGHES *et al.*, 2009).

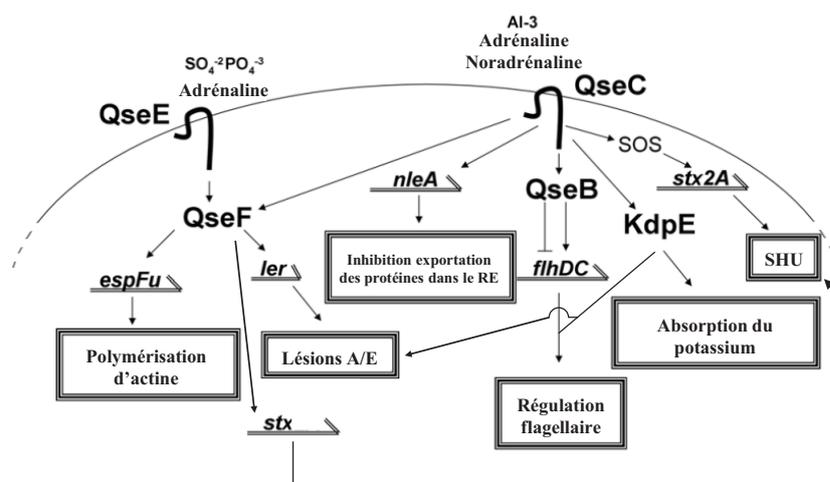


FIGURE 26. Cascade de signalisation QseC et QseE adrénérique et noradrénérique chez les EHEC. Les EHEC utilisent QseC et QseE comme senseurs de l'adrénaline et de la noradrénaline. Cette cascade de signalisation participerait, entre autre, au rapprochement des EHEC de l'épithélium intestinal en augmentant la motilité et la formation de lésions A/E (Modifié d'après HUGHES *et al.*, 2009).

esp : *E. coli*-secreted protein, ler : LEE-encoded-regulator, RE : réticulum endoplasmique, SHU : syndrome hémolytique et urémique, stx : Shiga-toxine

2.3.5.6 Concentration en oxygène

L'environnement du tractus gastro-intestinal est caractérisé par des concentrations en oxygène variables en fonction de la localisation. De plus, alors que la lumière du tractus intestinal est relativement

anaérobie, une zone d'oxygénation existe au voisinage de la surface de la muqueuse qui est générée par diffusion de l'oxygène à partir du réseau de capillaires des microvillosités. Les mécanismes impliqués dans la modulation de la virulence des EHEC par l'oxygène dans l'environnement digestif ne sont pas encore connus. Néanmoins, il a été récemment montré *in vitro* que l'environnement microaérobie de l'intestin humain favorise la macropinocytose de Stx2 à travers l'épithélium intestinal humain avec des teneurs en oxygène comprises entre 1,4 et 1,7% (TRAN *et al.*, 2014).

2.3.5.7 Monoxyde d'azote

Les cellules de la muqueuse intestinale peuvent développer un programme de défense non spécifique en réponse aux bactéries entéropathogènes. Cette réponse immunitaire innée se caractérise notamment par la synthèse de monoxyde d'azote. Ce dernier est un radical libre qui peut endommager les bactéries et/ou induire des modifications transcriptionnelles via des senseurs. VAREILLE *et al.* (2007) ont montré que le monoxyde d'azote peut inhiber la production de Stx par les EHEC sans altérer leur viabilité.

2.4 Diagnostic et stratégies thérapeutiques des infections à EHEC

2.4.1 Diagnostic

Le diagnostic des infections à EHEC est difficile à réaliser ; les bactéries étant rapidement éliminées du tube digestif, le recueil des selles doit s'effectuer au maximum quatre à six jours après le début des symptômes digestifs. De plus, en particulier au moment du SHU, la diarrhée peut être absente et il est alors indispensable de pratiquer un écouvillonnage rectal pour la recherche des EHEC (Figure 27). Le diagnostic repose sur la mise en évidence, directement dans les selles et/ou après un enrichissement, des gènes de virulence (*stx* et *eae*), des Shiga-toxines ou de la présence d'anticorps spécifiques anti-lipopolysaccharides dans le sérum (MARIANI-KURKDJIAN et BINGEN, 2012 ; MARIANI-KURKDJIAN et BONACORSI, 2014).

2.4.1.1 Recherche microbiologique

Les EHEC étant présents en quantité parfois très faible dans les selles (inférieures à 10^2 /g de selles), il est indispensable de réaliser un enrichissement. En médecine humaine, l'eau peptonée tamponnée additionnée de vancomycine et de céfixime est classiquement utilisée comme milieu d'enrichissement. Le diagnostic microbiologique classique d'une infection à EHEC O157:H7 est aisé à mettre en œuvre, dans un bouillon d'enrichissement, par la mise en évidence des caractéristiques biochimiques particulières de ce sérotype, *i.e.* l'absence de fermentation du sorbitol et l'absence de β -glucuronidase. Ces caractéristiques permettent l'utilisation de milieux sélectifs comme les milieux Mac Conkey Sorbitol (SMAC), CHROMagar O157:H7 et O157:H7 ID (BioMérieux). Les sérotypes non-O157 n'ont pas de propriété

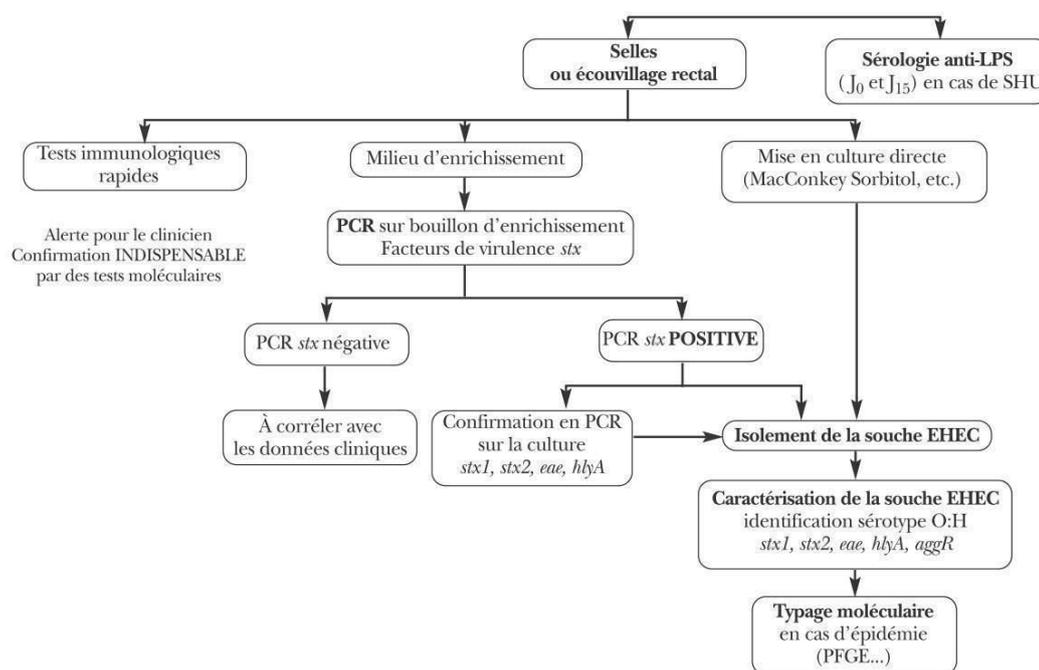


FIGURE 27. Diagnostic d'une infection à EHEC

D'après MARIANI-KURKDJIAN et BONACORSI, 2014.

EHEC : *E. coli* entérohémorragiques, LPS : lipopolysaccharide, PCR : polymérase chain reaction, PFGE : électrophorèse en champ pulsé, SHU : syndrome hémolytique et urémique

biochimique commune permettant leur isolement sélectif sur un milieu particulier. Leur recherche nécessite d'avoir recours à des méthodes moléculaires et consiste en la mise en évidence de facteurs de virulence (MARIANI-KURKDJIAN et BINGEN, 2012). Cependant, une technique permettant de détecter et de différencier les colonies des sept principaux sérogroupes de STEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145 et O157) sur différents milieux chromogènes sélectifs en fonction des modèles de dispersion optique a été récemment développée par TANG *et al.* (2014) ; cette technique est appelée BARDOT (Bacterial Rapid Detection using Optical scattering Technology).

2.4.1.2 Recherche de gènes de virulence

Compte-tenu de la présence en faible quantité des EHEC dans les selles, l'amplification génique *in situ* par PCR (polymérase chain reaction) basée sur la recherche des gènes *stx* et/ou *eae* représente la méthode la plus sensible. En cas de détection d'un des gènes de virulence des EHEC par PCR, l'isolement de la bactérie est indispensable pour caractériser la souche pathogène (ESPIÉ *et al.*, 2008).

2.4.1.3 Recherche de Shiga-toxines dans les selles

La technique de référence pour la recherche de Shiga-toxines libres sur filtrat de selles est la cytotoxicité sur cellules Vero ou HeLa, spécifique si elle est neutralisée par un antisérum anti-Stx (FACH *et al.*,

2003). Cependant, des techniques immunologiques de type ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ont été développées, e.g. Premier[®] EHEC test (Meridian Bioscience) ou encore Ridascreen[®] Verotoxin Enzyme Immunoassay (R-Biopharm) (BEUTIN *et al.*, 2007; WILLFORD *et al.*, 2009).

2.4.1.4 Sérodiagnostic

Dans la majorité des cas, les malades développent des anticorps anti-lipopolysaccharides dont la détection est facilement réalisable par ELISA, Western-blot, immunoblotting ou hémagglutination indirecte. Le diagnostic sérologique doit être réalisé sur un sérum « précoce » et un sérum « tardif », afin de rechercher la présence d'IgG, d'IgM et d'IgA anti-lipopolysaccharides. Ces trois classes d'anticorps sont détectables précocement et permettent d'attester d'une infection à EHEC même plusieurs semaines après le début des symptômes digestifs. De plus, la recherche de ces anticorps est indispensable pour le diagnostic en complément de la PCR et pour des études épidémiologiques lorsque la mise en évidence directe des gènes de virulence des EHEC est impossible dans les selles (ESPIÉ *et al.*, 2008; MARIANI-KURKDJIAN et BINGEN, 2012).

2.4.2 Stratégies thérapeutiques

Il n'existe, à ce jour, aucun traitement étiologique des infections à EHEC. Seul un traitement symptomatique du SHU est possible (diurèse forcée, hémodialyse, transfert de plasma frais congelé), permettant à la fois de compenser les pertes hydriques dues aux diarrhées et de soutenir les fonctions rénales (SCHEIRING *et al.*, 2010; TARR *et al.*, 2005). En effet, les niveaux de fluide et l'équilibre électrolytique sont extrêmement importants dans la gestion du développement du SHU (GOLDWATER et BETTELHEIM, 2012). Le traitement de cette maladie vise donc à améliorer les complications relatives à la gastro-entérologie, l'hématologie, l'angiologie et la néphrologie (BITZAN, 2009).

Plusieurs traitements couramment utilisés en clinique pour traiter les infections bactériennes ne sont pas conseillés pour des patients infectés par les EHEC : c'est le cas de l'antibiothérapie, de l'usage d'anti-diarrhéiques et des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (TARR *et al.*, 2005). L'administration d'antibiotiques est controversée. En effet, les phages portant les gènes *stx* sont inductibles comme les autres phages de type λ . Cette induction passe par un système bactérien de réponse au stress : le système SOS. La synthèse de Stx2 est induite par un grand nombre d'antibiotiques dont ceux de la classe des quinolones (ZHANG *et al.*, 2000). Ces derniers sont des agents activateurs du système SOS par l'inhibition d'une ADN gyrase, ce qui provoque une altération de l'ADN et une activation de la protéine RecA. Les antibiotiques pourraient favoriser la production de Shiga-toxines par les EHEC et par conséquent avoir un effet négatif sur la santé du patient traité en aggravant ses symptômes (C. S. WONG *et al.*, 2000). Cependant, une méta-analyse des vingt études réalisées entre 1982 et 2005, concernant près de 2500 patients, comparant le risque de SHU selon que les patients aient reçu ou non des antibiotiques au

stade diarrhéique, n'as pas permis d'exclure l'antibiothérapie du traitement des infections à EHEC. En effet, les données suggèrent que les quinolones, en particulier lorsqu'elles sont administrées rapidement après l'apparition des premiers symptômes cliniques, ne peuvent être contre-indiquées (PANOS *et al.*, 2006). Néanmoins, l'utilisation des antibiotiques bactéricides n'est pas recommandée chez les patients atteints d'une infection à EHEC (MARIANI-KURKDJIAN et BINGEN, 2012; SCHEIRING *et al.*, 2010; SZYCH *et al.*, 2014). *A contrario*, l'utilisation d'antibiotiques bactériostatiques, comme l'azythromycine, est envisageable, car elle n'entraîne pas de libération de Stx et permet d'éradiquer les EHEC en trois jours. Cependant, une étude prospective⁶ sur l'effet de cet antibiotique au stade diarrhéique ou en début de SHU est nécessaire (ULINSKI, 2013).

Par ailleurs, les anti-diarrhéiques ont été associés à un risque accru de développement de SHU ou à des complications neurologiques de la maladie en augmentant la durée du transit intestinal et la probabilité de translocation des bactéries et de leurs toxines (BELL *et al.*, 1997; CIMOLAI *et al.*, 1992; TARR *et al.*, 2005). Enfin, les anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent diminuer le flux sanguin rénal (MURRAY et BRATER, 1993). En outre, ces agents doivent être utilisés avec prudence car leurs métabolites peuvent engendrer une insuffisance rénale (CIMOLAI *et al.*, 1992; SERNA IV et BOEDEKER, 2008).

La compréhension des mécanismes de l'expression des gènes *stx* et du mode d'action des toxines contribue à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. Actuellement, les stratégies expérimentales visant à limiter les complications associées aux infections à EHEC sont basées sur l'utilisation de composés anti-bactériens, de neutraliseurs de toxines, d'anticorps visant à inhiber des voies métaboliques impliquées dans le processus infectieux et de vaccins (GOLDWATER et BETTELHEIM, 2012). À ce jour, parmi ces stratégies, trois semblent prometteuses : (i) l'utilisation d'inhibiteurs du quorum sensing pour moduler négativement l'expression de certains gènes de virulence des EHEC, (ii) la vaccination et l'immunothérapie pour prévenir et traiter ces infections, et (iii) la captation des Stx pour éviter leur liaison au Gb3 des cellules cibles (PACHECO et SPERANDIO, 2012; RASKO et SPERANDIO, 2010).

Les EHEC peuvent, via le quorum sensing et plus particulièrement le QseC, déclencher l'expression de gènes flagellaires et du LEE et ainsi favoriser la colonisation de l'hôte. En raison de l'importance de QseC dans la régulation de la virulence des EHEC, un inhibiteur de la régulation de la virulence médiée par QseC a été identifié (LED209) permettant d'empêcher l'autophosphorylation de ce senseur, sans affecter la croissance bactérienne. Cependant, l'efficacité de ces inhibiteurs de quorum sensing n'a pas été testée lors d'essais cliniques chez l'homme (PACHECO et SPERANDIO, 2012).

Plusieurs stratégies vaccinales ont été utilisées avec un succès variable dans des modèles animaux. Ces stratégies ont impliqué l'utilisation de protéines recombinantes de virulence tels que les Stx, l'inti-

6. Étude longitudinale des phénomènes qui vont affecter un échantillon de population en le comparant à un autre, sélectionné selon des critères différents ou exposé à d'autres conditions.

mine, l'EspA, ou encore des protéines de fusion des sous-unités A et B de Stx1 et Stx2. La vaccination de souris avec un vaccin oral à base de plants de tabac recombinants produisant Stx2 les protège contre l'intoxication systémique avec Stx2, létale chez les souris non-immunisées (WEN *et al.*, 2006). Bien que ces résultats soient encourageants, ils doivent être interprétés avec prudence, l'infection à EHEC chez la souris ne reproduisant pas l'infection humaine dans sa globalité (NAYLOR *et al.*, 2005).

Les Stx se lient aux récepteurs Gb3 présents principalement aux niveaux rénal et cérébral, ce qui provoque des microangiopathies thrombotiques. Ainsi, de nombreux analogues du récepteur Gb3 ont été conçus dans le but de bloquer cette étape de la physiopathologie des infections à EHEC. Cependant, les essais cliniques évaluant l'utilisation ces composés n'ont pas été concluants (PACHECO et SPERANDIO, 2012). L'échec d'un traitement par voie orale avec un analogue du récepteur Gb3, le Synsorb Pk (trisaccharide synthétique couplé de manière covalente à une silice qui lie et neutralise les Stx), n'est pas surprenant compte tenu de la rareté des toxines libres fécales chez les enfants atteints de SHU après une infection à *E. coli* O157:H7 (PACHECO et SPERANDIO, 2012; TARR *et al.*, 2005).

L'utilisation d'anticorps monoclonaux inhibant l'activation de la fraction C5 du complément (Eculizumab) pourrait être une stratégie prometteuse pour prévenir les complications les plus graves de l'infection à EHEC. En effet, LAPEYRAQUE *et al.* (2011) ont montré que ce composé a permis d'améliorer les fonctions rénales et neurologiques de trois enfants de moins de trois ans avec un SHU sévère lors de l'épidémie allemande de 2011.

Enfin, il a été récemment montré en modèles cellulaire et murin que l'ion manganèse (Mn^{2+}) bloque le trafic des Stx dans l'appareil de Golgi, offrant une nouvelle piste thérapeutique peu onéreuse qui devrait conduire à des essais contrôlés randomisés chez l'homme (MUKHOPADHYAY et LINSTEDT, 2012).

Pour conclure, il reste d'importants obstacles à la réussite d'un traitement curatif des infections à EHEC étant donné la complexité de la physiopathologie. Ainsi, il est peu probable que le ciblage d'une seule voie de la physiopathologie soit suffisant dans la réussite d'un traitement, une approche multi-factorielle semblant nécessaire.

Chapitre 3

Escherichia coli entérohémorragiques et probiotiques

Sommaire

3.1 Les probiotiques	83
3.1.1 Historique et définitions	83
3.1.2 Caractéristiques et nature des probiotiques	84
3.1.3 Mode d'action des probiotiques bactériens	86
3.1.4 Mode d'action des probiotiques à base de levures	88
3.1.5 Risques associés aux stratégies probiotiques	89
3.2 Stratégie probiotique dans la prévention et/ou le traitement des infections à EHEC	90
3.2.1 EHEC et probiotique : Exclusion	90
3.2.2 EHEC et probiotique : Antagonisme direct	96
3.2.3 EHEC et probiotique : Immunomodulation	100

3.1 Les probiotiques

3.1.1 Historique et définitions

L'appellation « probiotique » est d'usage relativement récent, mais l'idée d'ingérer des micro-organismes exogènes afin de moduler favorablement le microbiote endogène, qui constitue la base du concept des probiotiques, n'est pas nouvelle. Le biologiste russe et prix Nobel de physiologie ou médecine Ilya Ilyrich Mechnikov (ou Élie Metchnikoff) a proposé en 1907 « d'adopter des mesures pour modifier la flore dans nos corps et remplacer les microbes nocifs par des microbes utiles », en soulignant l'importance de la consommation de produits laitiers fermentés pour l'amélioration de la qualité de la vie et de la

longévité. Le terme probiotique provient de deux mots grec, *pro* et *bios*, qui signifient littéralement « en faveur de la vie ». Ce terme a été introduit en 1953 par Werner Kollath pour décrire les compléments alimentaires organiques et inorganiques appliqués à rétablir la santé de patients souffrant de malnutrition et différencier ces « probiotiques » des antibiotiques. Depuis cette époque, le terme a subi plusieurs transformations. Ainsi, Roy Fuller, en 1989, a défini les « probiotiques » comme complément alimentaire microbien vivant qui apporte un avantage à l'hôte en améliorant son équilibre intestinal (RAUCH et LYNCH, 2012, pour revue). Cette définition a été largement utilisée par l'ensemble du monde scientifique, cependant depuis 2001, la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) officialisent la définition du terme « probiotique » afin d'éviter des abus de langage et des dérives. Les probiotiques sont donc définis comme des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte » (FAO/WHO, 2001 ; C. HILL *et al.*, 2014).

3.1.2 Caractéristiques et nature des probiotiques

3.1.2.1 Critères de sélection d'un probiotique

Pour être considéré comme probiotique, un micro-organisme doit posséder différentes caractéristiques (Tableau 12). Un probiotique doit être une souche non pathogène, non toxique, non allergisante. Pour être utilisés en santé humaine, les probiotiques doivent présenter une innocuité totale pour l'hôte et bénéficier du statut GRAS (Generally Recognized As Safe) défini par la FDA (Federal Drug Administration) aux États-Unis et/ou du statut de présomption d'innocuité reconnue ou QPS (Qualified Presumption of Safety) défini par l'EFSA (European Food Standard Agency) en Europe. Un probiotique doit être vivant et actif dans l'environnement digestif. Ainsi, il doit être résistant à l'acidité gastrique et aux sels biliaires afin de pouvoir exercer ses effets bénéfiques dans le tractus gastro-intestinal (DUNNE *et al.*, 2001 ; KLAENHAMMER et KULLEN, 1999 ; SANDERS, 2008).

Il est difficile, voire même impossible, de sélectionner une souche probiotique idéale remplissant la totalité des critères de sélection (Tableau 12). Dans la pratique, d'un point de vue industriel et économique, le choix d'un produit probiotique est toujours un compromis entre les différentes propriétés bénéfiques et les critères techniques de production des souches testées. Par ailleurs, il est admis que les effets exercés par les probiotiques sont propres à une souche considérée et ne peuvent être extrapolés d'une souche à l'autre, même si elles appartiennent au même genre ou à la même espèce.

3.1.2.2 Micro-organismes probiotiques

Les probiotiques sont des bactéries ou des levures ingérées vivantes, présentes ou non dans le microbiote intestinal résident. Les micro-organismes probiotiques sont principalement des bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (PENNER *et al.*, 2005). Toutefois, la souche

TABLEAU 12. Critères de sélection des souches probiotiques

Critères de sécurité	<ul style="list-style-type: none"> Identification taxonomique exacte Non toxique, non pathogène, GRAS et/ou QPS Pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques
Critères technologiques	<ul style="list-style-type: none"> Adapté à une production de masse et un stockage Viabilité des populations élevée dans le produit commercialisé (10^6 à 10^8 UFC/g) Stabilité des caractéristiques désirées pendant la préparation et le stockage Qualités organoleptiques souhaitables (ou pas de qualités indésirables) lorsqu'ils sont inclus dans des aliments ou des procédés de fermentation Génétiquement stable
Compétitivité	<ul style="list-style-type: none"> Survie et activité métabolique au niveau du site cible <i>in vivo</i> Tolérance à l'acidité, aux sels biliaires et aux enzymes digestives Capable de rivaliser avec le microbiote résident et les métabolites fermentaires Adhésion et colonisation potentielle
Performances et fonctionnalités	<ul style="list-style-type: none"> Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé (efficacité documentée et prouvée dans des études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> contrôlées chez l'Homme) Action antagoniste vis-à-vis de bactéries pathogènes Production de substances anti-microbiennes et/ou bioactives (enzymes, peptides, bactériocines, peroxyde d'hydrogène, acides organiques ou autres composés inhibiteurs) Propriétés immunostimulantes Anti-mutagène et anti-cancérigène

Modifié d'après KLAENHAMMER et KULLEN, 1999.

TABLEAU 13. Exemples de souches probiotiques bactériennes et de levures et effets rapportés

Souches	Effets rapportés dans les études cliniques
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LC1	Renforcement du système immunitaire, adhésion aux cellules intestinales humaines, normobiose du microbiote intestinal
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFO1748	Réduction des enzymes fécales, prévention de la diarrhée associée à la radiothérapie, traitement de la constipation
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Prévention de la diarrhée associée aux antibiotiques, traitement et prévention de la diarrhée à rotavirus, traitement de la diarrhée récurrente à <i>Clostridium difficile</i> , prévention de la diarrhée aiguë, action antagoniste vis-à-vis de bactéries carcinogènes
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Prévention des troubles intestinaux, homéostasie du microbiote intestinal, réduction des enzymes fécales, inhibition du cancer superficiel de la vessie
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Réduction des enzymes fécales, survie dans le tractus intestinal
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Traitement de la diarrhée à rotavirus, homéostasie du microbiote intestinal, traitement des diarrhées d'origine virale
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Prévention de la diarrhée du voyageur, prévention et traitement de la diarrhée à <i>Clostridium difficile</i>

Modifié d'après DUNNE *et al.*, 2001.

GRAS : Generally Recognized As Safe, QPS : Qualified Presumption of Safety

non pathogène *E. coli* Nissle 1917, certaines souches de *Bacillus subtilis* et les levures du genre *Saccharomyces* sont également considérés comme des probiotiques (Tableau 13). Les probiotiques représentent aujourd'hui un poids économique majeur (39 milliards d'euros par an dans le monde) en constante augmentation, cette dynamique étant soutenue par le lien existant entre l'alimentation et les bénéfices santé (CASELLI *et al.*, 2013). Les principales souches utilisées dans l'industrie agro-alimentaire sont *Lactobacillus casei* et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN 173 010, respectivement dans l'Actimel et l'Activia commercialisés par Danone® ; et dans l'industrie pharmaceutique *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (*S. boulardii*) dans l'Ultra-levure (Biocodex®).

3.1.3 Mode d'action des probiotiques bactériens

Les modes d'action par lesquels certains probiotiques bactériens exercent des effets prophylactiques ou curatifs ne sont pas complètement élucidés, mais plusieurs mécanismes ont été proposés (Figure 28). Les mécanismes d'action majeurs des probiotiques comprennent (i) l'exclusion (amélioration de la fonction de barrière intestinale et exclusion compétitive des micro-organismes pathogènes), (iii) l'antagonisme direct et (iv) la modulation du système immunitaire (BERMUDEZ-BRITO *et al.*, 2012).

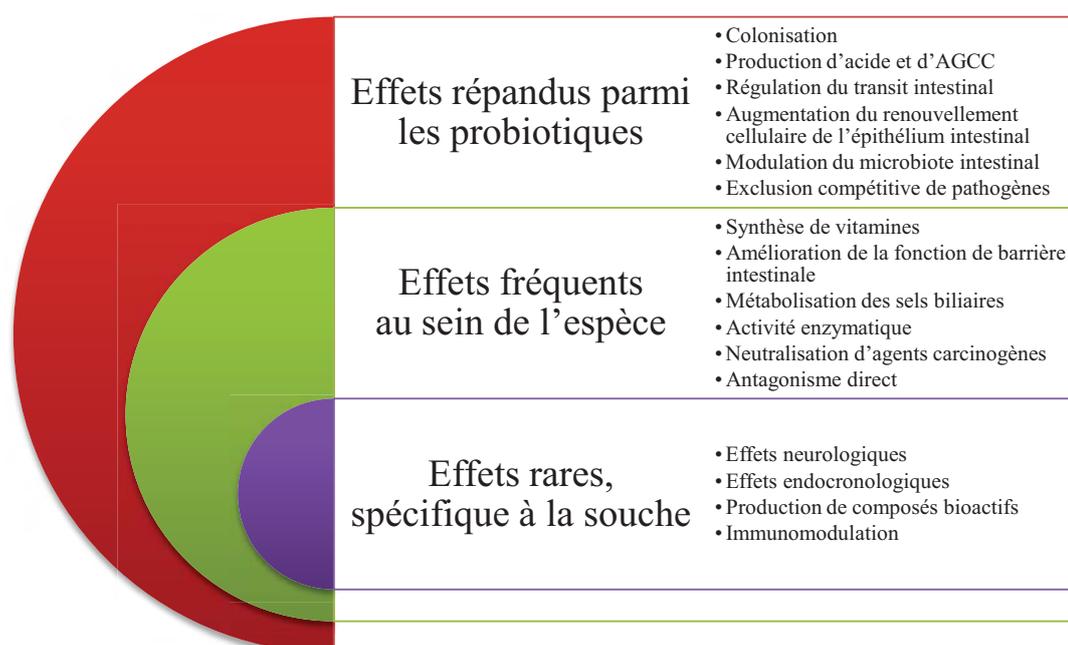


FIGURE 28. Mécanismes d'action des probiotiques et leur fréquence

Modifié d'après C. HILL *et al.*, 2014.

AGCC : acide gras à chaîne courte

3.1.3.1 Exclusion

3.1.3.1.1 Amélioration de la fonction de barrière intestinale

L'épithélium intestinal est en contact permanent avec le contenu de la lumière du tube digestif. La barrière intestinale est un mécanisme de défense majeur dans la protection de l'organisme. L'intégrité de l'épithélium intestinal est assurée par une couche de mucus, les complexes de jonction des cellules épithéliales et la production de peptides anti-microbiens et d'immuno-globulines A (IgA) sécrétoires. Lorsque cette fonction de barrière est altérée, des antigènes bactériens peuvent atteindre la sous-muqueuse et induire une réponse inflammatoire à l'origine de troubles intestinaux. La consommation de probiotiques contribue à l'amélioration et au maintien de la fonction de barrière, mais les mécanismes ne sont pas entièrement connus. Cependant, pour améliorer la fonction de barrière, il a été suggéré que les probiotiques pourraient favoriser la sécrétion de mucus, moduler l'expression de gènes codant les protéines constitutives des jonctions serrées ou encore prévenir l'apoptose cellulaire induite par des cytokines pro-inflammatoires (BERMUDEZ-BRITO *et al.*, 2012).

3.1.3.1.2 Exclusion compétitive de micro-organismes pathogènes

Les mécanismes utilisés par une souche probiotique visant à exclure ou à réduire la croissance d'autres espèces microbiennes dans l'environnement digestif sont variés : (i) la création d'un micro-environnement hostile en modifiant le microbiote résident, (ii) la réduction de la disponibilité des récepteurs des micro-organismes pathogènes afin de limiter leur adhésion, leur entrée ou leur translocation, (iii) la diminution du pH de la lumière intestinale par la production d'acides organiques, en particulier l'acétate et le lactate, (iv) l'épuisement compétitif des nutriments essentiels à la survie du pathogène (BERMUDEZ-BRITO *et al.*, 2012; PREIDIS *et al.*, 2011).

3.1.3.2 Antagonisme direct

Contrairement à l'exclusion qui regroupe l'ensemble des mécanismes d'action aspécifiques, l'antagonisme direct vise à (i) inhiber la croissance du pathogène par la production de composés anti-microbiens ou (ii) exercer une action antagoniste sur les facteurs de virulence nécessaires à leur pathogénicité (OELSCHLAEGER, 2010; PREIDIS *et al.*, 2011).

3.1.3.3 Immunomodulation

Les bactéries probiotiques ont la capacité d'interagir avec les cellules épithéliales et dendritiques, les monocytes/macrophages et les lymphocytes. Le système immunitaire présente deux composantes, *i.e.* le système inné et le système adaptatif. La réponse immunitaire adaptative dépend des lymphocytes B et T, qui sont spécifiques à des antigènes particuliers. En revanche, le système immunitaire inné répond à des structures communes partagées par la plupart des agents pathogènes, les PAMP (pathogen-associated molecular patterns). La première réponse aux agents pathogènes est déclenchée par des récepteurs cellulaires épithéliaux capables de reconnaître ces PAMP, les PRR (pattern recognition receptor) comme les TLR (toll-like receptors), le CLR (C-type lectin receptors) ou encore les NLR (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein (NOD)-like receptors) permettant une localisation efficace du pathogène (LEBEER *et al.*, 2010). Ainsi, l'immunomodulation vise à (i) favoriser la réponse immune innée ou adaptative de l'hôte et (ii) limiter la capacité du pathogène à induire une réponse inflammatoire.

3.1.4 Mode d'action des probiotiques à base de levures

S. boulardii est, à ce jour, la seule levure utilisée comme probiotique dont l'efficacité a été démontrée par des études cliniques en double aveugle. Les principaux mécanismes d'action de *S. boulardii* sont (i) l'inhibition directe ou indirecte de pathogènes intestinaux, (ii) la modification des voies de signalisation de l'hôte, notamment celles impliquées dans la réponse inflammatoire, (iii) une stimulation du système immunitaire ou encore (iv) des effets trophiques sur la muqueuse intestinale (IM et POTHOUKAKIS, 2010). Cependant, d'autres levures ont également montré des propriétés probiotiques. En effet, plusieurs

espèces de levures tolèrent les conditions rencontrées dans l'environnement digestif humain et ont montré une action antagoniste vis-à-vis de bactéries pathogènes, *i.e.* *Debaryomyces hansenii*, *Torulasporea delbrueckii* (PSANI et KOTZEKIDOU, 2006), *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* (L.-S. CHEN *et al.*, 2010), *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lodderae* (KUMURA *et al.*, 2004) et *Sacharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 (ETIENNE-MESMIN *et al.*, 2011b). Ainsi, l'effet antagoniste des levures sur les micro-organismes pathogènes a été attribué principalement à (i) la compétition pour les éléments nutritifs, (ii) des changements de pH dans le milieu à la suite d'une augmentation de la production d'acides organiques par le microbiote intestinal, (iii) la production d'éthanol et (iv) la sécrétion et la libération de composés anti-microbiens comme des composés organiques volatils (FIALHO *et al.*, 2010; HATOUM *et al.*, 2012).

Par ailleurs, les probiotiques à base de levures peuvent interagir positivement avec des probiotiques bactériens en améliorant leur survie dans l'environnement digestif et en stimulant leur croissance. En effet, cette synergie pourrait être attribuée à la production par les levures de nutriments tels que des peptides, des acides aminés et/ou des vitamines (HATOUM *et al.*, 2012). De plus, la paroi cellulaire des levures est principalement composée de glucanes, de mannanes et de chitines. Ces composants peuvent jouer un rôle dans les phénomènes d'adhésion (co-agrégation et cohésion) permettant d'augmenter la survie des bactéries probiotiques dans l'environnement digestif (MILLSAP *et al.*, 1998).

3.1.5 Risques associés aux stratégies probiotiques

Compte tenu de l'utilisation courante des probiotiques dans le monde, seul un nombre limité d'événements indésirables graves (bactériémie et fongémie) ont été associés à ces traitements (SEGARRA-NEWNHAM, 2007). Les thérapies à base de probiotiques sont à proscrire chez les patients immunodéprimés et les enfants atteints du syndrome du grêle court (SURAWICZ et DAMMAN, 2014). Un essai clinique randomisé sur l'utilisation de probiotiques chez des patients atteints de pancréatite aiguë sévère a montré une augmentation des complications infectieuses dans les groupes probiotique et placebo, avec une augmentation de la mortalité dans le groupe probiotique par rapport au groupe placebo (BESSELINK *et al.*, 2008). Cependant, REID *et al.* (2008) ont émis des réserves sur la méthodologie employée dans cette étude en invoquant un biais de randomisation des patients.

3.2 Stratégie probiotique dans la prévention et/ou le traitement des infections à EHEC

L'absence de traitement spécifique des infections à EHEC et le fait que l'antibiothérapie soit controversée – augmentation du risque de complications en cas de diarrhées sanglantes – ont conduit à s'intéresser à des moyens préventifs et/ou curatifs alternatifs comme l'utilisation de probiotiques. Actuellement, les études sont essentiellement descriptives et les mécanismes impliqués peu connus. Les stratégies probiotiques dans la lutte contre les infections à EHEC sont basées sur les trois modes d'action des probiotiques décrit précédemment, i.e. (i) l'exclusion (amélioration de la fonction de barrière intestinale et exclusion compétitive), (ii) l'antagonisme direct et (iii) la modulation du système immunitaire.

3.2.1 EHEC et probiotique : Exclusion

Une liste des publications où des probiotiques ont été utilisés dans une stratégie d'exclusion des EHEC est présentée dans le Tableau 14. La pathogénicité des EHEC est associée à leur capacité à induire des lésions A/E. Les probiotiques du genre *Lactobacillus* comme *Lactobacillus casei* (*L. casei*) et *L. helveticus* peuvent diminuer l'adhésion du pathogène aux cellules épithéliales intestinales (X. CHEN *et al.*, 2007; HSUEH *et al.*, 2010). Parallèlement, d'autres études ont montré que *L. acidophilus* et *L. rhamnosus* peuvent sécréter des substances protéiques inhibant l'adhésion d'*E. coli* O157:H7 à des cellules coliques en culture et la formation de lésions A/E (GOPAL *et al.*, 2001; RUND *et al.*, 2013). L'administration de probiotiques est également envisageable afin d'agir favorablement sur l'intégrité de la barrière intestinale. Ainsi, DAHAN *et al.* (2003) ont montré *in vitro* que la levure probiotique *S. boulardii* permet d'augmenter la résistance électrique trans-épithéliale par le maintien structural des protéines du cytosquelette. *Bifidobacterium lactis* (*B. lactis*) et *L. rhamnosus* produisent quant à elles des molécules qui stabilisent les jonctions serrées en inhibant le réarrangement du cytosquelette (redistribution des protéines claudines) induit par les EHEC. Ces molécules sont sécrétées, présentes dans le surnageant de culture et sensibles aux protéases mais ne sont pas actuellement identifiées (JOHNSON-HENRY *et al.*, 2008; PUTAALA *et al.*, 2008). Enfin, des probiotiques du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* peuvent sécréter des acides organiques acidifiant le milieu. Des études *in vitro* et *in vivo* en modèle murin ont associé cette baisse de pH à une diminution de la survie du pathogène et de l'expression des Stx (ASAHARA *et al.*, 2004; CAREY *et al.*, 2008; FUKUDA *et al.*, 2012). Les mécanismes d'actions impliqués dans l'exclusion des EHEC par des probiotiques sont schématisés dans la Figure 29.

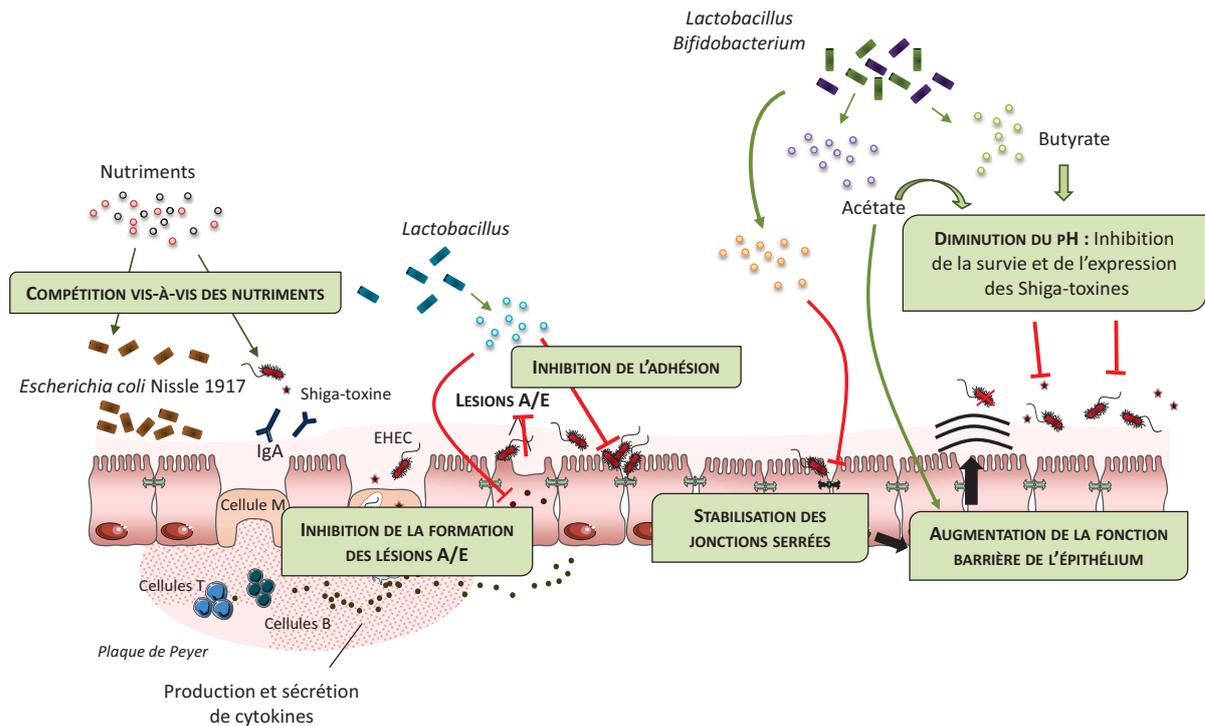


FIGURE 29. Probiotiques et exclusion des EHEC

Des probiotiques du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* peuvent sécréter des acides organiques acidifiant le milieu. Des études ont associés cette baisse de pH à une diminution de la survie du pathogène et de l'expression des Stx (ASAHARA *et al.*, 2004; CAREY *et al.*, 2008; FUKUDA *et al.*, 2012). Dans une étude *in vivo* en modèle murin, la sur-production d'acétate augmente la fonction de barrière intestinale (FUKUDA *et al.*, 2012). D'autres études sur modèles cellulaires indiquent que des probiotiques du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont capables de stabiliser les jonctions serrées (JOHNSON-HENRY *et al.*, 2008; PUTAALA *et al.*, 2008). *L. acidophilus* sécrète des protéines interférant avec l'adhésion des EHEC et la formation de lésions A/E par le biais d'un mécanisme inconnu (MEDELLIN-PEÑA et GRIFFITHS, 2009). Enfin, la pré-colonisation de l'intestin de souris avec *E. coli* Nissle 1917 permet une élimination plus rapide des EHEC du tractus digestif probablement en raison d'une compétition pour les nutriments (LEATHAM *et al.*, 2009).

TABEAU 14. Stratégie probiotique dans les infections à EHEC : l'exclusion

Exclusion					
Diminuer le pH de la lumière intestinale					
Genre	Espèce	Traitement	Modèles	Actions	Références
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	Curatif	Co-culture	Production d'acide lactique	OGAWA <i>et al.</i> (2001b)
	<i>plantarum</i>	Curatif	Co-culture	Diminution du pH conduisant à la diminution de l'expression de <i>stxA</i>	CAREY <i>et al.</i> (2008)
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	Préventif	Souris strepto	Production d'acide acétique	ASAHARA <i>et al.</i> (2004)
	<i>longum</i>	Préventif	Souris axéniques	Production d'acide acétique	FUKUDA <i>et al.</i> (2011)
	<i>thermophilum</i>	Curatif	Co-culture	Diminution du pH conduisant à la diminution de l'expression de <i>stxA</i>	CAREY <i>et al.</i> (2008)
<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i>	Curatif	Co-culture	Diminution du pH conduisant à la diminution de l'expression de <i>stxA</i>	CAREY <i>et al.</i> (2008)
Modifier le microbiote résident					
Genre	Espèce	Traitement	Modèles	Actions	Références
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	Préventif	Souris strepto	Précolonisation par des <i>E. coli</i> probiotiques de souris traitées à la streptomycine diminue la colonisation par les EHEC	LEATHAM <i>et al.</i> (2009); MALTBY <i>et al.</i> (2013)

TABLEAU 14. Stratégie probiotique dans les infections à EHEC : l'exclusion (suite)

Augmenter l'effet barrière de l'épithélium intestinal					
Genre	Espèce	Traitement	Modèles	Actions	Références
<i>Bifidobacterium</i>	<i>lactis</i>	Préventif	Cellules Caco-2	Augmentation de l'intégrité des jonctions serrées	PUTAALA <i>et al.</i> (2008)
	<i>longum</i>	Préventif	Souris axéniques	Amélioration de l'effet barrière par une accumulation d'acétate	FUKUDA <i>et al.</i> (2012)
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	Préventif	Cellules T84	Augmentation de l'intégrité des jonctions serrées	JOHNSON-HENRY <i>et al.</i> (2008)
<i>Saccharomyces</i>	<i>boulardii</i>	Préventif	Cellules T84	Augmentation de l'intégrité des jonctions serrées	DAHAN <i>et al.</i> (2003)
Limitation de l'adhésion, de l'entrée ou de la translocation du pathogène					
Genre	Espèce	Traitement	Modèles	Actions	Références
<i>Bifidobacterium</i>	<i>lactis</i>	Préventif	Souris BALB/c et C57	Diminution de la translocation du pathogène	SHU <i>et al.</i> (2001)
<i>Clostridium</i>	<i>butyricum</i>	Curatif	Souris gnotobiotiques	Limite l'adhésion des EHEC à l'épithélium intestinal	TAKAHASHI <i>et al.</i> (2004)
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	Curatif	Cellules Caco-2	Limite l'adhésion des EHEC	RUND <i>et al.</i> (2013)

TABLEAU 14. Stratégie probiotique dans les infections à EHEC : l'exclusion (suite)

<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	Curatif	Cellules T84	Limite l'adhésion des EHEC	SHERMAN <i>et al.</i> (2005); TURKOVÁ <i>et al.</i> (2013)
-	-	Préventif	Cellules T84	Limite l'adhésion des EHEC	SHERMAN <i>et al.</i> (2005); TURKOVÁ <i>et al.</i> (2013)
-	-	Curatif	Souris ICR	Limite l'adhésion des EHEC à l'épithélium intestinal	MEDELLIN-PEÑA <i>et al.</i> (2009)
<i>crispatus</i>		Curatif	Cellules HeLa	Limite l'adhésion des EHEC	X. CHEN <i>et al.</i> (2007)
<i>delbrueckii</i>		Préventif	Cellules HEp-2	Limite l'adhésion des EHEC	HUGO <i>et al.</i> (2008)
<i>gasseri</i>		Curatif	Cellules Caco-2	Limite l'adhésion des EHEC	TURKOVÁ <i>et al.</i> (2013)
<i>helveticus</i>		Préventif	Cellules T84 et HEp-2	Limite l'adhésion des EHEC	JOHNSON-HENRY <i>et al.</i> (2007)
-	-	Curatif	Cellules Caco-2	Limite l'adhésion des EHEC	TURKOVÁ <i>et al.</i> (2013)
<i>plantarum</i>		Préventif	Cellules HEp-2	Limite l'adhésion des EHEC	HUGO <i>et al.</i> (2008)
<i>reuteri</i>		Préventif	Souris axéniques	Limite la nécrose des tubules rénaux	EATON <i>et al.</i> (2011)
-	-	Curatif	Cellules Caco-2	Limite l'adhésion des EHEC	HSUEH <i>et al.</i> (2010)
<i>rhamnosus</i>		Préventif	Cellules HT29 et Caco-2	Limite l'adhésion des EHEC	GOPAL <i>et al.</i> (2001)
-	-	Curatif	Cellules C2BBel	Limite l'adhésion des EHEC	HIRANO <i>et al.</i> (2003)
-	-	Préventif	Souris BALB/c et C57	Diminution de la translocation du pathogène	SHU <i>et al.</i> (2002)
-	-	Préventif	Cellules T84	Limite l'adhésion des EHEC	SHERMAN <i>et al.</i> (2005)

TABLEAU 14. Stratégie probiotique dans les infections à EHEC : l'exclusion (suite)

<i>Saccharomyces boulardii</i>	Curatif	Co-culture	Adhésion des EHEC à la surface du probiotique	GEDEK (1999)
--------------------------------	---------	------------	-----------------------------------------------	--------------

Le terme « Curatif » est utilisé pour signifier un traitement probiotique co-administré avec le pathogène ou une co-culture probiotique/pathogène.
 EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragiques, Souris strepto : souris traitées à la streptomycine

3.2.2 EHEC et probiotique : Antagonisme direct

Une stratégie probiotique visant à inhiber la croissance des EHEC par la production de composés antimicrobiens et/ou à diminuer leur virulence a été envisagée. Une liste des publications reportant l'usage de probiotiques dans ce cadre est présentée dans le Tableau 15. ETIENNE-MESMIN *et al.* (2011b) ont montré en conditions digestives humaines simulées une action inhibitrice de la souche *S. cerevisiae* CNCM I-3856, co-administrée avec *E. coli* O157:H7. Ce probiotique diminue significativement la reprise de croissance du pathogène dans les parties distales de l'intestin grêle dans le système digestif artificiel TIM 1. Cependant, son rôle sur l'expression des gènes de virulence et la production des protéines associées dans l'environnement digestif artificiel humain n'était pas évalué dans cette étude. En modèle murin, l'administration d'un traitement préventif avec *Clostridium butyricum* permet de diminuer la survie des EHEC dans le tractus gastro-intestinal et d'augmenter le taux de survie des animaux infectés (TAKAHASHI *et al.*, 1999 ; TAKAHASHI *et al.*, 2004). Les Shiga-toxines sont les principaux facteurs de virulence des EHEC et sont associées aux pathologies les plus sévères comme le SHU. Plusieurs études rapportent une action antagoniste des probiotiques sur l'expression des gènes *stx* et la production de Stx. Des souches de *L. acidophilus* et *B. breve* ont montré *in vitro* et *in vivo* en modèle murin leur capacité à inhiber la synthèse de Stx au niveau transcriptionnel et traductionnel via une production d'acétate par les bactéries probiotiques (ASAHARA *et al.*, 2004 ; CAREY *et al.*, 2008). La production d'autres composés antimicrobiens comme la reutéline ou le butyrate par des souches probiotiques des genres *Lactobacillus* et *Clostridium* a également été mise en évidence (SPINLER *et al.*, 2008 ; TAKAHASHI *et al.*, 2004). La production de butyrate par *Clostridium butyricum* inhibe l'expression des gènes *stx* en modèle murin (TAKAHASHI *et al.*, 2004). Cependant, le butyrate favorise l'expression du Gb3 en modèle cellulaire (JACEWICZ *et al.*, 1995). De plus, *in vitro*, il active simultanément les gènes du LEE et des gènes flagellaires (TOBE *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'expression des gènes de motilité, des gènes du LEE et du système de sécrétion de type III sont régulés, en partie, par une molécule signalisatrice de quorum sensing : l'autoinducteur AI-2. Des études *in vitro* ont montré que des souches du genre *Lactobacillus* sécrétaient des molécules de nature protéique inhibant la production d'AI-2 et donc, de ce fait, l'expression de gènes cibles comme les gènes du LEE (MEDELLIN-PEÑA *et al.*, 2007 ; PARK *et al.*, 2014). Les mécanismes d'action impliqués dans l'antagonisme direct des probiotiques contre les EHEC sont schématisés dans la Figure 30.

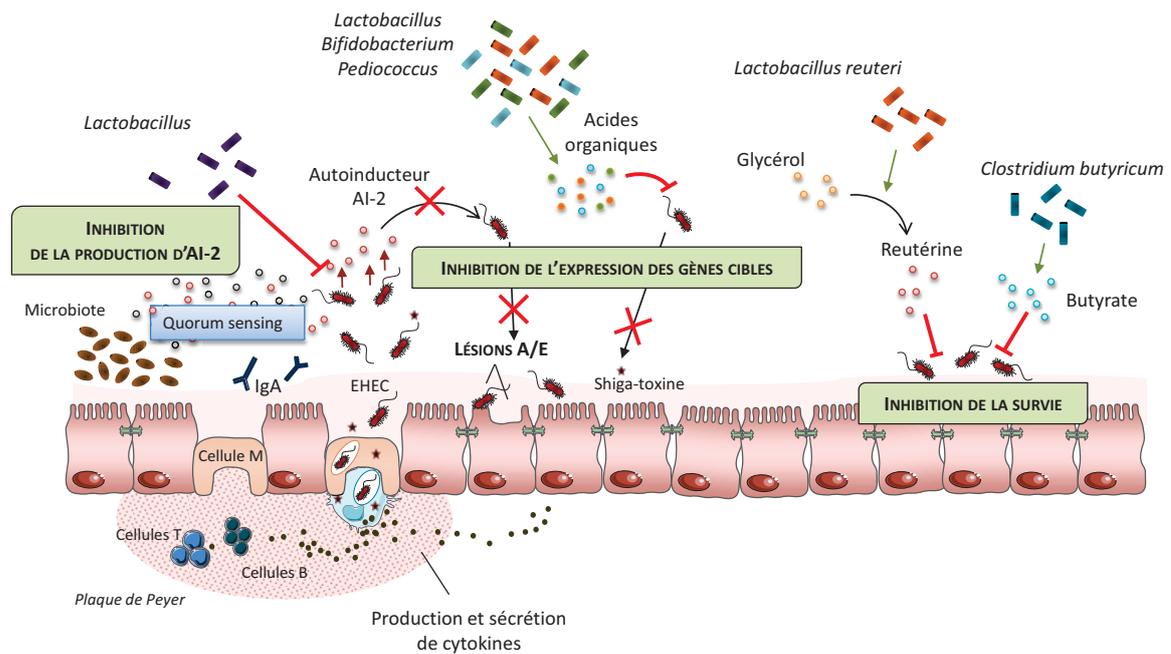


FIGURE 30. Antagonisme direct des probiotiques vis-à-vis des EHEC

La survie du pathogène peut être inhibée par la production de composés bactériostatiques : *C. butyricum* produit du butyrate (TAKAHASHI *et al.*, 2004) et *L. reuteri* de la reutérine à partir du glycérol (SPINLER *et al.*, 2008). Le quorum sensing est un système de communication inter-espèces bactériennes basé sur la production d'AI (molécules de signalisation) qui vont activer des gènes cibles. Des lactobacilles sont capables d'inhiber la production d'AI-2 et l'expression de gènes cibles associés comme les gènes du LEE (MEDELLIN-PEÑA *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2014).

EHEC : *E. coli* entérohémorragiques, AI : auto-inducteur, LEE : Locus d'Effacement des Entérocytes, Lésions A/E : lésions d'attachement et effacement

TABLEAU 15. Stratégie probiotique dans les infections à EHEC : l'antagonisme direct

Antagonisme					
Inhiber la croissance du pathogène					
Genre	Espèce	Traitement	Modèles	Actions	Références
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	Curatif	Co-culture	Diminution de la croissance des EHEC	LIKOTRAFITI <i>et al.</i> (2013)
<i>Clostridium</i>	<i>butyricum</i>	Préventif	Souris gnotobiotiques	Diminution du nombre d'EHEC dans les selles et augmentation de la survie des souris	TAKAHASHI <i>et al.</i> (1999) ; TAKAHASHI <i>et al.</i> (2004)
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	Curatif	Co-culture	Diminution de la croissance des EHEC	REISSBRODT <i>et al.</i> (2009)
<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>	Curatif	Co-culture	Diminution de la croissance des EHEC	LIKOTRAFITI <i>et al.</i> (2013)
	<i>reuteri</i>	Curatif	Co-culture	Transformation du glycérol en réutérine qui inhibe la croissance du pathogène	SPINLER <i>et al.</i> (2008)
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	Curatif	TIM 1	Inhibition de la reprise de croissance observée dans l'intestin grêle	ETIENNE-MESMIN <i>et al.</i> (2011b)
Excercer une action antagonisme sur des facteurs de virulence					
Genre	Espèce	Traitement	Modèles	Actions	Références
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	Préventif	Souris gnotobiotiques	Diminution de la production de Stx dans les selles	ASAHARA <i>et al.</i> (2004)
	<i>lactis</i>	Préventif	Cellules Vero	Diminution des interactions Gb3/Stx	TAHAMTAN <i>et al.</i> (2011)

TABLEAU 15. Stratégie probiotique dans les infections à EHEC : l'antagonisme direct (suite)

<i>longum</i>	Préventif	Cellules Vero	Diminution des interactions Gb3/Stx	S. H. KIM <i>et al.</i> (2001)
–	Curatif	Souris gnotobiotiques	Diminution de la production de Stx dans les selles	YOSHIMURA <i>et al.</i> (2010)
–	Préventif	Souris axéniques	Diminution du passage des Stx au travers de l'épithélium intestinal	FUKUDA <i>et al.</i> (2011)
<i>thermophilum</i>	Curatif	Co-culture	Diminution de l'expression de <i>stxA</i>	CAREY <i>et al.</i> (2008)
<i>Clostridium butyricum</i>	Préventif	Souris gnotobiotiques	Diminution de la quantité de Stx dans les selles et augmentation de la survie des souris	TAKAHASHI <i>et al.</i> (1999) ; TAKAHASHI <i>et al.</i> (2004)
<i>Escherichia coli</i>	Curatif	Co-culture	Diminution de la production de Stx	REISSBRODT <i>et al.</i> (2009) ; RUND <i>et al.</i> (2013)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Curatif	Co-culture	Diminution de l'activité de l'auto-inducteur AI-2 et de l'expression des facteurs de virulences portés par le LEE	Y. KIM <i>et al.</i> (2008) ; MEDELLIN-PEÑA <i>et al.</i> (2007)
–	–	Co-culture	Réduction de la formation de biofilm	Y. KIM <i>et al.</i> (2009)
<i>rhamnosus</i>	Curatif	Co-culture	Diminution de l'expression de <i>stxA</i>	CAREY <i>et al.</i> (2008)
<i>sakei</i>	Curatif	Co-culture	Diminution de l'expression des facteurs de virulence impliqués dans les lésions A/E via une diminution de l'activité de l'auto-inducteur AI-2	PARK <i>et al.</i> (2014)
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Curatif	Co-culture	Diminution de l'expression de <i>stxA</i>	CAREY <i>et al.</i> (2008)

Le terme « Curatif » est utilisé pour signifier un traitement probiotique co-administré avec le pathogène ou une co-culture probiotique/pathogène.

A/E : attachement et effacement, AI-2 : auto-inducteur 2, EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragiques, Gb3 : récepteur cellulaire globotriosyl céramide 3, LEE : locus d'effacement des entérocytes, Stx : Shiga-toxine

3.2.3 EHEC et probiotique : Immunomodulation

Les probiotiques peuvent également être utilisés pour moduler le système immunitaire de l'hôte (i) en favorisant la réponse immune innée ou adaptative et (ii) en limitant la capacité du pathogène à induire une réponse inflammatoire (Figure 31). Une liste des publications concernant les probiotiques modulant le système immunitaire de l'hôte dans la stratégie contre les EHEC est présentée dans le Tableau 16. Les probiotiques peuvent moduler le système immunitaire en augmentant la réponse locale immune. Des études *in vivo* indiquent que *L. casei*, *L. rhamnosus* et *B. thermacidophilum* induisent une augmentation de la sécrétion d'IgA spécifiques aux *E. coli* O157:H7 ou à leurs toxines, mais les mécanismes impliqués restent inconnus à ce jour (GAGNON *et al.*, 2006; OGAWA *et al.*, 2001a; SHU et H. S. GILL, 2001). Les probiotiques peuvent également moduler la réponse immunitaire induite par les EHEC en interférant avec les voies inflammatoires médiées par le NF- κ B (nuclear factor- κ B) et les MAPK (mitogen-activated protein kinases). Des études, *in vitro* et *in vivo* en modèle murin indiquent que des probiotiques bactériens comme *L. helveticus*, *L. paracasei*, *B. longum* et *B. breve* peuvent entraîner une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induite par *E. coli* O157:H7. En particulier, DAHAN *et al.* (2003) ont montré que la levure *S. boulardii* diminue la sécrétion d'interleukine 8 (IL-8) pro-inflammatoire en bloquant la phosphorylation d'I κ B (inhibitor of κ B) conduisant à l'inhibition de la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B et la voie des MAPK.

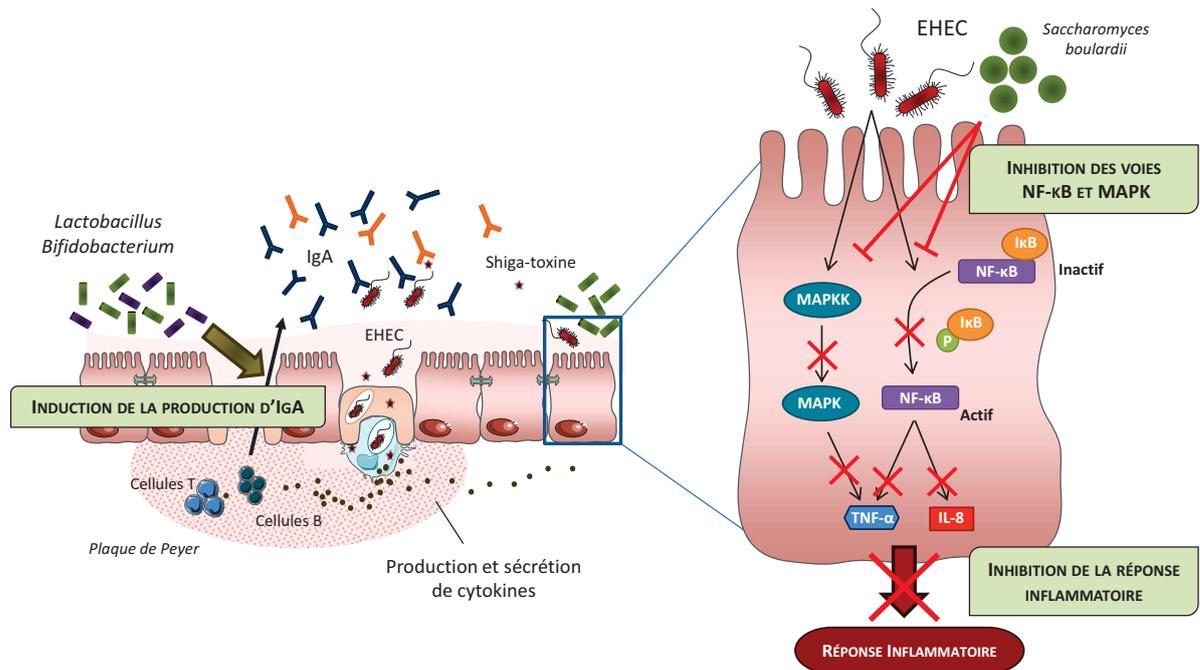


FIGURE 31. Effet immunomodulateur des probiotiques sur les EHEC

La réponse immunitaire induite par les EHEC peut être modulée par les probiotiques. Des études *in vivo* en modèle lapin (OGAWA *et al.*, 2001a) et en modèle murin (GAGNON *et al.*, 2006 ; SHU et H. S. GILL, 2002) ont montré que *L. casei*, *L. rhamnosus* et *B. thermacidophilum* induisent une hausse de la production d'IgA dirigés contre *E. coli* O157:H7 et les Stx. *S. boulardii* est capable d'interférer avec les voies inflammatoires dépendant du NF-κB et des MAPK, activées par les EHEC lors d'une infection. La levure bloque la phosphorylation d'IκB conduisant à l'inhibition de la translocation nucléaire du facteur de transcription NF-κB et donc de la production de cytokines pro-inflammatoires IL-8 (DAHAN *et al.*, 2003).

EHEC : *E. coli* entérohémorragiques, IgA : Immuno-globuline A, IκB : inhibitor of κB, IL-8 : interleukine 8, MAPK : mitogen-activated protein kinases, MAPKK : mitogen-activated protein kinases kinases, NF-κB : nuclear factor-κB, TNF-α : tumor necrosis factor α

TABLEAU 16. Stratégie probiotique dans les infections à EHEC : l'immunomodulation

Immunomodulation					
Favoriser la réponse immune innée ou adaptative de l'hôte					
Genre	Espèce	Traitement	Modèles	Actions	Références
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Préventif	Lapin	Augmentation de la production d'IgA anti-Stx1 et 2	OGAWA <i>et al.</i> (2001a)
	<i>rhamnosus</i>	Préventif	Souris BALB/c et C57	Augmentation de la production d'IgA anti- <i>E. coli</i> O157:H7	SHU et H. S. GILL (2002)
<i>Bifidobacterium</i>	<i>thermacidophilum</i>	Préventif	Souris BALB/c	Augmentation de la production d'IgA, IgM et IgG anti- <i>E. coli</i> O157:H7	GAGNON <i>et al.</i> (2006)
Limiter la capacité du pathogène à induire une réponse inflammatoire					
Genre	Espèce	Traitement	Modèles	Actions	Références
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	Curatif	Cellules HT29	Diminution de la sécrétion d'IL-8 et inhibition de l'activation de la voie NF- κ B	STÖBER <i>et al.</i> (2010)
	<i>longum</i>	Préventif	Souris ICR	Diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β	S. H. KIM <i>et al.</i> (2001)
<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	Préventif	Souris C57	Diminution de l'expression des gènes pro-inflammatoires induits par <i>E. coli</i> O157:H7	SAGAYA <i>et al.</i> (2014)
	<i>helveticus</i>	Préventif	Cellules Caco-2	Diminution de l'expression des gènes pro-inflammatoires induits par <i>E. coli</i> O157:H7. Inhibition de la synthèse de l'interféron γ	N. HO <i>et al.</i> (2013); JANDU <i>et al.</i> (2009)

TABLEAU 16. Stratégie probiotique dans les infections à EHEC : l'immunomodulation (suite)

<i>paracasci</i>	Préventif	Souris BALB/c	Modulation de la réponse immunitaire en inhibant l'inflammation	TSAI <i>et al.</i> (2010)
<i>rhamnosus</i>	Curatif	Cellules Caco-2	Diminution de l'expression des gènes pro-inflammatoires induits par <i>E. coli</i> O157:H7	N. HO <i>et al.</i> (2013)
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Préventif	Cellules T84	Diminution de la sécrétion d'IL-8 en inhibant la voie NF- κ B et MAPK. Retarde l'apoptose induite par O157:H7 en diminuant la sécrétion de TNF- α	DAHAN <i>et al.</i> (2003); DALMASSO <i>et al.</i> (2006)

Le terme « Curatif » est utilisé pour signifier un traitement probiotique co-administré avec le pathogène ou une co-culture probiotique/pathogène.

Ig : Immuno-globuline, IL : interleukine, MAPK : mitogen-activated protein kinase, NF- κ B : nuclear factor- κ B, Stx : Shiga-toxine, TNF- α : tumor necrosis factor- α

Dans la lutte contre les infections à EHEC, la mise en place de stratégies probiotiques n'est pas limitée à l'Homme (approche qui a été développée au cours de cette thèse) mais peut être également envisagée chez l'animal et dans les produits alimentaires.

En effet, l'utilisation de probiotiques est envisageable pour réduire l'excrétion fécale des STEC chez les animaux de ferme et ainsi diminuer les risques de contaminations humaines. L'utilisation de *S. boulardii* inhibe la croissance d'*E. coli* O157:H7 dans du fluide ruménal clarifié *in vitro*, mais cette action antagoniste n'est pas confirmée sur une culture en continu de la flore du rumen (BACH *et al.*, 2003). La supplémentation de l'alimentation des animaux permet de réduire l'excrétion fécale de *E. coli* O157:H7. Une réduction plus importante de son excrétion a été obtenue avec différentes bactéries probiotiques comme *Enterococcus faecium*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum* et *L. plantarum* (RIGOBELLO *et al.*, 2013). Parallèlement, l'administration de bactéries probiotiques est connue pour améliorer les performances zootechniques des animaux. Bien que la réduction de l'excrétion fécale par les animaux diminue les risques de contaminations des produits alimentaires par l'agent pathogène, l'élimination totale des STEC/EHEC de la flore commensale des animaux est peu probable.

Par ailleurs, différents traitements physico-chimiques peuvent être appliqués aux matrices alimentaires au cours de leur processus de transformation/fabrication et stockage dans le but de réduire les contaminations microbiennes (optimisation de la teneur en nitrite, activité de l'eau, pH, traitement thermique, irradiation), mais leur utilisation dans le cadre de contaminations par des souches STEC/EHEC est uniquement expérimentale (HOLCK *et al.*, 2011 ; RASOOLY et DO, 2010 ; RODE *et al.*, 2012). L'utilisation de ferments à base de souches probiotiques est également envisageable quand les matrices alimentaires le permettent sur le plan organoleptique (KAKISU *et al.*, 2011 ; MUTHUKUMARASAMY et HOLLEY, 2006 ; RUIZ-MOYANO *et al.*, 2009). Ainsi, l'évaluation des effets de différents probiotiques contre les STEC/EHEC a été réalisée dans des matrices carnée (MUTHUKUMARASAMY et HOLLEY, 2007 ; TYÖPPÖNEN *et al.*, 2003), laitière (BARRANTES *et al.*, 2004 ; CALDERON *et al.*, 2007 ; MILLETTE *et al.*, 2007 ; ZEINHOM *et al.*, 2012) et végétale (BEVILACQUA *et al.*, 2010).

Deuxième partie

Travaux expérimentaux

Chapitre 1

Survie et pathogénicité de STEC dans le tractus digestif supérieur en présence d'une matrice fromagère au lait cru

Sommaire

Évaluation <i>in vitro</i> de la survie d' <i>Escherichia coli</i> O26 :H11 et d'O157 :H7 dans la lumière gastro-intestinale en présence d'une matrice fromagère au lait cru	107
Introduction à la publication n°1	107
Commentaires de la publication n°1	119

Évaluation *in vitro* de la survie d'*Escherichia coli* O26:H11 et O157:H7 dans la lumière gastro-intestinale en présence d'une matrice fromagère au lait cru

Introduction à la publication n°1

Les épidémies liées aux STEC ont mis en cause de la viande hachée de bœuf insuffisamment cuite, mais également des produits laitiers. Le lait cru a rarement été associé à des épidémies humaines. *A contrario*, les fromages au lait cru ont été impliqués dans des cas sporadiques ou des épidémies (FARROKH *et al.*, 2013). Sur les dix épidémies d'infection à EHEC recensées par DE BUYSER *et al.* (2001) dans l'hémisphère Nord (Angleterre et pays de Galles, Canada, Écosse, France et États-Unis) entre 1986 et 1994, la consommation de produits laitiers au lait cru a été incriminée pour 44 cas sur 239 (18%). En France, en novembre 2005, une épidémie de faible envergure (17 cas de SHU) a impliqué des fromages au lait cru – type pâte molle à croûte fleurie – contaminés par *E. coli* O26:H11 (ESPIÉ *et al.*, 2006b).

SURVIE ET PATHOGÉNICITÉ DE STEC DANS LA TRACTUS DIGESTIF SUPÉRIEUR EN PRÉSENCE D'UNE MATRICE FROMAGÈRE AU LAIT CRU

Quelques mois avant, un cas groupé de SHU avait été identifié (2 cas de SHU) au sein d'une même famille vosgienne ayant consommé du fromage au lait cru de chèvre contaminé par des *E. coli* du sérotype O157 (ESPIÉ *et al.*, 2006a).

En 2009, le taux de contamination des fromages au lait cru analysés dans le cadre de plans de surveillance français était inférieur à 0,9%. De plus, 64,71% des souches STEC isolées appartenaient au sérotype O26:H11, 23,53% au sérotype O103:H2 et 5,88% au sérotype O157:H7 ou O145:H28 (LOUKIADIS *et al.*, 2012). Contrairement aux données de prévalence soulignant l'importance d'O26:H11, les épidémies liées à la consommation de produits laitiers contaminés par des STEC/EHEC sont dues dans 56% des cas au sérotype O157:H7 (FARROKH *et al.*, 2013). En effet, la plupart des souches STEC isolées de produits laitiers en France ont des caractéristiques différentes de celles isolées de patients, *i.e.* prédominance de *stx1* et minorité d'isolats hébergeants les gènes *eae*, *espP* et/ou *katP* (PRADEL *et al.*, 2008). Par ailleurs, la dose infectieuse moyenne ne peut pas être définie avec exactitude, la limite de détection des EHEC/STEC dans les produits laitiers non pasteurisés étant fixée à 100 UFC/g (VERNOZY-ROZAND *et al.*, 2005) des étapes d'enrichissement étant nécessaires lors de leur recherche. L'impact de l'origine des souches, de leur environnement, de leur sérotype ainsi que des processus de fabrication des fromages sur la survie des STEC est documenté (FARROKH *et al.*, 2013; MISZCZYCHA *et al.*, 2013; PERRIN *et al.*, 2014; ZWEIFEL *et al.*, 2010). Ainsi, par une approche en « challenge test » sur cinq technologies fromagères, *i.e.* type pâte persillée (lait cru de brebis), type pâte pressée non cuite avec affinage long ou affinage court (lait cru de vache), type pâte pressée cuite (lait cru de vache) et type lactique chèvre (lait cru de chèvre), MISZCZYCHA *et al.* (2013) ont montré qu'un traitement thermique appliqué au caillé – type pâte pressée cuite – ou qu'une acidification brutale – type lactique chèvre – permet d'éliminer les souches STEC. *A contrario*, une augmentation de la concentration en STEC est observée dans les fromages issus des autres technologies fromagères, et seul un affinage long permettrait une diminution de la charge bactérienne au cours du temps. De plus, le comportement des STEC au sein d'une même matrice fromagère est variable en fonction du sérotype. Néanmoins, dans toutes les matrices testées, MISZCZYCHA *et al.* (2013) ont montré que la concentration du sérotype O157:H7 était toujours inférieure à celle des autres sérotypes étudiés (O26/H11, O103:H2 et O145:H28), à la fin de chaque processus de fabrication. Cependant, à ce jour aucune étude ne s'est intéressée à la survie de souches STEC et l'expression de leur pathogénicité dans l'environnement digestif humain après ingestion de fromages contaminés.

Suite à une collaboration avec l'Unité de Recherche CALITYSS (VetAgro Sup, Université de Lyon) et l'Unité de Recherche fromagère (INRA d'Aurillac), nous nous sommes intéressés au cours de la thèse à la survie et la pathogénicité de souches STEC, isolées de fromages, dans le tractus digestif supérieur de l'Homme. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du projet STRECFRO qui repose sur deux approches : (i) étudier le comportement de plusieurs sérotypes de STEC au cours des différentes étapes de la fabrication de fromages au lait cru et (ii) étudier *in vitro* la survie et la pathogénicité des différentes souches dans l'environnement digestif humain après ingestion des fromages contaminés. Ainsi,

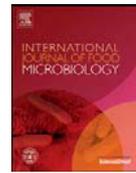
des fromages au lait cru – type pâte pressée non cuite – ont été expérimentalement contaminés au cours des premières étapes de leur fabrication par une souche de chacun des sérotypes O26:H11 et O157:H7, et la survie de ces deux sérotypes a été étudiée dans le système digestif artificiel TIM 1 à l'EA-CIDAM. Parallèlement, la survie des flores technologiques présentes dans les fromages au lait cru a également été évaluée au cours des différentes étapes de la fabrication des fromages et des digestions artificielles.

L'ensemble des résultats obtenus a fait l'objet d'une publication :

MISZCZYCHA*, S. D., THÉVENOT*, J., DENIS, S., CALLON, C., LIVRELLI, V., ALRIC, M., MONTEL, M.-C., BLANQUET-DIOT, S., et D. THEVENOT-SERGENTET (2014). Survival of *Escherichia coli* O26:H11 exceeds that of *Escherichia coli* O157:H7 as assessed by simulated human digestion of contaminated raw milk cheeses. *International journal of food microbiology*, vol. 172, p. 40-48.

* co-premiers auteurs

Ces résultats ont également fait l'objet d'un poster présenté aux Journées de l'École Doctorale Sciences de la Vie Santé Agronomie Environnement (Clermont-Ferrand, France, Mai 2013).



Survival of *Escherichia coli* O26:H11 exceeds that of *Escherichia coli* O157:H7 as assessed by simulated human digestion of contaminated raw milk cheeses



Stéphane D. Miszczycha^{a,b,1}, Jonathan Thévenot^{c,d,1}, Sylvain Denis^c, Cécile Callon^e, Valérie Livrelli^{d,f}, Monique Alric^c, Marie-Christine Montel^e, Stéphanie Blanquet-Diot^c, Delphine Thevenot-Sergentet^{a,g,*}

^a Université de Lyon, VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, Unité de Recherche CALITYSS, F-63280 Marcy l'Etoile, France

^b CNIEL, F-75314 Paris, France

^c Clermont Université, Université d'Auvergne, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, EA 4678 CIDAM, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^d Clermont Université, Université d'Auvergne, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, M2iSH, UMR INSERM/Université d'Auvergne U1071 USC-INRA 2018, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^e INRA, UR 545, Recherches Fromagères, F-15000 Aurillac, France

^f CHU Clermont-Ferrand, Service de Bactériologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France

^g LMAP-NRL STEC, VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, F-63280 Marcy l'Etoile, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2013

Received in revised form 15 November 2013

Accepted 26 November 2013

Available online 4 December 2013

Keywords:

Raw milk cheese

STEC

E. coli O157:H7

E. coli O26:H11

Digestion

ABSTRACT

Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) are an important cause of human foodborne outbreaks. The consumption of raw milk dairy products may be an important route of STEC infection. For successful foodborne transmission, STEC strains must survive stress conditions met during gastrointestinal transit in humans. The aim of this study was to evaluate the survival of two STEC strains of serotypes O157:H7 and O26:H11 during simulated human digestion in the TNO gastro-intestinal tract Model (TIM) of contaminated uncooked pressed cheeses. The survival of cheese microflora during in vitro gastrointestinal transit was also determined for the first time. The level of STEC increased from 2 log₁₀ CFU/ml to 4 log₁₀ CFU/g during the first 24 h of cheese making and remained stable at around 4 log₁₀ CFU/g during cheese ripening and conservation. During transit through the artificial stomach and duodenum, levels of STEC decreased: 0.2% of *E. coli* O157:H7 and 1.8% of *E. coli* O26:H11 were recovered at 150 min in the gastric compartment, compared with 14.3% for the transit marker. Bacterial resumption was observed in the jejunum and ileum: 35.8% of *E. coli* O157:H7 and 663.2% of *E. coli* O26:H11 were recovered at 360 min in the ileal compartment, compared with 12.6% for the transit marker. The fate of STEC was strain-dependent, the survival of *E. coli* O26:H11 being 13 times greater than that of *E. coli* O157:H7 at the end of digestion in the cumulative ileal deliveries. These data provide a better understanding of STEC behavior during gastrointestinal transit in humans after ingestion of contaminated cheese.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) are an important emerging group of foodborne pathogens. STEC are characterized by the production of cytotoxins named Shiga toxins (encoded by the genes *stx1* and *stx2*) (Nataro and Kaper, 1998). Pathogenic STEC (also called enterohemorrhagic *E. coli* or EHEC) are responsible for outbreaks of food poisoning in humans. STEC can be responsible for a variety of clinical outcomes ranging from diarrhea to hemorrhagic colitis, and in some severe cases can cause hemolytic–uremic syndrome and even death (Nataro and Kaper, 1998; Paton and Paton, 1998). EHEC are transmitted

via a variety of food vehicles, including ground beef, vegetables and dairy products (Farrokh et al., 2013; Karmali et al., 2010; Tzschoppe et al., 2012). STEC strains have been found in raw milk and raw milk cheeses (Farrokh et al., 2013). *E. coli* O157:H7 and *E. coli* O26:H11 are the most often implicated *E. coli* serotypes in outbreaks of STEC illness from dairy products (Baylis, 2009; Espié et al., 2006; Farrokh et al., 2013). Several studies were dedicated to the investigation of STEC behavior during the manufacture and ripening of cheeses (Farrokh et al., 2013). In particular, in a previous study (Miszczycha et al., 2013), we demonstrated that various STEC serotypes, particularly *E. coli* O157:H7 and O26:H11 strains are able to survive during cheese manufacturing in different cheese technologies. Nevertheless, for successful foodborne transmission, EHEC strains must survive harsh conditions found not only during food processing but also during gastrointestinal transit in humans.

During digestion, gastric pH, gastrointestinal secretions and peristalsis are important factors controlling the outcome of food-borne

* Corresponding author at: Université de Lyon, VetAgro Sup, Unité de Recherche CALITYSS, 63280 Marcy l'Etoile, France. Tel.: +33 478 87 25 99; fax: +33 478 87 25 51.

E-mail address: delphine.sergentet@vetagro-sup.fr (D. Thevenot-Sergentet).

¹ These authors contributed equally to this manuscript.

pathogens. In a previous study, Etienne-Mesmin et al. (2011) studied the behavior of *E. coli* O157:H7 strain EDL 933 in the TNO gastro-Intestinal tract Model (TIM) during artificial digestion of contaminated raw ground beef. The TIM system is the dynamic multi-compartmental in vitro system that currently allows the closest simulation of in vivo physiological processes occurring within the lumen of the stomach and small intestine in humans (Blanquet-Diot et al., 2012; Minekus et al., 1995). However, no study has hitherto monitored the fate of STEC during human digestion of contaminated raw milk cheeses.

In this study, the behavior of *E. coli* O26:H11 and *E. coli* O157:H7 STEC strains and cheese microflora was first studied during the manufacturing and ripening of uncooked pressed cheeses prepared with artificially contaminated raw cow milk. We then used the TIM system for the first time to evaluate the survival of serotypes O157:H7 and O26:H11 and cheese microflora during simulated human digestion of these cheeses.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Two different strains isolated from contaminated cheeses and obtained from the French National Laboratory Reference of STEC were used in the present study: *E. coli* O26:H11 strain F15338A (issued from raw cow's milk cheese) and *E. coli* O157:H7 strain 721.4 (issued from sheep's milk). Presence of the major genes implicated in bacterial virulence (genes *eae* and *stx*) and acid resistance (*rpoS*, *gadA/B*, *gadC* and *gadE*) were tested by PCR as previously described (Ma et al., 2003; Nielsen and Andersen, 2003; Perelle et al., 2004; Takada et al., 2007; Waterman and Small, 2003). In addition, the strains were tested for their ability to survive acid stress by using the glutamate-dependent system according to the protocol described by Rice et al. (1993) and modified by Takada et al. (2007). The decarboxylation of glutamate by glutamate decarboxylase (GAD) led to an increase in pH

of the GAD reagent, causing the indicator color (bromocresol green) to change from yellow to green.

All the strains were revived from vials frozen at -80°C by growing for 24 h at 37°C in BHI (Brain Heart Infusion, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). A 1:100 (v/v) dilution was made in BPW (Buffered Peptone Water, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), incubated at 37°C for 24 h and stored at 8°C for 48 h to simulate the storage conditions of milk and cold-adapt the strains. The cold-adapted inocula were diluted before use in cheese making.

2.2. Manufacture and ripening of cheese

2.2.1. Cheese making

Two cheese-making experiments (Fig. 1) were carried out at a two-week interval with artificial inoculation of either *E. coli* O26:H11 strain F15338A (Experiment A) or *E. coli* O157:H7 strain 721.4 (Experiment B).

For each experiment, raw milk was collected from a local producer and transferred to the experimental cheese plant (INRA, Unité de Recherches Fromagères, UR545, Aurillac, France) under refrigerated conditions. For each trial, the absence of *E. coli* O26:H11 or *E. coli* O157:H7 was checked. Raw milk was divided into three vats containing 20 l of milk each, and then warmed to 34°C . All the vats of raw milk were supplemented with CaCl_2 (3 ml/20 l) (Danisco, Paris, France) and inoculated with independent cultures of each STEC strain at 500 CFU/ml of milk. Starter cultures containing 1% thermophilic bacteria Y 502 and 0.1% mesophilic bacteria SIR, one strain of *Debaryomyces hansenii* (0.3 ml/20 l) and one strain of *Geotrichum candidum* (0.3 ml/20 l) (Danisco, Paris and SIR, Thônes, France) were added. Rennet was then added at 30 ml/100 l (Beaugel 500, Coquard, Villefranche-sur-Saône, France). Four cheeses weighing 500 g were manufactured from each vat according to an uncooked pressed cheese type technology with a short ripening step (Fig. 2) as previously described (Miszczycha et al., 2013). Three cheeses were used for physico-chemical analyses and counting of STEC and cheese microflora (cheese making, aging up to

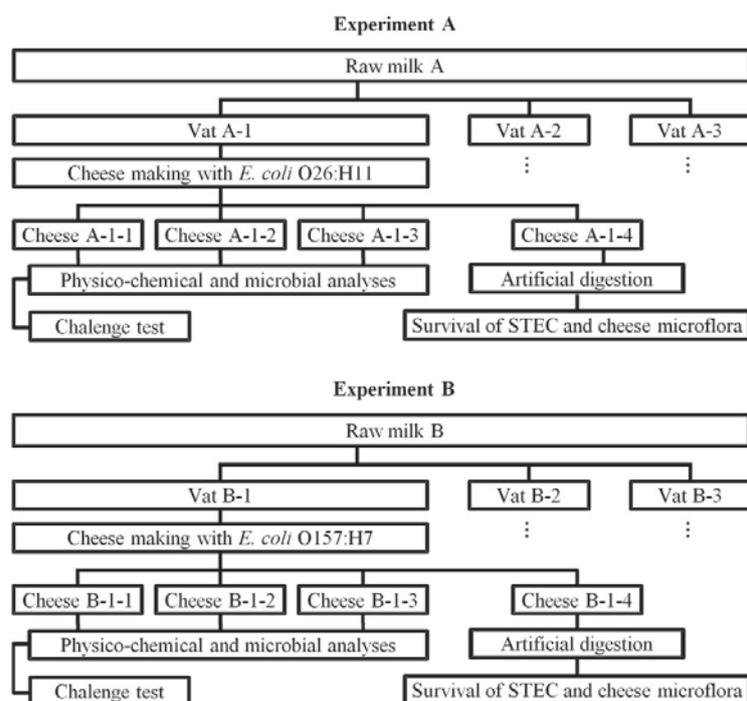


Fig. 1. Design of experiments.

SURVIE ET PATHOGÉNICITÉ DE STEC DANS LA TRACTUS DIGESTIF SUPÉRIEUR EN PRÉSENCE D'UNE MATRICE FROMAGÈRE AU LAIT CRU

42

S.D. Miszczycha et al. / International Journal of Food Microbiology 172 (2014) 40–48

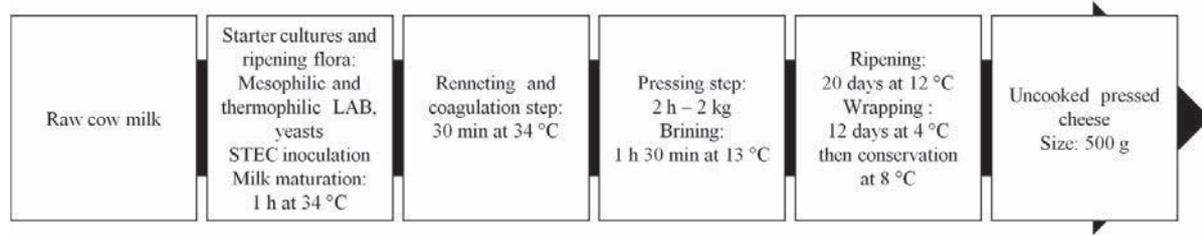


Fig. 2. Flow-diagram of cheese making. LAB = Lactic acid bacteria.

20 days and storage up to 35 days). One cheese was used to investigate microorganism survival during artificial digestion in the TIM system (cf. 2.3).

2.2.2. Physico-chemical analysis

The pH was regularly determined during cheese manufacturing (at 0, 3, 18 and 24 h and then on days 7, 14, 20 and 28) using a 926 VTV pH meter with an Ingold 406 MX penetration electrode (Mettler-Toledo, Viroflay, France). The a_w values were measured at day 35 with a LabMaster-aw meter (Novasina, Lachen, Switzerland).

2.2.3. Sampling

Samples for counting STEC strains and cheese microflora were taken from milk (50 ml) and cheeses in cores (50 g) at different stages of cheese making, ripening and storage (before and after the maturation of milk and on days 1, 7, 14, 20 and 35).

2.3. Artificial digestions

2.3.1. Gastro-intestinal system

All the artificial digestions were performed at the EA CIDAM (Clermont-Ferrand, France). The gastro-intestinal system TIM (TNO, Zeist, The Netherlands) consists of four successive compartments simulating the conditions found in the stomach and the three segments of the small intestine in humans, i.e. the duodenum, jejunum, and ileum. This system has already been described elsewhere (Blanquet-Diot et al., 2012; Minekus et al., 1995). Briefly, each compartment is composed of glass units with a flexible inner membrane. Peristaltic mixing and body temperature are achieved by pumping water at 37 °C into the space between the glass jacket and the flexible wall at regular intervals. Mathematical modeling of gastric and ileal deliveries with a power exponential equation (Elashoff et al., 1982) is used for the computer control of chyme transit. Chyme transport through the TIM is regulated by the peristaltic valves that connect the successive compartments. The volume in each compartment is monitored by a pressure sensor, and pH is computer-monitored and continuously controlled by adding either HCl or NaHCO₃. Simulated gastric, biliary and pancreatic secretions are introduced into the corresponding compartments by computer-

controlled pumps. Water and products of digestion are removed from the jejunal and ileal compartments by pumping dialysis liquid through hollow fiber membranes (SF 90G, Nipro®, Belgium). Before each experiment, the system is washed with detergent, rinsed with water and decontaminated by steaming at 105 °C for 45 min.

2.3.2. TIM parameters

The TIM system was programmed to reproduce, according to in vivo data, the physicochemical conditions observed during the digestion of a solid meal in a healthy human adult (Table 1). The suspension (300 ml) consisted of equal weights of cheese and mineral water (Volvic®, France), homogenized for 1 min with an Ultra Turrax system (T25, IKA®-Werke, Germany) set at 24,000 rpm. All the cheese suspensions were prepared extemporaneously and underwent digestion for 360 min. Two series of digestions were performed: (A) uncooked pressed cheese experimentally contaminated with *E. coli* O26:H11 strain F15338A ($n = 3$) and (B) uncooked pressed cheese experimentally contaminated with *E. coli* O157:H7 strain 721.4 ($n = 3$). During digestion, the ileal deliveries were kept on ice and pooled hour-by-hour. To evaluate the microorganism survival rate throughout digestion, control experiments were carried out using the same experimental protocol ($n = 3$ with solid meal parameters) with water containing 0.8% (w/v) of a non-absorbable water-soluble marker, blue dextran (Minekus et al., 1995).

2.3.3. Sampling

Samples were taken from the cheese suspensions prior to introduction into the artificial stomach for STEC and cheese microflora counting. Samples (1 ml) were regularly collected during digestion from each compartment, stomach (30, 60, 90, 120 and 150 min), duodenum (30, 60, 120, 180, 240 min), jejunum and ileum (60, 120, 180, 240, 300, 360 min), and cumulative ileal deliveries (0–60, 60–120, 120–180, 180–240, 240–300, 300–360 min) of the TIM system for STEC and/or cheese microflora counting.

2.3.4. Blue dextran analysis

Blue dextran concentrations in the digestive samples from the TIM system were determined colorimetrically using a spectrophotometer

Table 1
Parameters of gastrointestinal digestion in the TIM system when simulating digestive conditions of a healthy adult after intake of a solid cheese suspension^a.

Compartment	Vol (ml) at initial time	pH/time (min)	Secretion	$t_{1/2}$ (min)	β coefficient
Gastric	300	2/0, 6/5, 5.7/15, 4.5/45, 2.9/90, 2.3/120, 1.8/240, 1.6/300, 1.5/360	0.25 ml/min of pepsin (2080 IU/ml), 0.25 ml/min of lipase (250.5 IU/ml), 0.25 ml/min of HCl (1.5 M) if necessary	85	1.8
Duodenal	30	Maintained at 6.0	0.5 ml/min of bile salts (4% during the first 30 min of digestion and then 2%), 0.25 ml/min of pancreatic juice (10 ³ USP/ml), 0.25 ml/min of intestinal electrolyte solution, 0.25 ml/min of NaHCO ₃ (1 M) if necessary, 23,600 IU of trypsin (at the beginning of digestion)		
Jejunal	130	Maintained at 6.9	0.25 ml/min of NaHCO ₃ (1 M) if necessary		
Ileal	130	Maintained at 7.2	0.25 ml/min of NaHCO ₃ (1 M) if necessary	250	2.5

^a The power exponential equation $f = 1 - 2^{-\left(\frac{t}{t_{1/2}}\right)^\beta}$ (where f represents the fraction of meal delivered, t the time of delivery, $t_{1/2}$ the half-time of delivery, and β a coefficient describing the shape of the curve) is used for the computer control of gastric and ileal deliveries in the TIM.

(DU® 640 B Spectrophotometer, Beckman Coulter, France) at a wavelength of 595 nm. The blue dextran is a transit marker that is neither degraded nor absorbed during digestion, and which models a 100% survival rate for bacteria. Its concentrations throughout the TIM fluctuated according to the volume of each digestive compartment, the rate of dilution by digestive secretions and the chyme flow between two successive compartments.

2.4. Microbial counting

2.4.1. Cheese microflora

Milk and cheese samples were mixed in 2% (w/v) sterile phosphate buffer and blended with a Stomacher Lab Blender (Seward Medical, London, UK) for 4 min. Digestive samples were diluted (1:10 v/v) in sterile BPW. Further decimal dilutions were performed with sterile TS (Tryptone Salt, bioMérieux). All counts were performed in triplicate. Mesophilic and thermophilic bacterial populations, facultatively heterofermentative *Lactobacilli*, dextran-producing *Leuconostoc*, dextran-negative lactic acid bacteria, *Enterococci*, Gram-positive catalase⁺ bacteria (ripening bacteria), Gram-negative bacteria and yeasts and molds were counted on selected agar as described in Table 2. All the media were purchased from Biokar Diagnostics (Pantin, France).

2.4.2. STEC strains

Milk, cheese and digestive samples were diluted (respectively 1:5, 1:5, 1:10 v/v) in sterile BPW. Cheese samples were homogenized for 60 s in a stomacher (AES, Bruz, France). Further decimal dilutions were performed with sterile TS and spread onto selective agar for O157:H7 and O26:H11 strains (Table 2). All counts were performed in triplicate.

When a STEC strain could not be counted in a sample, an enrichment step was performed. The remaining enrichment broth (complemented with acriflavin for cheese samples) was incubated for 24 h at 41.5 °C for serogroups O26 and O157 (Miszczycha et al., 2013). Immunomagnetic separation (IMS) using beads coated with specific antibodies against the serogroup of the target strain was performed with Dynabeads (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), according to the manufacturer's instructions. The resulting IMS solutions were plated onto selective differential agar media (Table 2).

Table 2
Selective media used to enumerate STEC strains and the main cultivable cheese microflora.

Microorganism	Selective medium	Incubation ^a
<i>E. coli</i> O26:H11 strain F15338A	Coli ID medium	1 day, 37 °C, A
<i>E. coli</i> O157:H7 strain 721.4	O157 ID medium + 0.05 mg/l cefixime + 2.5 mg/l tellurite	1 day, 37 °C, A
Ripening bacteria	Cheese ripening bacteria medium	10 days, 25 °C, A
Thermophilic bacterial populations	M17 agar	1 day, 42 °C, A
Mesophilic bacterial populations	M17 agar	1 day, 30 °C, A
Gram-negative bacteria	Plate count agar + 1% milk + 5 mg/l vancomycin + 5 mg/l crystal violet	2 days, 30 °C, A
Facultatively heterofermentative <i>lactobacilli</i>	FH agar	3 days, 37 °C, AN
Dextrane producing <i>Leuconostoc</i>	Mayeux, Sandine and Elliker agar	2 days, 30 °C, A
Dextrane-negative lactic acid bacteria	Mayeux, Sandine and Elliker agar	2 days, 30 °C, A
<i>Enterococci</i>	Slanetz and Bartley agar	2 days, 42 °C, A
Yeasts	Oxytetracycline glucose agar	2 days, 25 °C, A
Molds	Oxytetracycline glucose agar	2 days, 25 °C, A

^a Cultures were incubated aerobically (A) or anaerobically (AN).

After 24 h incubation at 37 °C, all presumptive colonies (obtained with or without the enrichment step) were tested with Real-Time PCR as described below.

2.4.3. Confirmation of isolated STEC strains from cheese and digestive samples by real-time PCR

Total genomic DNA was extracted from a single colony by boiling in DNA/DNase-free water for 15 min followed by centrifuging (3 min at 13,000 ×g). The supernatant containing the DNA was stored at –20 °C until used. The confirmations of *E. coli* O157:H7, the O-antigens of *E. coli* O26 and the flagellar H11 antigen genes were performed using the protocols described by Miszczycha et al. (2012), Perelle et al. (2004) and Madic et al. (2010), respectively. Each reaction (30 µl) comprised 1 × TaqMan gene expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), primers and probes diluted according to authors' instructions, 1 × IPC Mix and IPC DNA (TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents—Applied Biosystems), molecular grade H₂O and 3 µl of template DNA. Thermal cycling and detection were performed using a StepOne Plus (Applied Biosystems). The generation of fluorescence for each sample was monitored at the end of each elongation step. A fluorescent signal 10 times higher than the standard deviation of the mean baseline emission was indicative of a positive detection. The CT was defined as the PCR cycle at which fluorescent intensity rises above the baseline.

2.5. Statistical analysis

Results are given as means ± standard deviation ($n = 3$). For the experiments in the TIM system, all the results were expressed as percentages of initial intake. Significant differences between treatments were tested by analysis of variance (ANOVA) with repeated-measure analysis followed by a post hoc test. Analyses were performed using SAS 9.1 Software (SAS 9.1 Software, Inc., Cary, NC). A probability level of $P < 0.05$ was taken to indicate statistical difference.

3. Results

3.1. Acid resistance of STEC strains

The major genes involved in acid resistance (*rpoS*, *gadA/B*, *gadC* and *gadE*) and virulence genes (*eae* and *stx*) were detected by PCR in both *E. coli* O157:H7 strain 721.4 (gene *stx2*) and *E. coli* O26:H11 strain F15338A (gene *stx1*). After 4 h incubation in the GAD reagent with *E. coli* O26:H11 strain, the decarboxylation of L-glutamic acid led to an increase in pH and a change of color from yellow to green. Interestingly, when incubated with *E. coli* O157:H7, the GAD reagent showed a mixed color of green and yellow, suggesting that the strain had a reduced GAD activity.

3.2. Behavior of microbial populations in cheese

3.2.1. STEC

STEC counts are shown in Fig. 3. The levels of the *E. coli* O26:H11 and *E. coli* O157:H7 strains increased during the first day of manufacturing to reach 4 to 5 log₁₀ CFU/g. During ripening, concentrations of the two STEC strains remained constant at around 4 log₁₀ CFU/g until day 20 (4.0 for *E. coli* O26:H11 in Experiment A and 3.8 log₁₀ CFU/g for *E. coli* O157:H7 in Experiment B).

3.2.2. Cheese microflora

Cheese microflora counts are shown in Table 3. The level of *Enterococci* increased to reach a peak of 6.8 ± 0.1 log₁₀ CFU/g at day 14 in Experiment A (cheeses inoculated with *E. coli* O26:H11) versus only 5.0 ± 0.6 log₁₀ CFU/g at day 20 in Experiment B (cheeses inoculated with *E. coli* O157:H7). It then remained constant until day 35. The other populations showed similar behavior in the core of the cheese in

SURVIE ET PATHOGÉNICITÉ DE STEC DANS LA TRACTUS DIGESTIF SUPÉRIEUR EN PRÉSENCE D'UNE MATRICE FROMAGÈRE AU LAIT CRU

44

S.D. Miszczycha et al. / International Journal of Food Microbiology 172 (2014) 40–48

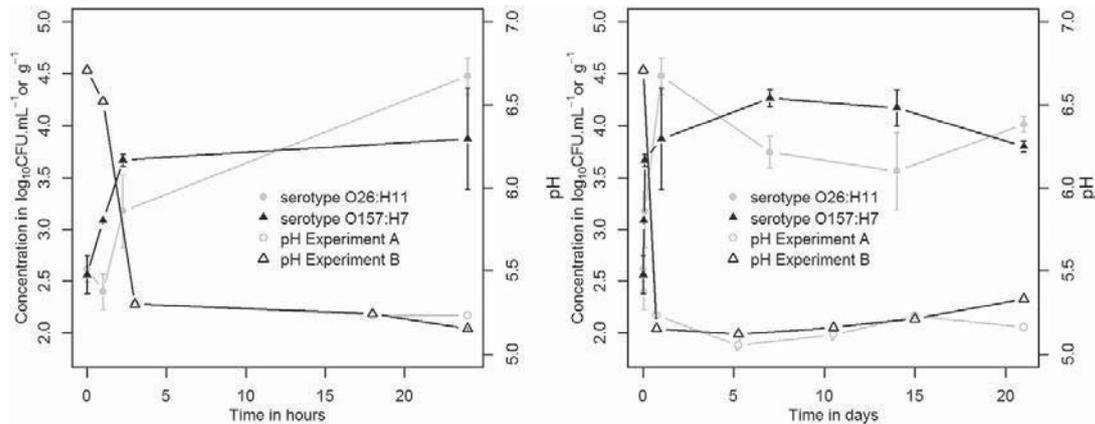


Fig. 3. Survival of *E. coli* O26:H11 and *E. coli* O157:H7 during cheese making and ripening and physicochemical characteristics of cheeses. The pH was regularly measured during cheese manufacturing. Results are expressed as means \pm standard deviations ($n = 3$).

both experiments. The level of dextran-negative lactic acid bacteria increased by 3 log₁₀ CFU/g during the first day of cheese manufacture and then remained stable until day 35. The level of dextran-producing *Leuconostoc* and *Lactobacilli* increased regularly after 24 h to reach 7.1–7.4 and 8.4–8.7 log₁₀ CFU/g, respectively, at day 35. The levels of ripening, mesophilic and thermophilic bacteria increased during the first week by 3 to 4 log₁₀ CFU/g. The levels of yeasts increased during the first week and remained constant afterward at around 6 log₁₀ CFU/g, whereas that of mold increased during cheese manufacture and ripening from 2 to 5 log₁₀ CFU/g. The concentrations of Gram-negative bacteria increased on the first day from 4 to 6 log₁₀ CFU/g, and then remained constant until day 35.

3.3. Physicochemical characteristics of cheeses

In both Experiments (A and B), cheese core pH decreased from 6.7 to 5.2 during the first day and reached 5.1 at day 7 (Fig. 3). The pH then increased slowly and reached 5.2 \pm 0.1 ($n = 3$) for Experiment A and 5.3 \pm 0.1 ($n = 3$) for Experiment B at day 28. The a_w values at day 35 in cheese cores were 0.96 for Experiments A and B.

3.4. Survival of *E. coli* O26:H11 and *E. coli* O157:H7 in simulated gastrointestinal conditions

The viability during gastrointestinal transit through the TIM of *E. coli* O26:H11 and *E. coli* O157:H7 present in cheese suspensions was determined by cross-comparing the result obtained for bacterial counting and blue dextran concentrations.

The survival percentages obtained for *E. coli* O26:H11 and *E. coli* O157:H7 in each compartment of the TIM are presented in Fig. 4. During its transit through the TIM stomach (Fig. 4A), the survival of O157:H7 was affected from 60 min digestion, the percentages obtained for bacteria being significantly lower than those of the transit marker ($P < 0.001$). At 150 min, 0.2 \pm 0.2% ($n = 3$) of ingested *E. coli* O157:H7 was recovered versus 14.3 \pm 0.3% ($n = 3$) for the transit marker. In this compartment, the level of *E. coli* O26:H11 was also significantly reduced ($P < 0.05$), but from 90 min digestion. At 150 min, 1.8 \pm 1.7% of *E. coli* O26:H11 was recovered versus 14.3 \pm 0.3% for the marker ($P < 0.001$, $n = 3$). In the gastric compartment, the survival percentage of *E. coli* O26:H11 was significantly higher than that of *E. coli* O157:H7 from 60 min digestion ($P < 0.05$).

Table 3
Survival of cheese microflora during cheese manufacture.

Microbial populations	Microbial counting (log ₁₀ CFU/g) ^a							
	0 h	1 h	2.25 h	1 d	7 d	14 d	20 d	35 d
Experiment A								
Ripening bacteria	3.8	4.5 \pm 0.1	4.4 \pm 0.1	6.2 \pm 0.2	7.5 \pm 0.3	6.7 \pm 0.2	7.9 \pm 0.1	6.8 \pm 0.5
Thermophilic bacterial populations	4.2	6.9 \pm 0.0	6.6 \pm 0.3	7.9 \pm 0.2	8.6 \pm 0.1	8.1 \pm 0.2	8.5 \pm 0.1	8.3 \pm 0.1
Mesophilic bacterial populations	4.6	6.8 \pm 0.1	6.8 \pm 0.1	8.5 \pm 0.1	8.4 \pm 0.1	8.3 \pm 0.1	8.5 \pm 0.1	8.7 \pm 0.0
Gram-negative bacteria	4.0	3.7 \pm 0.1	3.8 \pm 0.1	6.3 \pm 0.2	6.3 \pm 0.2	5.9 \pm 0.1	6.0 \pm 0.2	5.9 \pm 0.2
Facultatively heterofermentative <i>Lactobacilli</i>	1.3	1.6 \pm 0.1	1.3 \pm 0.3	4.6 \pm 0.1	6.9 \pm 0.2	7.7 \pm 0.1	7.7 \pm 0.6	8.4 \pm 0.2
Dextrane producing <i>Leuconostoc</i>	1.8	1.7 \pm 0.3	1.5 \pm 0.5	4.6 \pm 0.2	6.0 \pm 0.2	7.0 \pm 0.1	6.8 \pm 0.2	7.1 \pm 0.1
Dextrane-negative lactic acid bacteria	3.9	4.1 \pm 0.0	4.2 \pm 0.1	7.5 \pm 0.6	7.3 \pm 0.1	7.9 \pm 0.1	7.7 \pm 0.3	8.2 \pm 0.1
Enterococci	2.9	2.9 \pm 0.4	3.2 \pm 0.1	5.8 \pm 0.1	6.0 \pm 0.1	6.8 \pm 0.1	5.8 \pm 0.6	5.7 \pm 0.1
Yeasts	2.9	4.1 \pm 0.1	4.1 \pm 0.1	5.7 \pm 1.1	7.4 \pm 0.1	6.0 \pm 0.5	8.0 \pm 0.1	6.0 \pm 0.6
Molds	2.0	2.2 \pm 0.2	2.1 \pm 0.2	3.4 \pm 0.7	5.3 \pm 0.4	5.1 \pm 0.5	5.9 \pm 0.7	5.4 \pm 0.2
Experiment B								
Ripening bacteria	3.7	4.9 \pm 0.0	5.0 \pm 0.1	6.5 \pm 0.1	7.4 \pm 0.6	6.9 \pm 0.4	7.1 \pm 0.2	7.0 \pm 0.2
Thermophilic bacterial populations	3.7	6.0 \pm 0.1	5.9 \pm 0.1	7.2 \pm 0.1	8.4 \pm 0.1	8.4 \pm 0.1	8.3 \pm 0.1	8.5 \pm 0.0
Mesophilic bacterial populations	3.9	6.1 \pm 0.2	6.2 \pm 0.2	7.6 \pm 0.3	8.1 \pm 0.2	8.2 \pm 0.5	8.6 \pm 0.2	8.7 \pm 0.0
Gram-negative bacteria	3.6	4.2 \pm 0.5	3.7 \pm 0.1	6.0 \pm 0.2	5.8 \pm 0.1	5.7 \pm 0.3	5.6 \pm 0.5	5.7 \pm 0.0
Facultatively heterofermentative <i>Lactobacilli</i>	2.9	3.0 \pm 0.0	3.0 \pm 0.0	4.5 \pm 0.1	6.6 \pm 0.5	7.7 \pm 0.5	8.4 \pm 0.1	8.7 \pm 0.0
Dextrane producing <i>Leuconostoc</i>	1.3	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	4.7 \pm 0.2	6.9 \pm 0.4	7.5 \pm 0.7	7.8 \pm 0.8	7.4 \pm 0.3
Dextrane-negative lactic acid bacteria	3.7	4.9 \pm 0.1	4.9 \pm 0.1	6.8 \pm 0.2	6.9 \pm 0.2	7.7 \pm 0.6	8.3 \pm 0.2	8.6 \pm 0.1
Enterococci	2.2	1.8 \pm 0.7	2.3 \pm 0.3	4.6 \pm 0.1	4.9 \pm 0.3	4.6 \pm 0.1	5.0 \pm 0.6	4.8 \pm 0.0
Yeasts	2.7	4.1 \pm 0.1	4.1 \pm 0.0	5.1 \pm 0.3	7.3 \pm 0.7	6.5 \pm 0.6	6.2 \pm 0.5	5.4 \pm 0.0
Molds	2.0	2.4 \pm 0.4	2.6 \pm 0.1	3.3 \pm 0.3	5.2 \pm 0.7	5.3 \pm 0.5	5.2 \pm 0.3	4.0 \pm 0.0

^a Major cultivable cheese microflora were measured by plate counting (log₁₀ CFU/g). Data are means \pm standard deviations for each experiment ($n = 3$).

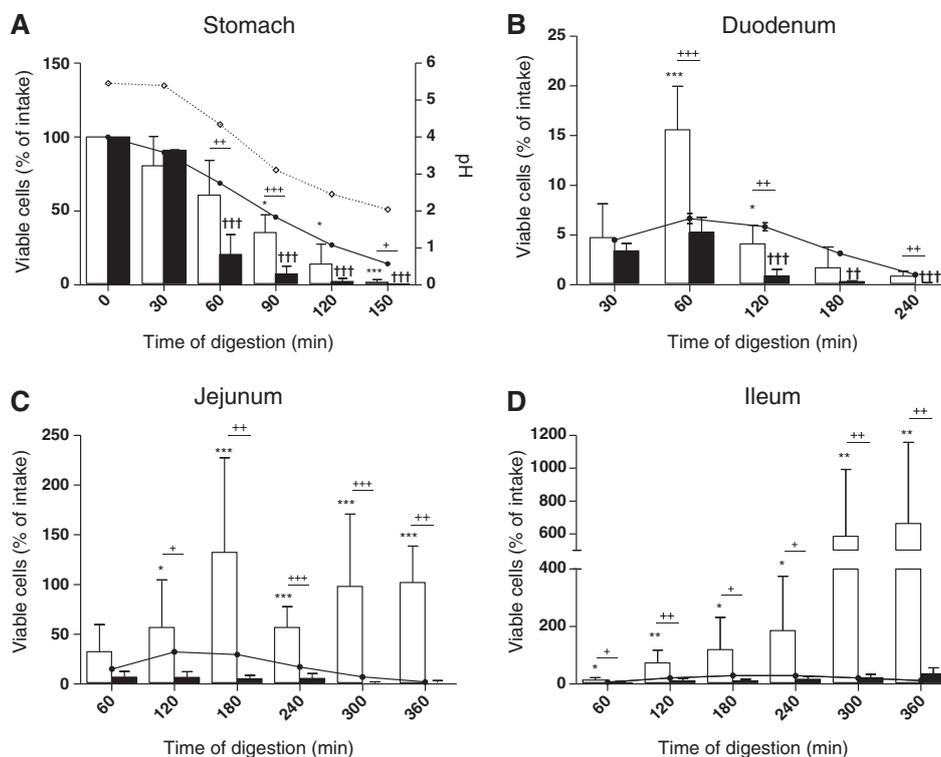


Fig. 4. Survival of STEC strains during in vitro digestions in the stomach (A), duodenum (B), jejunum (C) and ileum (D) of the TIM. The results obtained in each compartment for *E. coli* O26:H11 (white bar) and *E. coli* O157:H7 (black bar) are compared with that of the transit marker (black line). The fall of gastric pH is plotted (A, dotted line). Results are expressed as means percentages \pm standard deviations of initial intake ($n = 3$). *E. coli* O26:H11 (·) and *E. coli* O157:H7 (†) results significantly different from those of the transit marker ($P < 0.05$). *E. coli* O26:H11 results significantly different from those of *E. coli* O157:H7 at P values of < 0.05 (+).

In the duodenum (Fig. 4B), a significant decrease in *E. coli* O157:H7 level was observed from 120 min of digestion ($P < 0.01$), whereas the survival of *E. coli* O26:H11 was not affected, the curve for the bacteria fitting that of the marker (except for 60 min). In the jejunum (Fig. 4C), the curve for *E. coli* O157:H7 remained above that of the marker during the overall digestion, although the difference was not significant. The percentages obtained for *E. coli* O26:H11 were significantly ($P < 0.05$) higher than that of the blue dextran, from 120 min to the end of digestion, showing that growth resumption occurred in this compartment. At 360 min, the percentages of bacterial cells largely exceeded that of the transit marker ($102.0 \pm 36.7\%$ versus $2.1 \pm 0.4\%$, $P < 0.001$, $n = 3$). In the ileum (Fig. 4D), a non-significant growth resumption was observed at 360 min for *E. coli* O157:H7 ($35.8 \pm 20.4\%$ for bacteria versus $12.6 \pm 1.1\%$ for the marker, $n = 3$). From 60 min digestion, significant growth resumption was observed for *E. coli* O26:H11 ($P < 0.05$). At 360 min, recovery percentages of bacteria were much higher than that of the transit marker ($663.2 \pm 493.1\%$ versus $12.6 \pm 1.1\%$, $P < 0.01$, $n = 3$). In the small intestinal compartments, recovery percentages of *E. coli* O26:H11 were significantly higher than that of *E. coli* O157:H7 ($P < 0.05$).

The cumulative ileal delivery of viable bacterial cells is given in Fig. 5. Though lower, the percentages obtained for *E. coli* O157:H7 were not significantly different from that of the transit marker ($P > 0.05$). By contrast, the recovery of *E. coli* O26:H11 was significantly higher than that of the marker from 300 min digestion ($P < 0.001$). At 360 min digestion, the survival percentage of *E. coli* O26:H11 was 13 times higher than that of *E. coli* O157:H7 ($443.9 \pm 131.3\%$ versus $33.3 \pm 17.4\%$, $P < 0.001$, $n = 3$). These results strengthen those previously obtained in the small intestinal compartments of the TIM model (Fig. 4).

3.5. Survival of cheese microflora in simulated gastro-intestinal conditions

The cumulative ileal deliveries of cheese microflora are given in Fig. 6. A significant loss of viability for mesophilic and thermophilic bacterial flora, ripening bacteria, dextran-negative lactic acid bacteria, and facultatively heterofermentative *lactobacilli* was observed from 60 min digestion ($P < 0.01$) in both experiments. For all these populations, at 360 min digestion, less than 30% of ingested cells were recovered versus

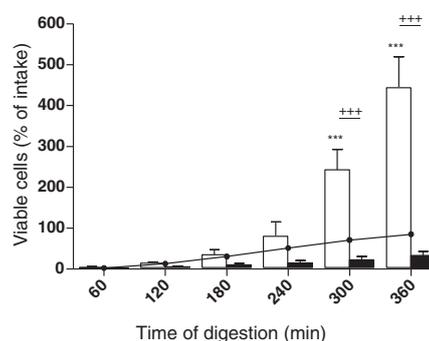


Fig. 5. Survival of STEC strains in the ileal effluents of the TIM system. Cumulative ileal deliveries of *E. coli* O26:H11 (white bar) and *E. coli* O157:H7 (black bar) were plotted and compared to that of the transit marker (black line). Results are expressed as means percentages \pm standard deviations of initial intake ($n = 3$). *E. coli* O26:H11 results significantly different from those of the transit marker (***, $P < 0.001$). *E. coli* O26:H11 results significantly different from those of *E. coli* O157:H7 at P values of < 0.001 (+++).

SURVIE ET PATHOGÉNICITÉ DE STEC DANS LA TRACTUS DIGESTIF SUPÉRIEUR EN PRÉSENCE D'UNE MATRICE FROMAGÈRE AU LAIT CRU

46

S.D. Miszczycha et al. / International Journal of Food Microbiology 172 (2014) 40–48

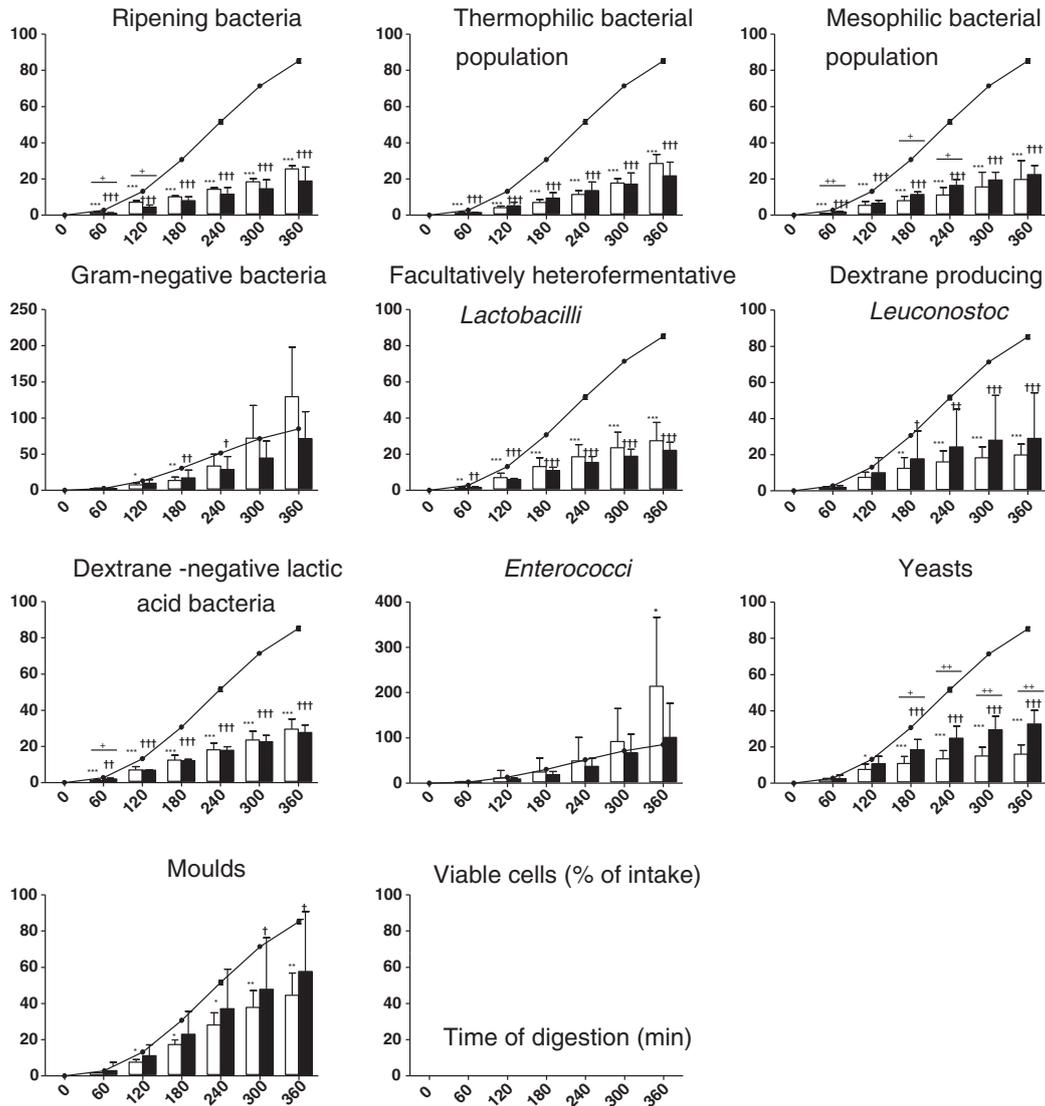


Fig. 6. Survival of cheese microflora in the ileal effluents of the TIM system. Cumulative ileal deliveries of the different populations in Experiment A (white bar) and B (black bar) were plotted and compared to that of the transit marker (black line). Data are expressed as mean percentages \pm standard deviations of initial intake ($n = 3$). Results obtained in Experiment A (-) and B (†) significantly different from that of the transit marker ($P < 0.05$). Experiment A significantly different from Experiment B at P values of < 0.05 (+).

85% for the transit marker. The survival of dextran-producing *Leuconostoc* was also significantly affected during *in vitro* digestions, but from 180 min ($P < 0.05$). For yeasts and molds, a significant loss of viability was observed in both experiments, from 180 min and 300 min digestion, respectively ($P < 0.05$). At the end of digestion, recovery percentages of molds were twice that of yeasts (around 50% versus 25%). From 180 min, yeast survival rate measured after digestion of cheeses inoculated with *E. coli* O157:H7 (Experiment B) was significantly ($P < 0.05$) higher than the rate obtained after digestion of cheeses inoculated with *E. coli* O26:H11 (Experiment A). At 360 min digestion, $32.7 \pm 7.6\%$ of ingested yeasts were recovered in Experiment B compared with $16.0 \pm 5.2\%$ in Experiment A ($n = 3$). The curves obtained for *Enterococci* (except for 360 min in Experiment A) and Gram-negative bacteria fitted that of the transit marker, showing that bacterial survival was not influenced by the digestion process ($P > 0.05$). At the

end of digestion of cheeses from Experiment A, the recovery percentage of *Enterococci* was significantly higher than that of the marker ($214.1 \pm 101.5\%$ compared with $85.2 \pm 1.2\%$, $P < 0.05$), suggesting that growth resumption occurred during *in vitro* digestion. Although not significant, Gram-negative bacteria and *Enterococci* survival percentages tended to be higher during the digestion of cheeses from Experiment A than in the digestion of cheeses from Experiment B.

4. Discussion

There is a lack of information concerning the responses of O157:H7 and non-O157:H7 STEC strains during digestion by human. This study is the first report of the survival of O157:H7 and O26:H11 STEC strains during artificial digestion of cheese suspensions. It also provides a better understanding of cheese microflora behavior during human digestion.

Throughout the making and ripening of these uncooked pressed cheeses, the fate of STEC strains was similar to that previously described (Miszczycha et al., 2013), with an increase in STEC levels during the first hours followed by stability in cell concentrations during the ripening. This increase is due to cell concentration during curd formation, generally increasing STEC levels by a factor of ten (personal data) and bacterial growth. Nevertheless, the maximum level of *E. coli* O26:H11 was lower than that previously observed (Miszczycha et al., 2013). This may result from variations in the biochemical composition of milk, quantitative or qualitative differences in autochthonous raw milk microbiota (the level of *Enterococci* was ten times higher in Experiment A than in Experiment B). Inhibition or activation of STEC by native microflora has been scantily described (Delbès-Paus et al., 2013; Duffy et al., 1999). The mechanisms involved include nutrient competition and generation of an unfavorable environment by production of organic acids, hydrogen peroxide, carbon dioxide, diacetyl, and bacteriocins (Delbès-Paus et al., 2013; Farrokh et al., 2013).

To assess the survival of STEC and cheese microflora in physicochemical conditions of human digestion, contaminated cheeses underwent digestion in the TIM system. A loss of viability was observed for STEC strains during bacterial transit through the artificial stomach and duodenum, whereas growth resumption was noted in the distal part of the small intestine. In the stomach, the loss of viability could result from the synergic effect of extremely acidic conditions and gastric secretions. The gastric juice is known to be the first barrier against various infectious diseases (Smith, 2003). The loss of viability of the STEC strains (especially of *E. coli* O157:H7) in the duodenum could be a consequence of the action of bile salts, as previously hypothesized (Etienne-Mesmin et al., 2011; Thanassi et al., 1997). The growth renewal observed in the jejunum and ileum (especially for *E. coli* O26:H11) may result from the occurrence of less stringent conditions such as pH values closer to neutrality, and bile salt concentrations lower than that found in the duodenum. The results obtained in the present study for *E. coli* O157:H7 strain 721.4 are in line with those previously found by Etienne-Mesmin et al. (2011) during in vitro digestion in the TIM system of a meal containing raw ground beef contaminated with *E. coli* O157:H7 strain EDL 933. Interestingly, the survival percentages obtained for EDL 933 when co-administered with a probiotic yeast strain of *S. cerevisiae* were similar to that observed here for *E. coli* O157:H7 strain 721.4 when ingested within a cheese matrix containing the autochthonous raw milk microbiota (including yeasts).

Most of the cheese microflora populations studied were sensitive to gastro-intestinal conditions, with the exception of Gram-negative bacteria and *Enterococci*. The survival percentages were similar for the two experiments (cheeses artificially inoculated with *E. coli* O26:H11 and *E. coli* O157:H7), except for yeasts and *Enterococci*. The higher level of *Enterococci* in cheese at the end of ripening in Experiment A can explain why growth resumption was observed at the end of digestion only during this experiment. *Enterococci* species carried in the milk used in Experiment A may also be more resistant to the gastro-intestinal conditions than those present in the milk used for Experiment B. Regarding yeasts, the same two strains, *D. hansenii* and *G. candidum*, were added to milk as a starter. Nevertheless, other yeasts from raw milk could be present in cheese, and it can be hypothesized that yeast strains from raw milk used in Experiment B were more resistant to digestion than that from raw milk used in Experiment A.

An important finding is that the survival percentages of *E. coli* O26:H11 during in vitro digestion were different from that of *E. coli* O157:H7.

In the stomach, the survival of *E. coli* O157:H7 was significantly affected from 60 min digestion ($P < 0.001$) compared with 90 min for *E. coli* O26:H11 ($P < 0.05$). In line with these results, several authors have already shown the greater ability of *E. coli* O26:H11 strains to survive acidic pH compared with *E. coli* O157:H7 (Elhadidy and Mohammed, 2012; Large et al., 2005). This may result from differences in acid resistance. EHEC have evolved at least five distinct mechanisms of acid resistance, including four amino acid decarboxylase-dependent

systems (lysine, ornithine, arginine and glutamate) and a glucose catabolite repressed system. In the present study, the activity of the GAD system was tested, as it is the most efficient in protecting cells during extreme acid challenges, and the main one involved in acid resistance in the pH conditions encountered in the human stomach (Foster, 2004; Ma et al., 2003). The results indicate that *E. coli* O26:H11 strain F15338 possesses normal GadA/B activity whereas it represents approximately half of total GAD activity for *E. coli* O157:H7 strain 721.4. *gadA* or *gadB* mutants showed mixed colors as obtained here for *E. coli* O157:H7 (Jung and Kim, 2003). It can thus be hypothesized that one of these two genes is defective in O157:H7 strain 721.4.

In the jejunum and ileum, the growth resumption observed for *E. coli* O26:H11 was more than ten times higher than that of *E. coli* O157:H7. This may be related to the physiological state of the STEC strains during digestion. During gastric digestion, because of the defective GAD system, *E. coli* O157:H7 may be less effective in increasing its internal pH, leading to cell injuries. This can explain why *E. coli* O157:H7 grows less well in the small intestinal compartments of the TIM system than *E. coli* O26:H11.

In this study, it has been demonstrated, during simulated human digestion of raw milk uncooked pressed cheeses experimentally contaminated with STEC, that *E. coli* O26:H11 strain F15338A has a greater ability to survive in the TIM environment than *E. coli* O157:H7 721.4. We hypothesize that this difference results from a variation in acid resistance among STEC strains that may or may not lend them ecological superiority. This implies that a large number of isolates should be examined to draw any conclusions about survival of O157:H7 and non-O157 STEC strains, if possible in dynamic multi-compartmental in vitro models that more closely mimic the human physiological conditions. These data, combined with the establishment of virulence traits, should allow a better risk analysis of STEC-contaminated cheeses.

Acknowledgments

The authors sincerely thank Sandrine Chalancon from the EA CIDAM of the Université d'Auvergne, Sarah Ganet from the LMAP-NRL STEC of VetAgro Sup and René Lavigne and Robert Didienne from the URF of the INRA, for their technical assistance, Jean-Michel Cardot from the EA CIDAM for the statistical analysis and the Direction Générale de l'Alimentation (DGAL). This work was funded by the CNIEL through a thesis grant and financial support.

References

- Baylis, C.L., 2009. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Int. J. Dairy Technol.* 62, 293–307.
- Blanquet-Diot, S., Denis, S., Chalancon, S., Chaira, F., Cardot, J.M., Alric, M., 2012. Use of artificial digestive systems to investigate the biopharmaceutical factors influencing the survival of probiotic yeast during gastrointestinal transit in humans. *Pharm. Res.* 29, 1444–1453.
- Delbès-Paus, C., Miszczycha, S., Ganet, S., Helinck, S., Veisseire, P., Pochet, S., Thevenot, D., Montel, M.-C., 2013. Behavior of *Escherichia coli* O26:H11 in the presence of *Hafnia alvei* in a model cheese ecosystem. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 212–218.
- Duffy, G., Whiting, R.C., Sheridan, J.J., 1999. The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 16, 299–307.
- Elashoff, J.D., Reedy, T.J., Meyer, J.H., 1982. Analysis of gastric emptying data. *Gastroenterology* 83, 1306–1312.
- Elhadidy, M., Mohammed, M.A., 2012. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw-milk cheese in Egypt: prevalence, molecular characterization and survival to stress conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* 56, 120–127.
- Espié, E., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Pihier, N., Vaillant, V., Francart, S., Capek, I., De Valk, H., 2006. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurized cows cheese, France, 2005. In: Sofronidis, J. (Ed.), Abstract of the 6th International Symposium on Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* Infections. Cambridge Publ., West Leederville, WA (Melbourne, Australia, 2006. Oct. 30–Nov. 1).
- Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Privat, M., Denis, S., Cardot, J.M., Alric, M., Blanquet-Diot, S., 2011. Effect of a new probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1127–1131.
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condron, R., De Reu, K., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Miszczycha, S., Moussiegt, S., Verstraete, K., Cerf, O., 2013. Review of

SURVIE ET PATHOGÉNICITÉ DE STEC DANS LA TRACTUS DIGESTIF SUPÉRIEUR EN PRÉSENCE D'UNE MATRICE FROMAGÈRE AU LAIT CRU

- Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiol.* 162, 190–212.
- Foster, J.W., 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 898–907.
- Jung, I.L., Kim, I.G., 2003. Polyamines and glutamate decarboxylase-based acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 278, 22846–22852.
- Karmali, M.A., Gannon, V., Sargeant, J.M., 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet. Microbiol.* 140, 360–370.
- Large, T.M., Walk, S.T., Whittam, T.S., 2005. Variation in acid resistance among shiga toxin-producing clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2493–2500.
- Ma, Z., Gong, S., Richard, H., Tucker, D.L., Conway, T., Foster, J.W., 2003. GadE (YhiE) activates glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 49, 1309–1320.
- Madic, J., Peytavin de Garam, C., Vingadassalon, N., Oswald, E., Fach, P., Jamet, E., Auvray, F., 2010. Simplex and multiplex real-time PCR assays for the detection of flagellar (H-antigen) *fljC* alleles and intimin (*eae*) variants associated with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and O157:H7. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1696–1705.
- Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R., Huis in't Veld, J.H.J., 1995. A multicompartimental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *Altern. Lab. Anim.* 23, 197–209.
- Miszczycza, S.D., Ganet, S., Dunière, L., Rozand, C., Loukiadis, E., Thevenot-Sergentet, D., 2012. Novel real time PCR method to detect *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk cheese and raw ground meat. *J. Food Prot.* 75, 1373–1381.
- Miszczycza, S.D., Perrin, F., Ganet, S., Jamet, E., Tenenhaus-Aziza, F., Montel, M.C., Thevenot-Sergentet, D., 2013. Behavior of different Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes in various experimentally contaminated raw milk cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 150–158.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.
- Nielsen, E.M., Andersen, M.T., 2003. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2884–2893.
- Paton, J.C., Paton, A.W., 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450–479.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., Fach, P., 2004. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol. Cell. Probes* 18, 185–192.
- Rice, E.W., Johnson, C.H., Dunnigan, M.E., Reasoner, D.J., 1993. Rapid glutamate decarboxylase assay for detection of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4347–4349.
- Smith, J.L., 2003. The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *J. Food Prot.* 66, 1292–1303.
- Takada, A., Umitsuki, G., Nagai, K., Wachi, M., 2007. RNase E is required for induction of the glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 158–164.
- Thanassi, D.G., Cheng, L.W., Nikaido, H., 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179, 2512–2518.
- Tzschoppe, M., Martin, A., Beutin, L., 2012. A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 152, 19–30.
- Waterman, S.R., Small, P.L.C., 2003. Transcriptional expression of *Escherichia coli* glutamate-dependent acid resistance genes *gadA* and *gadBC* in an *hns rpoS* mutant. *J. Bacteriol.* 185, 4644–4647.

Commentaires de la publication n°1

La survie des souches STEC et la régulation des facteurs de pathogénicité dans l'environnement digestif humain sont des éléments indispensables à l'évaluation du risque pour la santé publique mais restent mal connus par manque de modèles d'étude adaptés. Avant ce travail, le comportement de souches STEC ingérées avec une matrice fromagère dans le tractus digestif humain n'était pas connu. L'objectif de ces travaux était double : (i) étudier le comportement de différents sérotypes de STEC au cours des différentes étapes de la fabrication d'un fromage au lait cru – type pâte pressée non cuite – et (ii) étudier *in vitro* la survie et la pathogénicité des différentes souches dans le tractus digestif supérieur de l'Homme.

Les concentrations des inocula bactériens ont été définies afin d'obtenir des doses identiques pour chacune des souches à la fin de la période d'affinage et les différents paramètres physico-chimiques (pH et a_w) et microbiologiques (pathogènes et flores technologiques) ont été suivis au cours du processus de fabrication fromager. Puis, nous avons procédé à l'évaluation du taux de survie (i) de souches STEC de différents sérotypes (O26:H11 et O157:H7) et (ii) des flores technologiques présentes dans les fromages au lait cru – type pâte pressée non cuite – dans les différents compartiments du système digestif artificiel TIM 1. Les paramètres physico-chimiques appliqués au système ont permis de simuler les conditions rencontrées dans la lumière de l'estomac et de l'intestin grêle de l'adulte sain lors de la digestion d'un repas « solide ». La survie des différents micro-organismes (pathogènes et flores technologiques) a été évaluée au cours du temps, compartiment par compartiment, en comparant les profils obtenus pour les micro-organismes avec ceux d'un marqueur de transit inerte non absorbable : le bleu de dextran (MINEKUS *et al.*, 1995).

Évaluation de la survie d'O26:H11 et d'O157:H7 dans l'estomac et l'intestin grêle *in vitro*

Mortalité bactérienne en conditions gastriques

Nos résultats ont permis de mettre en évidence une mortalité des deux souches STEC étudiées (en présence d'une matrice fromagère et de sa flore autochtone) dans les conditions gastrique et duodénale, suivie d'une reprise de croissance dans le jéjunum et iléon en fin de digestion. Le comportement, dans l'environnement digestif *in vitro*, de la souche *E. coli* O157:H7 721.4 ingéré avec une matrice fromagère au lait cru est équivalent à celui de la souche O157:H7 EDL 333 (EHEC) co-administrée, au sein d'un repas complet, avec la souche probiotique *S. cerevisiae* CNCM I-3856 (ETIENNE-MESMIN *et al.*, 2011b). A titre d'exemple, après 300 min de digestion, 23% des bactéries inoculées initialement sont dénombrées dans le compartiment iléal du TIM 1 pour les deux souches. En revanche, le comportement de la souche *E. coli* O26:H11 F15338A est différent de celui des deux souches de sérotype O157:H7, *i.e.* mortalité dans le compartiment gastrique plus faible et reprise de croissance plus importante dans le jéjunum et l'iléon. Ainsi 587% des bactéries inoculées initialement sont dénombrées dans le compartiment iléal du

TIM 1 après 300 min de digestion.

Il n'existe pas de données sur la sensibilité différentielle des sérotypes O26 et O157 vis-à-vis des sels biliaires. Par contre, parmi les différents sérotypes de STEC issus de produits laitiers, il est admis que le sérotype O26:H11 a une capacité supérieure à survivre dans un environnement acide par rapport au sérotype O157:H7. Les voies AR2 et AR3 permettent aux *E. coli* de survivre dans des environnements extrêmement acides comme celui de l'estomac (ZHAO et HOURY, 2010). La caractérisation des souches utilisées dans cette étude n'a pas porté sur la recherche des gènes impliqués dans le système de décarboxylation de l'arginine (AR3) mais il a été montré qu'elles possèdent toutes les deux les gènes impliqués dans le système de décarboxylation du glutamate (AR2). Cependant, l'évaluation des performances de ce système de résistance à l'acidité (« GAD assay ») suggère que la souche *E. coli* O157:H7 721.4 possède un AR2 moins opérationnel que celui de la souche *E. coli* O26:H11 F15338A corroborant les résultats de suivie obtenus dans l'environnement gastrique au cours de nos travaux. Dans son ensemble, la régulation du système AR2 est extrêmement complexe et intègre des signaux environnementaux et des adaptations physiologiques. En effet, l'activité du système AR2 est régulée par plus de vingt protéines et par des ARN non codants. Néanmoins, l'activateur central du système est la protéine GadE se liant à la boîte « gad » située en amont des sites d'initiation de la transcription de *gadA* et de l'opéron *gadBC* alors que la protéase Lon dégrade constitutivement la protéine GadE, même dans des conditions acides (Figure 32). Parallèlement, la protéine GadB doit subir un changement de conformation pour être active à pH acide et un canal chlorure doit réguler le potentiel transmembranaire de la cellule en réponse à l'acidité (ZHAO et HOURY, 2010). La différence d'activité du système AR2 entre les deux souches peut donc avoir différentes origines : transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle.

Reprise de croissance dans l'intestin grêle

La reprise de croissance observée dans les compartiments jéjunal et iléal du système gastro-intestinal TIM 1 en fin de digestion pourrait s'expliquer par la présence de conditions physico-chimiques moins agressives pour les micro-organismes (pH proche de la neutralité, faibles concentrations en sels biliaires du fait de leur absorption passive dans ces compartiments, temps de séjour plus long). Le taux de survie global de O26:H11 F15338A est treize fois supérieur à celui de O157:H7 721.4. Cette différence de survie pourrait résulter d'une concentration en protons intra-cellulaires supérieure chez *E. coli* O157:H7 721.4, comparativement à O26:H11 F15338A, après son passage dans le compartiment gastrique en raison d'un système AR2 moins performant. En effet, une défaillance fonctionnelle d'un seul des composants du système AR2 pourrait conduire à une augmentation des protons intra-cellulaires et du potentiel électrique de la membrane bactérienne et par conséquent pourrait limiter la reprise de croissance bactérienne dans les parties distales de l'intestin grêle. Bien que le système AR3 permette également d'augmenter le pH intra-cellulaire dans un environnement acide, son action ne suffirait pas à elle seule à se substituer à l'action synergique des systèmes AR2 et AR3.

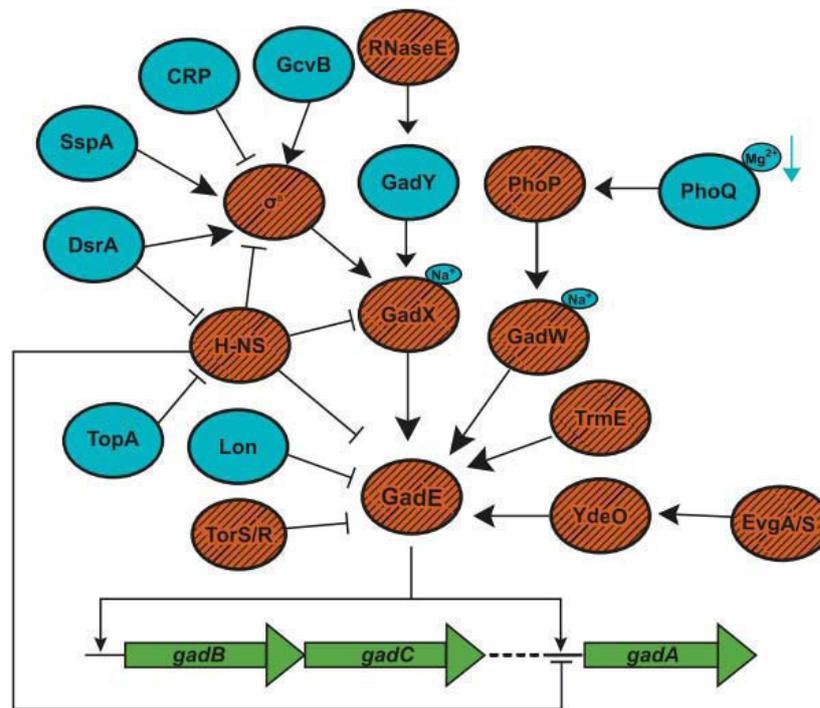


FIGURE 32. Représentation schématique de la régulation du système de décarboxylation du glutamate. Le système AR2 est régulé par plus de vingt protéines et des ARN non codants. Les flèches indiquent l'activation et les lignes en forme de « T » la répression. Les hachures symbolisent un effet de la protéine sur la transcription du gène de la protéine connectée. L'absence de hachure implique une régulation via d'autres mécanismes comme des interactions protéine-protéine, ADN-protéine ou encore ARN-ARN (D'après ZHAO et HOURY, 2010). Mg^{2+} : ion magnésium, Na^{+} : ion sodium

Les données de survie dans l'environnement digestif de ces deux souches ne concordent pas avec les données épidémiologiques. En effet, les épidémies liées à la consommation de produits laitiers contaminés par des EHEC sont majoritairement dues (dans 56% des cas) au sérotype O157:H7 qui survit moins dans notre étude aux conditions digestives que O26:H11 F15338A (FARROKH *et al.*, 2013). Néanmoins, les données de survie obtenues dans ces travaux ne sont bien sûr pas généralisables à l'ensemble des souches de ces deux sérogroupes, une seule souche pour chaque sérotype O26:H11 et O157:H7 ayant été testée. De plus, les deux souches testées, isolées de produits laitiers, n'ont jamais été impliquées dans des épidémies, même si elles présentent dans leur génome les principaux gènes de virulence des EHEC (*eae* et *stx*). Par contre, le génotypage *stx* indique que la souche *E. coli* O26:H11 F15338A porte le gène *stx1* et la souche *E. coli* O157:H7 721.4 le gène *stx2*, or la production de Stx2 par une souche est souvent associée aux cas pathologiques les plus sévères. L'ensemble de ces informations n'est pas suffisant pour prédire les potentialités pathogènes de ces deux souches. L'analyse phylogénétique associée au génotypage et au sous-typage *stx* des souches infectantes pourrait présager de leur virulence et de leur implication potentielle lors d'une infection. Parallèlement, l'expression, dans l'environnement digestif humain, des gènes de virulence et la production des protéines associées doivent être pris en compte.

SURVIE ET PATHOGÉNICITÉ DE STEC DANS LA TRACTUS DIGESTIF SUPÉRIEUR EN PRÉSENCE D'UNE MATRICE FROMAGÈRE AU LAIT CRU

Ces facteurs n'ont pas pu être étudiés ici en raison de problèmes techniques (ARN de mauvaise qualité, concentration en Stx inférieure à la limite de détection du test ELISA).

À l'heure actuelle, les mécanismes par lesquels une souche STEC peut potentiellement devenir EHEC dans l'environnement digestif humain restent donc inconnus. Le concept de « pathogénicité prévisionnelle » pourrait être envisageable dans la gestion de la sécurité sanitaire des produits alimentaires. Ces modèles devraient intégrer des données de résistance à l'acidité et aux sels biliaires, de survie et de régulation spatio-temporelle des différents facteurs de virulence lors de leur passage dans le tractus gastro-intestinal humain.

Évaluation de la survie de la flore technologique dans l'estomac et l'intestin grêle *in vitro*

Les données de survie, au cours du transit gastro-intestinal, obtenues pour la flore technologique présente au sein d'une matrice fromagère sont inédites. Les entérocoques et les bactéries Gram négatif de ces fromages ne sont pas sensibles aux conditions environnementales du tractus digestif supérieur. Ainsi, certains micro-organismes de la microflore du lait cru pourraient atteindre le côlon à des concentrations proches de celles présentes dans l'aliment ingéré. L'étude des propriétés probiotiques potentielles des entérocoques du lait cru est envisageable afin de sélectionner des souches d'intérêt. La majorité des bactéries probiotiques étant Gram positif, l'étude des propriétés probiotiques potentielles des bactéries Gram négatif semble moins pertinente (BUTEL, 2014; PETROF, 2009).

Toutefois, l'ensemble des résultats obtenus doit être interprété avec prudence. En effet, le système gastro-intestinal TIM 1 est dépourvu de microbiote au sein de ses différents compartiments. L'effet de barrière du microbiote intestinal n'est donc pas pris en compte dans ce modèle. Par ailleurs, les doses infectieuses utilisées dans nos expérimentations sont largement supérieures à celles suspectées lors d'épidémies. Les outils disponibles à l'heure actuelle ne permettent pas d'utiliser les modèles avec de faibles concentrations et les études transcriptomique et protéomique impliquent de travailler avec des doses plus élevées.

Chapitre 2

Survie et pathogénicité des EHEC dans l'environnement colique et influence d'un traitement probiotique

Sommaire

Influence d'un traitement probiotique sur la survie et la pathogénicité des EHEC dans un environnement colique humain simulé et sur la translocation du pathogène dans un modèle murin d'anses iléales	123
Introduction aux publications n°2 et 3	123
Commentaires des publications n°2 et 3	186

Influence d'un traitement probiotique sur la survie et la pathogénicité des EHEC dans un environnement colique humain simulé et sur la translocation du pathogène dans un modèle murin d'anses iléales

Introduction aux publications n°2 et 3

La survie des EHEC et la régulation des facteurs de pathogénicité dans l'environnement digestif humain sont importants pour la virulence, mais restent mal connues par manque de modèles d'études adaptés. Les principaux sites d'actions suggérés chez l'Homme pour les EHEC sont l'iléon terminal et le côlon (CHONG *et al.*, 2007 ; MARIANI-KURKDJIAN et BONACORSI, 2014). Cependant, aucune donnée n'est disponible concernant la survie et la régulation des gènes de virulence des EHEC dans l'environnement colique humain. De plus, plusieurs études suggèrent l'importance du microbiote intestinal dans

SURVIE ET PATHOGÉNICITÉ DES EHEC DANS L'ENVIRONNEMENT COLIQUÉ ET INFLUENCE D'UN TRAITEMENT PROBIOTIQUE

l'évolution des infections à EHEC (DE SABLET *et al.*, 2009; GAMAGE *et al.*, 2006, 2003; TOSHIMA *et al.*, 2007). En particulier, DE SABLET *et al.* (2009) ont montré, *in vitro* et *ex vivo*, dans des contenus cœcaux de rats associés à un microbiote intestinal humain, que des facteurs solubles sécrétés par une espèce du microbiote intestinal humain, *Bacteroides thetaiotaomicron*, peuvent réprimer la synthèse de Stx chez O157:H7. À l'inverse, des colicines produites par les bactéries colicinogéniques peuvent augmenter la production de Stx (TOSHIMA *et al.*, 2007). Par ailleurs, la présence du microbiote commensal de l'intestin murin réduit la colonisation par *E. coli* O157:H7 (GAMAGE *et al.*, 2006).

Dans la lutte contre les EHEC, différents moyens préventifs et/ou curatifs alternatifs ont été envisagés, comme l'utilisation de probiotiques. La levure *S. boulardii* est un probiotique fréquemment utilisé chez l'homme dans le traitement des diarrhées associées à la prise d'antibiotiques et a montré *in vitro* et *in vivo* des propriétés antagonistes intéressantes vis-à-vis de différents pathogènes, dont les EHEC. Des études ont montré que *S. boulardii* diminuait l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires dans les cellules coliques T84 infectées par *E. coli* O157:H7, et ce, uniquement lorsque le traitement probiotique était antérieur à l'infection (DAHAN *et al.*, 2003; DALMASSO *et al.*, 2006). D'autres souches de levures ont également montré une action inhibitrice vis-à-vis des EHEC. En effet, lors de travaux précédents au laboratoire, ETIENNE-MESMIN *et al.* (2011b) ont montré que la souche *S. cerevisiae* CNCM I-3856, co-administrée avec *E. coli* O157:H7, diminuait significativement la reprise de croissance du pathogène dans les parties distales de l'intestin grêle dans le système digestif artificiel TIM 1.

Ainsi, dans un premier temps, afin de poursuivre ces travaux, nous nous sommes intéressés à la survie d'une souche *E. coli* O157:H7 (EDL933) délétée des gènes codant les toxines Stx1 (EDL933 Δ *stx1*) dans l'environnement colique humain *in vitro* et l'influence sur celle-ci d'un traitement probiotique à base de levures *S. cerevisiae* CNCM I-3856 (co-administré en même temps que le pathogène), en utilisant un fermenteur de type semi-continu développé par l'EA-CIDAM, le système ARCOL. Ces travaux ont également permis d'évaluer l'influence de la souche *E. coli* O157:H7 sur le microbiote intestinal humain. La levure *S. boulardii* ayant montré des actions inhibitrices contre les EHEC (BACH *et al.*, 2003), cette souche a également été testée.

L'ensemble des résultats obtenus a fait l'objet d'une publication :

THÉVENOT, J., ETIENNE-MESMIN, L., DENIS, S., CHALANCON, S., ALRIC, M., LIVRELLI, V. et S. BLANQUET-DIOT (2013). Enterohémorragic *Escherichia coli* O157:H7 survival in an *in vitro* model of the human large intestine and interactions with probiotic yeasts and resident microbiota. *Applied and environmental microbiology*, vol. 79, n° 3, p. 1058-1064.

Ces résultats ont également fait l'objet de trois posters présentés à la Journée Scientifique du Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne (Clermont-Ferrand, France, Novembre 2011), à la 7^{ème}

Journée de la Recherche de l'Institut Fédératif de la Recherche en Auvergne (Clermont-Ferrand, France, Novembre 2011) et au 8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (Amsterdam, Pays-Bas, Mai 2012).

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'effet des levures probiotiques *S. cerevisiae* CNCM I-3856 sur la survie et la pathogénicité de la souche *E. coli* O157:H7 EDL 933 dans l'environnement colique humain simulé, lorsque celles-ci sont administrées préalablement à l'ajout du pathogène et en post-exposition. Ces travaux ont également permis d'évaluer l'influence de la souche *E. coli* O157:H7 et/ou du probiotique sur le microbiote intestinal humain, lorsque trois donneurs différents de selles sont impliqués (un seul était impliqué dans la première étude).

Enfin, dans le but de compléter les données obtenues *in vitro*, l'effet antagoniste des levures probiotiques vis-à-vis de l'interaction d'EDL 933 avec l'épithélium intestinal a été testé en modèle murin.

L'ensemble des résultats obtenus vont être soumis à publication dans Environmental Microbiology :

THÉVENOT, J.*, CORDONNIER, C.*, ROUGERON, A., LE GOFF, O., NGUYEN, HTT., DENIS, S., ALRIC, M., LIVRELLI, V. et S. BLANQUET-DIOT. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* has donor-dependent effect on human gut microbiota and may be antagonized by probiotic yeast during translocation across Peyer's patches.

*co-premiers auteurs.

Ces résultats sont présentés, dans ce manuscrit, sous la forme d'un article qui sera retravaillé avant soumission au journal.



Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Survival in an *In Vitro* Model of the Human Large Intestine and Interactions with Probiotic Yeasts and Resident Microbiota

Jonathan Thévenot,^{a,b} Lucie Etienne-Mesmin,^{a,b} Sylvain Denis,^a Sandrine Chalancon,^a Monique Alric,^a Valérie Livrelli,^{b,c} Stéphanie Blanquet-Diot^a

Clermont Université, Université d'Auvergne, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, EA 4678 CIDAM, Conception Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament, Clermont-Ferrand,^a Clermont Université, Université d'Auvergne, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, M2ISH, Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte UMR INSERM/Université d'Auvergne U1071 USC-INRA 2018, Clermont-Ferrand,^b CHU Clermont-Ferrand, Service de Bactériologie, Clermont-Ferrand,^c France

This is the first report on the fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in simulated human colonic conditions. The pathogen was progressively eliminated from the bioreactor and did not modify the major populations of resident microbiota. The coadministration of the *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 probiotic strain led to a significant increase in acetate production but did not reduce pathogen viability.

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is a major food-borne zoonotic agent associated with outbreaks worldwide. Human contamination occurs mainly after consumption of raw or undercooked ground beef, vegetables, water, and dairy products contaminated by bovine feces (1). EHEC causes illnesses ranging from uncomplicated diarrhea to life-threatening complications, such as hemolytic-uremic syndrome. Most of the outbreaks and sporadic cases are caused by EHEC strains belonging to serotype O157:H7, but other serotypes can be involved. For instance, EHEC of the O104:H4 serotype was responsible for a large outbreak in June 2011 in Europe (2, 3). The virulence of EHEC strains is mainly associated with their ability to damage intestinal epithelial cells and produce Shiga toxins Stx1 and/or Stx2.

Although the terminal ileum and colon are assumed to be the main sites of EHEC colonization and pathology in humans (4, 5), data on bacterial survival and regulation of virulence genes in the human intestine are scant. Human studies are obviously unethical when pathogenic microorganisms are involved, and no animal model can reproduce the physiopathology of EHEC infection as a whole (6). Hence, for technical, economic, and ethical reasons, *in vitro* models offer a relevant alternative to *in vivo* studies (7, 8). EHEC survival was recently evaluated in a dynamic *in vitro* system reproducing the luminal conditions of the human stomach and small intestine (9), but no data are available on their viability in human large intestinal conditions. Recent studies have suggested that human intestinal microbiota may play a key role in the outcome of EHEC infection (10, 11). de Sablet et al. (10) showed, *in vitro* and *ex vivo*, using the cecal contents of human digestive microbiota-associated rats, that soluble factors released by the human microbiota repressed Stx synthesis in EHEC O157:H7. Conversely, DNase colicins produced by colicinogenic flora may enhance Stx production (11). Moreover, Kendall et al. (12) showed that ethanolamine, a major component of mammalian and bacterial membranes found in the large intestine, regulates O157:H7 virulence gene expression.

Since antibiotic therapy to treat EHEC infection is controversial (13, 14), probiotics are being investigated as an alternative strategy. Probiotics are defined as live microorganisms that resist digestion and reach the colon alive and that when administered in

adequate amounts, confer a health benefit on the host (15). They can exert protective effects against enteric pathogens via direct antagonism, immunomodulation, and/or competitive exclusion (16). Probiotic yeasts have already shown beneficial effects in the control of EHEC infection. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (*S. boulardii*) reduces O157:H7 growth in ruminal fluids (17) and decreases proinflammatory pathways in EHEC-infected T84 human colonic cells (18, 19). Using an *in vitro* model of the human gastrointestinal tract, Etienne-Mesmin et al. (9) also showed that another probiotic yeast, *S. cerevisiae* CNCM I-3856, significantly decreases EHEC O157:H7 growth resumption in the distal parts of the small intestine, possibly through the combined action of ethanol and other inhibitory substances.

This study used the *in vitro* model of the human large intestine ARCOL (artificial colon) to (i) evaluate the survival of an EHEC O157:H7 strain in simulated human colonic conditions and (ii) investigate the effect of probiotic treatment with *S. cerevisiae* strains. In addition, the influence of both pathogen and probiotics on the main populations of resident microbiota was also assessed.

Fermentation in the ARCOL. ARCOL is a one-stage fermentation system (Applikon, Schiedam, The Netherlands) that integrates the main parameters of the *in vivo* human colonic environment (20), including pH, temperature, supply of ileal effluents, retention time, anaerobiosis maintained by the sole activity of resident microbiota, and passive absorption of water and fermentation metabolites by dialysis fibers (Table 1). The bioreactor was inoculated with fresh feces from a healthy volunteer who had no history of antibiotic treatment 3 months before the study, and it was used under semicontinuous conditions.

Received 26 October 2012 Accepted 27 November 2012

Published ahead of print 30 November 2012

Address correspondence to Stéphanie Blanquet-Diot, stephanie.blanquet@udamail.fr.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.03303-12

TABLE 1 Parameters of *in vitro* fermentations in the ARCOL system

Parameters of <i>in vitro</i> fermentation	Exptl conditions
Temp	37°C
Continuous stirring	400 rpm
pH	6.3
Pressure	1.1 bar
Vol of fermentative medium	450 ml
Retention time	36 h
Redox potential	-400 mV

Two fermentations were carried out (Fig. 1). Both started after a 3-day stabilization phase (phase A) and were divided into three different 3-day phases (B, C, and D). In fermentation 1 (F1), *E. coli* O157:H7 (an isogenic mutant of the reference strain EDL 933 lacking the *stx₁* gene but harboring *stx₂*) (21) was first administered alone (phase B), then coadministered with *S. boulardii* (Biocodex, Gentilly, France) (phase C), and finally coadministered with *S. cerevisiae* CNCM I-3856 (Lesaffre Human Care, Milwaukee, WI) (phase D). In fermentation 2 (F2), phases C and D were inverted to ensure that there was no carryover of treatment effects between phases. An aerobic culture (LB, 24 h, 37°C) of *E. coli* O157:H7 was introduced in the vessel (10^5 CFU/ml of colonic medium) (9), whereas yeasts were supplied in active dried powder form (10^7 CFU/ml of colonic medium) (22). Samples were regularly collected from the colonic medium and plated onto selective media (Table 2) to determine O157:H7 and probiotic yeast survival kinetics. Survival rates were assessed by comparing the profiles obtained for bacteria and yeasts with that of a theoretical marker which simulates the behavior of an inert (i.e., nondegraded and nonabsorbed) compound. Its removal from the bioreactor was described by $C_t = C_0 \times e^{(-t/\tau)}$, where C_t is the concentration of the marker at time t , C_0 its initial concentration, t the time of fermentation, and τ the residence time (23). In parallel, the main bacterial populations of human intestinal microbiota were measured by plate counts (Table 2) and real-time quantitative PCR (qPCR) analysis. Total genomic DNA was extracted from 250 µl colonic medium by using the two first steps of Yu and Morrison's protocol (24) and the QIAamp DNA stool minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Specific primers used in this study are listed in Table 3. PCR amplification and detection were performed with a Stratagene Mx3005P QPCR system (Agilent Technologies, Massy, France).

TABLE 2 Selective media used^a

Microorganism	Selective medium	Incubation ^b
<i>E. coli</i> EDL 933 Δ <i>stx₁</i> Yeasts	Luria-Bertani + 100 µg/liter kanamycin	1 day, 37°C, A
	Sabouraud dextrose agar + 50 mg/liter chloramphenicol + 10 mg/liter gentamicin	3 days, 30°C, A
Total anaerobes	Brain heart infusion	7 days, 37°C, AN
Total aerobes	Brain heart infusion	3 days, 37°C, A
<i>Clostridia/Eubacteria</i>	Reinforced clostridial medium	7 days, 37°C, AN
<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides</i> mineral salt	7 days, 37°C, AN
Bifidobacteria	Beerens	4 days, 37°C, AN
<i>Enterobacteriaceae</i>	MacConkey	1 day, 37°C, A
Enterococci	D-Coccosel	2 days, 37°C, A

^a Overview of the selective media used to enumerate *E. coli* O157:H7, probiotic yeasts, and the main cultivable bacterial populations of the human intestinal microbiota.

^b Cultures were incubated aerobically (A) or anaerobically (AN).

Ethanol concentrations in the colonic medium were determined by an enzymatic UV test (Biosentec, Toulouse, France). Dialysis outflow was daily sampled to determine short-chain fatty acid (SCFA) production by gas chromatography, as described by Gérard-Champod et al. (30). For all survival kinetics, significant differences between treatments were tested by repeated-measure two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni correction for multiple comparisons. For data on intestinal bacterial populations and SCFA production, a Kruskal-Wallis test was performed followed, if the results were significant, by a Mann-Whitney test for pairwise comparisons (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Values of $P < 0.05$ were taken as indicating statistically significant differences.

Survival of *E. coli* O157:H7 in simulated human colonic conditions. This study is the first report of EHEC O157:H7 survival kinetics in a one-stage fermentation system reproducing human large intestinal conditions (Fig. 2). The pathogen was progressively eliminated from the bioreactor, more rapidly than the theoretical transit marker. After 36 h fermentation, $4.2 \pm 0.03 \log_{10}$ CFU/ml of viable bacteria ($n = 2$) was recovered in the bioreactor, i.e., less than 5% of the initial intake versus 35% for the marker. These results indicate that the pathogen did not persist in this environment at a level similar to that of the marker, probably due to the barrier effect of intestinal microbiota. Resident microbiota can prevent the establishment of intestinal pathogen by producing antimicrobial substances, such as bacteriocins, or through competition for nutrients or ecological niches (31). In particular, *E.*

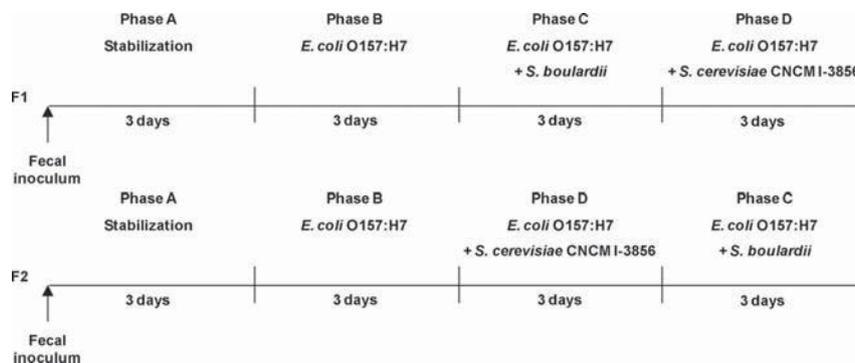


FIG 1 Schedule of *in vitro* fermentations in the ARCOL system.

SURVIE ET PATHOGÉNICITÉ DES EHEC DANS L'ENVIRONNEMENT COLIQUÉ ET INFLUENCE D'UN TRAITEMENT PROBIOTIQUE

Thévenot et al.

TABLE 3 Primer and probe sequences used in real-time qPCR assays

Name	Sequence 5'–3'	Target	Annealing temp (°C)	Reference
SYBR green				
BAC338F	ACTCTACGGGAGGCAG	Total bacteria	58	25
BAC516F	GTATTACCGGGCTGCTG			
789cfbF	CRAACAGGATTAGATACCT			
cfb967R	GGTAAGGTTCTCGCGTAT	<i>Bacteroidetes</i>	61	26
Act920F3	TACGGCCGCAAGGCTA	<i>Actinobacteria</i>	61	26
Act1200R	TCRTCCACCTTCCTCCG			
928F-Firm	TGAACTYAAAGGAATTGACG			
1040FirmR	ACCATGCACCACCTGTC	<i>Firmicutes</i>	61	26
Eco1457F	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC	<i>Enterobacteriaceae</i>	63	27
Eco1652R	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC			
F_Lacto05	AGCAGTAGGGAATCTTCCA			
R_Lacto04	CGCCACTGGTGTCTYTCCATATA	<i>Lactobacillus/Pediococcus/Leuconostoc</i>	60	28
TaqMan				
F_Bact 1369	CGGTGAATACGTTCCCGG	Total bacteria	60	28
P_TM1389F	FAM-CTTGATACACACCGCCGTC-TAMRA			
R_Prok1492R	TACGGCTACCTTGTACGACTT			
E. coli-F	CATGCCGCGTGTATGAAGAA	<i>Escherichia coli</i>	60	29
E. coli-P	FAM-TATTAACCTTTACTCCCTTCCCTCCCGCTGAA-TAMRA			
E. coli-R	CGGGTAACGTCATGAGCAAA			
F_Bifid 09c	CGGGTGAGTAATGCGTGACC	Bifidobacteria	60	28
P_Bifid	FAM-CTCCTGAAACGGGTG-TAMRA			
R_Bifid 06	TGATAGGACGCGACCCCA			
F_Bacter 11	CCTWCGATGGATAGGGTT	<i>Bacteroides/Prevotella</i>	60	28
P_Bac303	YY-AAGTCCCCACATTG-TAMRA			
R_Bacter 08	CACGTACTTGGCTGGTTCAG			

coli strains producing colicins or microcins have been reported to be effective *in vitro* in inhibiting *E. coli* O157:H7 (32, 33). EHEC is considered to be a colonic pathogen. However, in the present study, *E. coli* O157:H7 does not persist in the colonic medium. Previous findings (4, 9, 34, 35) suggest that the distal small intestine would play a major role in EHEC infection, whence bacteria can spread to the colon as colonization becomes established.

Yeast viability in the ARCOL system. As survival in the hu-

man gastrointestinal tract is a key feature of probiotic strains, yeast viability was followed during large intestine *in vitro* fermentations. Both strains were rapidly eliminated from the bioreactor (Fig. 3). However, *S. cerevisiae* CNCM I-3856 was significantly ($P < 0.05$) more affected by colonic conditions than *S. boulardii*, no viable yeast being recovered after 36 h and 60 h, respectively. *S. boulardii* is a variant of *S. cerevisiae* with specific genomic and phenotypic

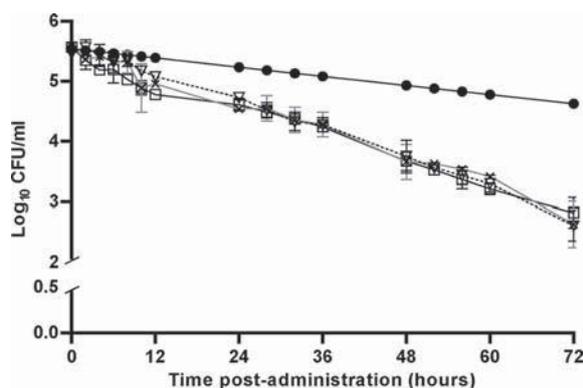


FIG 2 Survival of *E. coli* O157:H7 during *in vitro* fermentations in the ARCOL system and influence of probiotic treatment. The curves obtained for bacteria alone (□) or coadministered with *S. boulardii* (×) or *S. cerevisiae* CNCM I-3856 (▽) were compared with that of the theoretical transit marker (●). Results are expressed as means (\log_{10} CFU/ml) \pm standard deviations ($n = 2$ for bacteria, $n = 6$ for theoretical transit marker).

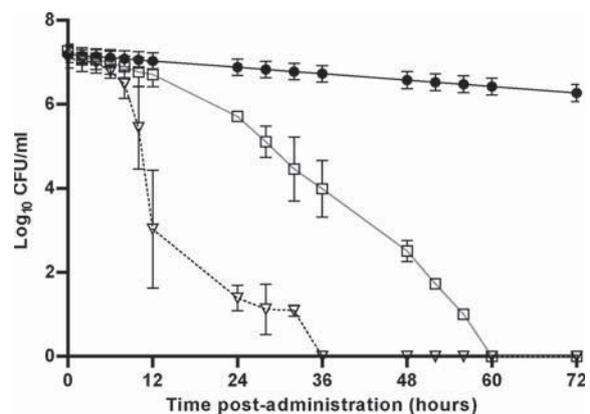


FIG 3 Survival kinetics of *S. boulardii* (□) and *S. cerevisiae* CNCM I-3856 (▽) during *in vitro* fermentations in the ARCOL system. The results obtained for yeasts were compared with that of the theoretical transit marker (●). Results are expressed as means (\log_{10} CFU/ml) \pm standard deviations ($n = 2$ for yeasts, $n = 4$ for theoretical transit marker).

TABLE 4 Influence of *E. coli* O157:H7 and probiotic treatment on human intestinal microbiota

Assay and target bacteria or population	Analysis ^a				
	Feces	Phase A	Phase B	Phase C	Phase D
SYBR assay					
Total bacteria	10.1 ± 0.2	10.7 ± 0.2a	10.8 ± 0.1a	10.3 ± 0.2b	10.4 ± 0.3ab
Bacteroidetes	9.0 ± 0.1	9.7 ± 0.1a	9.4 ± 0.4a	7.6 ± 0.5b	8.1 ± 0.8b
Actinobacteria	7.2 ± 0.1	7.0 ± 0.2a	6.9 ± 0.1a	6.5 ± 0.2b	6.2 ± 0.3b
Firmicutes	10.0 ± 0.1	10.2 ± 0.1ac	10.4 ± 0.2a	10.1 ± 0.1b	10.1 ± 0.2bc
Enterobacteriaceae	6.2 ± 0.4	6.3 ± 0.2a	5.7 ± 0.3b	5.7 ± 0.3b	5.7 ± 0.1b
<i>Lactobacillus/Pediococcus/Leuconostoc</i>	5.0 ± 0.4	5.4 ± 0.1a	5.5 ± 0.2a	5.3 ± 0.2a	5.3 ± 0.1a
TaqMan assay					
Total bacteria	9.9 ± 0.1	10.4 ± 0.1a	10.4 ± 0.3ac	9.9 ± 0.1b	10.0 ± 0.3bc
Bifidobacteria	7.8 ± 0.2	7.6 ± 0.3a	5.1 ± 2.4b	3.0 ± 1.6b	4.7 ± 1.4b
<i>Bacteroides/Prevotella</i>	9.3 ± 0.1	10.1 ± 0.1a	9.8 ± 0.3a	8.6 ± 0.4b	8.9 ± 0.8b
<i>Escherichia coli</i>	6.2 ± 0.4	6.3 ± 0.1a	4.8 ± 1.4b	5.3 ± 0.5b	4.2 ± 1.8b
Bacterial populations					
Total anaerobes	9.5 ± 0.0	9.9 ± 0.4a	9.9 ± 0.1a	9.8 ± 0.1a	10.0 ± 0.1a
<i>Clostridia/Eubacteria</i>	9.4 ± 0.0	10.0 ± 0.6a	9.9 ± 0.2a	9.8 ± 0.1a	10.0 ± 0.1a
<i>Bacteroides</i>	8.1 ± 0.0	8.2 ± 0.1a	7.8 ± 0.5a	8.2 ± 0.0a	8.5 ± 1.0a
Bifidobacteria	8.2 ± 0.0	8.0 ± 0.3a	7.0 ± 0.5b	6.0 ± 0.2c	6.1 ± 0.2c
Total aerobes	5.6 ± 0.1	5.8 ± 0.5a	5.3 ± 0.4a	5.8 ± 0.2a	5.9 ± 0.7a
<i>Enterococcus</i>	4.5 ± 0.3	4.6 ± 0.3a	4.2 ± 0.4a	4.9 ± 0.9a	4.1 ± 0.3a
Enterobacteriaceae	5.5 ± 0.1	5.8 ± 0.4a	4.8 ± 0.3b	4.5 ± 0.4b	4.7 ± 0.3b

^a Major phyla of gut microbiota and their main members were measured by plate counts (results shown in log₁₀ CFU/ml) and/or real-time qPCR analysis (results shown in log₁₀ mean copy number/ml). Data are means ± standard deviations for the 3 days of each phase during F1 and F2 assays (n = 6 for phases A, B, C, and D). Samples with different letters in a row are significantly different according to Kruskal-Wallis test followed, if the results were significant, by Mann-Whitney test; P < 0.05. Phase A, stabilization; phase B, *E. coli* O157:H7; phase C, *E. coli* O157:H7 plus *S. boulardii*; phase D, *E. coli* O157:H7 plus *S. cerevisiae* CNCM I-3856.

characteristics, including optimal growth at body temperature. Consistent with our results in colonic conditions, *S. boulardii* seems more resistant than *S. cerevisiae* in a simulated human gastric environment (36, 37). The extensive elimination of yeasts observed *in vitro* has already been described in humans (38, 39), supporting the usefulness of the ARCOL model. To maximize the number of viable yeasts in the human intestine and so maybe potentiate their probiotic effect, repeated administration of yeasts could be considered (20).

Influence of probiotic treatment on EHEC survival. When yeasts were coadministered with the pathogen, the survival rate of *E. coli* O157:H7 in the ARCOL (Fig. 2) was not modified (P > 0.05). Accordingly, the antagonistic effect observed *in vitro* with *S. cerevisiae* CNCM I-3856 in the distal small intestine (9) was not found here in human colonic conditions. This difference may be explained by (i) the low survival of yeasts in colonic medium, (ii) the lack of resident microbiota in the gastric and small intestinal model used by Etienne-Mesmin et al. (9), and (iii) higher concentrations in ethanol, which may act as an inhibitory agent (40), in the small intestinal compartments of this model (up to 0.6 g/liter) compared with those measured in colonic medium in the present study (0.05 g/liter).

Influence of *E. coli* O157:H7 and probiotic treatment on the main populations of human intestinal microbiota. The major phyla of gut microbiota and their main members (41, 42) were counted throughout fermentations in the ARCOL (Table 4). During the stabilization phase (phase A), their concentrations were similar to those described in humans (43, 44) or in other *in vitro* models of the human gut (45, 46).

No study had hitherto evaluated the influence of EHEC

O157:H7 on human intestinal microbiota. In phase B of both assays (F1 and F2), no change was observed by cultural and molecular approaches after addition of EHEC O157:H7, except for bifidobacteria, Enterobacteriaceae, and *E. coli* (P < 0.05). Each administration of *E. coli* O157:H7 was followed by a decrease in concentrations of Enterobacteriaceae (Fig. 4). Our results suggest that EHEC colonization of the large intestine is not associated with any major modifications in the profile of dominant bacterial populations. The decrease in Enterobacteriaceae may be explained by Shiga toxin-encoding phage transfer from *E. coli* O157:H7 to commensal *E. coli* resulting in bacterial lysis. According to Gamage et al. (47), about 10% of the normal *E. coli* in the human intestine is sensitive to infection by Shiga-toxin-encoding phage.

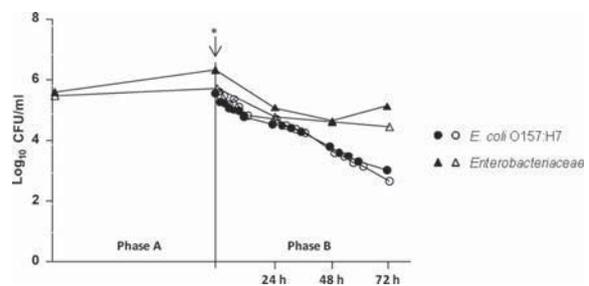


FIG 4 Survival kinetics of *E. coli* O157:H7 and Enterobacteriaceae during *in vitro* fermentations in the ARCOL system. *E. coli* O157:H7 and Enterobacteriaceae were regularly counted (log₁₀ CFU/ml) during phases A and B of F1 (closed symbol) and F2 (open symbol) assays. *, addition of *E. coli* O157:H7 (10⁵ CFU/ml of colonic medium); phase A, stabilization; phase B, *E. coli* O157:H7.

SURVIE ET PATHOGÉNIE DES EHEC DANS L'ENVIRONNEMENT COLIQUE ET INFLUENCE D'UN TRAITEMENT PROBIOTIQUE

Thévenot et al.

TABLE 5 Influence of *E. coli* O157:H7 and probiotic treatment on SCFA production^a

SCFA	Amt during phase ^b :							
	A		B		C		D	
	mmol/h	%	mmol/h	%	mmol/h	%	mmol/h	%
Total ^c	9.4 ± 0.7a		8.3 ± 1.0a		8.2 ± 1.4a		9.4 ± 0.4a	
Acetate	5.8 ± 0.3a	62.2α	5.3 ± 0.8a	63.9α	5.4 ± 1.1a	65.2α	6.6 ± 0.3b	70.2β
Propionate	1.9 ± 0.3a	19.7α	1.5 ± 0.3a	17.9α	1.4 ± 0.2a	17.5α	1.5 ± 0.2a	16.1α
Butyrate	1.7 ± 0.3a	18.1α	1.5 ± 0.2a	18.2α	1.4 ± 0.3ab	17.3α	1.3 ± 0.1b	13.7β
<i>iso</i> -Butyrate	0.2 ± 0.02a		0.2 ± 0.01a		0.2 ± 0.03a		0.2 ± 0.01a	
<i>iso</i> -Valerate	0.3 ± 0.04a		0.3 ± 0.01a		0.3 ± 0.1a		0.3 ± 0.01a	
Valerate	0.4 ± 0.05a		0.4 ± 0.03a		0.3 ± 0.05a		0.4 ± 0.01a	
Hexanoic acid	0.3 ± 0.05a		0.3 ± 0.1a		0.4 ± 0.1a		0.4 ± 0.1a	
Heptanoic acid	0.1 ± 0.03a		0.1 ± 0.02a		0.2 ± 0.04a		0.2 ± 0.03a	

^a SCFA in the dialysis outflow were measured by gas chromatography. Data are means ± standard deviations for the 3 days of each phase during F1 and F2 assays ($n = 6$ for phases A, B, C, and D). Samples with different letters in a row (a, b, and c for values in mmol/h; α and β for percentages) are significantly different according to Kruskal-Wallis test followed, if the results were significant, by Mann-Whitney test; $P < 0.05$.

^b Phase A, stabilization; phase B, *E. coli* O157:H7; phase C, *E. coli* O157:H7 plus *S. boulardii*; phase D, *E. coli* O157:H7 plus *S. cerevisiae* CNCM I-3856.

^c Defined as the sum of acetate, propionate, and butyrate.

When probiotic yeasts were coadministered with the pathogen (phases C and D), no profound change was observed in gut microbiota compared to phase B. The only modifications identified by qPCR were slight decreases in the levels of *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, and *Firmicutes* ($P < 0.05$). Our results are consistent with those obtained in healthy human volunteers, showing that *S. boulardii* and *S. cerevisiae* do not alter radically the dominant bacterial groups of fecal microbiota (39, 48).

Influence of *E. coli* O157:H7 and probiotic treatment on the metabolic activity of human intestinal microbiota. To further investigate the effects of both pathogen and probiotics on intestinal microbiota, its metabolic activity was followed by assessing the production of major and minor SCFAs in the dialysis outflow of the ARCOL (Table 5). Whichever the treatment, similar trends were observed for SCFA production and acetate was the predominant SCFA, followed by propionate and butyrate. The molar ratios of acetate-propionate-butyrate obtained *in vitro* were consistent with that measured in humans (49, 50). The coadministration of *S. boulardii* (phase C) led to no significant change in SCFA production. In contrast, when EHEC O157:H7 and *S. cerevisiae* CNCM I-3856 were coadministered (phase D), the production of acetate was significantly increased ($P < 0.01$) and that of butyrate significantly decreased ($P < 0.05$) compared with phases A and B. Hitherto, *S. boulardii* was known to have no effect on SCFA profiles in healthy humans but was found to increase butyrate and acetate production in patients with diarrhea who were on long-term total enteral nutrition (51). Although the increase in acetate production with *S. cerevisiae* CNCM I-3856 was not linked to any decrease in *E. coli* O157:H7 viability, appropriate manipulation of the SCFA levels through probiotic treatment may be a potentially useful approach in the fight against EHEC infection. Indeed, in mice, the anti-infectious activity of bifidobacteria against *E. coli* O157:H7 has been thought to be related to an increase in acetate production, leading to either (i) a lower gut pH (52) or (ii) inhibition of Stx production and translocation (53). Interestingly, *S. cerevisiae* CNCM I-3856, when coadministered with *E. coli* O157:H7, led to a decrease in butyrate concentrations, while this SCFA has been shown to enhance the expression of virulence-associated genes in EHEC (35). The ARCOL system would potentially enable us to determine what experimental conditions could lead to high

acetate and low butyrate production when probiotic yeasts are added, with the aim of inhibiting EHEC O157:H7.

In conclusion, this study is the first report on the fate of EHEC O157:H7 in simulated human colonic conditions. Our experiments provide new information on EHEC survival in the human gastrointestinal tract and its interactions with resident microbiota, which is essential for a full understanding of EHEC pathogenesis. There is growing interest in developing new strategies, such as the use of probiotics, in the fight against this pathogen. In our experimental conditions, *S. cerevisiae* strains did not exert any clear-cut antagonistic effect against *E. coli* O157:H7, but the present results open new fields in research on probiotics. The ARCOL system could be advantageously used to investigate the effect of resident microbiota on EHEC virulence or to screen probiotic strains for their ability to modulate pathogen infectivity in the human gastrointestinal tract. In a more holistic view of EHEC behavior in the human digestive environment, the ARCOL model should be used in combination with gastric and small intestinal systems (20, 54), if possible including a resident microbiota (55).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the French Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche to J.T., EA 4678 CIDAM, and UMR INSERM/Université d'Auvergne U1071 USC-INRA 2018.

We thank Jean-Michel Cardot for help in statistical analysis and the Lesaffre Company for providing the *S. cerevisiae* CNCM I-3856 strain.

REFERENCES

1. Pennington H. 2010. *Escherichia coli* O157. *Lancet* 376:1428–1435.
2. Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, an der Heiden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M, Zoufaly A, Jordan S, Kemper MJ, Follin P, Muller L, King LA, Rosner B, Buchholz U, Stark K, Krause G. 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N. Engl. J. Med.* 365:1771–1780.
3. King LA, Nogareda F, Weill FX, Mariani-Kurkdjian P, Loukiadis E, Gault G, Jourdan-DaSilva N, Bingen E, Mace M, Thevenot D, Ong N, Castor C, Noel H, Van Cauteren D, Charron M, Vaillant V, Aldabe B, Goulet V, Delmas G, Couturier E, Le Strat Y, Combe C, Delmas Y, Terrier F, Vendrely B, Rolland P, de Valk H. 2012. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 associated with organic fenugreek sprouts, France, June 2011. *Clin. Infect. Dis.* 54:1588–1594.
4. Chong Y, Fitzhenry R, Heuschkel R, Torrente F, Frankel G, Phillips

- AD. 2007. Human intestinal tissue tropism in *Escherichia coli* O157: H7–initial colonization of terminal ileum and Peyer's patches and minimal colonic adhesion *ex vivo*. *Microbiology* 153:794–802.
5. Shigeno T, Akamatsu T, Fujimori K, Nakatsuji Y, Nagata A. 2002. The clinical significance of colonoscopy in hemorrhagic colitis due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Endoscopy* 34:311–314.
 6. Naylor SW, Gally DL, Low JC. 2005. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 295:419–441.
 7. Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M. 2012. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends Biotechnol.* 30:591–600.
 8. Payne AN, Zihler A, Chassard C, Lacroix C. 2012. Advances and perspectives in *in vitro* human gut fermentation modeling. *Trends Biotechnol.* 30:17–25.
 9. Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Privat M, Denis S, Cardot JM, Alric M, Blanquet-Diot S. 2011. Effect of a new probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:1127–1131.
 10. de Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, Vareille M, Gobert AP, Martin C. 2009. Human microbiota-secreted factors inhibit Shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 77:783–790.
 11. Toshima H, Yoshimura A, Arikawa K, Hidaka A, Ogasawara J, Hase A, Masaki H, Nishikawa Y. 2007. Enhancement of Shiga toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNase colicins. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7582–7588.
 12. Kendall MM, Gruber CC, Parker CT, Sperandio V. 2012. Ethanolamine controls expression of genes encoding components involved in interkingdom signaling and virulence in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *mBio* 3:e00050–12. doi:10.1128/mBio.00050-12.
 13. Menne J, Nitschke M, Stingle R, Abu-Tair M, Beneke J, Bramstedt J, Bremer JP, Brunkhorst R, Busch V, Dengler R, Deuschl G, Fellermann K, Fickenscher H, Gerigk C, Goettsche A, Greeve J, Hafer C, Hagemuller F, Haller H, Herget-Rosenthal S, Hertenstein B, Hofmann C, Lang M, Kielstein JT, Klostermeier UC, Knobloch J, Kuehbacher M, Kunzendorf U, Lehnert H, Manns MP, Menne TF, Meyer TN, Michael C, Munte T, Neumann-Grutzeck C, Nuernberger J, Pavenstaedt H, Ramazon L, Renders I, Repenthin J, Ries W, Rohr A, Rump LC, Samuelsson O, Sayk F, Schmidt BM, Schnatter S, Schockmann H, Schreiber S, von Seydewitz CU, Steinhoff J, Stracke S, Suerbaum S, van de Loo A, Vischedyk M, Weissenborn K, Wellhoner P, Wiesner M, Zeissig S, Buning J, Schiffer M, Kuehbacher T. 2012. Validation of treatment strategies for enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 induced haemolytic uraemic syndrome: case-control study. *BMJ* 345:e4565. doi:10.1136/bmj.e4565.
 14. Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI. 2000. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N. Engl. J. Med.* 342:1930–1936.
 15. FAO/WHO. 2002. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, London, Ontario, Canada.
 16. Preidis GA, Hill C, Guerrant RL, Ramakrishna BS, Tannock GW, Versalovic J. 2011. Probiotics, enteric and diarrheal diseases, and global health. *Gastroenterology* 140:8–14.
 17. Bach SJ, McAllister TA, Veira DM, Gannon VJP, Holley RA. 2003. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* feed supplement on *Escherichia coli* O157:H7 in ruminal fluid *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 104:179–189.
 18. Dahan S, Dalmasso G, Imbert V, Peyron JF, Rampal P, Czerucka D. 2003. *Saccharomyces boulardii* interferes with enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced signaling pathways in T84 cells. *Infect. Immun.* 71:766–773.
 19. Dalmasso G, Loubat A, Dahan S, Calle G, Rampal P, Czerucka D. 2006. *Saccharomyces boulardii* prevents TNF- α -induced apoptosis in EHEC-infected T84 cells. *Res. Microbiol.* 157:456–465.
 20. Blanquet-Diot S, Denis S, Chalancon S, Chaira F, Cardot JM, Alric M. 2012. Use of artificial digestive systems to investigate the biopharmaceutical factors influencing the survival of probiotic yeast during gastrointestinal transit in humans. *Pharm. Res.* 29:1444–1453.
 21. Gobert AP, Vareille M, Glasser AL, Hindre T, de Sablet T, Martin C. 2007. Shiga toxin produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* inhibits PI3K/NF- κ B signaling pathway in globotriaosylceramide-3-negative human intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 178:8168–8174.
 22. McFarland LV. 2010. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J. Gastroenterol.* 16:2202–2222.
 23. Danckwerts PV. 1953. Continuous flow systems: distribution of residence times. *Chem. Eng. Sci.* 2:1–13.
 24. Yu Z, Morrison M. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digests and fecal samples. *Biotechniques* 36:808–812.
 25. Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S. 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 89:670–679.
 26. Bacchetti De Gregoris T, Aldred N, Clare AS, Burgess JG. 2011. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *J. Microbiol. Methods* 86:351–356.
 27. Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME. 2004. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3575–3581.
 28. Furet JP, Firmesse O, Gourmelon M, Bridonneau C, Tap J, Mondot S, Dore J, Corthier G. 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68:351–362.
 29. Huijsdens XW, Linskens RK, Mak M, Meuwissen SG, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. 2002. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40:4423–4427.
 30. Gerard-Champod M, Blanquet-Diot S, Cardot JM, Bravo D, Alric M. 2010. Development and validation of a continuous *in vitro* system reproducing some biotic and abiotic factors of the veal calf intestine. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:5592–5600.
 31. Lievin-Le Moal V, Servin AL. 2006. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:315–337.
 32. Eberhart LJ, Deringer JR, Brayton KA, Sawant AA, Besser TE, Call DR. 2012. Characterization of a novel microcin that kills enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and O26. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:6592–6599.
 33. Schamberger GP, Diez-Gonzalez F. 2005. Assessment of resistance to colicinogenic *Escherichia coli* by *E. coli* O157:H7 strains. *J. Appl. Microbiol.* 98:245–252.
 34. Etienne-Mesmin L, Chassaing B, Sauvanet P, Denizot J, Blanquet-Diot S, Darfeuille-Michaud A, Pradel N, Livrelli V. 2011. Interactions with M cells and macrophages as key steps in the pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *PLoS One* 6:e23594. doi:10.1371/journal.pone.0023594.
 35. Nakanishi N, Tashiro K, Kuhara S, Hayashi T, Sugimoto N, Tobe T. 2009. Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology* 155:521–530.
 36. Edwards-Ingram L, Gitsham P, Burton N, Warhurst G, Clarke I, Hoyle D, Oliver SG, Stateva L. 2007. Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:2458–2467.
 37. Fietto JL, Araujo RS, Valadao FN, Fietto LG, Brandao RL, Neves MJ, Gomes FC, Nicoli JR, Castro IM. 2004. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Can. J. Microbiol.* 50:615–621.
 38. Klein SM, Elmer GW, McFarland LV, Surawicz CM, Levy RH. 1993. Recovery and elimination of the biotherapeutic agent, *Saccharomyces boulardii*, in healthy human volunteers. *Pharm. Res.* 10:1615–1619.
 39. Pecquet S, Guillaumin D, Tancrede C, Andremont A. 1991. Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* elimination from the intestines of human volunteers and effect of this yeast on resistance to microbial colonization in gnotobiotic mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3049–3051.
 40. Chiou RY, Phillips RD, Zhao P, Doyle MP, Beuchat LR. 2004. Ethanol-mediated variations in cellular fatty acid composition and protein profiles of two genotypically different strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2204–2210.
 41. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poullain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Dore J, Antolin M, Artiguenave F,

SURVIE ET PATHOGÉNICITÉ DES EHEC DANS L'ENVIRONNEMENT COLIQUÉ ET INFLUENCE D'UN TRAITEMENT PROBIOTIQUE

Thévenot et al.

- Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariac G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Merieux A, Melo Minardi R, M'Rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473:174–180.
42. 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* 308:1635–1638.
43. Finegold SM, Attebery HR, Sutter VL. 1974. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. *Am. J. Clin. Nutr.* 27:1456–1469.
44. Marteau P, Pochart P, Dore J, Bera-Maillet C, Bernalier A, Corthier G. 2001. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4939–4942.
45. Marzorati M, Verhelst A, Luta G, Sinnott R, Verstraete W, Van de Wiele T, Possemiers S. 2010. *In vitro* modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant-derived polysaccharide-rich dietary supplements. *Int. J. Food Microbiol.* 139:168–176.
46. Sannasiddappa TH, Costabile A, Gibson GR, Clarke SR. 2011. The influence of *Staphylococcus aureus* on gut microbial ecology in an *in vitro* continuous culture human colonic model system. *PLoS One* 6:e23227. doi:10.1371/journal.pone.0023227.
47. Gamage SD, Strasser JE, Chalk CL, Weiss AA. 2003. Nonpathogenic *Escherichia coli* can contribute to the production of Shiga toxin. *Infect. Immun.* 71:3107–3115.
48. Swidsinski A, Loening-Bauco V, Verstraelen H, Osowska S, Doerffel Y. 2008. Biostructure of fecal microbiota in healthy subjects and patients with chronic idiopathic diarrhea. *Gastroenterology* 135:568–579.
49. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28:1221–1227.
50. Topping DL, Clifton PM. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.* 81:1031–1064.
51. Schneider SM, Girard-Pipau F, Filippi J, Hebuterne X, Moysé D, Hinojosa GC, Pompei A, Rampal P. 2005. Effects of *Saccharomyces boulardii* on fecal short-chain fatty acids and microflora in patients on long-term total enteral nutrition. *World J. Gastroenterol.* 11:6165–6169.
52. Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A, Takeda Y. 2004. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 72:2240–2247.
53. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T, Taylor TD, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M, Ohno H. 2011. *Bifidobacteria* can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469:543–547.
54. Hatanaka M, Nakamura Y, Maathuis AJ, Venema K, Murota I, Yamamoto N. 2012. Influence of *Bacillus subtilis* C-3102 on microbiota in a dynamic *in vitro* model of the gastrointestinal tract simulating human conditions. *Benef. Microbes* 3:229–236.
55. Possemiers S, Marzorati M, Verstraete W, Van de Wiele T. 2010. Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. *Int. J. Food Microbiol.* 141:97–103.

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection has donor-dependent effect on human gut microbiota and may be antagonized by probiotic yeast during interaction with Peyer's patches

Running title: Gut microbiota and probiotics in EHEC infection

THÉVENOT, J.^{1,2,*}, CORDONNIER, C.^{1,2,*}, ROUGERON, A.², LE GOFF, O.¹, NGUYEN, HTT.², DENIS, S.¹, ALRIC, M.¹, LIVRELLI, V.^{2,3} et S. BLANQUET-DIOT¹

¹ Clermont Université, Université d'Auvergne, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, EA 4678 CIDAM, Conception Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament, Clermont-Ferrand, France.

² Clermont Université, Université d'Auvergne, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, M2iSH, Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte UMR INSERM / Université d'Auvergne U1071 USC-INRA 2018, Clermont-Ferrand, France.

³ CHU Clermont-Ferrand, Service de Bactériologie, Clermont-Ferrand, France.

* These authors contributed equally to this manuscript.

Corresponding author: Stéphanie Blanquet-Diot; Mailing adress: CBRV, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand; E-mail stephanie.blanquet@udamail.fr; Tel. (+33) (0) 4 73 17 83 90; Fax (+33) (0) 4 73 17 83 82.

1 **Summary**

2 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is a major food-borne pathogen responsible for
3 serious infections ranging from diarrhea to hemorrhagic colitis and life threatening complications.
4 Shiga-toxins (Stx) are the main virulence factor of EHEC. The effectiveness of a prophylactic
5 treatment with *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 against EHEC O157:H7 was investi-
6 gated using complementary *in vitro* human simulated colonic conditions and *in vivo* murine ileal
7 loops models. *In vitro*, probiotic treatment led to a significant increase in acetate production
8 and decrease in butyrate but has no effect on O157:H7 survival. We describe a donor-dependent
9 effect of O157:H7 and probiotic treatment on the major populations of gut microbiota. For
10 the first time, *stx* expression was followed in human colonic environment: 9 h and 12 h post
11 EHEC infection, probiotic treatment significantly decrease *stx1* mRNA levels. Furthermore,
12 in murine ileal loops, probiotic specifically inhibits O157:H7 interactions with Peyer's patches.
13 Taken together, the results suggest that *S. cerevisiae* may be useful in the fight against EHEC
14 infection and that host associated factors such as microbiota could influence clinical evolution
15 of EHEC infection and the effectiveness of probiotic treatment.

16 **Introduction**

17 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is a major food-borne zoonotic agent associated
18 with outbreaks worldwide that poses a serious public health concern. Characteristics of EHEC
19 infection include abdominal pain and watery diarrhea, hemorrhagic colitis as well as the life-
20 threatening complications hemolytic uremic syndrome (HUS). The majority of food poisoning
21 outbreaks are caused by strains of serotype O157:H7. Ruminants, especially cattle, are a major
22 reservoir of EHEC and infections are typically acquired through the ingestion of contaminated
23 food. Production of Shiga toxin (Stx) is the main virulence feature associated with severe
24 human disease but cannot be solely responsible for full pathogenicity. EHEC belong to a group
25 of enteric pathogens that induces cytoskeletal rearrangements in infected epithelial cells, in-
26 cluding loss of enterocyte microvilli and intimate attachment of the bacterium to cell surface,
27 leading to the formation of attaching and effacing (A/E) lesions. The genes responsible for A/E
28 lesions are located on a "pathogenicity island" identified as the locus of enterocyte effacement
29 (LEE). The terminal ileum and colon are assumed to be the main sites of EHEC colonization.
30 *In vitro* and *ex vivo* experiments have shown a preferential tropism of EHEC to colonize the
31 follicle-associated epithelium (FAE) of small intestinal Peyer's patches (PPs) (Phillips *et al.*,
32 2000). Recent works by Etienne-Mesmin *et al.* (2011a) have shown that the uptake of EHEC
33 by M cells and underlying macrophages in the PPs would be a critical step in Stx translocation

34 and release into the blood.

35 Survival in the human digestive tract and regulation of virulence genes are key factors for
36 bacterial pathogenesis but few data are available due to lack of relevant models. O157:H7 sur-
37 vival was recently evaluated in dynamic *in vitro* systems reproducing the luminal conditions
38 of the human stomach and small intestine (Etienne-Mesmin *et al.*, 2011b; Miszczycha *et al.*,
39 2014) or large intestine (Thévenot *et al.*, 2013). A high bacterial mortality was observed in the
40 stomach and duodenum and in contrast, bacteria grew in the distal parts of the small intestine.
41 In the large intestine, the pathogen was progressively eliminated and did not modify the major
42 population of resident microbiota. In addition, several studies have shown that specific gas-
43 trointestinal parameters may influence the expression of EHEC virulence factors (Foster, 2013).
44 For instance, bile treatment downregulates *stx2* gene expression (Kus *et al.*, 2011). Intestinal
45 microbiota and its metabolites may also play a key role in the outcome of EHEC infection.
46 De Sablet *et al.* (2009) have shown that soluble factors secreted by *Bacteroides thetaiotaomi-*
47 *cron* repress Stx synthesis in O157:H7. High concentrations of short chain fatty acids (SCFA)
48 inhibit EHEC's growth whereas low butyrate concentrations are able to enhance expression of
49 virulence genes involved in motility, adhesion and induction of A/E lesion formation (Nakanishi
50 *et al.*, 2009; Tobe *et al.*, 2011).

51 Currently no treatment is available for EHEC infections and as the use of conventional
52 antibiotics may exacerbate Stx-mediated cytotoxicity. Therefore, there is growing interest in
53 developing new alternatives to control EHEC infections, such as the use of probiotics. Probi-

otics are defined as live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host (FAO/WHO (2001), as updated by Hill *et al.*, 2014). Probiotics may exert their beneficial effect against enteric pathogens, such as EHEC, through three different modes of action: immunomodulation, direct antagonism and/or competitive exclusion (Oelschlaeger, 2010). Among the available probiotic strains, *Saccharomyces cerevisiae* var *boulardii* (*S. boulardii*) is a thermophilic nonpathogenic yeast, administered in western Europe for the prevention and treatment of a variety of diarrheal diseases, that have already shown beneficial effects in the control of EHEC infections. Dahan *et al.* (2003) have demonstrated that preincubation of T84 intestinal cells with *S. boulardii* inhibits proinflammatory signaling pathways induced by the pathogen. Using an *in vitro* model of the human gastrointestinal tract, Etienne-Mesmin *et al.* (2011b) have shown that another probiotic strain from the genus *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* CNCM I-3856), when coadministered with the pathogen, significantly decreases EHEC O157:H7 growth resumption in the distal parts of the small intestine. In the ARCOL (Artificial Colon) *in vitro* model of the human large intestine, the co-administration of O157:H7 and the probiotic yeast strain has no effect on pathogen viability but led to a significant increase in acetate production (Thévenot *et al.*, 2013).

Using the ARCOL system and three different donors, this study aims to investigate in simulated human colonic conditions the effects of a prophylactic treatment with *S. cerevisiae* CNCM I-3856 on EHEC O157:H7. The influence of probiotic treatment on EHEC survival and virulence gene expression was assessed, as well as the effect of both pathogen and probiotic

74 on the main populations of resident microbiota was assessed. Complementary *in vivo* assays
75 using murine ileal loops were performed to investigate the effect of the probiotic on EHEC
76 interactions with the intestinal membrane.

77

78 **Results**

79 *Probiotic yeast are quickly cleared from the colonic medium*

80 *S. cerevisiae* CNCM I-3856 viability was followed during large intestinal *in vitro* fermenta-
81 tions. Following each injection, viable yeast concentrations immediately reached peak levels
82 around 7 log₁₀ but this level was not maintained in the fermentative medium until the next
83 administration, despite a twice daily pulse supplementation (Suppl. A). Indeed, following
84 injection, yeasts were quickly cleared from the bioreactor: 6 h following each morning inoc-
85 ulation, $2.0 \times 10^{-2} \pm 2.4 \times 10^{-2}$ % ($n=3$) of initial yeasts was counted, except for the first
86 injection where 17.9 ± 2.9 % ($n=3$) of the initial inoculum was maintained. These results are in
87 accordance with those previously obtained by Blanquet-Diot *et al.* (2012). Moreover, a nycthe-
88 meral rhythm could be described: 12 h post-administration, yeasts that were inoculated in the
89 evening were better maintained in the colonic medium than yeast inoculated in the morning
90 ($3.7 \times 10^{-3} \pm 4.0 \times 10^{-3}$ % versus $1.2 \times 10^{-4} \pm 1.1 \times 10^{-4}$ %, $P < 0.001$, $n=3$). Yeast survival
91 was not modified by the addition of *E. coli* O157:H7 ($P > 0.05$).

92

93 *E. coli* O157:H7 virulence gene expression but not survival is modified by probiotic treatment in

94 *colonic environment*

95 *E. coli* O157:H7 was progressively eliminated from the bioreactor, more rapidly than the the-
96 oretical transit marker, showing that the pathogen was not able to maintain in human colonic
97 conditions (Fig. 1). After 36 h fermentation, 6.3 ± 4.8 % ($n=3$) of pathogenic bacteria was
98 recovered in the bioreactor versus 35.1 ± 0.8 % ($n=3$) for the transit marker ($P < 0.05$). The
99 elimination rate of *E. coli* O157:H7 in ARCOL (Fig 1) was not modified by the twice daily
100 supplementation of yeast ($P > 0.05$). However, prophylactic treatment with probiotic yeast
101 significantly decreased the *stx1* gene expression compared to non-treated conditions 9 h and 12
102 h after EHEC administration ($P < 0.001$; Fig 2A), but it did not impact *eae* expression (except
103 at 24 h post infection ; $P < 0.01$; Fig 2B).

104

105 *E. coli* O157:H7 and probiotic treatments have individual-dependent effects on human gut mi-
106 crobiota

107 The major phyla of gut microbiota and their main members were quantified by qPCR using
108 16S rRNA targeted oligonucleotide specific primers (Suppl. B). Bacterial concentrations were
109 normalized with respect to the amount found the last day of the stabilization phase. Whatever
110 the treatment, no significant change was observed in the levels of the selected population ($P >$
111 0.05). To investigate the effect of pathogen and probiotic supplementation on each individual's
112 microbiota, an agglomerative hierarchical clustering on the major phyla and genus was used to
113 cluster data (Fig 3). All control samples (no treatment) were found in the same cluster, what-

114 ever the stool donor. Conversely, the effect of both pathogen and probiotic supplementation
115 on gut microbiota varies from one subject to another. The resulting heat map of clustering
116 shows the individual variations in response to treatment. For example, EHEC infection led to
117 an increase in *Lactobacillus* / *Pediococcus* / *Leuconostoc* genus in donor 2 and 3 but a decrease
118 in donor 1 compared to control group. Also, in donor 3, prophylactic yeast treatment led to a
119 decrease in *Enterobacteriaceae* compared to the presence of EHEC only. Whereas, in donor 1,
120 it led to a decrease in *Bacteroidetes*.

121

122 *Yeast probiotic treatment significantly influences the metabolic activity of human gut microbiota*
123 *during EHEC infection*

124 To further investigate the effects of both pathogen and probiotics on intestinal microbiota, its
125 metabolic activity was daily followed by assessing the production of major and minor SCFAs in
126 the dialysis outflow of the ARCOL. Data were grouped and analyzed per experimental phase
127 (phase A or B). Whatever the treatment, acetate is the main metabolite followed by propionate
128 and butyrate (Table 1). In the control, percentage of acetate, propionate and butyrate amount
129 were, 66, 18 and 16 % respectively of major SCFA in dialysis outflow. To evaluate the influence
130 of EHEC administration, with or without preventive yeast treatment, the variation in SCFA
131 production between phase B and phase A was calculated in both cases. The administration of
132 *E. coli* O157:H7 did not induce major modification of SCFA production compared to control
133 experimentation ($P > 0.05$) (Fig 4A). In contrast, when EHEC O157:H7 was administrated af-

134 ter a preventive yeast treatment, the production of acetate was significantly decreased between
135 phase A and B compared with SCFA production when yeast treatment was applied without
136 EHEC infection (-1.2 ± 1.3 % versus 5.0 ± 3.9 %, $P < 0.05$, $n = 3$) and that of butyrate signifi-
137 cantly increased (-1.9 ± 1 % versus -3.3 ± 4.4 %, $P < 0.05$, $n = 3$) (Fig 4B). The administration
138 of EHEC in conjunction with yeast treatment also led to a significantly decrease in minor SCFA
139 production (branched-SCFA and valerate; $P < 0.05$).

140

141 *Probiotic treatment has no adverse effect on mice*

142 Probiotic yeasts were orally administrated to mice during 7 days. At the end of probiotic treat-
143 ment, body weights were determined and compared to that of the control group (physiological
144 water). The body weight of mice after 7 days in the *S. cerevisiae* group (23.7 ± 2.7 g, $n = 23$)
145 was not significantly different from that of the control group (24.0 ± 2.7 g, $n = 26$) (Fig 5A). The
146 mean fecal *S. cerevisiae* count in the treated group was approximately $4 \log_{10}$ CFU/g during
147 the 7 days. As expected, no yeast was found in the control animals (Fig 5B).

148

149 *S. cerevisiae inhibits EHEC interaction with ileal murine Peyer's patches and subsequent PPs*
150 *bleeding*

151 The effect of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 on EHEC interaction with intestinal mucosa with or
152 without PP's was investigated using a mice ileal loops assay (Fig 5C). In the control group,
153 the number of intracellular bacteria was significantly ($P < 0.05$) higher in ileal tissue with

154 PPs ($4.1 \pm 2.4 \log_{10}$ CFU/g of ileal tissue) compared to ileal mucosa without PPs ($2.6 \pm 1.7 \log_{10}$
155 CFU/g of ileal tissue). These results confirmed those previously obtained by Etienne-Mesmin
156 *et al.* (2011a). Interaction of EHEC with murine ileal mucosa without PPs was not influenced
157 by the probiotic treatment. However, the mean number of EHEC bacteria that have inter-
158 acted with ileal mucosa with PPs in the *S. cerevisiae* treated group ($1.7 \pm 1.9 \log_{10}$ CFU/g of
159 ileal tissue) was significantly lower than that of the control group ($4.1 \pm 2.4 \log_{10}$ CFU/g; $P <$
160 0.001). Bloodshot PPs were macroscopically observed following EHEC infection (Fig 6A) and
161 the number of hemorrhagic PPs was determined both in the *S. cerevisiae* and control groups.
162 We showed that pre-treatment with yeast significantly ($P < 0.01$) reduced the number of hem-
163 orrhagic PPs, 66 % of total PPs being hemorrhagic in the control animals versus 26 % in the
164 probiotic treated group (Fig 6B).

165

166 *S. cerevisiae* exerts a trophic effect on intestinal mucosa but has no influence on KC production
167 Histological analysis was also performed on ileal loops from *S. cerevisiae* and control groups
168 (physiological water) after 5 h O157:H7 challenge. Microvilli on the ileum section of the *S.*
169 *cerevisiae*-fed mice were less atrophied than that of untreated mice (Fig 7A and C). Moreover,
170 an increase in the amount of goblet cells, which are specialized epithelial cells secreting mucus,
171 was observed in the ileum of mice given *S. cerevisiae* (Fig 7B and D). EHEC infection in human
172 is associated with an increase in the production of the proinflammatory IL-8. To investigate the
173 potential immunomodulatory effect of *S. cerevisiae*, the proinflammatory keratinocyte-derived

174 chemokine (KC) expression and production levels were measured in the two groups of mice.
175 The results showed that *S. cerevisiae* did not significantly influence KC expression and release,
176 with mean protein levels of 2039 ± 4551 pg/mL in the probiotic treated group versus 3046 ± 8202
177 pg/mL in the control group (Fig 8).

178

179 Discussion

180 EHEC are important foodborne bacteria that represent a public health risk to the consumer.
181 The terminal ileum and colon are assumed to be the main sites of colonization in human. Sur-
182 vival in the human digestive tract and regulation of virulence genes are key factors for bacterial
183 pathogenesis but yet remain largely unknown. Most of studies investigating EHEC behavior
184 in digestive conditions have been conducted in oversimplified *in vitro* models or in mice with
185 conditions far from that really observed in humans (Foster, 2013). In addition, none of these
186 studies have evaluated EHEC virulence gene expression during gastrointestinal transit of the
187 pathogen.

188 Since treatment of EHEC infection is only supportive and antibiotic therapy remains con-
189 troversial, probiotics are being investigated as an alternative strategy. Studies reports are
190 essentially descriptive and associated mechanisms that are badly described. In addition, an-
191 tagonistic effects of probiotic strains against EHEC are mainly determined in static *in vitro*
192 digestive models, cell culture assay or mice models. These conditions are not representative of
193 the stresses that probiotics and pathogens undergo during gastrointestinal human transit. Us-

194 ing dynamic *in vitro* systems closely simulating human gut, previous studies by our group have
195 recently shown a bacterial mortality of EHEC O157:H7 in the stomach, a growth resumption
196 in the distal parts of the small intestine (Etienne-Mesmin *et al.*, 2011b) and a progressive elim-
197 ination of the pathogen from the large intestine (Thévenot *et al.*, 2013). When co-administered
198 with the pathogen, the probiotic yeast *S. cerevisiae* CNCM I-3856 significantly decreases EHEC
199 O157:H7 growth resumption in ileum but has not effect on EHEC survival in the large intestine
200 (Etienne-Mesmin *et al.*, 2011b; Thévenot *et al.*, 2013).

201 Probiotics may exert different effects depending on the way they are administrated (coad-
202 ministration versus prophylactic). For example, Dahan *et al.* (2003) and Dalmasso *et al.* (2006)
203 have shown that preincubation, but not coincubation, of EHEC-infected T84 cells with the
204 well-known probiotic yeast *S. boulardii* decreases IL-8 secretion and TNF- α induced apoptosis.
205 Here, we aim to investigate the antagonistic effect of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 on EHEC
206 infection when administered as a prophylactic treatment, using both *in vitro* (simulated human
207 colonic conditions) and *in vivo* (mouse ileal loops) approaches. The progressive elimination of
208 EHEC strain from the large intestinal model in the present study was observed with the stools
209 obtained from 3 donors, confirming data previously obtained with a unique donor (Thévenot
210 *et al.*, 2013). Similar trends are observed in mice model where large inocula (10^{10} CFU) or an-
211 tibiotic treatment are required for effective colonization by EHEC pathogens. Colonization and
212 subsequent virulence was increased, in mice model, by pre-treatment with streptomycin which
213 disrupts commensal microbiota (Naylor *et al.*, 2005). In human, Tarr *et al.* (1990) have shown

214 than 4 to 6 days after the beginning of digestive syndromes, no viable EHEC can be detected
215 in the feces of HUS patients, corroborating our *in vitro* results. In the present study, *S. cerevisiae*
216 CNCM I-3856 showed no antagonistic effect on EHEC survival in prophylactic treatment, as
217 already observed by Thévenot *et al.* (2013) when the probiotic was coadministrated with the
218 pathogen. This may be explained by the fact that, unliky Etienne-Mesmin *et al.* (2011b) in
219 TIM 1 who found an antagonistic effect of *S. cerevisiae* against EHEC growth, the ARCOL
220 system is inoculated with a complex resident microbiota.

221 The effect of both pathogen and probiotic supplementation on gut microbiota was inves-
222 tigated. In our study, each treatment was tested in triplicate using fresh feces collected from
223 three healthy volunteers: one female and two males, aged from 24 to 46 years old. In the
224 control samples (no pathogen nor probiotic treatment), the gut microbiota profiles were similar
225 for the three volunteers. However, when EHEC or probiotic were administered, the profiles
226 became different depending on the volunteer. This suggests that EHEC and probiotic effects
227 are donor-dependant. Our findings thus corroborate the idea that host-associated factors, such
228 as gut microbiota, may influence the clinical course of EHEC. De Sablet *et al.* (2009) have
229 shown *ex vivo*, in rat cecal content associated with a human intestinal microbiota, that solu-
230 ble factors released by *Bacteroides thetaiotaomicron* can suppress Stx production whereas the
231 colicins produced by colicinogenic bacteria can increase it (Toshima *et al.*, 2007). Investigating
232 the influence of EHEC in at-risk populations (children under five and elderly person) would be
233 of great interest.

234 To further investigate the effects of both pathogen and probiotics on intestinal microbiota,
235 its metabolic activity was followed by assessing the production of major and minor SCFAs in
236 the dialysis outflow of the ARCOL model. When prophylactic treatment by probiotic yeast
237 was applied, EHEC infection led to a significant increase in the production of acetate, asso-
238 ciated with a significant decrease in the production of butyrate. In mice, acetate produced
239 by *Bifidobacterium* strains was associated with an anti-infectious activity as it inhibited Stx
240 production and translocation (Fukuda *et al.*, 2011). Conversely, butyrate has been shown to
241 enhance the expression of virulence-associated genes in EHEC, particularly those localized on
242 LEE cluster and mobility genes (Nakanishi *et al.*, 2009; Tobe *et al.*, 2011). Our findings also
243 showed an activation of *stx* in simulated human colonic environment. In addition, a prophylac-
244 tic treatment with *S. cerevisiae* strain significantly decrease *stx1* expression compared to non
245 treated conditions 9 and 12 h after EHEC administration ($P < 0.001$). A decrease in *stx* ex-
246 pression by other bacterial strains have been described (Carey *et al.*, 2008). To our knowledge,
247 this is the first report of antagonistic yeast action on *stx* expression. However, the Stx levels
248 were to low to be detectable, and the antagonistic action of *S. cerevisiae* on toxin production
249 have be investigated to fully understand all the potential effects of the probiotic.

250 Previous studies in experimental animals have indicated that some probiotics strains can
251 counteract the adverse affects of enteropathogenic bacteria on intestinal mucosa by enhancing
252 the intestinal barrier function (Putaalaa *et al.*, 2008; Johnson-Henry *et al.*, 2008; Fukuda *et al.*,
253 2012). The present study investigates the effect of a pre-challenge feeding with probiotic *S.*

254 *cerevisiae* CNCM I-3856 on *E. coli* O157:H7 interaction with the murine ileal mucosa. Our
255 *in vivo* ileal loop assays confirmed that EHEC O157:H7 specifically targets PPs, as previously
256 described (Phillips *et al.*, 2000). We showed that a prophylactic treatment with *S. cerevisiae*
257 CNCM I-3856 significantly reduced *E. coli* O157:H7 interactions with PPs in a murine model.
258 This study is the first report on a probiotic strain showing a specific antagonistic effect against
259 EHEC interactions with PPs. Previous studies have only reported that different probiotics
260 strains could inhibit EHEC adhesion to intestinal epithelium, with curative treatment both in
261 cellular (Takahashi *et al.*, 2004; Hsueh *et al.*, 2010; Rund *et al.*, 2013; Turková *et al.*, 2013)
262 and in mice models (Medellin-Peña and Griffiths, 2009), and with prophylactic treatment only
263 in cellular models (Gopal *et al.*, 2001; Sherman *et al.*, 2005; Johnson-Henry *et al.*, 2007; Hugo
264 *et al.*, 2008).

265 Mechanisms by which EHEC preferentially target PPs are still unknown. Sun *et al.* (2010)
266 have shown that *Lactobacillus acidophilus* FN001, a yogurt-derived strain, could bind to FAE
267 of mice PPs, and that the adhesion of to PPs was only specific for cell surface mannose. We
268 can therefore hypothesize that EHEC tropism to PPs may also be mannose-specific, but fur-
269 ther characterization of carbohydrates on PPs surface cells will be necessary. Interestingly, *L.*
270 *acidophilus* inhibits the adhesion on PPs of *E. coli* ATCC25922 (not a STEC strain) which
271 contains mannose-specific lectin. In addition, Tiago *et al.* (2012) have shown that several en-
272 teropathogenic bacteria, such as *E. coli* or *Salmonella Typhimurium* can adhere to the surface
273 of *S. boulardii*, *S. cerevisiae* UFMG 905 and *S. cerevisiae* BY4741 and can be therefore cap-

274 tured by the yeasts. As a consequence, the interaction of enteric bacteria with the intestinal
275 epithelium may be reduced, but the intestinal interaction site is never specified in these studies
276 (Martins *et al.*, 2007; Tiago *et al.*, 2013). Investigating the capacity of *S. cerevisiae* CNCM
277 I-3856 to capture *E. coli* O157:H7 on its surface would allow a significant insight in the com-
278 prehension of the antagonistic effect of this yeast against EHEC interaction with PPs. Indeed,
279 we can hypothesize that, without *S. cerevisiae*, EHEC tropism to PPs is due to their binding to
280 specific carbohydrates such as mannose on the cell surface. *S. cerevisiae* CNCM I-3856 surface
281 which is rich in mannose could act as a trap binding EHEC, subsequently leading to a decrease
282 in the number of associated bacteria with PPs (Fig 9).

283 Etienne-Mesmin *et al.* (2011a) were the first to describe that EHEC infection induces hem-
284 orrhagic lesions in PPs in ileal loop assays, probably due to the action of Stx. In the present
285 work, pre-treatment with probiotic yeast significantly reduced the number of hemorrhagic PPs.
286 We can hypothesize that, by reducing the number of EHEC which came into contact with PPs,
287 the amount of Stx able to induce hemorrhagic lesions was also decreased. *S. cerevisiae* may
288 also act by inhibiting expression or production of Stx (as shown in the present study with *stx1*)
289 or may act on Stx's translocation directly.

290 In conclusion, even if *S. cerevisiae* CNCM I-3856 does not exert a direct antagonistic effect
291 on *E. coli* O157:H7 survival in the simulated human colonic environment, probiotic yeast may
292 be considered as a useful approach in the fight against the pathogen through an appropriate
293 modulation of *stx1* expression and of SCFAs production. Besides, this probiotic also specifi-

294 cally inhibits EHEC interactions with PPs in mice ileal loops and prevent their hemorrhagic
295 evolution. In addition, this is the first study showing that EHEC influence on gut microbiota is
296 donor-dependant, suggesting its potential importance in the clinical outcome of the infection.

297

298 **Experimental procedure**

299 *Strains and culture conditions*

300 The EHEC O157:H7 reference strain EDL933 used in this study was isolated from Michigan
301 ground beef that was linked to the original 1982 outbreak. Bacteria were stored in Luria-Bertani
302 medium containing 15 % glycerol at -80°C and grown in Luria broth overnight at 37 °C without
303 shaking until stationary phase. The yeast *S. cerevisiae* CNCM I-3856 (Lynside Pro GI, Lesaffre
304 Human Care, Milwaukee, WI) was supplied in its active dried powder form and administered
305 in *in vitro* and *in vivo* assays resuspended in sterile physiological water (10^7 CFU/mL).

306

307 *In vitro gastrointestinal digestion*

308 To mimic bacterial transit through the upper digestive tract, EDL 933 was subjected to a static
309 gastric and small intestinal digestion protocol, before being administered to the ARCOL model
310 or ileal loops. Briefly, the procedure consists of two successive steps simulating the conditions
311 found in the human stomach and small intestine. Gastric environment was reproduced by addi-
312 tion of 1.8 % (wt/vol) of pepsin to an aerobic culture of EDL 933 followed by acidification with
313 1 M HCl to pH 2.5. The gastric phase was performed at 37°C for 1 h. Intestinal conditions

314 were mimicked by addition of 2 %, 1.6 % and 0.8 % (wt/vol) of porcine pancreatin, bile salt
315 for microbiology (mixture of sodium cholate and sodium deoxycholate) and bile porcine ex-
316 tract, respectively, followed by alcalinisation with 1 M NaHCO₃ to pH 6.5. The small intestinal
317 phase was performed at 37°C for 1 h (ileal loops model) or 2 h (ARCOL model). All incuba-
318 tion steps were performed under shaking (60 rpm). After digestion, bacteria were collected by
319 centrifugation (7000 g, 10 min) and suspended in physiological saline (final concentration of
320 10⁷ CFU/mL) before inoculation in the ARCOL model or in mice ileal loops.

321

322 *In vitro fermentations in the ARCOL model*

323 ARCOL is a one-stage fermentation system (Applikon, The Netherlands) that integrates the
324 main parameters of the *in vivo* human colonic environment (Thévenot *et al.*, 2013), including
325 pH, temperature, supply of ileal effluents, retention time, anaerobiosis maintained by the sole
326 activity of resident microbiota, and passive absorption of water and fermentation metabolites
327 by dialysis fibers (Table 2). The bioreactor was inoculated with fresh feces from a healthy
328 individual who had no history of antibiotic treatment 3 months before the study, and was used
329 under semi-continuous conditions. Four experimental schemes were used. Each fermentation
330 started after a 4-day stabilization phase and was divided into two different 4-day phases (A
331 and B). During phase A, there was either no supplementation or a twice daily supplementa-
332 tion of *S. cerevisiae* CNCM-I 3856 (10⁷ CFU/mL by day). During phase B, four different
333 conditions were tested, e.i., (i) none supplementation, (ii) a twice daily supplementation of *S.*

334 *cerevisiae* CNCM-I 3856 (10^7 CFU by day), (iii) a single administration of *E. coli* EDL 933
335 (10^7 CFU) or (iv) a single administration of *E. coli* EDL 933 (10^7 CFU) in conjunction with
336 the twice daily treatment by yeasts. Each condition was made in triplicate using feces collected
337 from three different volunteers (one female and two males, ranging in age from 24 to 46 years).
338 Samples were regularly collected from the colonic medium to determine the survival kinetics of
339 both pathogen and probiotic strains. In addition, the expression of the main virulence genes
340 of EHEC O157:H7 (*stx* and *eae*) was determined by qRT-PCR and the major bacterial pop-
341 ulations of human intestinal microbiota were followed by qPCR. Dialysis outflow was daily
342 sampled to determine SCFA production by gas chromatography.

343

344 *Mice ileal loops assay*

345 Seven week-old sex-matched littermates FVB/c mice were separated into two groups. Mice
346 were orally inoculated once daily during seven days either with physiological water (control
347 group) or with approximately 0.2 ml of 1×10^7 CFU/mL of *S. cerevisiae* CNCM I-3856. Mice
348 were weighted prior to the first inoculation and daily thereafter. Examination of viable counts
349 of it in stools was performed.

350 Mice ileal loops assay were carried out on day eight, as previously described by Hitotsubashi
351 *et al.* (1992). Briefly, mice were anesthetized and the abdominal cavity was opened. A 6 cm
352 ileal segment with 2 to 3 PPs was isolated by suturing two ends of the segment and 5×10^8
353 CFU/mL of EDL 933 were injected into the ileal loops. The small intestine was then placed

354 back into the abdominal cavity which was closed with sutures. After 5 h, mice were killed by
355 cervical dislocation according to animal care procedure. The PPs and an equivalent surface
356 of mucosa into the loops were excised and each PPs was examined to define its hemorrhagic
357 status. In order to evaluate the number of intracellular bacteria, tissue samples were incubated
358 with RPMI medium containing 100 µg/mL of gentamicin for 1 h at 37°C. Tissues were washed,
359 homogenized in phosphate-buffered saline containing 0.1 % Triton X-100 (Sigma, Saint-Louis,
360 MO) and plated onto Luria Broth agar medium. In addition, keratinocyte-derived chemokine
361 (KC) expression was determined using qRT-PCR. Animal protocols used in the study were ap-
362 proved by the committee for ethical issues, CEMEA Auvergne (Agreement to Nicolas Barnich,
363 CEMEA CE16-09, Clermont-Ferrand, France).

364

365 *Survival kinetics of probiotic and pathogen and bacterial translocation*

366 EDL933 and *S. cerevisiae* CNCM I-3856 survival kinetics were determined in the ARCOL
367 model by qPCR analysis using *stx* primers (Table 3) and plate counts, respectively. Viable
368 yeasts were determined by plating on Sabouraud dextrose agar supplemented with gentamicin
369 (10 µg/L) and chloramphenicol (50 µg/L) followed by incubation at 37°C during 48 h. In mice,
370 yeast survival was determined by counting in stool. Fresh stool specimen (1 to 2 pellets) were
371 weighed and placed in an Eppendorf tube containing 1 mL of sterilized physiological saline,
372 homogenized and plated on Sabouraud dextrose agar medium as previously described. The
373 number of associated bacteria in ileal loops was determined by plating on Luria Broth agar

374 medium (37°C, 24 h).

375

376 *Gene expression analysis*

377 qRT-PCR was used to follow the expression of specific genes from EDL 933 and epithelial cells:

378 *stx* and *eae* in the ARCOL model and KC gene in mice ileal loops. Total RNA was extracted

379 from tissue samples from mice using TRizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to

380 manufacturer's instructions and from *in vitro* colonic medium using phenol-chloroform. Then,

381 RNAs were reversely transcribed using the first-strand cDNA synthesis kit (Takara) to quantify

382 mRNA expression levels. qRT-PCR was performed using SYBR Green qPCR Master Mix

383 (Roche) on a Stratagene Mx3005P QPCR system (Agilent Technologies, Massy, France) with

384 the specific primers indicated in Table 3. *Enterobacteriaceae* 16S and mouse 36B4 were used as

385 internal controls for quantification of mRNA expression. Fold-induction was calculated using

386 the Ct method as follows:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{target\ gene} - Ct_{housekeeping\ gene})_{treatment} - (Ct_{target\ gene} - Ct_{housekeeping\ gene})_{non\ treatment}$$

387 and the final data were derived from $2^{-\Delta\Delta Ct}$. KC gene expression analysis was completed by

388 the measurement of the corresponding protein. The amount of KC secreted in the supernatants

389 from mouse ileal tissues cultured for 24 h in RPMI medium containing Penicillin / Streptomycin

390 and 100 µg/mL gentamicin in an atmosphere containing 5 % CO₂ at 37°C, was determined by

391 ELISA (R&D systems, Norwich, England) according to the manufacturer's instructions.

392

393 *Composition and metabolic activity of human intestinal microbiota*

394 The main bacterial populations of human intestinal microbiota in the ARCOL model were
395 measured by qPCR analysis as described previously by Thévenot *et al.* (2013). Primers used
396 in this study are listed in Table 3. SCFAs production in the ARCOL model was determined
397 by gas chromatography. Dialysis outflow supplemented with internal standard (2-ethyl butyric
398 acid at 49 mM) were deproteinized by addition of saturated phosphotungstic acid (500 g/L),
399 centrifuged at 9000 g for 20 min before supernatants were filtered (0.45 µm). The samples were
400 run through a 6890 Series GC System (HP, USA) fitted with HP-INOWax column (0.25 mm x
401 30 m x 0.25 µm) and flame ionization detector. Helium was used a carrier gas and delivered at
402 a flow rate of 2 mL/min. Injector and detector were set at 250°C. The column was maintained
403 in an oven with a temperature gradient ranging from 110 to 240°C. One micro liter quantity
404 of each sample was injected with a run time of 14.3 min. Peaks were integrated using the
405 HP ChemStation software. Fatty acid concentrations were quantified by comparing their peak
406 areas with the corresponding standards.

407

408 *Histological analysis*

409 Tissue samples taken from the mouse small intestine were fixed in PBS containing 4 % formalin,
410 paraffin-embedded, cut into 5 µm slices, stained with hematoxylin / eosin / safranin and then
411 examined with a light microscope by a pathologist kept unaware of sample origin.

412

413 *Statistical analysis*

414 For each microorganism, significant differences in survival between treatments and time points
415 were tested using a nonparametric analysis of repeated measures (the same individuals were
416 measured over time) with the "f1.ld.f1" function of the R package "nparLD" (Noguchi *et al.*,
417 2012) in R 3.0.0 (Team, 2013). In case of a significant treatment or interaction effect, Tukey
418 contrast effects of survival between the four treatments for each time point were calculated using
419 the function "nparcomp" of the R package "nparcomp" (Konietschke, 2012). The same method
420 was applied on SCFA data analysis. Nycthemeral rhythm of yeast viability and percentage
421 variation of SCFA production between phase A and B in ARCOL and effects of treatments
422 in the in vivo assay were determined by Mann-Whitney test and $P < 0.05$ was considered as
423 significant. The independence between treatment and hemorrhagic status of PPs was tested by
424 Chi-squared with Yates' correction. The agglomerative hierarchical clustering with the "hclust"
425 function was used to cluster treatment depending on their composition in major bacterial
426 populations.

427

428 **Acknowledgments**

429 This work was supported by grants from the French Ministre de l'Éducation Nationale de
430 l'Enseignement Supérieur et de la Recherche to J.T. and from Conseil Régional Auvergne
431 (grant T2ANHS-R72_p1 ASTERISK, Auvergne STEC risque) to C.C., EA CIDAM, and UMR

432 INSERM/Université d'Auvergne U1071 USC-INRA 2018. We thank Nourddine Azzaoui for
433 help in statistical analysis and the Lesaffre Compagny for providing the *S. cerevisiae* CNCM
434 I-3856 strain.

435

436 References

437 Bacchetti De Gregoris, T., Aldred, N., Clare, A.S., and Burgess, J.G. (2011) Improvement
438 of phylum-and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa.
439 *Journal of microbiological methods* **86**: 351–356.

440 Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G.T., and McMurdo, M.E. (2004) Characterization of bac-
441 terial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients
442 by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied*
443 *and environmental microbiology* **70**: 3575–3581.

444 Blanquet-Diot, S., Denis, S., Chalancon, S., Chaira, F., Cardot, J.-M., and Alric, M. (2012)
445 Use of artificial digestive systems to investigate the biopharmaceutical factors influencing
446 the survival of probiotic yeast during gastrointestinal transit in humans. *Pharmaceutical*
447 *research* **29**: 1444–1453.

448 Carey, C.M., Kostrzynska, M., Ojha, S., and Thompson, S. (2008) The effect of probiotics
449 and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*
450 O157:H7. *Journal of microbiological methods* **73**: 125–132.

- 451 Dahan, S., Dalmaso, G., Imbert, V., Peyron, J.-F., Rampal, P., and Czerucka, D. (2003) *Sac-*
452 *charomyces boulardii* interferes with enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced signaling
453 pathways in T84 cells. *Infection and immunity* **71**: 766–773.
- 454 Dalmaso, G., Loubat, A., Dahan, S., Calle, G., Rampal, P., and Czerucka, D. (2006) *Sac-*
455 *charomyces boulardii* prevents TNF-alpha-induced apoptosis in EHEC-infected T84 cells.
456 *Research in microbiology* **157**: 456–465.
- 457 De Sablet, T., Chassard, C., Bernalier-Donadille, A., Vareille, M., Gobert, A.P., and Martin,
458 C. (2009) Human microbiota-secreted factors inhibit shiga toxin synthesis by enterohemor-
459 rhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and immunity* **77**: 783–790.
- 460 Etienne-Mesmin, L., Chassaing, B., Sauvanet, P., Denizot, J., Blanquet-Diot, S., Darfeuille-
461 Michaud, A., *et al.* (2011a) Interactions with M Cells and macrophages as key steps in the
462 pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *PloS one* **6**: e23594.
- 463 Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Privat, M., Denis, S., Cardot, J.-M., Alric, M., and Blanquet-
464 Diot, S. (2011b) Effect of a new probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain on survival of
465 *Escherichia coli* O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model. *Applied and environmental*
466 *microbiology* **77**: 1127–1131.
- 467 FAO/WHO (2001) Report on Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health
468 and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid
469 bacteria. *FAO/WHO Cordoba*.

- 470 Foster, D.B. (2013) Modulation of the enterohemorrhagic *E. coli* virulence program through
471 the human gastrointestinal tract. *Virulence* **4**: 315–323.
- 472 Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., *et al.* (2011) Bi-
473 fidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate.
474 *Nature* **469**: 543–547.
- 475 Fukuda, S., Toh, H., Taylor, T.D., Ohno, H., and Hattori, M. (2012) Acetate-producing bifi-
476 dobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters.
477 *Gut microbes* **3**: 449–454.
- 478 Furet, J.-P., Firmesse, O., Gourmelon, M., Bridonneau, C., Tap, J., Mondot, S., *et al.* (2009)
479 Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quan-
480 titative PCR. *FEMS microbiology ecology* **68**: 351–362.
- 481 Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J., and Gill, H.S. (2001) *In vitro* adherence properties of *Lac-*
482 *tobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic
483 activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International journal of food microbi-*
484 *ology* **67**: 207–216.
- 485 Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., *et al.* (2014) Expert
486 consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics
487 consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews*
488 *Gastroenterology & Hepatology* **11**: 506–514.

- 489 Hitotsubashi, S., Fujii, Y., Yamanaka, H., and Okamoto, K. (1992) Some properties of purified
490 *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infection and immunity* **60**: 4468–4474.
- 491 Hsueh, H.-Y., Yueh, P.-Y., Yu, B., Zhao, X., and Liu, J.-R. (2010) Expression of *Lactobacillus*
492 *reuteri* Pg4 collagen-binding protein gene in *Lactobacillus casei* ATCC 393 increases its
493 adhesion ability to Caco-2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry* **58**: 12182–12191.
- 494 Hugo, A., Kakisu, E., De Antoni, G., and Perez, P. (2008) Lactobacilli antagonize biological
495 effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* *in vitro*. *Letters in applied microbiology* **46**:
496 613–619.
- 497 Huijsdens, X.W., Linskens, R.K., Mak, M., Meuwissen, S.G., Vandenbroucke-Grauls, C.M.,
498 and Savelkoul, P.H. (2002) Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa
499 by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology* **40**: 4423–4427.
- 500 Johnson-Henry, K.C., Donato, K.A., Shen-Tu, G., Gordanpour, M., and Sherman, P.M. (2008)
501 *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-
502 induced changes in epithelial barrier function. *Infection and immunity* **76**: 1340–1348.
- 503 Johnson-Henry, K.C., Hagen, K.E., Gordonpour, M., Tompkins, T.A., and Sherman, P.M.
504 (2007) Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemor-
505 rhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cellular microbiology* **9**: 356–
506 367.
- 507 Konietzschke, F. (2012) Nparcomp: perform multiple comparisons and compute simultaneous
508 confidence intervals for the nonparametric relative contrast effects. *R package Version 2.0*.

- 509 Kus, J.V., Gebremedhin, A., Dang, V., Tran, S.-L., Serbanescu, A., and Foster, D.B. (2011)
510 Bile salts induce resistance to polymyxin in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.
511 *Journal of bacteriology* **193**: 4509–4515.
- 512 Martins, F.S., Rodrigues, A.C.P., Tiago, F.C., Penna, F.J., Rosa, C.A., Arantes, R.M., *et al.*
513 (2007) *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica*
514 serotype *Typhimurium* and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional
515 mice. *Journal of medical microbiology* **56**: 352–359.
- 516 Medellin-Peña, M.J., and Griffiths, M.W. (2009) Effect of molecules secreted by *Lactobacillus*
517 *acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. *Applied and environ-*
518 *mental microbiology* **75**: 1165–1172.
- 519 Medellin-Peña, M.J., Wang, H., Johnson, R., Anand, S., and Griffiths, M.W. (2007) Probiotics
520 affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and environ-*
521 *mental microbiology* **73**: 4259–4267.
- 522 Miszczycha, S.D., Thévenot, J., Denis, S., Callon, C., Livrelli, V., Alric, M., *et al.* (2014)
523 Survival of *Escherichia coli* O26:H11 exceeds that of *Escherichia coli* O157:H7 as assessed
524 by simulated human digestion of contaminated raw milk cheeses. *International journal of*
525 *food microbiology* **172**: 40–48.
- 526 Nakanishi, N., Tashiro, K., Kuhara, S., Hayashi, T., Sugimoto, N., and Tobe, T. (2009) Regu-
527 lation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology*
528 **155**: 521–530.

- 529 Naylor, S.W., Gally, D.L., and Christopher Low, J. (2005) Enterohaemorrhagic *E. coli* in vet-
530 erinary medicine. *International journal of medical microbiology* **295**: 419–441.
- 531 Nguyen, H.T.T., Dalmaso, G., Müller, S., Carrière, J., Seibold, F., and Darfeuille–Michaud, A.
532 (2014) Crohn’s Disease–Associated Adherent Invasive *Escherichia coli* modulate levels of
533 microRNAs in intestinal epithelial cells to reduce autophagy. *Gastroenterology* **146**: 508–
534 519.
- 535 Noguchi, K., Gel, Y.R., Brunner, E., and Konietzschke, F. (2012) NparLD: an R software
536 package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. *Journal*
537 *of Statistical Software* **50**: 1–23.
- 538 Oelschlaeger, T.A. (2010) Mechanisms of probiotic actions—a review. *International Journal of*
539 *Medical Microbiology* **300**: 57–62.
- 540 Phillips, A., Navabpour, S., Hicks, S., Dougan, G., Wallis, T., and Frankel, G. (2000) En-
541 terohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer’s patches in humans and cause
542 attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut* **47**: 377–381.
- 543 Pollard, D., Johnson, W., Lior, H., Tyler, S., and Rozee, K. (1990) Differentiation of Shiga
544 toxin and Vero cytotoxin type 1 genes by polymerase chain reaction. *Journal of Infectious*
545 *Diseases* **162**: 1195–1198.
- 546 Putaala, H., Salusjärvi, T., Nordström, M., Saarinen, M., Ouwehand, A.C., Bech Hansen, E.,
547 and Rautonen, N. (2008) Effect of four probiotic strains and *Escherichia coli* O157:H7

548 on tight junction integrity and cyclo-oxygenase expression. *Research in microbiology* **159**:
549 692–698.

550 Rund, S.A., Rohde, H., Sonnenborn, U., and Oelschlaeger, T.A. (2013) Antagonistic effects
551 of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104:H4 and
552 O157:H7. *International Journal of Medical Microbiology* **303**: 1–8.

553 Sherman, P.M., Johnson-Henry, K.C., Yeung, H.P., Ngo, P.S., Goulet, J., and Tompkins, T.A.
554 (2005) Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-and enteropathogenic
555 *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing
556 bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infection and immunity* **73**: 5183–5188.

557 Sun, J., Zhou, T.-T., Le, G.-W., and Shi, Y.-H. (2010) Association of *Lactobacillus acidophilus*
558 with mice Peyer's patches. *Nutrition* **26**: 1008–1013.

559 Takahashi, M., Taguchi, H., Yamaguchi, H., Osaki, T., Komatsu, A., and Kamiya, S. (2004) The
560 effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia*
561 *coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **41**: 219–226.

562 Tarr, P.I., Neill, M.A., Clausen, C.R., Watkins, S.L., Christie, D.L., and Hickman, R.O. (1990)
563 *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures
564 in establishing the etiology. *Journal of Infectious Diseases* **162**: 553–556.

565 Team, R.D.C. (2013). R: *a language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria:
566 R Foundation for Statistical Computing.

- 567 Thévenot, J., Etienne-Mesmin, L., Denis, S., Chalancon, S., Alric, M., Livrelli, V., and Blanquet-
 568 Diot, S. (2013) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 survival in an *in vitro* model
 569 of the human large intestine and interactions with probiotic yeasts and resident microbiota.
 570 *Applied and environmental microbiology* **79**: 1058–1064.
- 571 Tiago, F.C.P., Martins, F.S., Souza, E., Pimenta, P., Araujo, H., Castro, I.M., *et al.* (2012)
 572 Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by
 573 *Saccharomyces* probiotics. *Journal of medical microbiology* **61**: 1194–1207.
- 574 Tiago, F.C.P., Sousa, L.P., Araújo, H.R., Pimenta, P.F., Bonjardim, C.A., Nicoli, J.R., and
 575 Teixeira, M.M. (2013) Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as ones
 576 of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in
 577 mice. *Microbes and Infection* **20**: 1–10.
- 578 Tobe, T., Nakanishi, N., and Sugimoto, N. (2011) Activation of motility by sensing short-
 579 chain fatty acids via two steps in a flagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic
 580 *Escherichia coli*. *Infection and immunity* **79**: 1016–1024.
- 581 Toshima, H., Yoshimura, A., Arikawa, K., Hidaka, A., Ogasawara, J., Hase, A., *et al.* (2007)
 582 Enhancement of shiga toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype
 583 O157:H7 by DNase colicins. *Applied and environmental microbiology* **73**: 7582–7588.
- 584 Turková, K., Mavrič, A., Narat, M., Rittich, B., Španová, A., Rogelj, I., and Matijašić, B.B.
 585 (2013) Evaluation of *Lactobacillus* strains for selected probiotic properties. *Folia microbio-*
 586 *logica* **58**: 261–267.

587 Yu, Y., Lee, C., Kim, J., and Hwang, S. (2005) Group-specific primer and probe sets to detect
588 methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotech-*
589 *nology and bioengineering* **89**: 670–679.

590 **Figure 1:** *S. cerevisiae* had no effect on O157:H7 survival in simulated human colonic condi-
591 tion.

592 EHEC survival was assessed by qPCR during *in vitro* fermentations in ARCOL after a single
593 administration of *E. coli* O157:H7 EDL 933 (10^7 CFU/mL) in conjunction or not with twice
594 daily treatment by probiotic yeasts. The curves obtained for bacteria alone (black line) or with
595 *S. cerevisiae* prophylactic treatment (dashed line) were compared with that of the theoretical
596 transit marker (dotted line). Results are expressed as means (\log_{10} CFU/mL) \pm standard de-
597 viations ($n = 3$ for bacteria, $n = 6$ for theoretical transit marker).

598

599 **Figure 2:** Prophylactic treatment by *S. cerevisiae* decreased *stx1* but not *eae* expression in
600 simulated human colonic conditions.

601 10^7 CFU/mL of O157:H7 was administrated in ARCOL with or without prophylactic yeast
602 treatment. Total RNAs were extracted from colonic medium and (A) *stx1* and (B) *eae* mRNA
603 were quantified by qRT-PCR with (grey bar) or without (black bar) the prophylactic yeast
604 treatment. Housekeeping 16S *Enterobacteriaceae* was used as an internal standard to normal-
605 ize the data. Results are expressed as means of fold-induction (calculated using the Ct method
606 using time 0 as reference) \pm standard error of mean ($n = 3$). Vertical dashed lines separated
607 first day to others. Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney
608 test. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

609

610 **Figure 3:** Donor-dependent effect of O157:H7 and probiotic treatment on the major popula-
611 tions of human gut microbiota.

612 Heat map analysis of the composition in major bacterial population (followed by qPCR) depend-
613 ing on the conditions (Control, Yeast alone, Bacteria alone, Bacteria with prophylactic yeast
614 treatment) was used to cluster data. Seven major phyla or genus were followed to clustering:
615 *Actinobacteria*, *Bacteroides*, *Bacteroidetes*, *Enterobacteriaceae*, *Firmicutes* and *Lactobacillus* /
616 *Pediococcus* / *Leuconostoc*. Heat map coloring refers to the concentration value: high values
617 are represented in green; low values are represented in red.

618

619 **Figure 4:** Prophylactic *S. cerevisiae* treatment induced an increased acetate production and
620 with a diminution in butyrate production during EHEC infection in the ARCOL.

621 Intestinal microbiota produced SCFAs in the dialysis outflow were measured by gas chromatog-
622 raphy with EHEC administration only (A) or with the prophylactic yeast treatment (B). Data
623 were grouped and analyzed per experimental phase (phase A or B) and are expressed as per-
624 centage of variations between phase A and B. Boxes denote interquartile ranges, lines denote
625 medians, and whiskers denote 25th and 75th percentiles. Statistical analysis was performed
626 using the nonparametric Mann-Whitney test. * $P < 0.05$.

627

628 **Figure 5:** *S. cerevisiae* inhibited EHEC interaction with mice Peyer's patches.

629 *S. cerevisiae* CNCM I-3856 was orally administrated to 25 mice (10^7 CFU/mouse/day) during

630 7 days. As a control, physiological water was given to 24 mice using the same experimental
631 protocol. On day 8, mice ileal loops assays were performed and inoculated with O157:H7 EDL
632 933 (5.10^8 CFU/ml). (A) Mice body weight (in g, means \pm standard deviation) was deter-
633 mined every day in each group. (B) Feces were collected in each group on days 0, 1, 3, 5 and
634 7 and plated on Sabouraud agar to determine the amount of viable yeasts (in \log_{10} CFU/g
635 of feces, means \pm standard deviation). (C) Ileal loops assays were performed to study EHEC
636 O157:H7 interaction with murine ileal mucosa without ("ileal mucosa") or with Peyer's patches
637 ("Peyer's patches"). Each point represents the number of translocated bacteria (\log_{10} CFU/g
638 of ileal tissue). Horizontal line represents the mean. Statistical significance between treatments
639 was indicated by asterisks (*: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; NS: non-significant).

640

641 **Figure 6:** *S. cerevisiae* decreased the number of hemorrhagic Peyer's patches in mice.

642 (A) Macroscopic analysis of murine Peyer's patches section after five-hour contact without
643 (upper panel) or with EHEC O157:H7 (below panel) in ileal loops assays. (B) The number
644 of hemorrhagic and non-hemorrhagic Peyer's patches was determined at the end of ileal loops
645 assay in each group (control mice and *S. cerevisiae*-treated mice). Results are given as per-
646 centages of the total number of Peyer's patches and significant differences are indicated ($P <$
647 0.01).

648

649 **Figure 7:** *S. cerevisiae* had trophic effect on mice intestinal mucosa.

650 Hematoxylin and eosin stained cross-sections of mouse ileum were performed after ileal loops
651 assay: in the control group (mice orally administrated with physiological water) and in *S.*
652 *cerevisiae*-pretreated mice (once daily during 7 days with approximately 10^7 CFU), both 5 h
653 post-infection with O157:H7. (A) Ileum from a control mouse (magnification, $\times 200$); (B) ileum
654 from a control mouse (magnification, $\times 400$); (C) ileum from a *S. cerevisiae* treated-mouse
655 (magnification, $\times 200$); (D) ileum from a *S. cerevisiae* treated-mouse (magnification, $\times 400$).
656 Black arrows: panel A and C, different sizes of microvilli; panel D, goblet cells infiltration.

657

658 **Figure 8:** Expression and production of keratinocyte-derived chemokine (KC) were not af-
659 fected by *S. cerevisiae* in mice ileal loops assay

660 Keratinocyte-derived chemokine (KC) expression and production was determined using qRT-
661 PCR and ELISA, respectively for both control mice and *S. cerevisiae*-pretreated mice, KC
662 mRNA and KC secretion were quantified from ileal loops assay 5 h post-infection with O157:H7.
663 (A) qRT-PCR analysis of KC mRNA expression. (B) Secreted amounts of KC in ileal tissue
664 culture supernatant as quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (pg/g of ileal tissues).
665 Means are represented by horizontal lines.

666

667 **Figure 9:** Hypothetical model for the protective effect of *S. cerevisiae* against EHEC in tar-
668 geting Peyer's patches.

669 (A) In absence of probiotic, EHEC may interact preferentially with mannose-rich M cells sur-

670 face. (B) Yeast surface rich in mannose may act as a trap for EHEC, leading to a fewer of
671 pathogens interacting with M cells.

672

673 **Table 1:** Influence of treatment on SCFA production

674

675 **Table 2:** Parameters of *in vitro* fermentations in the ARCOL system

676

677 **Table 3:** Primer and probe sequences used in real-time qPCR assays

678

679 **Supplementary figure A:** Probiotic yeast did not maintain in the human simulated colonic
680 medium

681 Survival kinetics of *S. cerevisiae* were determined by plating on Sabouraud agar. Two daily
682 inoculations of $7 \log_{10}$ CFU/mL were performed. Yeast were inoculated alone (red curve) or
683 with 1×10^7 CFU/ml O157:H7 at day 8 (blue curve). Results are expressed as means (\log_{10}
684 CFU/mL) \pm standard deviations ($n = 3$).

685

686 **Supplementary figure B:** No change was observed in the levels of the major populations of
687 gut microbiota.

688 The major phyla of gut microbiota and their main members were quantified by qPCR following
689 different treatment: control (black), O157:H7 alone (orange), yeast alone (purple) and O157:H7

690 with yeast (green). Results are expressed as percentage of the last stabilization day \pm standard

691 deviations ($n = 3$ for each condition).

692

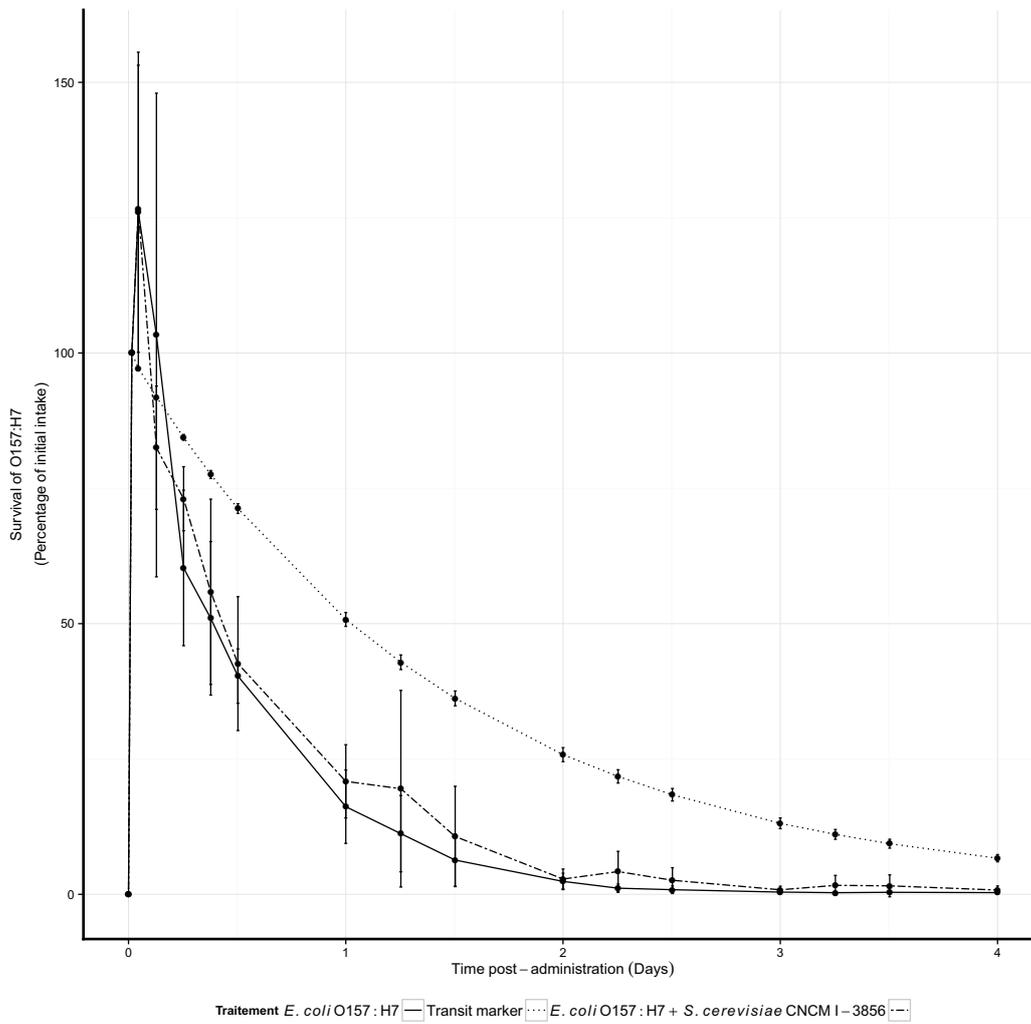


Figure 1.

SURVIE ET PATHOGÉNICITÉ DES EHEC DANS L'ENVIRONNEMENT COLIQUE ET INFLUENCE D'UN TRAITEMENT PROBIOTIQUE

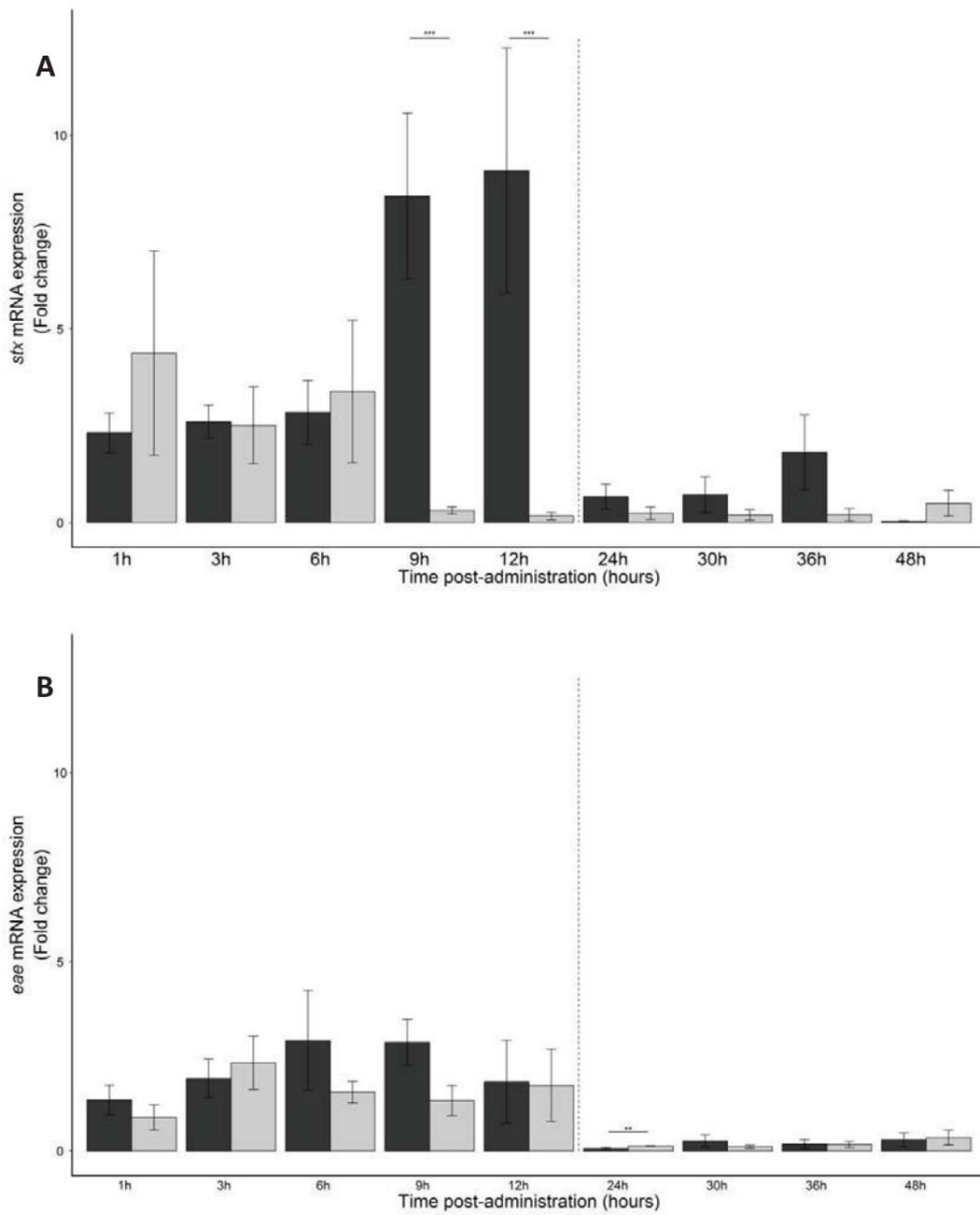


Figure 2.

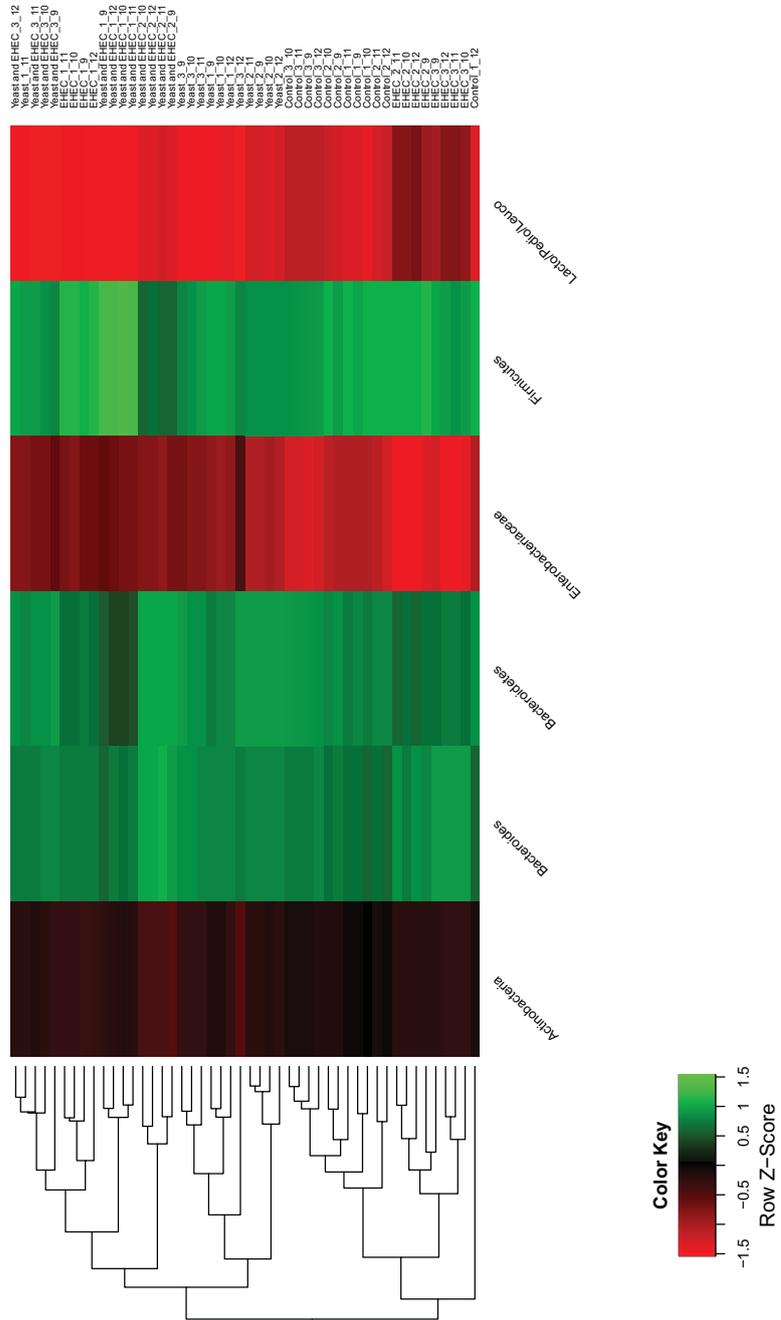


Figure 3.

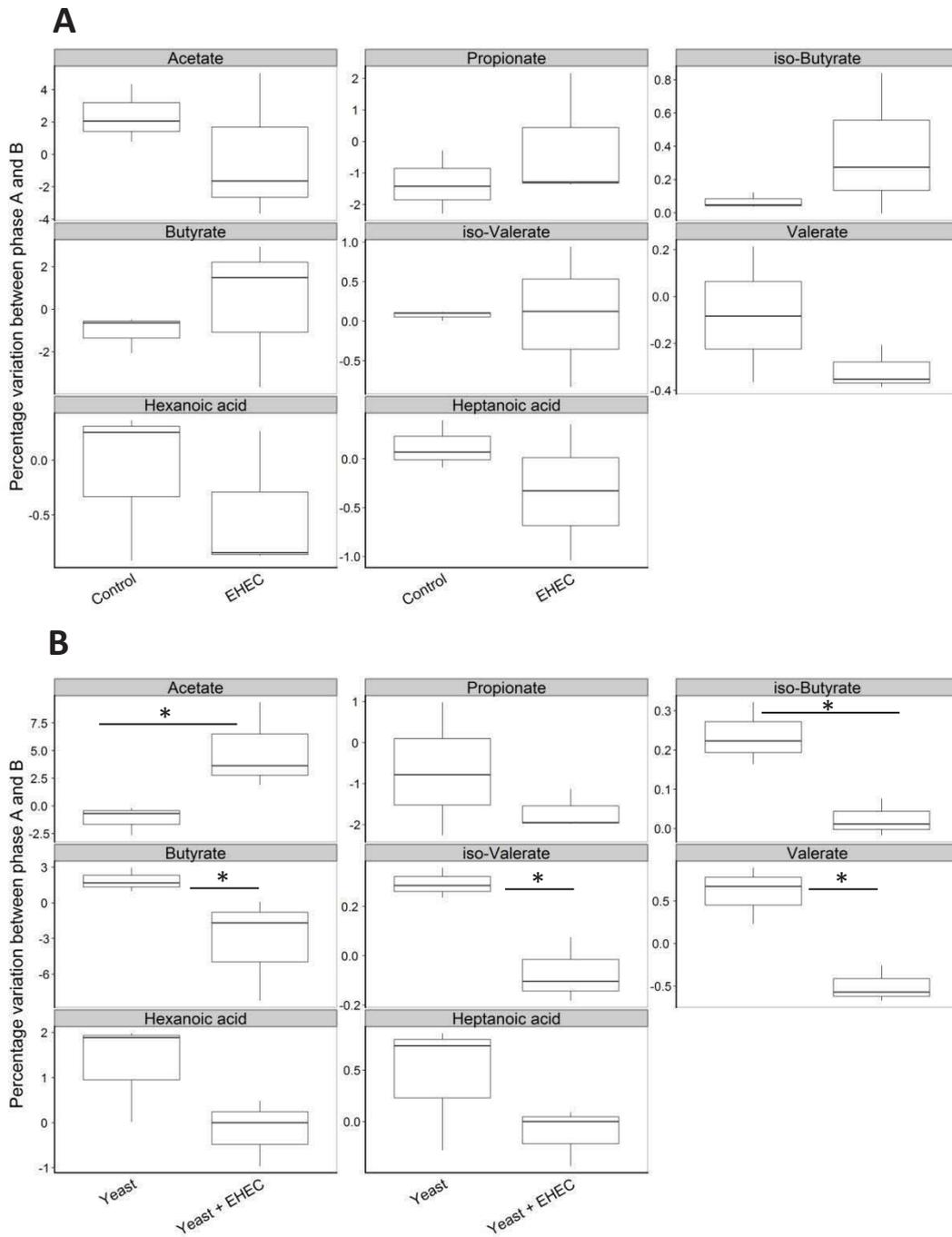


Figure 4.

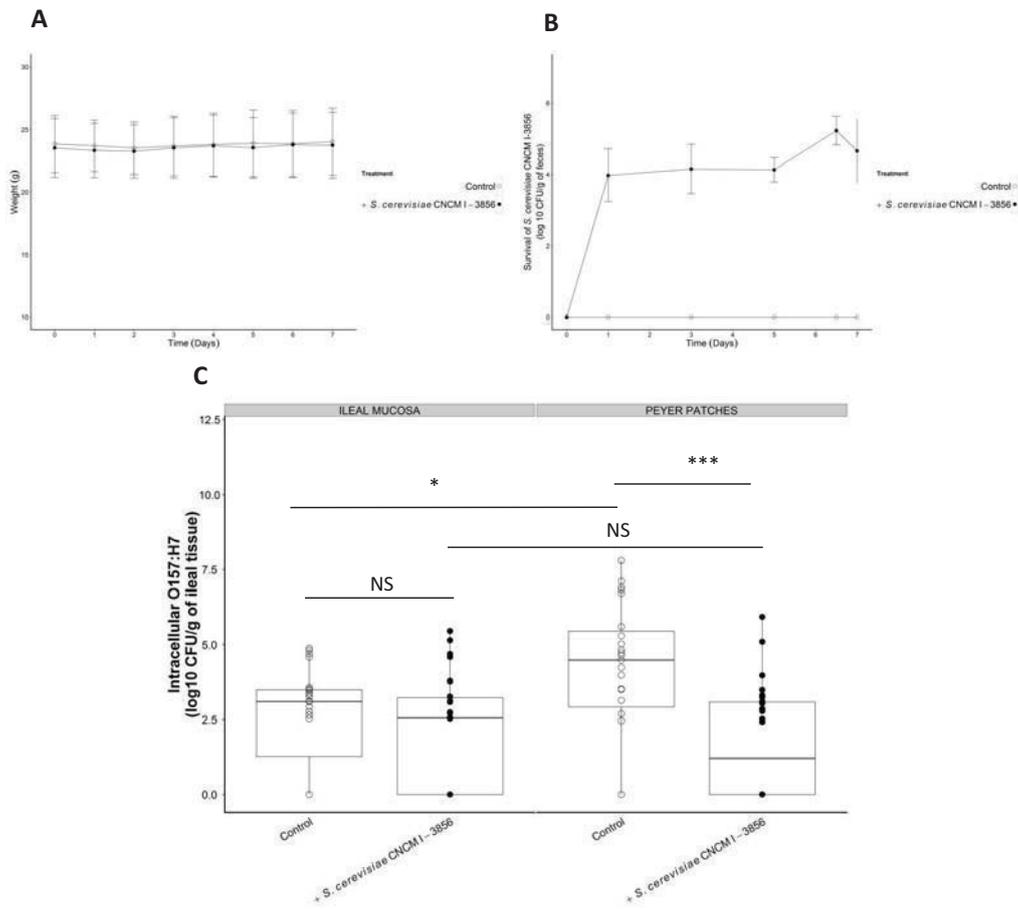


Figure 5.

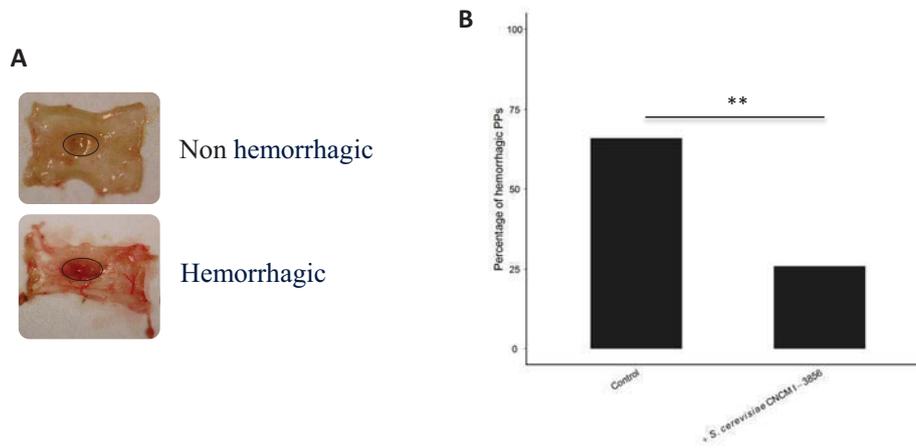


Figure 6.

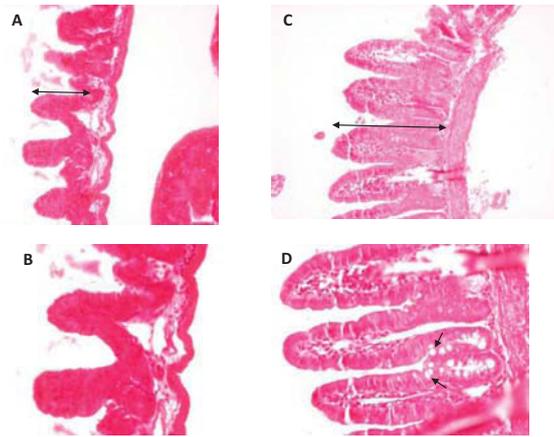


Figure 7.

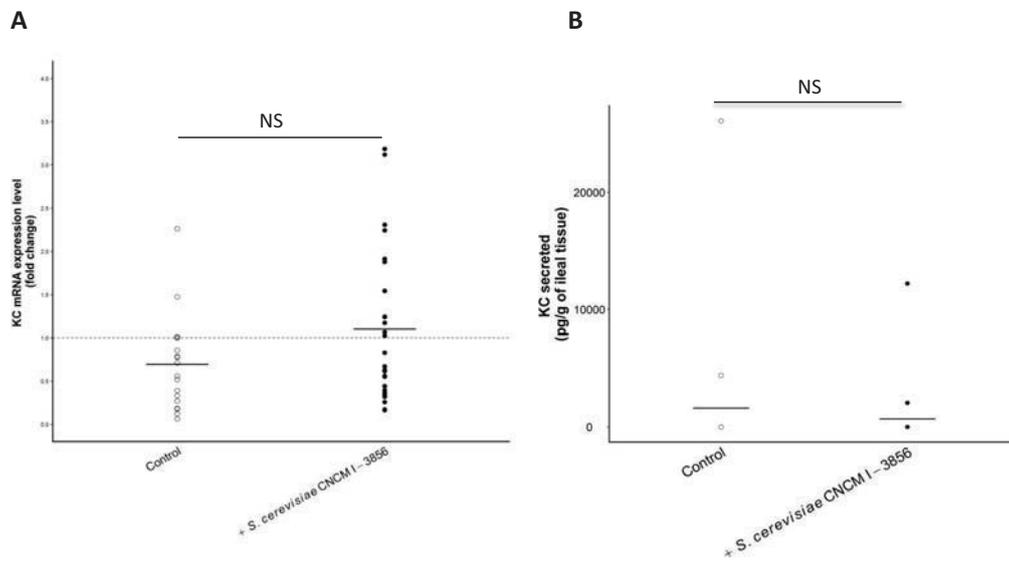


Figure 8.

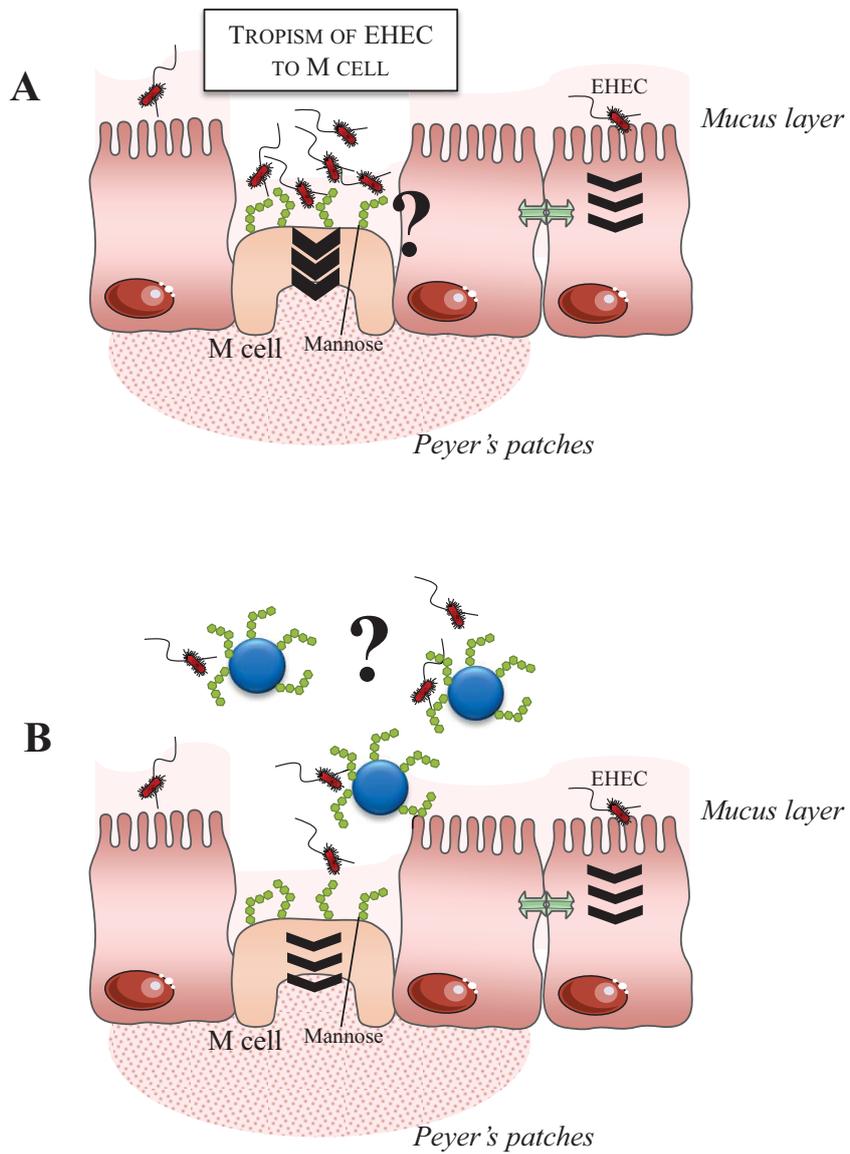


Figure 9.

Table 1

SCFA ^α	% during the different phases ^β											
	Control		Treatment 1 ^γ				Treatment 2 ^δ				Treatment 3 ^ε	
	Phase A	Phase B	Phase A	Phase B	Phase A	Phase B	Phase A	Phase B	Phase A	Phase B	Phase A	Phase B
Acetate	66.1 ± 2.6	68.5 ± 2.5	67.4 ± 3.2	66.2 ± 2.6	69.0 ± 3.7	68.9 ± 2.3	63.7 ± 8.5	68.7 ± 5.3	66.1 ± 2.6	68.5 ± 2.5	67.4 ± 3.2	66.2 ± 2.6
Propionate	18.4 ± 2.0	17.1 ± 1.8	18.7 ± 2.4	18.0 ± 2.4	17.2 ± 1.4	17.0 ± 1.8	19.7 ± 3.6	18.0 ± 4.0	18.4 ± 2.0	17.1 ± 1.8	18.7 ± 2.4	18.0 ± 2.4
Butyrate	15.9 ± 1.2	14.4 ± 1.5	13.9 ± 1.8	15.8 ± 1.0	13.9 ± 2.5	14.1 ± 1.4	16.6 ± 5.0	13.3 ± 1.9	15.9 ± 1.2	14.4 ± 1.5	13.9 ± 1.8	15.8 ± 1.0
iso-Butyrate	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.1	2.3 ± 0.1	1.9 ± 0.6	2.3 ± 0.3	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.1	2.3 ± 0.1
iso-Valerate	2.8 ± 0.2	2.9 ± 0.3	2.9 ± 0.3	3.2 ± 0.3	2.5 ± 0.6	2.6 ± 0.5	2.0 ± 0.5	1.9 ± 0.4	2.8 ± 0.2	2.9 ± 0.3	2.9 ± 0.3	3.2 ± 0.3
Valerate	4.6 ± 0.6	4.5 ± 0.6	4.6 ± 0.6	5.2 ± 0.5	6.2 ± 1.4	5.8 ± 1.0	5.7 ± 0.8	5.2 ± 0.8	4.6 ± 0.6	4.5 ± 0.6	4.6 ± 0.6	5.2 ± 0.5
Hexanoic acid	3.1 ± 0.6	3.0 ± 0.5	2.7 ± 1.6	4.0 ± 1.0	5.1 ± 2.2	4.6 ± 1.3	3.5 ± 2.7	3.4 ± 2.5	3.1 ± 0.6	3.0 ± 0.5	2.7 ± 1.6	4.0 ± 1.0
Heptanoic acid	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.4	0.5 ± 0.5	0.9 ± 0.4	2.3 ± 1.7	2.0 ± 1.7	2.0 ± 1.6	1.9 ± 1.4	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.4	0.5 ± 0.5	0.9 ± 0.4

^α SCFA in the dialysis outflow were measured by gas chromatography. Data are means ± standard deviations for the 4 days of each phase ($n = 12$ for phases A and B). ^β Defined as the percentage of each SCFA amount compared to the sum of acetate, propionate and butyrate. Control refers to no treatment. ^γ A twice daily supplementation of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 in phases A and B. ^δ A single administration of *E. coli* EDL 933 the first day of phase B. ^ε A twice daily supplementation of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 in phases A and B in conjunction with a single administration of *E. coli* EDL 933 the first day of phase B.

Table 2

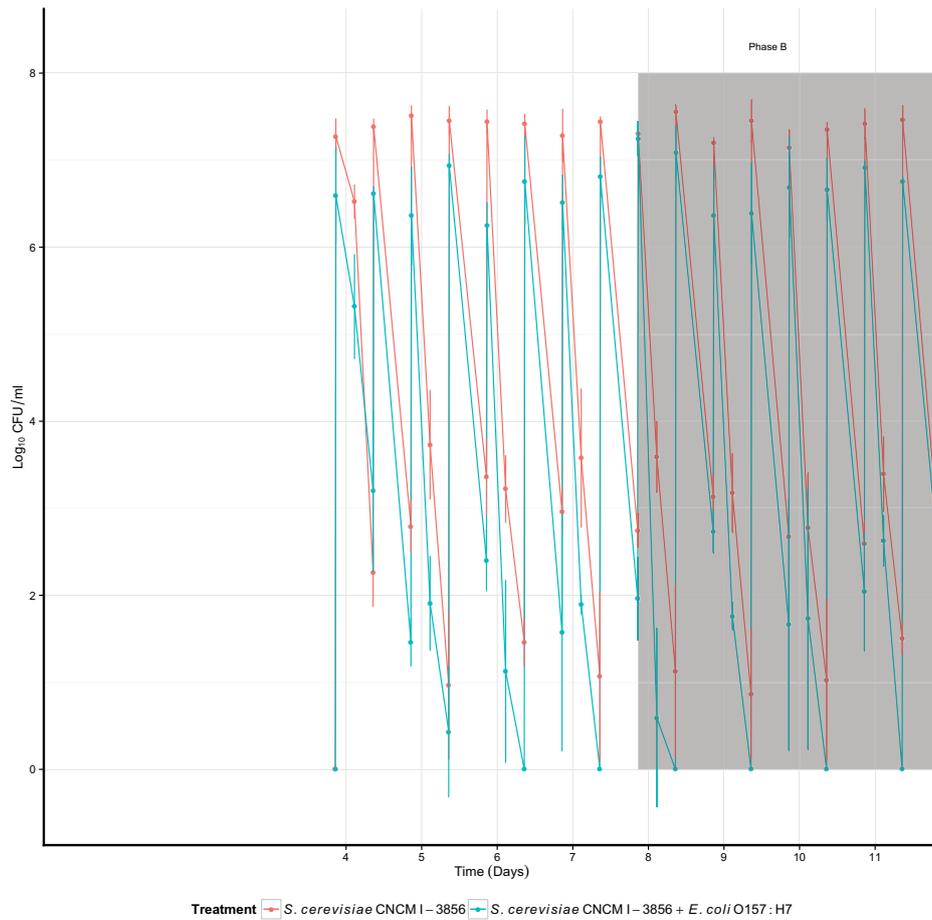
Parameters of <i>in vitro</i> fermentation	Experimental conditions
Temperature	37 °C
Continuous stirring	400 rpm
pH	6.3
Pressure	1.1 bar
Volume of fermentative medium	450 mL
Retention time	36 h
Redox potential	-400 mV

SURVIE ET PATHOGÉNICITÉ DES EHEC DANS L'ENVIRONNEMENT COLIQUÉ ET INFLUENCE D'UN TRAITEMENT PROBIOTIQUE

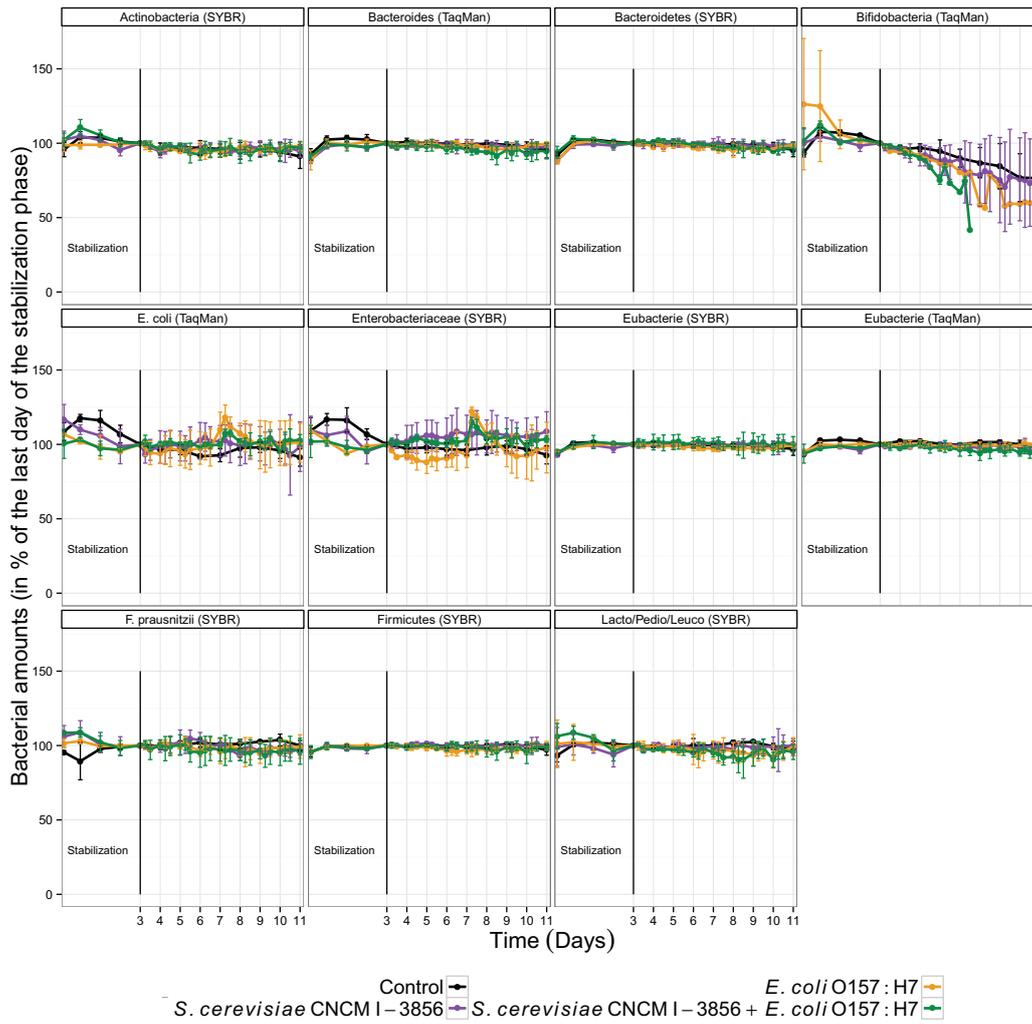
Table 3

Name	Sequence 5'-3'	Target	Annealing temp (°C)	References
SYBR green				
36B4-F	TCCAGGCTTTGGGCATCA	36B4 Mouse telomere	56	Nguyen <i>et al.</i> (2014)
36B4-R	CTTTATCAGCTAGCACATCACTCAGA		50.9	
KC-F	TTGTGGGAAAAGAACTGCAG	Mouse keratinocyte-derived-chemokine	58	Nguyen <i>et al.</i> (2014)
KC-R	TACAAACACAGCCTCCAGA		60	
eaeA-F	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	EHEC intimin	60	Medellin-Peña <i>et al.</i> (2007)
eaeA-R	CCCGAATTCGGTCTCGCCAGTATTCCG			
VT1c	ACCCCTGTAACGAAAGTTTGGG	EHEC Shiga-toxin 1	60	Pollard <i>et al.</i> (1990)
VT1d	ATCTCATGGACTACTTTGAC			
BAC338F	ACTCTACGGGAGGCAG	Total bacteria	58	Yu <i>et al.</i> (2005)
BAC516F	GTATTAACCGGGCTGCTG			
789c-fbF	CRAACAGATTAGATACCCT	<i>Bacteroidetes</i>	61	Bacchetti De Gregoris <i>et al.</i> (2011)
cfb967R	GGTAAGGTTCTCGGGTAT			
Act920F3	TACGGCGCAAGGCTA	<i>Actinobacteria</i>	61	Bacchetti De Gregoris <i>et al.</i> (2011)
Act1200R	TCRTCCACCTTCCCTCCG			
928F-Firm	TGAAACTYAAAGGAATTGACG	<i>Firmicutes</i>	61	Bacchetti De Gregoris <i>et al.</i> (2011)
1040FirmR	ACCATGCACCCACTGTC			
Ecol1457F	CATTGAGGTTACCGCAGAAAGAAAGC	<i>Enterobacteriaceae</i>	63	Bartosch <i>et al.</i> (2004)
Ecol1652R	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC			
F-Lacto05	AGCAGTAGGGAAATCTCCA	<i>Lactobacillus/Pediococcus/Leuconostoc</i>	60	Furet <i>et al.</i> (2009)
R-Lacto04	CGCCACTGTGTCTYTCCATATA			
TaqMan				
F_Bact 1369	CGGTGAATPACGTTCCCGG	Total bacteria	60	Furet <i>et al.</i> (2009)
P_TMI1389F	FAM-CTTGTACACACGCCCGCTC-TAMRA			
R_Prok1492R	TACGGCTACCTTGTACGACTT			
E_coli-F	CATGCCGCTGTATGAAGAA	<i>Escherichia coli</i>	60	Huijsdens <i>et al.</i> (2002)
E_coli-P	FAM-TATTAACTTTACTCCCTTCTCCCGCTGAA-TAMRA			
E_coli-R	CGGGTAAAGTCAATGAGCAA			
F_Bifid 09c	CGGGTGAATATGCGTGACC	Bifidobacteria	60	Furet <i>et al.</i> (2009)
P_Bifid	FAM-CTCTTGAAAACGGGTG-TAMRA			
R_Bifid 06	TGATAGCACGGACCCCA			
F_Bacter 11	CCTWCGATGGATAGGGTT	<i>Bacteroides/Prenotella</i>	60	Furet <i>et al.</i> (2009)
P_Bac303	YY-AAAGTCCCCCAATG-TAMRA			
R_Bacter 08	CAGGCTACTTGGCTGGTTCCAG			

SURVIE ET PATHOGÉNICITÉ DES EHEC DANS L'ENVIRONNEMENT COLIQUÉ ET INFLUENCE D'UN TRAITEMENT PROBIOTIQUE



Suppl. A.



Suppl. B.

Commentaires des publications n°2 et 3

Les principaux sites d'actions suggérés chez l'Homme pour les EHEC sont l'iléon terminal et le côlon (CHONG *et al.*, 2007 ; MARIANI-KURKDJIAN et BONACORSI, 2014). Cependant, aucune donnée n'est disponible concernant leur survie et la régulation des gènes de virulence des EHEC dans l'environnement colique humain. L'objectif de nos travaux repose sur trois approches : (i) l'étude de la survie de la souche de référence *E. coli* O157:H7 EDL 933 sauvage ou délétée des gènes codant les toxines Stx1 (EDL933 Δ *stx1*) dans l'environnement colique humain et de l'expression des principaux gènes de virulence (*stx* et *eae*), (ii) l'effet des EHEC sur le microbiote intestinal, (iii) l'étude de la survie de souches de levures probiotiques et leur effet sur le microbiote colique, la survie du pathogène, l'expression de ses facteurs de virulence, et son interaction avec l'épithélium intestinal.

Ainsi, nous avons procédé *in vitro* en modèle colique humain (i) à l'évaluation du taux de survie de la souche EDL933 – sauvage ou Δ *stx1* – et (ii) à l'étude des principaux représentants des grands groupes bactériens du microbiote colique humain, et ce, en présence ou non d'un traitement probiotique à base de levures (*S. boulardii* et/ou *S. cerevisiae* CNCM I-3856). La survie des différents micro-organismes (pathogènes et probiotiques) a été évaluée au cours du temps en comparant les profils obtenus pour ces micro-organismes à la courbe théorique d'élimination d'un marqueur inerte, rapportée à la même concentration initiale (DANCKWERTS, 1953).

Évaluation de la survie et de la virulence d'O157:H7 dans l'environnement colique humain simulé

Pour la première fois, dans la publication n°2, notre étude s'est intéressée à la survie d'une souche EHEC dans un environnement colique humain *in vitro*. Nous avons montré une sensibilité de cette souche EHEC aux conditions coliques, celle-ci ne se maintenant pas dans le bioréacteur. Ces données sont en adéquation avec celles de GAMAGE *et al.* (2006) en modèle murin où la présence d'un microbiote intestinal limite la colonisation d'*E. coli* O157:H7. Cependant, ces données de survie ne peuvent pas être généralisées à l'ensemble des souches des EHEC, une seule souche de sérotype O157:H7 ayant été testée.

Afin de se rapprocher au mieux des conditions *in vivo*, plusieurs adaptations méthodologiques ont été apportées dans la publication n°3 par rapport à la publication n°2 : l'ajout d'un stress gastro-intestinal en « batch » préalablement à l'introduction des EHEC dans le système ARCOL, l'utilisation de selles issus de différents donneurs et le changement de la concentration de l'inoculum bactérien. Néanmoins, les résultats de survie d'O157:H7 obtenus dans la troisième étude confirment ceux de la publication n°2 et nous indiquent que l'ajout d'un stress gastro-intestinal ne modifie pas la cinétique d'élimination du pathogène du milieu fermentaire. À titre d'exemple, 36 h après un stress gastro-intestinal, $6,3\% \pm 4,8$ de l'inoculum initial est détecté dans le milieu fermentaire contre $4,7\% \pm 0,8$ quand les bactéries

n'étaient pas stressées préalablement. De plus, l'utilisation de plusieurs donneurs de matières fécales (contrairement à un seul donneur dans l'étude n°2) nous permet de généraliser ces données à la population humaine adulte. Enfin, le choix de la concentration ⁷ (10^5 UFC/mL dans l'étude n°2 à 10^7 UFC/mL dans l'étude n°3) de l'inoculum bactérien n'a pas d'influence sur la cinétique d'élimination du pathogène dans le milieu colique. Ces deux concentrations sont supra-physiologiques et il serait intéressant d'évaluer la survie des EHEC à des concentrations plus faibles, la dose infectieuse moyenne de ces bactéries serait proche de 10^2 UFC (LIN *et al.*, 1996).

Évaluation de la survie de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 et de *S. boulardii* dans l'environnement colique humain simulé

La viabilité étant un critère essentiel – bien que controversé – pour l'activité des probiotiques dans l'environnement gastro-intestinal, la survie des levures a donc été suivie au cours des fermentations. Les deux souches testées dans la publication n°2 ont été rapidement éliminées du bioréacteur. Cependant, *S. cerevisiae* CNCM I-3856 était significativement plus affectée par les conditions coliques que *S. boulardii* (*S. cerevisiae* CNCM I-3856 non détectée après 36 h versus 60 h pour *S. boulardii*). En accord avec nos résultats, différentes études ont montré que *S. boulardii* semble plus résistant que *S. cerevisiae* aux conditions gastro-intestinales (EDWARDS-INGRAM *et al.*, 2007; FIETTO *et al.*, 2004). Dans les expérimentations rapportées dans la publication n°3, un mode d'administration bi-quotidien a été retenu afin d'essayer de maintenir les concentrations en levures les plus élevées possibles dans le milieu fermentaire (BLANQUET-DIOT *et al.*, 2012). Néanmoins, nos résultats montrent que, même avec ce mode d'administration, les levures ne se maintiennent pas dans le milieu colique à des concentrations semblables à celles des inocula. Ces données de survie *in vitro* corroborent celles décrites *in vivo* chez l'Homme pour différentes souches de *S. cerevisiae* où une élimination rapide des levures est observée dans les échantillons fécaux dès l'arrêt du traitement (KLEIN *et al.*, 1993; PECQUET *et al.*, 1991). En effet, *in vivo*, des probiotiques, tels que *S. boulardii* ou encore *S. cerevisiae* 905 sont éliminés du tractus digestif des mammifères hébergeant un microbiote intestinal complexe en deux à trois jours (MARTINS *et al.*, 2007). Ainsi, l'ingestion quotidienne de ces micro-organismes est nécessaire afin de maintenir des concentrations artificiellement élevées dans l'écosystème digestif. Toutefois, l'absence de survie n'est pas corrélée avec une absence d'effet. En effet, SIVIGNON *et al.* (2014) ont montré que la viabilité des levures *S. cerevisiae* CNCM I-3856 n'est pas indispensable pour observer des effets bénéfiques dans le cadre d'une piste thérapeutique de la maladie de Crohn.

7. Basée sur les concentrations observées par ETIENNE-MESMIN *et al.* (2011b) dans les sorties iléales cumulées après 5 h de digestion dans le système TIM 1, consécutivement à l'introduction de 2×10^5 UFC/mL d'EDL933 $\Delta stx1 \Delta stx2$ dans l'estomac

Influence de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 et de *S. boulardii* sur la survie et la virulence d'O157:H7 dans l'environnement colique humain simulé

Lorsque les levures sont co-administrées avec la souche pathogène (étude n°2), le taux de survie d'*E. coli* O157:H7 dans le système ARCOL n'est pas modifié. L'effet antagoniste de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 vis-à-vis de la reprise de croissance d'O157:H7 dans la partie distale de l'intestin grêle du TIM 1 observé par ETIENNE-MESMIN *et al.* (2011b) n'est pas retrouvé ici avec des conditions coliques humaines simulées. Néanmoins, la différence majeure entre ces deux modèles est l'absence de microbiote intestinal dans le tractus digestif supérieur *in vitro*. Ainsi, il serait intéressant d'utiliser des modèles intégrant un microbiote intestinal dans les parties hautes du tractus digestif afin de conclure sur l'influence d'un écosystème complexe sur le comportement des EHEC dans l'environnement digestif humain. L'administration bi-quotidienne de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 préalablement à l'ajout du pathogène et en post-exposition ne modifie pas la cinétique d'élimination du pathogène du milieu fermentaire comparativement au traitement « curatif ». Néanmoins, nous avons montré que l'administration de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 en préventif puis en post-exposition aux EHEC permettait, en modulant l'activité fermentaire du microbiote colique, de diminuer significativement l'expression du gène *stx1* sans modifier l'expression du gène *eae*. La diminution de l'expression et/ou de la traduction des gènes *stx* par différentes souches probiotiques bactériennes a déjà été montré (CAREY *et al.*, 2008 ; REISSBRODT *et al.*, 2009 ; RUND *et al.*, 2013 ; TAKAHASHI *et al.*, 1999 ; TAKAHASHI *et al.*, 2004). Pour la première fois, une levure probiotique a montré une action inhibitrice vis-à-vis de l'expression de *stx1*, mais la production des toxines doit être prise en compte pour prédire les potentialités pathogènes de souches EHEC. Ces facteurs n'ont pas pu être étudiés en raison de problèmes techniques (concentration en Stx inférieure à la limite de détection).

Influence d'O157:H7 et des traitements probiotiques sur les principales populations du microbiote colique

Dans la publication n°2, nous avons montré une diminution des *Enterobacteriaceae* consécutive à l'administration d'EHEC. Cette diminution des concentrations en *Enterobacteriaceae* pourrait être expliquée par un transfert de phage codant les Stx porté par O157:H7 vers les *E. coli* commensaux consécutivement à une lyse bactérienne. GAMAGE *et al.* (2003) ont montré qu'environ 10% des *E. coli* du microbiote intestinal humain étaient sensibles au phage. Enfin, la co-administration de levures ne modifie pas les profils bactériens comparativement à ceux obtenus avec le pathogène seul. Cette diminution de la population d'entérobactéries n'a pu être observée dans la publication n°3 en raison de l'augmentation de l'inoculum bactérien, ce dernier étant alors supérieur à la concentration des *Enterobacteriaceae* commensales ($7 \log_{10}$ versus $5 \log_{10}$ UFC/mL). De surcroît, aucun effet de l'administration des EHEC sur le microbiote n'a été observé dans la publication n°3 sur l'ensemble des trois donneurs. Néanmoins, dans le but d'analyser les variations inter-individuelles du microbiote en réponse aux différents traitements une

classification hiérarchique ascendante a été effectuée. Nos résultats indiquent que les échantillons « Témoin » des trois donneurs sont regroupés dans le même cluster. *A contrario*, l'administration d'EHEC et/ou de probiotiques divise nos échantillons en groupes différents en fonction des donneurs, suggérant que la réponse du microbiote intestinal serait individu dépendant. En effet, il a été récemment montré *in vivo* que la composition du microbiote intestinal était affectée différemment par l'alimentation en fonction des individus (BOLNICK *et al.*, 2014). Nos résultats confortent donc l'idée que des facteurs associés à l'hôte, comme le microbiote intestinal, pourraient influencer l'évolution clinique des infections à EHEC (ASHIDA *et al.*, 2012 ; DE SABLET *et al.*, 2009 ; GAMAGE *et al.*, 2006, 2003 ; KEENEY et FINLAY, 2011 ; TOSHIMA *et al.*, 2007). L'utilisation de techniques d'empreintes ou de séquençage permettrait d'obtenir une vision plus complète des modifications engendrées par ces différents traitements. Enfin, l'augmentation du nombre de donneurs (hommes et femmes) permettrait de conclure sur l'influence du sexe des donneurs (deux hommes et une femme dans l'étude n°3) sur la réponse du microbiote intestinal en s'affranchissant des paramètres hormonaux type adrénalinergique.

Influence d'O157:H7 et des traitements probiotiques sur l'activité métabolique du microbiote colique

Quel que soit le traitement, dans l'étude n°2, l'acétate est l'AGCC dominant, suivi par le propionate et le butyrate. Les proportions de ces trois AGCC sont en accord avec les données obtenues chez l'Homme (CUMMINGS *et al.*, 1987 ; TOPPING et CLIFTON, 2001). La co-administration de *S. boulardii* ne conduit pas à des modifications dans la production d'AGCC, contrairement à celle de *S. cerevisiae* CNCM I-3856. L'augmentation de la production d'acétate observée avec ce traitement est en adéquation avec les stratégies probiotiques contre les EHEC engagées par différentes équipes de recherche. En effet, l'activité anti-infectieuse des bifidobactéries contre *E. coli* O157:H7 résulterait de l'augmentation de la production d'acétate et aurait pour conséquence une diminution du pH intestinal conduisant à (i) une diminution de l'expression et/ou traduction des gènes *stx* ou encore (ii) une inhibition de la translocation de Stx (ASAHARA *et al.*, 2004 ; FUKUDA *et al.*, 2011). Par ailleurs, la co-administration de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 avec les EHEC diminue la production de butyrate, ce dernier étant connu pour augmenter l'expression des gènes du LEE et des gènes flagellaires (TOBE *et al.*, 2011). Ces modifications d'activité métabolique du microbiote intestinal sont également retrouvées dans l'étude n°3 où la levure *S. cerevisiae* CNCM I-3856 est administrée pendant quatre jours de traitement « préventif » puis consécutivement à une infection à EHEC. Les données transcriptomiques des gènes *stx1* et *eae* obtenues après l'administration de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 en préventif puis en post-exposition aux EHEC sont en accord avec la littérature au regard de nos données de production d'AGCC. Ainsi, la levure *S. cerevisiae* CNCM I-3856 administrée en prévention et consécutivement à une infection à EHEC induirait une augmentation de la production d'acétate et une diminution de la production du butyrate permet-

SURVIE ET PATHOGÉNICITÉ DES EHEC DANS L'ENVIRONNEMENT COLIQUÉ ET INFLUENCE D'UN TRAITEMENT PROBIOTIQUE

tant de diminuer significativement l'expression des gènes *stx1* sans modifier l'expression du gène *eae* et la survie du pathogène. Toutefois, une approche transcriptomique des EHEC au cours d'un traitement « curatif » permettra d'orienter le choix de la stratégie probiotique à retenir. Enfin, ces résultats ont été obtenus dans un système mono-étagé qui ne permet pas de simuler l'environnement colique luminal des différentes régions anatomiques du côlon humain. Il pourrait être envisageable de poursuivre ces travaux dans des modèles multi-compartmentés.

Influence de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 sur la translocation d'O157:H7 au travers de l'épithélium iléal murin

Comme d'autres pathogènes entériques, les EHEC ont un tropisme particulier pour les plaques de Peyer (PHILLIPS *et al.*, 2000). ETIENNE-MESMIN *et al.* (2011a) ont montré *in vivo* en modèle murin que l'épithélium du follicule associé aux plaques de Peyer devient hémorragique en présence de souches EHEC suite à l'action des Stx et *in vitro* en culture cellulaire que les cellules M sont une voie de passage préférentielle de ces bactéries pathogènes et de leurs toxines vers la lamina propria. Différentes études rapportent l'intérêt de l'utilisation des souches probiotiques, en augmentant l'effet barrière de l'épithélium intestinal ou en limitant l'adhésion, l'entrée ou la translocation du pathogène, en cas d'infections par des EHEC (FUKUDA *et al.*, 2012; JOHNSON-HENRY *et al.*, 2008; PUTAALA *et al.*, 2008). Ainsi, dans la publication n°3, nous nous sommes intéressés à l'influence d'un traitement préventif à base de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 sur l'interaction d'*E. coli* O157:H7 EDL 933 avec l'épithélium iléal murin dans un modèle *in vivo* d'anses iléales. Nous avons montré pour la première fois que l'administration de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 limitait l'interaction du pathogène avec les plaques de Peyer, mais pas avec l'épithélium de la muqueuse. Néanmoins, la méconnaissance des mécanismes par lesquels les EHEC ciblent préférentiellement les plaques de Peyer rend difficile la compréhension du mécanisme d'action des levures. Toutefois des données de la littérature indiquent que des probiotiques du genre *Saccharomyces* peuvent piéger certaines bactéries entéropathogènes, comme *Salmonella Typhimurium*, et ainsi diminuer leur translocation au travers de l'épithélium (MARTINS *et al.*, 2007; TIAGO *et al.*, 2013). De plus, l'adhésion des EHEC à la surface de *S. boulardii* a déjà été observée par GEDEK (1999). Enfin, nous avons montré, pour la première fois, que l'utilisation d'un traitement préventif à base de *S. cerevisiae* prévient l'hémorragie des plaques de Peyer associée à une infection à EHEC. Il serait intéressant d'analyser les récepteurs et les sucres présents à la surface des EHEC et des plaques de Peyer afin d'étudier le tropisme de ces structures lymphoïdes secondaires pour ce pathogène. Parallèlement, l'étude de l'adhésion des EHEC à la surface de la levure *S. cerevisiae* CNCM I-3856 et l'analyse des sucres de la paroi des levures probiotiques pourrait être envisagée dans le but de comprendre leur mode d'action. Enfin, aucun effet sexe n'a pu être mis en évidence sur l'influence des levures sur l'interaction du pathogène avec l'épithélium intestinal (plaque de Peyer et muqueuse). L'étude de la composition du microbiote intestinal

des souris traitées par les levures, pendant ces expériences, pourrait permettre de conclure, *in vivo*, sur l'influence du sexe dans le cadre de stratégie probiotique comme BOLNICK *et al.* (2014) l'ont montré pour l'alimentation.

Troisième partie

Discussion générale et conclusion

Les EHEC sont des pathogènes zoonotiques responsables de toxi-infections alimentaires pouvant évoluer vers des atteintes potentiellement mortelles chez l'Homme, comme le syndrome hémolytique et urémique. La survie des EHEC et l'expression des gènes de virulence dans l'environnement digestif humain sont des facteurs essentiels dans la physiopathologie de ces infections mais sont mal connus, essentiellement par manque de modèles d'études adaptés. De plus, l'absence de traitement spécifique a conduit à s'intéresser à des moyens préventifs et/ou curatifs alternatifs, comme l'utilisation de probiotiques.

Les travaux précédemment réalisés au laboratoire ont permis (i) d'évaluer la survie de la souche de référence *E. coli* O157:H7 EDL 933 dans le tractus digestif supérieur humain simulé (TIM 1) et (ii) de montrer l'effet antagoniste d'une souche probiotique (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856). En effet, une mortalité cellulaire est observée pour EDL 933 dans l'estomac et le duodénum, puis les bactéries qui ont survécu se divisent à nouveau dans les parties distales de l'intestin grêle (jéjunum et iléon). La co-administration des levures *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 permet une diminution significative de la reprise de croissance des EHEC dans l'intestin grêle.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse s'inscrivent dans la continuité de ces études. Les objectifs étaient, dans un premier temps, de poursuivre l'étude du comportement de souches EHEC dans le tractus digestif supérieur en examinant la survie de différents sérotypes, administrés dans différentes matrices alimentaires, à l'aide du système digestif artificiel TIM 1. Puis, dans un second temps, le comportement (survie et pathogénicité) de la souche EDL 933 a été déterminé, ainsi que l'influence du pathogène sur le microbiote colique humain, en conditions coliques humaines simulées (ARCOL). Parallèlement, les propriétés antagonistes de *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 ont été évaluées dans l'environnement colique *in vitro* lors de traitements « curatif » et « prophylactique » et les mécanismes d'actions mis en jeu étudiés. Enfin, dans le but de compléter les données obtenues *in vitro*, l'effet antagoniste des levures probiotiques vis-à-vis de l'interaction d'EDL 933 avec l'épithélium intestinal a été testé en modèle murin.

Comportement des STEC/EHEC dans le tractus digestif supérieur

Intérêts et limites du modèle expérimental TIM 1

L'étude de la survie et de la régulation spatio-temporelle des différents facteurs de virulence de souches STEC/EHEC lors de leur passage dans le tractus gastro-intestinal humain est indispensable pour envisager une gestion optimale de la sécurité sanitaire des produits alimentaires au cas par cas, *i.e.* en fonction des souches et des matrices alimentaires. Néanmoins, pour des raisons évidentes d'éthique, de telles études sont impossibles chez l'Homme. De plus, aucun modèle *in vivo* ne peut reproduire, à ce jour, le spectre complet de la physiopathologie des infections à EHEC chez l'Homme (MOHAWK et A. D. O'BRIEN, 2011 ; NAYLOR *et al.*, 2005). L'utilisation de modèles *in vitro* constitue une approche alternative très intéressante, notamment si ceux-ci sont particulièrement pertinents et validés par des corrélations *in vivo/in vitro*.

Actuellement, le **système digestif artificiel TIM 1** (MINEKUS *et al.*, 1995) est le modèle multi-compartimenté dynamique simulant de la façon la plus physiologique possible les conditions rencontrées dans la lumière gastro-intestinale du tractus digestif supérieur de l'Homme. En plus des avantages classiquement attribués aux modèles *in vitro* (coût, reproductibilité, absence de contrainte éthique), il offre la possibilité de collecter des échantillons tout au long de la digestion, dans tous ses compartiments, à savoir dans l'estomac et les trois parties de l'intestin grêle. Ainsi, de nombreuses données peuvent être obtenues sur l'effet du temps et du compartiment digestif sur le comportement des EHEC. De plus, tous les paramètres du système TIM 1 peuvent être contrôlés et ajustés. Il est alors possible de simuler aussi bien la digestion de l'Homme adulte que celle du nourrisson ou de la personne âgée. Dans ces travaux, il est important de noter que les paramètres de digestion retenus correspondent à ceux de l'Homme adulte, or la proportion des cas d'infections intestinales à EHEC qui évoluent vers un SHU est plus importante chez l'enfant et les personnes âgées (MARIANI-KURKDJIAN et BONACORSI, 2014). Une perspective intéressante à ce travail serait donc d'étudier le comportement des EHEC dans l'environnement digestif en intégrant des données spécifiques (temps de transit, pH, concentration en enzymes digestives) à la digestion de l'enfant ou de la personne âgée.

Même si le système TIM 1 est très perfectionné, les conditions reproduites restent différentes de celles observées *in vivo*. En effet, la digestion est un processus extrêmement complexe faisant intervenir de très nombreux facteurs impossibles à modéliser *in vitro*, comme les phénomènes immunologiques ou le contrôle nerveux et hormonal de la digestion.

En particulier, une des principales limites du TIM 1 est l'**absence de microbiote** au sein des compartiments reproduisant l'intestin grêle. Actuellement, des expériences visant à implanter et stabiliser un microbiote iléal dans le système TIM 1 sont en cours de développement (STOLAKI, 2010). Il serait intéressant d'évaluer l'importance du microbiote de l'intestin grêle, et plus particulièrement de l'iléon, sur le comportement des EHEC dans le tractus digestif supérieur. En effet, le microbiote luminal de l'iléon est constitué majoritairement d'espèces anaérobies strictes, appartenant au phylum Bacteroidetes, et d'espèces anaérobies facultatives (HAYASHI *et al.*, 2005) alors que les populations bactériennes associées à la muqueuse de l'iléon terminal comprennent des membres du phylum Bacteroidetes et de *Clostridium* cluster XIVa (WANG *et al.*, 2003). Ces derniers pourraient, en particulier, influencer la pathogénicité des EHEC du fait de leur capacité à biosynthétiser du butyrate (BERNALIER-DONADILLE, 2010), connu pour activer simultanément les gènes du LEE et des gènes flagellaires des souches EHEC (TOBE *et al.*, 2011).

De plus, les différents compartiments du système TIM 1 sont en aérobiose, alors qu'*in vivo* un gradient décroissant de **concentration en oxygène** s'établit le long du tractus digestif parallèlement à une augmentation de la densité bactérienne et une zone d'oxygénation existe au voisinage de la surface de la muqueuse, générée par diffusion de l'oxygène à partir du réseau de capillaires des microvillosités. La capacité de l'oxygène à moduler la virulence des EHEC dans l'environnement digestif humain n'est pas connue. Néanmoins, il a été récemment montré *in vitro* que l'environnement microaérobie de l'intestin humain favorise la macropinocytose de Stx2 à travers l'épithélium intestinal avec des teneurs en oxygène comprises entre 1,4 et 1,7% (TRAN *et al.*, 2014). De plus, par une approche protéomique, POLZIN *et al.* (2013) ont montré, en cultivant *E. coli* O157:H7 EDL 933 dans un milieu *in vitro* simulant les conditions physico-chimiques iléales en microaérobie (2% d'oxygène), une augmentation de la biosynthèse de plusieurs protéines comme LuxS impliquée dans la formation d'AI-2 (molécule signalisatrice de quorum sensing inter-espèces), comparativement à une culture dans du TSB (tryptic soy broth). Une augmentation de la biosynthèse de protéines impliquées dans différentes voies métaboliques est également observée *in vivo* par PIEPER *et al.* (2013) en modèle porcine comparativement à une culture en Luria-Bertani. Ainsi, il serait intéressant de reproduire plus fidèlement les conditions d'anaérobiose du tractus digestif supérieur dans le TIM 1 afin d'évaluer leur impact sur la pathogénicité des EHEC.

Parmi les « stress » rencontrés dans le tractus digestif supérieur, il est connu que **la bile** peut influencer l'expression des facteurs de virulence de plusieurs bactéries entériques (CHASSAING *et al.*, 2013; HUNG et MEKALANOS, 2005; KUS *et al.*, 2011; MALIK-KALE *et al.*, 2008; PROUTY *et al.*, 2004).

En raison de similitudes entre la physiologie digestive du Porc et de l'Homme, la bile utilisée pour les expérimentations dans le TIM 1 à l'EA-CIDAM, et *a fortiori* dans le cadre de cette thèse, provient d'extrait de bile porcine. Ce produit est également utilisé dans le cadre d'études microbiologiques par d'autres laboratoires manipulant sur le système TIM 1 (FERNANDEZ *et al.*, 2014; KHEADR *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2011). Cependant, l'analyse de la composition des extraits de bile porcine et humaine a indiqué des profils en acides biliaires différents (données récentes du laboratoire, non publiées). En effet, le cholate et le désoxycholate, qui sont des acides biliaires majoritaires chez l'Homme, n'entrent pas dans la composition de la bile porcine. Actuellement, des analyses visant à déterminer l'influence d'une supplémentation des extraits de bile porcine en cholate et désoxycholate sur la survie d'*E. coli* O157:H7 sont en cours. Les résultats préliminaires indiquent que le taux de survie global du pathogène ne semble pas modifié par la présence de bile supplémentée. Cependant, une analyse transcriptomique par biopuce permettant un accès à l'ensemble des gènes du génome de la souche *E. coli* O157:H7 EDL 933 est en cours et permettra de vérifier l'importance des cholates.

Influence du sérotype ou de la souche

Afin de déterminer l'influence du sérotype ou de la souche STEC/EHEC sur leur survie et leur pathogénicité dans l'environnement digestif, les bactéries doivent être administrées au sein d'une même matrice alimentaire. Ainsi, un des objectifs de cette thèse était d'étudier la survie et la pathogénicité des souches *E. coli* **O26:H11 F155338A** et **O157:H7 721.4**, administrées dans le TIM 1 au sein d'une matrice fromagère – type pâte pressée non cuite –. Ces deux sérotypes ont été impliqués dans des épidémies associées à la consommation de fromages contaminés (FARROKH *et al.*, 2013). Parmi les différents sérotypes de STEC issus de produits laitiers, il est admis que le sérotype O26:H11 a une capacité supérieure à survivre dans un environnement acide par rapport au sérotype O157:H7 (MISZCZYCHA *et al.*, 2013). Nos résultats corroborent ces données puisqu'une mortalité significativement plus importante pour O157:H7 721.4 comparativement O26:H11 F155338A a été observée dans le compartiment gastrique du TIM 1 dès 60 min de digestion. Des analyses complémentaires ont montré que la souche de sérotype O26:H11 a un système de résistance à l'acidité dépendant de la décarboxylation du glutamate (AR2) plus fonctionnel que celui de O157:H7 721.4, confortant les résultats de survie observés dans l'estomac *in vitro* en fin de digestion.

L'origine de ces deux souches pourrait également expliquer les différences de survie observées dans le tractus digestif. En effet, la souche O157:H7 721.4 a été isolée de lait brebis et la souche O26:H11 F155338A d'un fromage au lait cru de vache. Les mécanismes de résistance à l'acidité de cette dernière ont donc déjà été induits au cours du processus d'acidification du lait lors de la formation du caillé de sa matrice d'origine. De plus, il a été montré, *in vitro*, que les EHEC ont la capacité de s'adapter à un stress acide (pH 5,5) et salin (4,5% de NaCl) – condition physico-chimique proches de notre matrice fromagère – en augmentant l'expression, entre autres, du gène *gadA* (OLESEN et JESPERSEN, 2010). Ainsi, l'historique d'activation des mécanismes d'acido-résistance pourrait potentiellement lui conférer

un avantage adaptatif dans l'environnement digestif humain. En effet, les facteurs de stress couramment présents dans les chaînes de production alimentaire la température, l'acidité ou encore le stress oxydatif pourrait influencer l'épidémiologie des infections à EHEC (VIDOVIC et KORBER, 2014). Enfin, la différence de survie observée dans l'estomac est confirmée dans les sorties iléales du TIM 1 où le taux de survie de O26 est treize fois supérieur à celui de O157.

Néanmoins, les données de survie obtenues dans l'environnement digestif artificiel ne sont pas généralisables à l'ensemble des souches de ces deux sérogroupes, une seule souche d'O26 et d'O157 ayant été testée. De plus, le lait utilisé pour la fabrication des fromages est d'origine différente. Or le lait cru est une matrice alimentaire avec un microbiote complexe (QUIGLEY *et al.*, 2013). La surface des trayons semble être le principal réservoir de la flore dominante des laits crus et le microbiote du lait serait influencé par les pratiques d'hygiène de traite (VERDIER-METZ *et al.*, 2012, 2009). Ainsi, une étude a montré que la croissance d'une souche d'*E. coli* O157:H7 était dépendante du lait cru utilisé (VALENTINE *et al.*, 2013). Ce biais expérimental (« **effet du lait** ») ne nous permet donc pas de conclure avec certitude sur l'influence de la souche/sérotype sur la survie dans l'environnement digestif humain simulé. Une réponse pourrait être apportée en évaluant la survie de ces deux souches/sérotypes dans une matrice stérile (lait filtré ou traité thermiquement) ou à flore contrôlée. Par ailleurs, cette étude pourrait être élargie à d'autres STEC fréquemment isolés de fromages (O103:H2 et O145:H28) ou d'autres aliments (O104:H4 et O111:H8).

Enfin, les deux souches testées n'ont jamais été impliquées dans une épidémie, même si elles présentent dans leur génome les principaux **gènes de virulence** des EHEC (*eae* et *stx*). Mais ces informations ne sont pas suffisantes pour prédire les potentialités pathogènes de ces deux souches. L'analyse phylogénétique associée au génotypage et au sous-typage *stx* des souches infectantes pourrait présager de leur virulence et de leur implication potentielle lors d'une infection en prenant en compte l'expression des gènes de virulence et la production des protéines associées dans l'environnement digestif humain.

Influence de la matrice alimentaire

Bien que la viande de bœuf insuffisamment cuite constitue la principale source de contamination lors d'infections à EHEC, d'autres aliments ont été incriminés tels que les produits laitiers au lait cru, les jus de fruits non pasteurisés, l'eau de boisson ou encore les légumes crus et graines germées (GOUALI et WEILL, 2013). L'analyse des données de survie et de pathogénicité de différentes souches STEC/EHEC présentes dans ces matrices alimentaires au cours de la digestion humaine est un pré-requis indispensable pour mieux comprendre la physio-pathologie de ces infections chez l'Homme. Les potentialités du système digestif artificiel TIM 1 permettent d'étudier l'influence de la matrice alimentaire sur la survie et la virulence des bactéries pathogènes dans l'environnement digestif humain. Ainsi, les conditions

associés à la digestion d'un repas « solide » ou d'un verre d'eau peuvent être reproduites en modifiant notamment les temps de demi-vidange gastrique (15 min pour le protocole « eau » contre 85 min dans le protocole « solide ») et iléal (150 min pour le protocole « eau » contre 250 min dans le protocole « solide »), les concentrations en sécrétions digestives et le pH des différents compartiments (Tableau 17).

Comme précédemment décrit, nous nous sommes intéressés au cours de ce travail de thèse à l'étude de la survie et de la pathogénicité de la souche *E. coli* O157:H7 721.4 dans le TIM 1, lorsque celle-ci est administrée dans une matrice fromagère (**matrice alimentaire d'origine animale**). Parallèlement, dans le cadre d'une collaboration avec une équipe de recherche espagnole⁸, la survie d'*E. coli* O157:H7 EDL 933 a été déterminée dans le tractus digestif artificiel, après ingestion dans une **matrice alimentaire d'origine végétale** (olives de table). Il est à noter qu'à ce jour aucune épidémie n'a été recensée suite à la consommation d'olives de table contaminées, mais étant donné qu'elles ne subissent aucun traitement thermique, elles sont vecteurs potentiels de bactéries pathogènes (ARROYO-LÓPEZ *et al.*, 2014). Enfin, des travaux précédents réalisés au laboratoire par ETIENNE-MESMIN (2012) ont permis d'obtenir des données sur le comportement d'*E. coli* O157:H7 EDL 933 dans le TIM 1 après administration dans de l'eau et de son double mutant isogénique EDL 933 $\Delta stx1 \Delta stx2$ après ingestion dans une matrice « solide » mimant un **repas occidental complet**. Les digestions ont été réalisées en utilisant un protocole « solide » pour la matrice fromagère, les olives et le « repas » de type occidental, et un protocole « liquide » pour l'eau (Tableau 17). Une analyse des données de survie d'*E. coli* O157:H7 dans ces différentes matrices a donc été réalisée afin d'évaluer l'influence de la matrice alimentaire sur la survie du pathogène dans le système TIM 1.

Nos résultats indiquent un taux de survie d'*E. coli* O157:H7 plus faible en présence d'une matrice alimentaire (fromage, olives, repas) comparativement à de l'eau (Figure 33). Les résultats sont à modérer par le fait qu'en présence d'eau une très forte variabilité est observée au temps 300 min, nécessitant de renouveler les expériences afin de confirmer les résultats obtenus. Par ailleurs, nous pouvons émettre l'hypothèse que, en présence d'eau, les nutriments utilisés par les EHEC pour leur croissance proviennent des sécrétions digestives ou des cellules bactériennes lysées. Les différences statistiques n'ont pas été testées en raison (i) de la variabilité des résultats obtenus dans l'eau, et (ii) de l'absence d'homogénéité au sein des souches testées (trois souches différentes). **Les lipides** sont généralement considérés comme un constituant des aliments conférant un rôle protecteur contre l'acidité gastrique et par conséquent favorisant la survie des pathogènes dans l'environnement digestif, notamment chez *Salmonella* (LEYRAL et VIERLING, 2007). Des résultats contraires semblent se dégager pour *E. coli* O157:H7 dans notre étude. En effet, d'après les fiches nutritionnelles du CIQUAL (Centre d'Information sur la Qualité des Aliments) de 2012 (LEDoux *et al.*, 2013), les teneurs moyennes en lipides pour 100 g de fromage – type pâte pressée non cuite –, d'olives vertes en saumure et d'eau de Volvic® sont respectivement de 27,6 g,

8. Instituto de la Grasa, Departamento de Biotecnología de Alimentos (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Séville, Espagne).

DISCUSSION GÉNÉRALE

TABLEAU 17. Paramètres digestifs reproduits dans le système digestif TIM 1 et conditions expérimentales employées

Paramètres de la digestion <i>in vitro</i>	Protocole « eau »	Protocole « solide »
pH		
Temps de transit		
Sécrétions digestives	Compartiment gastrique	
	130 U/min de pepsine 5 U/min de lipase 0,25 mL/min d'HCl 0,3 M si nécessaire $\beta = 1$ et $t_{1/2} = 15$ min	520 U/min de pepsine 20 U/min de lipase 0,25 mL/min d'HCl 1,5 M si nécessaire $\beta = 1,8$ et $t_{1/2} = 85$ min
	Compartiment duodénal	
	20 mg/mL de bile pendant 30 min puis 10 mg/mL 0,25 mg/mL d'une solution d'électrolyte intestinal 20 mg/min de jus pancréatique (4 USP) 0,25 mL/min d'NaHCO ₃ 0,5 M si nécessaire	80 mg/min de jus pancréatique (4 USP) 0,25 mL/min d'NaHCO ₃ 1 M si nécessaire
	Compartiment jéjunal	
0,25 mL/min d'NaHCO ₃ 0,5 M si nécessaire	0,25 mL/min d'NaHCO ₃ 1 M si nécessaire	
Compartiment iléal		
0,25 mL/min d'NaHCO ₃ 0,5 M si nécessaire $\beta = 2,4$ et $t_{1/2} = 150$ min	0,25 mL/min d'NaHCO ₃ 1 M si nécessaire $\beta = 2,5$ et $t_{1/2} = 250$ min	
Dialyse	10 mL/min	

U : unité, USP : United States Pharmacopeia

13,9 g et 0 g. Enfin, la teneur en lipides du repas utilisé par ETIENNE-MESMIN (2012) était de 5,7 g pour 100 g d'aliment. Ainsi, le taux de survie d'*E. coli* O157:H7 semble corrélé négativement à la teneur en lipides des matrices alimentaires dans lesquelles la souche est ingérée. Aucune donnée de la littérature ne permet à ce jour d'étayer ou d'infirmer cette hypothèse. Une seule étude relate l'effet des globules gras du lait sur l'expression de certains facteurs de virulence des EHEC. Ainsi, la présence de la membrane des globules gras du lait de vache entraîne *in vitro* une diminution de l'expression des gènes *stx* et des gènes impliqués dans la motilité (comme *fliC*) d'*E. coli* O157:H7 (TELLEZ *et al.*, 2012). Il serait donc intéressant de tester l'influence de différents teneurs en lipides d'une matrice alimentaire donnée sur la survie et le transcriptome des EHEC pendant les digestions artificielles.

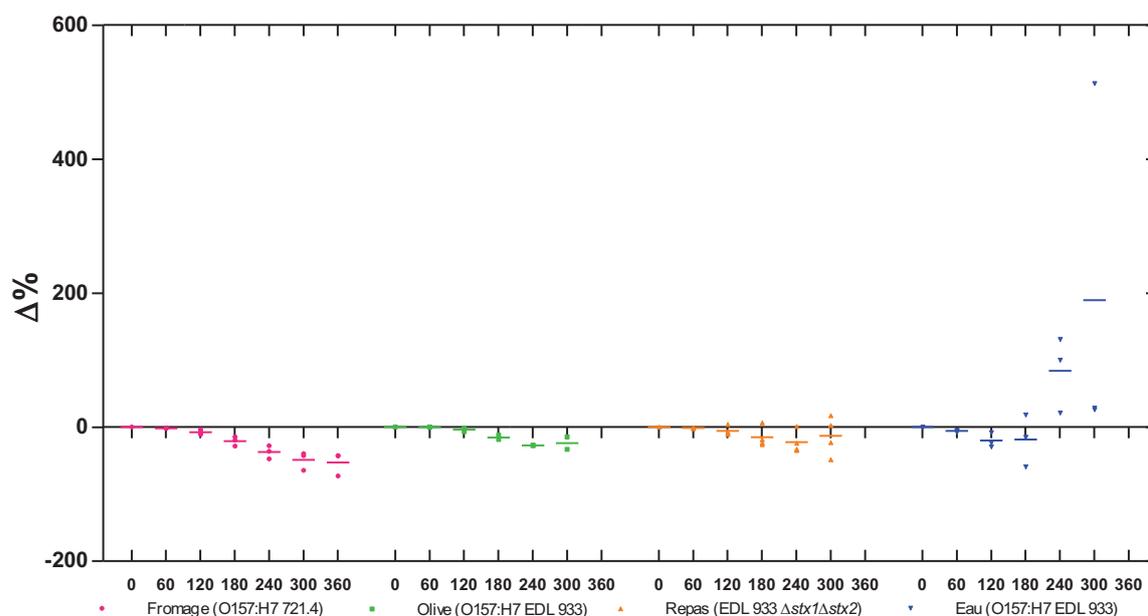


FIGURE 33. Influence de la matrice alimentaire sur la survie d'*E. coli* O157:H7 dans le TIM 1. Les potentialités du système TIM 1 ont permis d'évaluer l'impact de la matrice alimentaire sur la survie d'*E. coli* O157:H7 au cours du temps (en minutes) dans le tractus gastro-intestinal. Afin de s'affranchir de la variable « temps de transit » au sein des différents compartiments (vidange plus rapide en protocole « liquide » que « solide ») et des concentrations bactériennes initiales, les pourcentages cumulés de bactéries présentes dans les effluents iléaux (en % de l'inoculum) sont centrés par rapport à ceux du marqueur de transit associé ($\Delta\%$). Des valeurs de $\Delta\%$ négatives indiquent une mortalité bactérienne lors du passage dans le tractus gastro-intestinal, des valeurs positives indiquent quant à elles une croissance bactérienne. $n = 3$ pour l'eau et le fromage ; $n = 2$ pour la matrice à base d'olives et $n = 4$ pour le « repas ».

Enfin, il est important de noter une différence majeure entre les différentes matrices alimentaires : la présence d'un **microbiote complexe** uniquement dans la matrice fromagère (QUIGLEY *et al.*, 2013). En effet, les olives ont été pasteurisées avant les expérimentations, l'eau de Volvic® est naturellement stérile et la composition du repas dans l'étude d'ETIENNE-MESMIN (2012) a été établie pour limiter au maximum la présence de microorganismes (produits stérilisés/pasteurisés). Ce biais expérimental ne nous permet donc pas de conclure avec certitude de l'unique influence de la matrice alimentaire sur la survie d'*E. coli* O157:H7 dans l'environnement digestif humain supérieur.

Comportement des EHEC dans l'environnement colique

Choix du modèle expérimental

Les principaux sites d'action suggérés chez l'Homme pour les EHEC sont l'iléon terminal et le côlon (CHONG *et al.*, 2007; MARIANI-KURKDJIAN et BONACORSI, 2014). L'étude de la survie des EHEC et de la régulation de leurs facteurs de pathogénicité dans l'environnement colique humain est donc indispensable. Comme pour le tractus digestif supérieur, ces études sont impossibles chez l'Homme et limitées chez l'animal (MOHAWK et A. D. O'BRIEN, 2011; NAYLOR *et al.*, 2005). Les études dans des modèles *in vitro* de l'environnement colique humain sont donc des compléments nécessaires aux expérimentations *in vivo*, et ce, pour des raisons à la fois éthiques, budgétaires et pratiques. Jusqu'à présent, aucune donnée n'était disponible concernant la survie et la régulation des gènes de virulence des EHEC dans l'environnement colique humain.

Parmi les différents modèles coliques existants, le **modèle ARCOL** – développé à l'EA-CIDAM (BLANQUET-DIOT *et al.*, 2012; GÉRARD-CHAMPOD *et al.*, 2010) – a été retenu pour nos études pour obtenir une première vision « globale » du comportement des EHEC dans l'environnement colique humain. Ce système repose sur la culture d'un microbiote fécal, dans un système mono-étagé parfaitement agité. Il est destiné à simuler le côlon dans son ensemble à partir d'un inoculum fécal frais d'un unique donneur. Le pH, la température et le temps de transit sont contrôlés, et la pression et le potentiel d'oxydo-réduction sont mesurés. L'anaérobiose est maintenue au sein du réacteur uniquement par la production des gaz issus de l'activité fermentaire du microbiote afin de se rapprocher des conditions *in vivo*. Ce système possède également une fibre de dialyse, immergée dans le milieu fermentaire, permettant de reproduire l'absorption passive de l'eau et des produits de fermentation. Dans nos expériences, il est important de noter que les donneurs inclus sont adultes. Une perspective à ce travail serait d'étudier le comportement des EHEC dans l'environnement colique en intégrant des selles d'individus à risque (enfants de moins de trois ans et personnes âgées) et les données spécifiques associées (temps de transit, pH).

Survie et pathogénicité des EHEC dans l'environnement colique

Le deuxième objectif de la thèse était de déterminer le comportement (survie et pathogénicité) de la souche *E. coli* EDL 933 dans ARCOL. Les travaux menés dans la publication n°2 ont apporté les premières informations sur la **survie** d'une souche EHEC de sérotype O157:H7 dans l'environnement colique humain *in vitro*. Ces données ont été confirmées dans la publication n°3. Nous avons ainsi montré une élimination progressive du pathogène au cours du temps dans le bioréacteur, moins de 5% de l'inoculum bactérien étant dénombré après 36 h de fermentation contre 35% pour le marqueur théorique de transit. Ces données sont en adéquation avec les observations cliniques. En effet, TARR *et al.* (1990) ont montré que le recueil des selles de patients atteints de SHU devait s'effectuer au maximum quatre à six jours après le début des syndromes digestifs pour que l'analyse soit contributive.

Dans les expérimentations rapportées dans la publication n°3, plusieurs **adaptations méthodologiques** ont été apportées comparativement à la première étude (Tableau 18). Afin de se rapprocher au mieux des conditions *in vivo*, un stress gastro-intestinal en « batch » a été appliqué aux EHEC préalablement à leur introduction dans le système fermentaire ARCOL afin de mimer leur transit dans les parties hautes du tube digestif. L'ajout d'un stress gastro-intestinal ne modifie pas la cinétique d'élimination des EHEC du milieu fermentaire. À titre d'exemple, après 36 h, $6,3\% \pm 4,8$ de l'inoculum initial est détecté dans le milieu fermentaire versus $4,7\% \pm 0,8$ quand les bactéries n'étaient pas stressées préalablement. Néanmoins, il est important de noter que la bile utilisée dans ce protocole n'était pas supplémentée en cholate et désoxycholate, la différence de composition entre la bile humaine et porcine n'étant pas encore connue au moment des expérimentations. Par ailleurs, des selles issus de trois donneurs différents (deux hommes et une femme ; âge médian 27 ans (de 24 à 46 ans)) ont été utilisées pour généraliser les résultats obtenus dans l'étude n°2 où un seul donneur était inclus. Il est important de noter que ce donneur a également été retenu pour la deuxième étude. Nous avons montré que la survie des EHEC dans l'environnement colique était similaire quel que soit le donneur. Enfin, la concentration supra-physiologique de l'inoculum bactérien de la première étude (10^5 UFC/mL) avait été choisie en fonction des concentrations obtenues dans les effluents iléaux du TIM 1 (ETIENNE-MESMIN *et al.*, 2011b). Dans le but de faciliter l'accès au transcriptome des EHEC, l'inoculum bactérien a été augmenté à 10^7 UFC/mL dans la seconde étude. Cette augmentation n'a pas eu d'influence sur la survie des EHEC dans le milieu colique.

Parallèlement à la survie, nous nous sommes également intéressés à la **régulation des facteurs de virulence** des EHEC dans l'environnement colique humain. En effet, DE SABLET *et al.* (2009) ont montré que le microbiote humain inhibe la transcription de *stx2* par l'inhibition de la transcription du régulateur majeur du système SOS (la protéine RecA) même lors de l'induction de ce dernier, et que cette inhibition peut être en partie attribuée à l'espèce *Bacteroides thetaiotaomicron*. Il est admis que l'unique production de Stx, sans expression de facteur d'adhésion, est jugée insuffisante pour induire l'ensemble

TABLEAU 18. Variables expérimentales pour les deux études réalisées dans ARCOL

Variables expérimentales	Publications	
	Étude n°2	Étude n°3
Nombre de donneurs	1 donneur	3 donneurs
Temps de transit	36 h	36 h
pH	6,3	6,3
Souche EHEC	EDL 933 $\Delta stx1$	EDL 933
Concentration de l'inoculum d'EHEC	10 ⁵ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL
Stress gastro-intestinal (sans cholate ni désoxycholate)	Non	Oui

EHEC : *E. coli* entérohémorragiques, UFC : Unité Formant Colonies

des aspects de la physiopathologie des infections à EHEC. Ainsi, les souches « EHEC typiques », comme *E. coli* O157:H7, ont la possibilité de provoquer des lésions A/E des entérocytes de l'iléon distal et du côlon (CHONG *et al.*, 2007; SHIGENO *et al.*, 2002). Dans un premier temps, les Stx ont été dosées par ELISA dans le milieu fermentaire mais sans succès en raison de problèmes de conservations de nos échantillons (présence probable de protéases). Puis, dans un second temps, une étude préliminaire de l'expression des facteurs de virulence dans l'environnement colique a été réalisée en se limitant aux deux principaux gènes : *stx1* et *eae* codant respectivement les Stx1 et l'intimine (impliquée dans les lésions A/E). Nos résultats indiquent une augmentation de l'expression de ces gènes dans un environnement colique humain simulé comparativement aux conditions initiales. POLZIN *et al.* (2013) ont montré dans un milieu *in vitro*, exempt de microbiote et simulant les conditions physico-chimiques coliques, une augmentation de l'expression de facteurs de virulence comme EspP et EspB impliqués dans les lésions A/E, comparativement à une culture en TSB. Ainsi, il semblerait que la présence de cellules épithéliales ne soit pas indispensable pour induire une augmentation de l'expression des facteurs de virulence portés par le LEE. Il serait intéressant de compléter ces données en utilisant une biopuce transcriptomique permettant d'étudier l'expression de l'ensemble des gènes génomique et plasmidique de la souche *E. coli* O157:H7 EDL 933 dans l'environnement colique.

Influence des EHEC sur le microbiote colique

Un autre objectif de la thèse était de déterminer l'influence du pathogène sur le **microbiote colique humain et son activité métabolique**. Le système ARCOL mime l'environnement de la lumière du côlon. Les principales populations appartenant aux phyla majoritaires du microbiote intestinal humain ont été suivies par dénombrement sur milieux gélosés sélectifs et/ou par qPCR tout au long des fermentations. L'administration d'EHEC n'a eu que très peu d'influence sur les populations bactériennes suivies. Nous avons mis en évidence uniquement une diminution des *Enterobacteriaceae* commensales consécutivement à l'introduction des EHEC dans le milieu fermentaire (publication n°2). Ces résultats concordent avec ceux de GAMAGE *et al.* (2003) estimant qu'environ 10% des *E. coli* commensaux sont

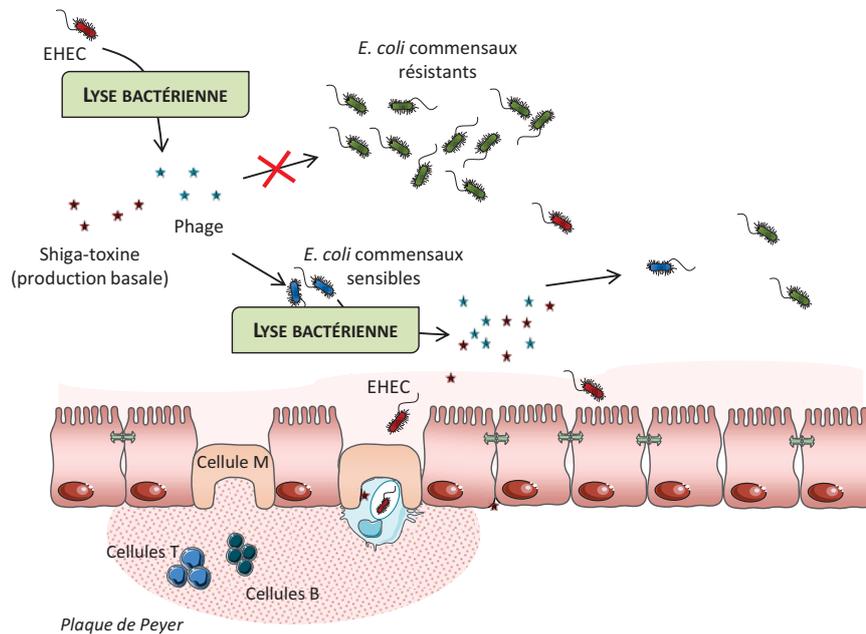


FIGURE 34. Influence des *E. coli* commensaux sur la production de Shiga-toxines

Au cours d'une infection à EHEC, des *E. coli* O157:H7 peuvent être lysées dans l'intestin et libérer des Stx et les phage codant les Stx. Si les *E. coli* commensaux du microbiote intestinal sont sensibles à l'infection phagique, des cycles répétés d'infections et de lyse conduiront à une amplification de la production de toxine (Modifié d'après GAMAGE *et al.* (2003)).

sensibles aux phages libérés lors de la lyse des EHEC (Figure 34). Cette lyse bactérienne s'accompagne également d'une libération accrue de Stx dans le milieu colique. Néanmoins, en raison de problèmes techniques, nous n'avons pas pu corrélérer la baisse des *Enterobacteriaceae* avec une production accrue de toxines. Cette diminution de la population d'entérobactéries n'a pu être observée dans la publication n°3 en raison de l'augmentation de l'inoculum bactérien, ce dernier étant alors supérieur à la concentration des *Enterobacteriaceae* commensales ($7 \log_{10}$ versus $5 \log_{10}$ UFC/mL). Parallèlement, consécutivement à l'administration des EHEC, aucune modification de l'activité métabolique fermentaire n'a pu être mise en évidence par le dosage des AGCC. Quel que soit le traitement, l'acétate est l'AGCC dominant, suivi par le propionate et le butyrate.

Bien qu'aucun effet de l'administration des EHEC sur le microbiote n'ait été observé, à l'exception des *Enterobacteriaceae* dans la publication n°2, nous avons voulu analyser les **variations inter-individuelles** en réponse aux différents traitements. Nos résultats indiquent que les échantillons « Témoin » pour les trois donneurs sont regroupés dans le même cluster. *A contrario*, l'administration d'EHEC divise nos échantillons en trois groupes différents en fonction des donneurs (Figure 35) suggérant

que l'influence des EHEC sur le microbiote intestinal pourrait être individu dépendant. Ces résultats conforteraient donc l'idée que des facteurs associés à l'hôte, comme le microbiote intestinal, pourrait influencer l'évolution clinique des infections à EHEC (ASHIDA *et al.*, 2012 ; DE SABLET *et al.*, 2009 ; GAMAGE *et al.*, 2006, 2003 ; KEENEY et FINLAY, 2011 ; TOSHIMA *et al.*, 2007). Par ailleurs, notre méthode d'analyse du microbiote est basée sur une approche *a priori*. L'utilisation de techniques d'empreintes ou de séquençage permettrait d'obtenir une vision plus complète des modifications potentiellement engendrées par l'inoculation d'une souche EHEC dans l'environnement colique humain. Il serait intéressant de tester l'influence du microbiote colique humain sur certains aspects de la physiopathologie des infections à EHEC (survie, inflammation, colonisation et translocation bactérienne) accessibles dans un modèle de souris gnotoxéniques⁹ humanisées avec les selles de nos donneurs. Il est important de souligner que afin de bien appréhender les mécanismes associés à la translocation des EHEC au travers de l'épithélium intestinal, une période de maturation des structures lymphoïdes secondaires (comme les plaques de Peyer) sera nécessaire après la mise en place d'un microbiote humanisé chez ses souris.

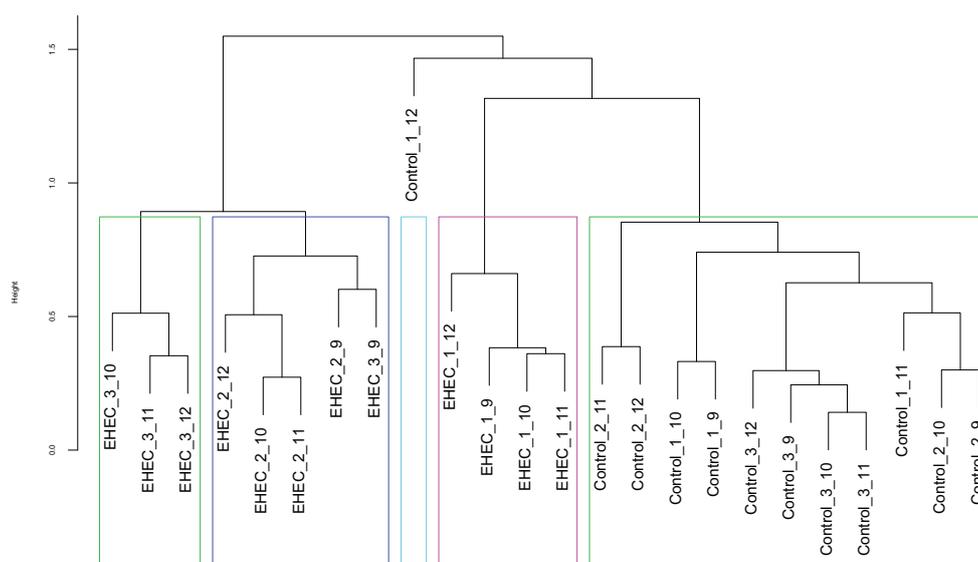


FIGURE 35. Classification des échantillons des trois donneurs sur la base des résultats de qPCR obtenus pour les grands groupes bactériens

Les étiquettes du dendrogramme représentent les différents échantillons (Traitement_Donneur_Jour de fermentation). Le microbiote des différents donneurs répond différemment au traitement administré (« Control » (Témoin) ou « EHEC »).

EHEC : *E. coli* entérohémorragiques

9. Qualifie un animal axénique à qui on a inoculé une souche microbienne ou un microbiote complexe.

Il est connu que la composition de la flore digestive se caractérise par des variations spatiales au sein d'un même individu (HAYASHI *et al.*, 2005) en particulier entre les différentes régions du côlon. À ce jour, les essais ont été réalisés dans un modèle colique mono-étagé. Des expérimentations complémentaires dans un modèle autorisant un accès différentiel aux différentes régions anatomiques du côlon humain, comme celui développé à l'EA-CIDAM (**ECSIM**; FERIA-GERVASIO *et al.* (2014)), permettraient donc de mieux appréhender la physiopathologie des EHEC dans l'environnement colique humain. De plus, le modèle ARCOL utilisé ne reproduit que la partie luminale de l'environnement colique. Or, la composition du microbiote luminal est différente de celle du microbiote muqueux (VERMEIREN *et al.*, 2012b). En particulier, les populations bactériennes associées au mucus dans le côlon ascendant comprennent des membres de *Clostridium* cluster XIVa (VERMEIREN *et al.*, 2012b) qui ont la capacité de biosynthétiser du butyrate (BERNALIER-DONADILLE, 2010), connu pour activer simultanément les gènes du LEE et des gènes flagellaires des souches EHEC (TOBE *et al.*, 2011). Plusieurs modèles *in vitro* intègrent à ce jour ces microenvironnement sous la forme de tubes en verre contenant un gel de mucine (S. MACFARLANE *et al.*, 2005) ou de microcosmes couverts de mucine (VAN DEN ABEELE *et al.*, 2012b). Ces dispositifs sont adaptables sur le modèle ARCOL. Enfin, afin d'étudier les interactions hôte/pathogène, il pourrait être intéressant de coupler le modèle *in vitro* ARCOL avec des cellules en culture, comme cela l'a déjà été fait pour le système de Macfarlane et Gibson (BAHRAMI *et al.*, 2011).

Dans ce cadre, un couplage avec le **module HMI** – module bi-compartmenté avec une double couche fonctionnelle composée de mucus disposée sur une membrane de polyamide semi-perméable permettant une culture d'entérocytes en interaction indirecte avec le milieu fermentaire – (MARZORATI *et al.*, 2013b) développé à l'Université de Ghent (Gand, Belgique) serait idéal pour étudier le comportement des EHEC dans l'environnement colique muqueux, en conditions microaérobies, tant au niveau transcriptomique que protéomique. Les interactions indirectes hôte-microbiote/pathogène pourraient également être étudiées en observant l'influence du sécrétome bactérien et ses effets immunomodulateurs sur les cellules intestinales en culture (Figure 36). L'étude du protéome des EHEC dans l'environnement colique humain simulé permettrait d'identifier les voies métaboliques primaires¹⁰ et les lier à l'expression des différents facteurs de virulence.

10. Représente le métabolisme de base permettant aux organismes de croître. Il inclut, en autres, le transport et l'utilisation du carbone, de l'azote et du phosphate.

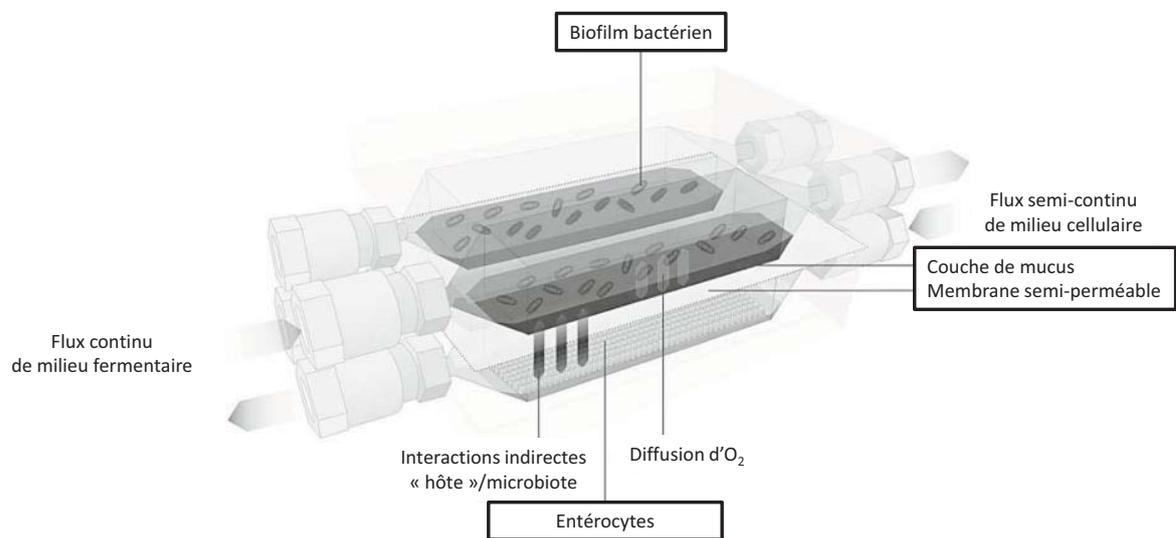


FIGURE 36. Interactions indirectes hôte/microbiote dans le module HMI
Modifié d'après MARZORATI *et al.* (2014).

Influence d'un traitement probiotique à base de levures

Choix de l'utilisation de levures probiotiques

L'absence de traitement spécifique des infections à EHEC et le fait que l'antibiothérapie soit controversée (PANOS *et al.*, 2006 ; ULINSKI, 2013 ; C. S. WONG *et al.*, 2000) ont conduit à s'intéresser à des moyens préventifs et/ou curatifs alternatifs comme l'utilisation de probiotiques. La levure *S. cerevisiae* CNCM I-3856 – commercialisée sous le nom de Lynside® Pro GI + par la société Lesaffre Human Care – a été retenue et son effet antagoniste vis-à-vis des EHEC évalué dans l'environnement colique humain simulé. Ce probiotique a précédemment montré un rôle bénéfique dans le traitement de l'inconfort digestif et des douleurs abdominales chez des sujets atteints du syndrome de l'intestin irritable (DESREUMAUX *et al.*, 2011). De plus, des travaux ont également montré l'intérêt de cette levure dans le traitement de la maladie de Crohn. En effet, l'administration de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 permet de réduire la colite induite par des bactéries AIEC chez des souris exprimant le récepteur CEACAM6 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6). L'administration du probiotique pourrait donc être envisagée dans un sous-groupe de patients atteints de la maladie de Crohn et exprimant anormalement ce récepteur (SIVIGNON *et al.*, 2014). Il est important de noter que dans ces travaux, la viabilité des levures n'était pas indispensable pour observer des effets bénéfiques. L'influence de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 sur d'autres pathogènes a également été testée. Elle permet d'inhiber l'expression de gènes pro-inflammatoires induits par les ETEC et d'exercer une interaction physique (agglutination) entre le pathogène et les levures (ZANELLO *et al.*, 2011). Enfin, au sein du laboratoire, ETIENNE-MESMIN *et al.* (2011b) ont montré un effet inhibiteur de cette levure sur la reprise de croissance d'*E. coli* O157:H7 observée dans les parties distales de l'intestin grêle dans le modèle de digestion artificielle TIM 1.

Survie de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 dans l'environnement colique

La viabilité étant un critère essentiel – bien que controversé – pour l'activité des probiotiques dans l'environnement digestif, la survie de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 a été évaluée au cours des fermentations (en présence ou non d'*E. coli* O157:H7). Les travaux menés dans la publication n°2 ont apporté les premières informations sur la survie de ce probiotique dans l'environnement colique humain *in vitro*, en présence d'une souche EHEC. Nous avons ainsi montré une élimination totale du probiotique dans le bioréacteur en 36 h lorsqu'il est administré simultanément au pathogène. Dans les expérimentations rapportées dans la publication n°3, un mode d'administration bi-quotidien a été retenu afin d'essayer de maintenir les concentrations en levures les plus élevées possibles dans le milieu fermentaire (BLANQUET-DIOT *et al.*, 2012). Néanmoins nos résultats montrent que même avec ce mode d'administration, les levures ne se maintiennent pas dans le milieu colique à des concentrations semblables à celles de l'inoculum. Ces données de survie *in vitro* corroborent celles obtenues *in vivo* chez l'Homme pour différentes souches de *S. cerevisiae* où une élimination rapide des levures est observée dans les échantillons fécaux dès l'arrêt du traitement (KLEIN *et al.*, 1993 ; PECQUET *et al.*, 1991). De plus, un rythme nyctéméral a été mis en évidence, les levures inoculées le soir se maintenant davantage dans le bioréacteur que les levures inoculées le matin, mais cette différence n'a pas pu être expliquée. Cependant, nous suspectons un effet de la lumière sur les expérimentations dans ARCOL, la double enveloppe du bioréacteur étant transparente. Il sera intéressant à l'avenir de couvrir la cuve des bioréacteurs pour s'affranchir de ce paramètre et se rapprocher des conditions physiologiques, le tube digestif étant naturellement isolé de l'environnement extérieur.

Influence de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 dans le traitement des infections à EHEC

Le dernier objectif de la thèse était d'évaluer l'intérêt d'un traitement « curatif » ou « préventif » à base de levures du genre *Saccharomyces* dans le cadre d'infections à EHEC. Les travaux menés dans la publication n°2 ont montré que l'administration simultanée d'*E. coli* O157:H7 et de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 ou de *S. boulardii* dans des conditions coliques *in vitro* n'a eu aucun effet sur la survie du pathogène. Néanmoins, nous avons montré que l'administration de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 (en présence du pathogène) permettait de moduler l'activité fermentaire du microbiote intestinal en augmentant la production d'acétate et en diminuant celle du butyrate. Or, ce dernier est connu pour activer simultanément les gènes du LEE et des gènes flagellaires des souches EHEC (TOBE *et al.*, 2011). De plus, la production par des probiotiques d'acides organiques, comme l'acétate, permet d'acidifier le milieu digestif. Des études ont associé cette baisse de pH à une diminution de la survie du pathogène et de l'expression des Stx (ASAHARA *et al.*, 2004 ; CAREY *et al.*, 2008 ; FUKUDA *et al.*, 2012). Dans

le modèle ARCOL, le pH est mesuré et ajusté finement en fonction du pH de consigne. Ainsi, nous ne pouvons pas observer d'acidification du milieu fermentaire dans notre modèle d'étude. Toutefois, aucune différence de volume journalier de soude introduite dans les bioréacteurs n'a pu être mise en évidence entre les différents traitements. Une réponse à cette problématique serait de créer une zone de tolérance dans l'ajustement du pH du bioréacteur.

Dans la publication n°3, nous nous sommes intéressés à l'effet des levures probiotiques sur la survie et la pathogénicité de la souche *E. coli* O157:H7 EDL 933 dans l'environnement colique humain simulé ARCOL lorsque celles ci sont administrées préalablement à l'ajout du pathogène (« préventif ») et en post-exposition. En effet, des travaux sur cellules épithéliales intestinales T84 infectées par *E. coli* O157:H7 ont montré que *S. boulardii* diminue la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 et prévient l'apoptose cellulaire induite par le TNF- α , mais uniquement lors d'un traitement « préventif » (DAHAN *et al.*, 2003 ; DALMASSO *et al.*, 2006). Dans notre étude, l'administration du probiotique n'influence pas la cinétique d'élimination des EHEC du milieu fermentaire, même dans ces conditions expérimentales (traitement « préventif »). De plus, nous avons montré que l'ajout de la levure *S. cerevisiae* CNCM I-3856, en présence ou non du pathogène, ne modifie pas la composition du microbiote colique. Des techniques d'empreintes ou de séquençage permettraient d'obtenir une vision plus complète des modifications potentielles du microbiote (VANHOUTTE *et al.*, 2006). Ces résultats sont en accord avec la littérature puisqu'il a été montré que les levures du genre *Saccharomyces* n'ont pas d'effet majeur sur le microbiote fécal de sujets sains (PECQUET *et al.*, 1991 ; SWIDSINSKI *et al.*, 2010). Parmi les adaptations méthodologiques apportées à l'étude n°2, nous avons augmenté à trois le nombre de donneurs de selles (parmi lesquels un donneur est commun aux études n°2 et 3). Nous avons pu mettre en évidence que le traitement probiotique (seul, comme en présence du pathogène) divise nos échantillons en groupes différents en fonction des donneurs. Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent donc que la réponse au traitement probiotique serait donneur dépendant. Néanmoins, ces modifications n'induisent pas d'activité fermentaire différente en réponse à un traitement en fonction des donneurs. En effet, nous avons mis en évidence pour l'ensemble des donneurs de l'étude n°3, uniquement avec l'association du pathogène et des levures, une augmentation de la production d'acétate et à une diminution de celle du butyrate, déjà observée dans l'étude n°2 (traitement « curatif »). Ces données suggèrent que l'administration curative de probiotique serait suffisante pour induire les mêmes modifications du microbiote et de son activité fermentaire que le traitement préventif. Par ailleurs, pour la première fois, nous avons montré que l'administration d'une souche de levure probiotique (*S. cerevisiae* CNCM I-3856) administrée en préventif puis en post-exposition aux EHEC permettait, en modulant l'activité fermentaire du microbiote colique – augmentation de la production d'acétate et diminution de la production du butyrate – de diminuer significativement l'expression du gène *stx1* sans modifier l'expression du gène *eae*. Par contre, la production des protéines associées à ces gènes de virulence doivent être pris en compte pour prédire les potentialités pathogènes de souches EHEC.

Les principaux sites d'action suggérés chez l'Homme pour les EHEC sont l'iléon terminal et le côlon (CHONG *et al.*, 2007; MARIANI-KURKDJIAN et BONACORSI, 2014), avec un tropisme particulier pour les plaques de Peyer (PHILLIPS *et al.*, 2000). Des études précédentes ont montré *in vivo* en modèle murin et *in vitro* en culture cellulaire que certaines souches probiotiques peuvent augmenter la fonction barrière de l'épithélium intestinal en cas d'infections par des EHEC (FUKUDA *et al.*, 2012; JOHNSON-HENRY *et al.*, 2008; PUTAALA *et al.*, 2008). Nous nous sommes intéressés à l'influence d'un traitement préventif à base de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 sur la translocation d'*E. coli* O157:H7 EDL 933 au travers de l'épithélium iléal murin dans un modèle *in vivo* d'anses iléales. Nous avons montré pour la première fois que l'administration de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 limitait l'interaction du pathogène avec les plaques de Peyer mais pas avec l'épithélium de la muqueuse. Néanmoins, la méconnaissance des mécanismes par lesquels les EHEC ciblent préférentiellement les plaques de Peyer rend difficile la compréhension du mécanisme d'action des levures. Toutefois des données de la littérature indiquent que des probiotiques du genre *Saccharomyces* peuvent piéger certaines bactéries entéropathogènes, comme *Salmonella Typhimurium*, et ainsi diminuer leur translocation au travers de l'épithélium (MARTINS *et al.*, 2007; TIAGO *et al.*, 2013). Ce mécanisme d'adhésion des bactéries à la surface des levures ne semble pas nécessiter la viabilité des probiotiques et serait dépendant de la présence de mannose (TIAGO *et al.*, 2012). SUN *et al.* (2010b) ont également montré la présence de résidus mannose à la surface de l'épithélium du follicule associé aux plaques de Peyer murines. L'adhésion des EHEC à la surface de *S. boulardii* a déjà été observée (GEDEK, 1999). Dans notre étude, la capacité de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 à piéger les EHEC via ses résidus mannoses pourrait être testée afin de proposer un mécanisme d'action de l'inhibition spécifique de cette levure sur la translocation des EHEC au travers des plaques de Peyer. Ces interactions probiotiques/pathogènes diminueraient l'adhésion des EHEC sur la surface de ces structures lymphoïdes secondaires et par conséquent leur translocation. ETIENNE-MESMIN *et al.* (2011a) ont montré que l'épithélium du follicule associé aux plaques de Peyer devient hémorragique en présence du pathogène suite à l'action des Stx. Dans la continuité de ces travaux, nous avons montré, pour la première fois, que l'utilisation d'un traitement préventif à base de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 prévient l'hémorragie des plaques de Peyer associée à une infection à EHEC. Nous pouvons donc supposer que ce traitement préventif à base de levures probiotiques permettrait de limiter la translocation des bactéries et de leurs toxines. Afin de déterminer l'importance du microbiote sur cet aspect de la physiopathologie, l'utilisation de souris gnotoxéniques humanisées avec les selles de nos donneurs (ou d'enfants) serait intéressante. L'utilisation de souris jeunes permettrait également de reproduire des conditions spécifiques à l'enfant (immaturité des plaques de Peyer).

Enfin, compte tenu du fait que l'effet antagoniste de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 semble se limiter à une inhibition de la translocation des EHEC, l'utilisation d'autres probiotiques pourraient être envisagée. Néanmoins, avant de réaliser de nouvelles études *in vivo* et *in vitro* dans les modèles de digestion artificielle, un pré-screening des souches probiotiques candidates devra être réalisé (activité anti-bactérienne, production de composés organiques, test d'adhésion, immunomodulation).

Pour conclure, nous avons montré, en conditions digestives humaines simulées, que quelle que soit la souche et la matrice alimentaire utilisées, les EHEC étaient sensibles aux conditions physico-chimiques rencontrées dans l'estomac et le duodénum. *A contrario*, une reprise de croissance des bactéries a été mise en évidence dans les parties distales de l'intestin grêle artificiel en fin de digestion. La présence d'une flore technologique inhibitrice au sein de matrices alimentaires ou la co-administration de probiotiques induit une diminution de cette reprise de croissance. Ces résultats mettent également en exergue l'importance d'évaluer l'effet du microbiote présent dans l'intestin grêle sur la survie du pathogène. Par ailleurs, des données récentes du laboratoire ont mis en évidence des différences de composition entre la bile utilisée pour nos expérimentations (bile porcine) et la bile humaine. Même si la nature de la bile ne semble pas avoir d'influence sur la survie du pathogène dans le tractus gastro-intestinal supérieur, il sera très important d'évaluer son effet sur l'expression des facteurs de virulence des EHEC.

Parallèlement, nous avons montré en conditions coliques humaines simulées que les EHEC ne se maintiennent pas dans le côlon et que les gènes de virulence *stx1* et *eae* sont exprimés. La survie du pathogène n'est pas modifiée par l'ajout de probiotiques du genre *Saccharomyces*. Par contre, l'administration de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 en « prophylaxie » permet de diminuer significativement l'expression de *stx1*. De surcroît, nous avons montré que l'effet du pathogène et du probiotique sur le microbiote colique était individu dépendant.

Nos résultats ont également permis de confirmer l'existence d'un tropisme particulier des EHEC pour les plaques de Peyer localisées dans l'iléon terminal, facilitant ainsi la translocation du pathogène au travers des cellules M. Un traitement probiotique à base de levures a permis de limiter la translocation bactérienne au travers des plaques de Peyer et les lésions hémorragiques associées.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont ainsi permis d'apporter des éléments nouveaux sur la physiopathologie des infections à EHEC et sur l'intérêt d'une stratégie probiotique dans la lutte contre ces pathogène entériques.

Bibliographie

- ABBOTT, S. L., J. O'CONNOR, T. ROBIN, B. L. ZIMMER et J. M. JANDA (2003). Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species, *Escherichia albertii*. *Journal of clinical microbiology*, vol. 41, n° 10, p. 4852–4854.
- ADLERBERTH, I. et A. E. WOLD (2009). Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta paediatrica*, vol. 98, n° 2, p. 229–238.
- AGUIRRE, M., J. RAMIRO-GARCIA, M. E. KOENEN et K. VENEMA (2014). To pool or not to pool? Impact of the use of individual and pooled faecal samples for *in vitro* fermentation studies. *Journal of microbiological methods*. in press.
- AHN, J., L. YANG, B. J. PASTER, I. GANLY, L. MORRIS, Z. PEI et R. B. HAYES (2011). Oral microbiome profiles : 16S rRNA pyrosequencing and microarray assay comparison. *PloS one*, vol. 6, n° 7, e22788.
- ALAVA, P., G. DU LAING, F. TACK, T. DE RYCK et T. VAN DE WIELE (2014). Westernized diets lower arsenic gastrointestinal bioaccessibility but increase microbial arsenic speciation changes in the colon. *Chemosphere*, vol. 119, p. 757–762.
- ALAVA, P., F. TACK, G. D. LAING et T. VAN DE WIELE (2012). HPLC-ICP-MS method development to monitor arsenic speciation changes by human gut microbiota. *Biomedical Chromatography*, vol. 26, n° 4, p. 524–533.
- ALLSOPP, P., S. POSSEMIERS, D. CAMPBELL, I. S. OYARZÁBAL, C. GILL et I. ROWLAND (2013). An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity. *Anaerobe*, vol. 22, p. 38–44.
- ALMEIDA, A., S. POSSEMIERS, M. BOONE, T. DE BEER, T. QUINTEN, L. VAN HOOREBEKE, J. P. REMON et C. VERVAET (2011). Ethylene vinyl acetate as matrix for oral sustained release dosage forms produced via hot-melt extrusion. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 77, n° 2, p. 297–305.
- ALMINGER, M. L., C. EKLUND-JONSSON, S. KIDMAN et M. LANGTON (2012). Starch microstructure and starch hydrolysis in barley and oat tempe during *in vitro* digestion. *Food digestion*, vol. 3, n° 1-3, p. 53–62.
- ANSON, N. M., R. HAVENAAR, A. BAST et G. R. HAENEN (2010). Antioxidant and anti-inflammatory capacity of bioaccessible compounds from wheat fractions after gastrointestinal digestion. *Journal of Cereal Science*, vol. 51, n° 1, p. 110–114.

- ANSON, N. M., R. HAVENAAR, W. VAES, L. COULIER, K. VENEMA, E. SELINHEIMO, A. BAST et G. R. HAENEN (2011). Effect of bioprocessing of wheat bran in wholemeal wheat breads on the colonic SCFA production *in vitro* and postprandial plasma concentrations in men. *Food Chemistry*, vol. 128, n° 2, p. 404–409.
- ANSON, N. M., E. SELINHEIMO, R. HAVENAAR, A.-M. AURA, I. MATTILA, P. LEHTINEN, A. BAST, K. POUTANEN et G. R. HAENEN (2009a). Bioprocessing of wheat bran improves *in vitro* bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, n° 14, p. 6148–6155.
- ANSON, N. M., R. van den BERG, R. HAVENAAR, A. BAST et G. R. HAENEN (2009b). Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility. *Journal of Cereal Science*, vol. 49, n° 2, p. 296–300.
- ARROYO-LÓPEZ, F. N., S. BLANQUET-DIOT, S. DENIS, J. THÉVENOT, S. CHALANCON, M. ALRIC, F. RODRÍGUEZ-GÓMEZ, V. ROMERO-GIL, R. JIMÉNEZ-DÍAZ et A. GARRIDO-FERNÁNDEZ (2014). Survival of pathogenic and lactobacilli species of fermented olives during simulated human digestion. *Frontiers in Microbiology*. in press.
- ARUMUGAM, M., J. RAES, E. PELLETIER, D. LE PASLIER, T. YAMADA, D. R. MENDE, G. R. FERNANDES, J. TAP, T. BRULS, J.-M. BATTO *et al.* (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, vol. 473, n° 7346, p. 174–180.
- ASAHARA, T., K. SHIMIZU, K. NOMOTO, T. HAMABATA, A. OZAWA et Y. TAKEDA (2004). Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and immunity*, vol. 72, n° 4, p. 2240–2247.
- ASHIDA, H., M. OGAWA, M. KIM, H. MIMURO et C. SASAKAWA (2012). Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nature chemical biology*, vol. 8, n° 1, p. 36–45.
- BACH, S., T. MCALLISTER, D. VEIRA, V. GANNON et R. HOLLEY (2003). Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* feed supplement on *Escherichia coli* O157:H7 in ruminal fluid *in vitro*. *Animal feed science and technology*, vol. 104, n° 1, p. 179–189.
- BAHRAMI, B., M. W. CHILD, S. MACFARLANE et G. T. MACFARLANE (2011). Adherence and cytokine induction in Caco-2 cells by bacterial populations from a three-stage continuous-culture model of the large intestine. *Applied and environmental microbiology*, vol. 77, n° 9, p. 2934–2942.
- BAINES, S. D., G. S. CROWTHER, S. L. TODHUNTER, J. FREEMAN, C. H. CHILTON, W. N. FAWLEY et M. H. WILCOX (2013). Mixed infection by *Clostridium difficile* in an *in vitro* model of the human gut. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 68, n° 5, p. 1139–1143.
- BAINES, S. D., J. FREEMAN et M. H. WILCOX (2009a). Tolevamier is not efficacious in the neutralization of cytotoxin in a human gut model of *Clostridium difficile* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 53, n° 5, p. 2202–2204.
- BAINES, S. D., A. R. NOEL, G. S. HUSCROFT, S. L. TODHUNTER, R. O’CONNOR, J. K. HOBBS, J. FREEMAN, A. M. LOVERING et M. H. WILCOX (2011). Evaluation of linezolid for the treatment of *Clostridium difficile* infection caused by epidemic strains using an *in vitro* human gut model. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 66, n° 7, p. 1537–1546.

- BAINES, S. D., R. O'CONNOR, K. SAXTON, J. FREEMAN et M. H. WILCOX (2009b). Activity of vancomycin against epidemic *Clostridium difficile* strains in a human gut model. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 63, n° 3, p. 520–525.
- BARRANTES, X., D. RAILEY, M. L. ARIAS et C. CHAVES (2004). Evaluation of the effect of probiotic cultures added to commercial yogurt over a known population of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Archivos latinoamericanos de nutricion*, vol. 54, n° 3, p. 293–297.
- BARROSO, E., T. VAN DE WIELE, A. JIMÉNEZ-GIRÓN, I. MUÑOZ-GONZÁLEZ, P. MARTÍN-ALVAREZ, M. MORENO-ARRIBAS, B. BARTOLOMÉ, C. PELÁEZ, M. MARTÍNEZ-CUESTA et T. REQUENA (2014). *Lactobacillus plantarum* IFPL935 impacts colonic metabolism in a simulator of the human gut microbiota during feeding with red wine polyphenols. *Applied microbiology and biotechnology*, p. 1–11.
- BARROSO, E., F. SANCHEZ-PATAN, P. J. MARTÍN-ALVAREZ, B. BARTOLOMÉ, M. V. MORENO-ARRIBAS, C. PELAEZ, T. REQUENA, T. VAN DE WIELE et M. C. MARTÍNEZ-CUESTA (2013). *Lactobacillus plantarum* IFPL935 favors the initial metabolism of red wine polyphenols when added to a colonic microbiota. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 61, n° 42, p. 10163–10172.
- BEGLEY, M., C. G. GAHAN et C. HILL (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS microbiology reviews*, vol. 29, n° 4, p. 625–651.
- BELONGUER, A., G. HOLTROP, S. H. DUNCAN, S. E. ANDERSON, A. G. CALDER, H. J. FLINT et G. E. LOBLEY (2011). Rates of production and utilization of lactate by microbial communities from the human colon. *FEMS microbiology ecology*, vol. 77, n° 1, p. 107–119.
- BELL, B. P., P. M. GRIFFIN, P. LOZANO, D. L. CHRISTIE, J. M. KOBAYASHI et P. I. TARR (1997). Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics*, vol. 100, n° 1, e12–e12.
- BEL-RHLID, R., V. CRESPIY, N. PAGÉ-ZOERKLER, K. NAGY, T. RAAB et C.-E. HANSEN (2009). Hydrolysis of rosmarinic acid from rosemary extract with esterases and *Lactobacillus johnsonii* *in vitro* and in a gastrointestinal model. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 57, n° 17, p. 7700–7705.
- BEL-RHLID, R., N. PAGE ?-ZOERKLER, R. FUMEAUX, T. HO-DAC, J.-Y. CHUAT, J. L. SAUVAGEAT et T. RAAB (2012). Hydrolysis of chicoric and caftaric acids with esterases and *Lactobacillus johnsonii* *in vitro* and in a gastrointestinal model. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 60, n° 36, p. 9236–9241.
- BERGHOLZ, T. et T. WHITTAM (2007). Variation in acid resistance among enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in a simulated gastric environment. *Journal of applied microbiology*, vol. 102, n° 2, p. 352–362.
- BERMUDEZ-BRITO, M., J. PLAZA-DIAZ, S. MUNOZ-QUEZADA, C. GOMEZ-LLORENTE et A. GIL (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, vol. 61, n° 2, p. 160–174.
- BERNALIER-DONADILLE, A. (2010). Activités métaboliques du microbiote intestinal humain. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, vol. 34, n° 4, p. 17–23.

- BERTIN, Y., J. GIRARDEAU, F. CHAUCHEYRAS-DURAND, B. LYAN, E. PUJOS-GUILLOT, J. HAREL et C. MARTIN (2011). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* gains a competitive advantage by using ethanalamine as a nitrogen source in the bovine intestinal content. *Environmental microbiology*, vol. 13, n° 2, p. 365–377.
- BESSELINK, M. G., H. C. van SANTVOORT, E. BUSKENS, M. A. BOERMEESTER, H. van GOOR, H. M. TIMMERMAN, V. B. NIEUWENHUIJS, T. L. BOLLEN, B. van RAMSHORST, B. J. WITTEMAN *et al.* (2008). Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis : a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, vol. 371, n° 9613, p. 651–659.
- BEUTIN, L. (2006). Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, vol. 53, n° 7, p. 299–305.
- BEUTIN, L., H. STEINRÜCK, G. KRAUSE, K. STEEGE, S. HABY, G. HULTSCH et B. APPEL (2007). Comparative evaluation of the Ridascreen® Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. *Journal of applied microbiology*, vol. 102, n° 3, p. 630–639.
- BEVILACQUA, A., C. ALTIERI, M. R. CORBO, M. SINIGAGLIA et L. I. I. OUOBA (2010). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian Bella di Cerignola table olives : selection of potential multifunctional starter cultures. *Journal of food science*, vol. 75, n° 8, p. M536–M544.
- BIK, E. M., P. B. ECKBURG, S. R. GILL, K. E. NELSON, E. A. PURDOM, F. FRANCOIS, G. PEREZ-PEREZ, M. J. BLASER et D. A. RELMAN (2006). Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, n° 3, p. 732–737.
- BITZAN, M. (2009). Treatment options for HUS secondary to *Escherichia coli* O157 : H7. *Kidney International*, vol. 75, S62–S66.
- BLANQUET-DIOT, S., S. DENIS, S. CHALANCON, F. CHAIRA, J.-M. CARDOT et M. ALRIC (2012). Use of artificial digestive systems to investigate the biopharmaceutical factors influencing the survival of probiotic yeast during gastrointestinal transit in humans. *Pharmaceutical research*, vol. 29, n° 6, p. 1444–1453.
- BLANQUET-DIOT, S., A. GUERRA, L. ETIENNE-MESMIN, S. DENIS, M.-A. PEYRON et M. ALRIC (2013). « Les modèles *in vitro* ». Dans : *Structure des aliments et effets nutritionnels*. Sous la dir. d'A. FARDET, I. SOUCHON et D. DUPONT. Quæ, p. 321–335.
- BLANQUET-DIOT, S., M. SOUFI, M. RAMBEAU, E. ROCK et M. ALRIC (2009). Digestive stability of xanthophylls exceeds that of carotenes as studied in a dynamic *in vitro* gastrointestinal system. *The Journal of nutrition*, vol. 139, n° 5, p. 876–883.
- BOERLIN, P., S. A. MCEWEN, F. BOERLIN-PETZOLD, J. B. WILSON, R. P. JOHNSON et C. L. GYLES (1999). Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 37, n° 3, p. 497–503.
- BOLCA, S. et W. VERSTRAETE (2010). Microbial equol production attenuates colonic methanogenesis and sulphidogenesis *in vitro*. *Anaerobe*, vol. 16, n° 3, p. 247–252.

- BOLNICK, D. I., L. K. SNOWBERG, P. E. HIRSCH, C. L. LAUBER, E. ORG, B. PARKS, A. J. LUSIS, R. KNIGHT, J. G. CAPORASO et R. SVANBÄCK (2014). Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota. *Nature communications*, vol. 5,
- BRIGOTTI, M., P. L. TAZZARI, E. RAVANELLI, D. CARNICELLI, L. ROCCHI, V. ARFILLI, G. SCAVIA, F. MINELLI, F. RICCI, P. PAGLIARO *et al.* (2011). Clinical relevance of shiga toxin concentrations in the blood of patients with hemolytic uremic syndrome. *The Pediatric infectious disease journal*, vol. 30, n° 6, p. 486–490.
- BROUWERS, J., B. ANNEVELD, G.-J. GOUDAPPEL, G. DUCHATEAU, P. ANNAERT, P. AUGUSTIJNS et E. ZEIJDNER (2011). Food-dependent disintegration of immediate release fosamprenavir tablets : *in vitro* evaluation using magnetic resonance imaging and a dynamic gastrointestinal system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 77, n° 2, p. 313–319.
- BRUGÈRE, H., F. AUVRAY, P. MARIANI-KURKDJIAN, L. A. KING et E. LOUKIADIS (2012). *E. coli* producteur de shigatoxines (STEC) : définitions, virulence et propriétés des souches entérohémorragiques (EHEC). *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire (BEH) du 9 mai 2012 - Hors-série Risques microbiologiques alimentaires dans les produits d'origine animale surveillance et évaluation*, p. 20–25.
- BURLAND, V., Y. SHAO, N. T. PERNA, G. PLUNKETT, F. R. BLATTNER et H. J. SOFIA (1998). The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Research*, vol. 26, n° 18, p. 4196–4204.
- BUTEL, M.-J. (2014). Les probiotiques et leur place en médecine humaine. *Journal des Anti-infectieux*, vol. 16, n° 2, p. 33–43.
- CADONA, J., A. V. BUSTAMANTE, A. E. PARMA, P. M. LUCCHESI et A. M. SANZO (2013). Distribution of additional virulence factors related to adhesion and toxicity in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw products in Argentina. *Letters in applied microbiology*, vol. 56, n° 6, p. 449–455.
- CALDERON, O., C. PADILLA, C. CHAVES, L. VILLALOBOS et M. L. ARIAS (2007). Evaluation of the effect of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic culture added to yogurt over *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* populations. *Archivos latinoamericanos de nutricion*, vol. 57, n° 1, p. 51–55.
- CAREY, C. M., M. KOSTRZYNSKA, S. OJHA et S. THOMPSON (2008). The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of microbiological methods*, vol. 73, n° 2, p. 125–132.
- CARNEY, E., S. O'BRIEN, J. SHERIDAN, D. MCDOWELL, I. BLAIR et G. DUFFY (2006). Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. *Food microbiology*, vol. 23, n° 1, p. 52–59.
- CARTER, M. Q., J. W. LOUIE, C. K. FAGERQUIST, O. SULTAN, W. G. MILLER et R. E. MANDRELL (2012). Evolutionary silence of the acid chaperone protein HdeB in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and environmental microbiology*, vol. 78, n° 4, p. 1004–1014.

- CASELLI, M., F. CASSOL, G. CALÒ, J. HOLTON, G. ZULIANI et A. GASBARRINI (2013). Actual concept of "probiotics" : Is it more functional to science or business? *World journal of gastroenterology : WJG*, vol. 19, n° 10, p. 1527.
- CAVE, M. R., J. WRAGG, I. HARRISON, C. H. VANE, T. VAN DE WIELE, E. DE GROEVE, C. P. NATHANAIL, M. ASHMORE, R. THOMAS et J. ROBINSON (2010). Comparison of batch mode and dynamic physiologically based bioaccessibility tests for PAHs in soil samples. *Environmental science & technology*, vol. 44, n° 7, p. 2654–2660.
- CEUPPENS, S., N. BOON, A. RAJKOVIC, M. HEYNDRIKX, T. VAN DE WIELE et M. UYTTENDAELE (2010). Quantification methods for *Bacillus cereus* vegetative cells and spores in the gastrointestinal environment. *Journal of microbiological methods*, vol. 83, n° 2, p. 202–210.
- CEUPPENS, S., A. RAJKOVIC, S. HAMELINK, T. VAN DE WIELE, N. BOON et M. UYTTENDAELE (2012a). Enterotoxin production by *Bacillus cereus* under gastrointestinal conditions and their immunological detection by commercially available kits. *Foodborne pathogens and disease*, vol. 9, n° 12, p. 1130–1136.
- CEUPPENS, S., M. UYTTENDAELE, K. DRIESKENS, M. HEYNDRIKX, A. RAJKOVIC, N. BOON et T. VAN DE WIELE (2012b). Survival and germination of *Bacillus cereus* spores during in vitro simulation of gastrointestinal transit occurred without outgrowth and enterotoxin production. *Applied and Environmental Microbiology*. in press.
- CEUPPENS, S., T. VAN DE WIELE, A. RAJKOVIC, T. FERRER-CABACERAN, M. HEYNDRIKX, N. BOON et M. UYTTENDAELE (2012c). Impact of intestinal microbiota and gastrointestinal conditions on the *in vitro* survival and growth of *Bacillus cereus*. *International journal of food microbiology*, vol. 155, n° 3, p. 241–246.
- CHASSAING, B., L. ETIENNE-MESMIN, R. BONNET et A. DARFEUILLE-MICHAUD (2013). Bile salts induce long polar fimbriae expression favouring Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* interaction with Peyer's patches. *Environmental microbiology*, vol. 15, n° 2, p. 355–371.
- CHEN, H., W. OUYANG, C. MARTONI, F. AFKHAMI, B. LAWUYI, T. LIM et S. PRAKASH (2010). Investigation of genipin cross-linked microcapsule for oral delivery of live bacterial cells and other biotherapeutics : preparation and *in vitro* analysis in simulated human gastrointestinal model. *International Journal of Polymer Science*, vol. 2010, p. 1–10.
- CHEN, J., V. GAIKWAD, M. HOLMES, B. MURRAY, M. POVEY, Y. WANG et Y. ZHANG (2011). Development of a simple model device for *in vitro* gastric digestion investigation. *Food & Function*, vol. 2, n° 3-4, p. 174–182.
- CHEN, L., G. HÉBRARD, E. BEYSSAC, S. DENIS et M. SUBIRADE (2010). *In vitro* study of the release properties of soy-zein protein microspheres with a dynamic artificial digestive system. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 58, n° 17, p. 9861–9867.
- CHEN, L.-S., Y. MA, J.-L. MAUBOIS, S.-H. HE, L.-J. CHEN et H.-M. LI (2010). Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol. *Dairy Science & Technology*, vol. 90, n° 5, p. 537–548.

- CHEN, X., J. XU, J. SHUAI, J. CHEN, Z. ZHANG et W. FANG (2007). The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *International journal of food microbiology*, vol. 115, n° 3, p. 307–312.
- CHILTON, C., G. CROWTHER, S. BAINES, S. TODHUNTER, J. FREEMAN, H. LOCHER, A. ATHANASIOU et M. WILCOX (2014a). *In vitro* activity of cadazolid against clinically relevant *Clostridium difficile* isolates and in an *in vitro* gut model of *C. difficile* infection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 69, n° 3, p. 697–705.
- CHILTON, C., G. CROWTHER, J. FREEMAN, S. TODHUNTER, S. NICHOLSON, C. LONGSHAW et M. WILCOX (2014b). Successful treatment of simulated *Clostridium difficile* infection in a human gut model by fidaxomicin first line and after vancomycin or metronidazole failure. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 69, n° 2, p. 451–462.
- CHINGCUANCO, F., Y. YU, J. V. KUS, L. QUE, T. LACKRAJ, C. M. LÉVESQUE et D. B. FOSTER (2012). Identification of a novel adhesin involved in acid-induced adhesion of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology*, vol. 158, n° Pt 9, p. 2399–2407.
- CHO, I. et M. J. BLASER (2012). The human microbiome : at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, vol. 13, n° 4, p. 260–270.
- CHONG, Y., R. FITZHENRY, R. HEUSCHKEL, F. TORRENTE, G. FRANKEL et A. D. PHILLIPS (2007). Human intestinal tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7 - initial colonization of terminal ileum and Peyer's patches and minimal colonic adhesion *ex vivo*. *Microbiology*, vol. 153, n° 3, p. 794–802.
- CHUNG, H., W. BANG et M. DRAKE (2006). Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, vol. 5, n° 3, p. 52–64.
- CIMOLAI, N., B. J. MORRISON et J. E. CARTER (1992). Risk factors for the central nervous system manifestations of gastroenteritis-associated hemolytic-uremic syndrome. *Pediatrics*, vol. 90, n° 4, p. 616–621.
- CINQUIN, C., G. LE BLAY, I. FLISS et C. LACROIX (2004). Immobilization of infant fecal microbiota and utilization in an *in vitro* colonic fermentation model. *Microbial ecology*, vol. 48, n° 1, p. 128–138.
- CLARKE, L. L. (2009). A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 296, n° 6, G1151–G1166.
- COLLIGNON, A. et M.-J. BUTEL (2004). « Établissement et composition de la flore microbienne intestinale ». Dans : *Flore microbienne intestinale : physiologie et pathologie digestives*. Sous la dir. de J.-C. RAMBAUD, J.-P. BUTS, G. CORTHER et B. FLOURIÉ. John Libbey Eurotext, p. 19–35.
- COMBRISSE, H. (2014). La directive 2010/63/UE : l'explicite et l'implicite. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, vol. 167, n° 2, p. 137–142.
- CROWTHER, G. S., S. D. BAINES, S. L. TODHUNTER, J. FREEMAN, C. H. CHILTON et M. H. WILCOX (2013). Evaluation of NVB302 versus vancomycin activity in an *in vitro* human gut model of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 68, n° 1, p. 168–176.

- CROXEN, M. A., R. J. LAW, R. SCHOLZ, K. M. KEENEY, M. WLODARSKA et B. B. FINLAY (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, vol. 26, n° 4, p. 822–880.
- CUMMINGS, J. H. et G. T. MACFARLANE (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 70, n° 6, p. 443–459.
- CUMMINGS, J. H., E. POMARE, W. BRANCH, C. NAYLOR et G. MACFARLANE (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, vol. 28, n° 10, p. 1221–1227.
- DAHAN, S., G. DALMASSO, V. IMBERT, J.-F. PEYRON, P. RAMPAL et D. CZERUCKA (2003). *Saccharomyces boulardii* interferes with enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced signaling pathways in T84 cells. *Infection and immunity*, vol. 71, n° 2, p. 766–773.
- DALMASSO, G., A. LOUBAT, S. DAHAN, G. CALLE, P. RAMPAL et D. CZERUCKA (2006). *Saccharomyces boulardii* prevents TNF- α -induced apoptosis in EHEC-infected T84 cells. *Research in microbiology*, vol. 157, n° 5, p. 456–465.
- DANCKWERTS, P. (1953). Continuous flow systems : distribution of residence times. *Chemical Engineering Science*, vol. 2, n° 1, p. 1–13.
- DAVE, M., P. D. HIGGINS, S. MIDDHA et K. P. RIOUX (2012). The human gut microbiome : current knowledge, challenges, and future directions. *Translational Research*, vol. 160, n° 4, p. 246–257.
- DE ALMEIDA, P., A. GRÉGIO, M. MACHADO, A. de LIMA et L. AZEVEDO (2008). Saliva composition and functions : a comprehensive review. *The journal of contemporary dental practice*, vol. 9, n° 3, p. 72–80.
- DE BUYSER, M.-L., B. DUFOUR, M. MAIRE et V. LAFARGE (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International journal of food microbiology*, vol. 67, n° 1, p. 1–17.
- DE GRAAF, A. A., A. MAATHUIS, P. de WAARD, N. E. DEUTZ, C. DIJKEMA, W. M. de VOS et K. VENEMA (2010). Profiling human gut bacterial metabolism and its kinetics using [U-13C] glucose and NMR. *NMR in biomedicine*, vol. 23, n° 1, p. 2–12.
- DE SABLET, T., C. CHASSARD, A. BERNALIER-DONADILLE, M. VAREILLE, A. P. GOBERT et C. MARTIN (2009). Human microbiota-secreted factors inhibit shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and immunity*, vol. 77, n° 2, p. 783–790.
- DE WEIRD, R., E. COENEN, B. VLAEMINCK, V. FIEVEZ, P. VAN DEN ABBEELE et T. VAN DE WIELE (2013). A simulated mucus layer protects *Lactobacillus reuteri* from the inhibitory effects of linoleic acid. *Beneficial microbes*, vol. 4, n° 4, p. 299–312.
- DE WEIRD, R., S. POSSEMIERS, G. VERMEULEN, T. C. MOERDIJK-POORTVLIET, H. T. BOSCHKER, W. VERSTRAETE et T. VAN DE WIELE (2010). Human faecal microbiota display variable patterns of glycerol metabolism. *FEMS microbiology ecology*, vol. 74, n° 3, p. 601–611.
- DÉAT, E., S. BLANQUET-DIOT, J.-F. JARRIGE, S. DENIS, E. BEYSSAC et M. ALRIC (2009). Combining the dynamic TNO-gastrointestinal tract system with a Caco-2 cell culture model : Application to the

- assessment of lycopene and α -tocopherol bioavailability from a whole food. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 57, n° 23, p. 11314–11320.
- DESREUMAUX, P., C. NEUT, M. CAZAUBIEL, P. MATTHIEU, P. FANNY et J. PETER (2011). Saccharomyces Cerevisiae CNCM I-3856 Reduces Digestive Discomfort and Abdominal Pain in Subjects With Irritable Bowel Syndrome : A Randomized Double-Blinded Placebo-Controlled Clinical Trial. *Gastroenterology*, vol. 140, n° 5, S50.
- DIAZ-BONE, R. A. et T. R. VAN DE WIELE (2009). Biovolatilization of Metal (loid) s by Intestinal Microorganisms in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem. *Environmental science & technology*, vol. 43, n° 14, p. 5249–5256.
- DICKINSON, P. A., R. A. RMAILEH, L. ASHWORTH, R. A. BARKER, W. M. BURKE, C. M. PATTERSON, N. STAINFORTH et M. YASIN (2012). An investigation into the utility of a multi-compartmental, dynamic, system of the upper gastrointestinal tract to support formulation development and establish bioequivalence of poorly soluble drugs. *The AAPS journal*, vol. 14, n° 2, p. 196–205.
- DOMOTO, N., M. E. KOENEN, R. HAVENAAR, A. MIKAJIRI et B.-S. CHU (2013). The bioaccessibility of eicosapentaenoic acid was higher from phospholipid food products than from mono-and triacylglycerol food products in a dynamic gastrointestinal model. *Food Science & Nutrition*, vol. 1, n° 6, p. 409–415.
- DORÉ, J. et G. CORTIER (2010). Le microbiote intestinal humain. *Gastroentérologie clinique et biologique*, vol. 34, n° 4, p. 7–16.
- DOSTAL, A., S. FEHLBAUM, C. CHASSARD, M. B. ZIMMERMANN et C. LACROIX (2013). Low iron availability in continuous *in vitro* colonic fermentations induces strong dysbiosis of the child gut microbial consortium and a decrease in main metabolites. *FEMS microbiology ecology*, vol. 83, n° 1, p. 161–175.
- DOSTAL, A., M. GAGNON, C. CHASSARD, M. B. ZIMMERMANN, L. O'MAHONY et C. LACROIX (2014). Salmonella Adhesion, Invasion and Cellular Immune Responses Are Differentially Affected by Iron Concentrations in a Combined *In Vitro* Gut Fermentation-Cell Model. *PloS one*, vol. 9, n° 3, e93549.
- DUNCAN, S. H., P. LOUIS, J. M. THOMSON et H. J. FLINT (2009). The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environmental microbiology*, vol. 11, n° 8, p. 2112–2122.
- DUNNE, C., L. O'MAHONY, L. MURPHY, G. THORNTON, D. MORRISSEY, S. O'HALLORAN, M. FEE-NEY, S. FLYNN, G. FITZGERALD, C. DALY, B. KIELY, G. C. O'SULLIVAN, F. SHANAHAN et J. K. COLLINS (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin : correlation with *in vivo* findings. *The American journal of clinical nutrition*, vol. 73, n° 2, 386s–392s.
- EATON, K. A., A. HONKALA, T. A. AUHTUNG et R. A. BRITTON (2011). Probiotic *Lactobacillus reuteri* ameliorates disease due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* in germfree mice. *Infection and immunity*, vol. 79, n° 1, p. 185–191.

- ECKBURG, P. B., E. M. BIK, C. N. BERNSTEIN, E. PURDOM, L. DETHLEFSEN, M. SARGENT, S. R. GILL, K. E. NELSON et D. A. RELMAN (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, vol. 308, n° 5728, p. 1635–1638.
- EDWARDS-INGRAM, L., P. GITSHAM, N. BURTON, G. WARHURST, I. CLARKE, D. HOYLE, S. G. OLIVER et L. STATEVA (2007). Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, vol. 73, n° 8, p. 2458–2467.
- EFFLER, E., M. ISAÄCSON, L. ARNTZEN, R. HEENAN, P. CANTER, T. BARRETT, L. LEE, C. MAMBO, W. LEVINE, A. ZAIDI *et al.* (2001). Factors contributing to the emergence of *Escherichia coli* O157 in Africa. *Emerging infectious diseases*, vol. 7, n° 5, p. 812–819.
- EFSA (2013). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, vol. 11, n° 4, p. 1–250.
- ELASHOFF, J. D., T. J. REEDY et J. H. MEYER (1982). Analysis of gastric emptying data. *Gastroenterology*, vol. 83, n° 6, p. 1306–1312.
- ENGLYST, H. N., S. M. KINGMAN, G. J. HUDSON et J. H. CUMMINGS (1996). Measurement of resistant starch *in vitro* and *in vivo*. *British Journal of Nutrition*, vol. 75, n° 5, p. 749–755.
- ESPIÉ, E., V. VAILLANT, P. MARIANI-KURKDJIAN, F. GRIMONT, R. MARTIN-SCHALLER, H. DE VALK et C. VERNOZY-ROZAND (2006a). *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiology and Infection*, vol. 134, n° 01, p. 143–146.
- ESPIÉ, E., F. GRIMONT, P. MARIANI-KURKIDJIAN, V. VAILLANT et le réseau des néphrologues PÉDIATRES (2006b). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2005. *In VS*, p. 1–3.
- ESPIÉ, E., P. MARIANI-KURKDJIAN, I. FILLIOL, V. VAILLANT et H. de VALK (2008). Infections humaines à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines en France : aspects cliniques, diagnostiques et épidémiologiques. *Revue Francophone des Laboratoires*, vol. 2008, n° 400, p. 59–65.
- ETIENNE-MESMIN, L. (2012). Survie et pathogénicité des *Escherichia coli* entérohémorragiques dans le tractus digestif supérieur humain – Rôle de levures probiotiques. Thèse de doct. France : Université d'Auvergne.
- ETIENNE-MESMIN, L., B. CHASSAING, P. SAUVANET, J. DENIZOT, S. BLANQUET-DIOT, A. DARFEUILLE-MICHAUD, N. PRADEL et V. LIVRELLI (2011a). Interactions with M Cells and macrophages as key steps in the pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections. *PloS one*, vol. 6, n° 8, e23594.
- ETIENNE-MESMIN, L., V. LIVRELLI, M. PRIVAT, S. DENIS, J.-M. CARDOT, M. ALRIC et S. BLANQUET-DIOT (2011b). Effect of a new probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model. *Applied and environmental microbiology*, vol. 77, n° 3, p. 1127–1131.

- FACH, P., F. GRIMONT, P. MARIANI-KURKDJIAN et C. VERNOZY-ROZAND (2003). « Isolement et Identification des STEC ». Dans : *Bilan des connaissances relatives aux Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines (STEC)*. Sous la dir. de C. VERNOZY-ROZAND et S. ROZE. Afssa, p. 106–120.
- FALLINGBORG, J., P. PEDERSEN et B. A. JACOBSEN (1998). Small intestinal transit time and intraluminal pH in ileocecal resected patients with Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences*, vol. 43, n° 4, p. 702–705.
- FAO/WHO (2001). Report on Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *FAO/WHO Cordoba*.
- FARFAN, M. J., L. CANTERO, R. VIDAL, D. J. BOTKIN et A. G. TORRES (2011). Long polar fimbriae of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 bind to extracellular matrix proteins. *Infection and immunity*, vol. 79, n° 9, p. 3744–3750.
- FARROKH, C., K. JORDAN, F. AUVRAY, K. GLASS, H. OPPEGAARD, S. RAYNAUD, D. THEVENOT, R. CONDRON, K. DE REU, A. GOVARIS *et al.* (2013). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International journal of food microbiology*, vol. 162, n° 2, p. 190–212.
- FERENS, W. A. et C. J. HOVDE (2011). *Escherichia coli* O157:H7 : animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne pathogens and disease*, vol. 8, n° 4, p. 465–487.
- FERIA-GERVASIO, D., W. TOTTEY, N. GACI, M. ALRIC, J.-M. CARDOT, P. PEYRET, J.-F. MARTIN, E. PUJOS, J.-L. SÉBÉDIO et J.-F. BRUGÈRE (2014). Three-stage continuous culture system with a self-generated anaerobiosis to study the regionalized metabolism of the human gut microbiota. *Journal of microbiological methods*, vol. 96, p. 111–118.
- FERNANDEZ, B., R. HAMMAMI, P. SAVARD, J. JEAN et I. FLISS (2014). *Pediococcus acidilactici* UL5 and *Lactococcus lactis* ATCC 11454 are able to survive and express their bacteriocin genes under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 116, n° 3, p. 677–688.
- FIALHO, M. B., L. TOFFANO, M. P. PEDROSO, F. AUGUSTO et S. F. PASCHOLATI (2010). Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the *in vitro* development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 26, n° 5, p. 925–932.
- FIETTO, J. L., R. S. ARAÚJO, F. N. VALADÃO, L. G. FIETTO, R. L. BRANDÃO, M. J. NEVES, F. C. GOMES, J. R. NICOLI et I. M. CASTRO (2004). Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Canadian journal of microbiology*, vol. 50, n° 8, p. 615–621.
- FIGUEROA-GONZÁLEZ, I., H. HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, G. RODRÍGUEZ-SERRANO, L. GÓMEZ-RUIZ, M. GARCÍA-GARIBAY et A. CRUZ-GUERRERO (2010). Antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* strain SHIROTA co-cultivated with *Escherichia coli* UAM0403. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. 9, n° 1, p. 11–16.

BIBLIOGRAPHIE

- FOGLIANO, V., M. L. COROLLARO, P. VITAGLIONE, A. NAPOLITANO, R. FERRACANE, F. TRAVAGLIA, M. ARLORIO, A. COSTABILE, A. KLINDER et G. GIBSON (2011). *In vitro* bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction. *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 55, n° S1, S44–S55.
- FOSTER, D. B. *et al.* (2013). Modulation of the enterohemorrhagic *E. coli* virulence program through the human gastrointestinal tract. *Virulence*, vol. 4, n° 4, p. 315–323.
- FRAHER, M. H., P. W. O'TOOLE et E. M. QUIGLEY (2012). Techniques used to characterize the gut microbiota : a guide for the clinician. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, vol. 9, n° 6, p. 312–322.
- FRANK, N., M. DUBOIS, G. SCHOLZ, W. SEEFELDER, J.-Y. CHUAT et B. SCHILTER (2013). Application of gastrointestinal modelling to the study of the digestion and transformation of dietary glycidyl esters. *Food Additives & Contaminants : Part A*, vol. 30, n° 1, p. 69–79.
- FRANKEL, G., A. D. PHILLIPS, I. ROSENSHINE, G. DOUGAN, J. B. KAPER et S. KNUITON (1998). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* : more subversive elements. *Molecular microbiology*, vol. 30, n° 5, p. 911–921.
- FREEMAN, J., M. MARQUIS, G. S. CROWTHER, S. L. TODHUNTER, W. N. FAWLEY, C. H. CHILTON, G. MOECK, D. LEHOUX et M. H. WILCOX (2012). Oritavancin does not induce *Clostridium difficile* germination and toxin production in hamsters or a human gut model. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 67, n° 12, p. 2919–2926.
- FRIEDRICH, A. W., M. BIELASZEWSKA, W.-L. ZHANG, M. PULZ, T. KUCZIUS, A. AMMON et H. KARCH (2002). *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants : frequency and association with clinical symptoms. *Journal of Infectious Diseases*, vol. 185, n° 1, p. 74–84.
- FUKUDA, S., H. TOH, K. HASE, K. OSHIMA, Y. NAKANISHI, K. YOSHIMURA, T. TOBE, J. M. CLARKE, D. L. TOPPING, T. SUZUKI, T. D. TAYLOR, K. ITOH, J. KIKUCHI, H. MORITA, M. HATTORI et H. OHNO (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, vol. 469, n° 7331, p. 543–547.
- FUKUDA, S., H. TOH, T. D. TAYLOR, H. OHNO et M. HATTORI (2012). Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. *Gut microbes*, vol. 3, n° 5, p. 449–454.
- GAGNON, M., E. E. KHEADR, N. DABOUR, D. RICHARD et I. FLISS (2006). Effect of *Bifidobacterium thermacidophilum* probiotic feeding on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in BALB/c mice. *International journal of food microbiology*, vol. 111, n° 1, p. 26–33.
- GAMAGE, S. D., A. K. PATTON, J. E. STRASSER, C. L. CHALK et A. A. WEISS (2006). Commensal bacteria influence *Escherichia coli* O157:H7 persistence and Shiga toxin production in the mouse intestine. *Infection and immunity*, vol. 74, n° 3, p. 1977–1983.
- GAMAGE, S. D., J. E. STRASSER, C. L. CHALK et A. A. WEISS (2003). Nonpathogenic *Escherichia coli* can contribute to the production of Shiga toxin. *Infection and immunity*, vol. 71, n° 6, p. 3107–3115.
- GANONG, W. (2005). *Physiologie médicale*. De Boeck Supérieur.

- GARMENDIA, J., G. FRANKEL et V. F. CREPIN (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections : translocation, translocation, translocation. *Infection and immunity*, vol. 73, n° 5, p. 2573–2585.
- GARRETT, D. A., M. L. FAILLA et R. J. SARAMA (1999). Development of an *in vitro* digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 47, n° 10, p. 4301–4309.
- GEDEK, B. (1999). Adherence of *Escherichia coli* serogroup O157 and the *Salmonella Typhimurium* mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. *Mycoses*, vol. 42, p. 261–264.
- GÉRARD, P. et A. BERNALIER-DONADILLE (2007). Les fonctions majeures du microbiote intestinal. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, vol. 42, p. 28–36.
- GÉRARD-CHAMPOD, M., S. BLANQUET-DIOT, J.-M. CARDOT, D. BRAVO et M. ALRIC (2010). Development and validation of a continuous *in vitro* system reproducing some biotic and abiotic factors of the veal calf intestine. *Applied and environmental microbiology*, vol. 76, n° 16, p. 5592–5600.
- GERNER-SMIDT, P. (2013). « Toxin-producing *E. coli* ». Dans : *Food Associated Pathogens*. Sous la dir. de W. THAM et M. L. DANIELSSON-THAM. CRC Press, p. 88–105.
- GERVAIS, R., F. GAGNON, E. E. KHEADR, M.-R. VAN CALSTEREN, E. R. FARNWORTH, I. FLISS et P. Y. CHOUINARD (2009). Bioaccessibility of fatty acids from conjugated linoleic acid-enriched milk and milk emulsions studied in a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. *International Dairy Journal*, vol. 19, n° 10, p. 574–581.
- GIBSON, G. R., J. H. CUMMINGS et G. T. MACFARLANE (1988). Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. *Applied and environmental microbiology*, vol. 54, n° 11, p. 2750–2755.
- GILLESPIE, I., S. O'BRIEN, G. ADAK, T. CHEASTY, G. WILLSHAW *et al.* (2005). Foodborne general outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in England and Wales 1992-2002 : where are the risks ? *Epidemiology and infection*, vol. 133, n° 5, p. 803–808.
- GIRARDEAU, J. P., A. DALMASSO, Y. BERTIN, C. DUCROT, S. BORD, V. LIVRELLI, C. VERNOZY-ROZAND et C. MARTIN (2005). Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Journal of clinical microbiology*, vol. 43, n° 12, p. 6098–6107.
- GOLAN, L., E. GONEN, S. YAGEL, I. ROSENSHINE et N. Y. SHPIGEL (2011). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* induce attaching and effacing lesions and hemorrhagic colitis in human and bovine intestinal xenograft models. *Disease models & mechanisms*, vol. 4, n° 1, p. 86–94.
- GOLDWATER, P. N. et K. A. BETTELHEIM (2012). Treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS). *BMC medicine*, vol. 10, n° 1, p. 1–8.
- GONYAR, L. A. et M. M. KENDALL (2014). Ethanolamine and choline promote expression of putative and characterized fimbriae in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and immunity*, vol. 82, n° 1, p. 193–201.

- GOPAL, P. K., J. PRASAD, J. SMART et H. S. GILL (2001). *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International journal of food microbiology*, vol. 67, n° 3, p. 207–216.
- GOUALI, M. et F.-X. WEILL (2013). Les *Escherichia coli* entérohémorragiques : des entérobactéries d'actualité. *La presse Médicale*, vol. 42, n° 1, p. 68–75.
- GRIMONT, P. (1987). Taxonomie des *Escherichia*. *Médecine et maladies infectieuses*, vol. 17, p. 6–10.
- GROOTAERT, C., N. BOON, F. ZEKA, B. VANHOECKE, M. BRACKE, W. VERSTRAETE et T. VAN DE WIELE (2011). Adherence and viability of intestinal bacteria to differentiated Caco-2 cells quantified by flow cytometry. *Journal of microbiological methods*, vol. 86, n° 1, p. 33–41.
- GROOTAERT, C., P. VAN DEN ABEELE, M. MARZORATI, W. F. BROEKAERT, C. M. COURTIN, J. A. DELCOUR, W. VERSTRAETE et T. VAN DE WIELE (2009). Comparison of prebiotic effects of arabinoxylan oligosaccharides and inulin in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS microbiology ecology*, vol. 69, n° 2, p. 231–242.
- GROPPER, S. S. et J. L. SMITH (2012). « The digestive system : Mechanism for nourishing the body ». Dans : *Advanced nutrition and human metabolism, Sixth Edition*. Sous la dir. de S. S. GROPPER et J. L. SMITH. Wadsworth, Cengage Learning, p. 33–62.
- GUERRA, A., L. ETIENNE-MESMIN, V. LIVRELLI, S. DENIS, S. BLANQUET-DIOT et M. ALRIC (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in biotechnology*, vol. 30, n° 11, p. 591–600.
- GUN, H., A. YILMAZ, S. TURKER, A. TANLASI et H. YILMAZ (2003). Contamination of bovine carcasses and abattoir environment by *Escherichia coli* O157:H7 in Istanbul. *International journal of food microbiology*, vol. 84, n° 3, p. 339–344.
- GUYON, R., F. DOREY, J. MALAS, F. GRIMONT, J. FORET, B. ROUVIERE et J. COLLOBERT (2001). Superficial contamination of bovine carcasses by *Escherichia coli* O157:H7 in a slaughterhouse in Normandy (France). *Meat science*, vol. 58, n° 3, p. 329–331.
- HAMZAH, A. M., A. M. HUSSEIN et J. M. KHALEF (2013). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 Strain from Fecal Samples of Zoo Animal. *The Scientific World Journal*, vol. 2013, p. 1–5.
- HATANAKA, M., Y. NAKAMURA, A. MAATHUIS, K. VENEMA, I. MUROTA et N. YAMAMOTO (2012). Influence of *Bacillus subtilis* C-3102 on microbiota in a dynamic *in vitro* model of the gastrointestinal tract simulating human conditions. *Beneficial Microbes*, vol. 3, n° 3, p. 229–236.
- HATOUM, R., S. LABRIE et I. FLISS (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts : from fundamental to novel applications. *Frontiers in microbiology*, vol. 3, n° 421, p. 1–12.
- HAUG, M. C., S. A. TANNER, C. LACROIX, M. J. STEVENS et L. MEILE (2011). Monitoring horizontal antibiotic resistance gene transfer in a colonic fermentation model. *FEMS microbiology ecology*, vol. 78, n° 2, p. 210–219.
- HAVENAAR, R., B. ANNEVELD, L. M. HANFF, S. N. de WILDT, B. A. de KONING, M. G. MOOIJ, J. LELIEVELD et M. MINEKUS (2013a). *In vitro* gastrointestinal model (TIM) with predictive power, even for infants and children? *International journal of pharmaceutics*, vol. 457, n° 1, p. 327–332.

- HAVENAAR, R., A. de JONG, M. E. KOENEN, J. van BILSEN, A. M. JANSSEN, E. LABIJ et H. J. WESTERBEEK (2013b). Digestibility of transglutaminase cross-linked caseinate versus native caseinate in an *in vitro* multicompartmental model simulating young child and adult gastrointestinal Conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 61, n° 31, p. 7636–7644.
- HAYASHI, H., R. TAKAHASHI, T. NISHI, M. SAKAMOTO et Y. BENNO (2005). Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of medical microbiology*, vol. 54, n° 11, p. 1093–1101.
- HÉBRARD, G., V. HOFFART, J.-M. CARDOT, M. SUBIRADE, M. ALRIC et E. BEYSSAC (2009). Investigation of coated whey protein/alginate beads as sustained release dosage form in simulated gastrointestinal environment. *Drug development and industrial pharmacy*, vol. 35, n° 9, p. 1103–1112.
- HELBIG, A., E. SILLETTI, G. A. van AKEN, A. OOSTERVELD, M. MINEKUS, R. J. HAMER et H. GRUPPEN (2013). Lipid digestion of protein stabilized emulsions investigated in a dynamic *in vitro* gastro-intestinal model system. *Food Digestion*, vol. 4, n° 2-3, p. 58–68.
- HEMERY, Y. M., N. M. ANSON, R. HAVENAAR, G. R. HAENEN, M. W. NOORT et X. ROUAU (2010). Dry-fractionation of wheat bran increases the bioaccessibility of phenolic acids in breads made from processed bran fractions. *Food Research International*, vol. 43, n° 5, p. 1429–1438.
- HILL, C., F. GUARNER, G. REID, G. R. GIBSON, D. J. MERENSTEIN, B. POT, L. MORELLI, R. B. CANANI, H. J. FLINT, S. SALMINEN *et al.* (2014). Expert consensus document : The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, vol. 11, n° 8, p. 506–514.
- HILL, M. (1997). Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 6, n° 2, S43–S45.
- HIRANO, J., T. YOSHIDA, T. SUGIYAMA, N. KOIDE, I. MORI et T. YOKOCHI (2003). The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells *in vitro*. *Microbiology and immunology*, vol. 47, n° 6, p. 405–409.
- HO, N. K., A. C. HENRY, K. JOHNSON-HENRY et P. M. SHERMAN (2013). Pathogenicity, host responses and implications for management of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Canadian Journal of Gastroenterology*, vol. 27, n° 5, p. 281.
- HO, N., S. HAWLEY, J. OSSA, O. MATHIEU, T. TOMPKINS, K. JOHNSON-HENRY et P. SHERMAN (2013). Immune signalling responses in intestinal epithelial cells exposed to pathogenic *Escherichia coli* and lactic acid-producing probiotics. *Beneficial microbes*, vol. 4, n° 2, p. 195–209.
- HOBDEN, M. R., A. MARTIN-MORALES, L. GUÉRIN-DEREMAUX, D. WILS, A. COSTABILE, G. E. WALTON, I. ROWLAND, O. B. KENNEDY et G. R. GIBSON (2013). *In Vitro* Fermentation of NUTRIOSE® FB06, a Wheat Dextrin Soluble Fibre, in a Continuous Culture Human Colonic Model System. *PloS one*, vol. 8, n° 10, e77128.

- HOEBLER, C., G. LECANNU, C. BELLEVILLE, M.-F. DEVAUX, Y. POPINEAU et J.-L. BARRY (2002). Development of an *in vitro* system simulating bucco-gastric digestion to assess the physical and chemical changes of food. *International journal of food sciences and nutrition*, vol. 53, n° 5, p. 389–402.
- HOLCK, A. L., L. AXELSSON, T. M. RODE, M. HØY, I. MÅGE, O. ALVSEIKE, T. M. L'ABÉE-LUND, M. K. OMER, P. E. GRANUM et E. HEIR (2011). Reduction of verotoxigenic *Escherichia coli* in production of fermented sausages. *Meat science*, vol. 89, n° 3, p. 286–295.
- HONDA, H., G. R. GIBSON, S. FARMER, D. KELLER et A. L. MCCARTNEY (2011). Use of a continuous culture fermentation system to investigate the effect of GanedenBC³⁰ (*Bacillus coagulans* GBI-30, 6086) supplementation on pathogen survival in the human gut microbiota. *Anaerobe*, vol. 17, n° 1, p. 36–42.
- HONG, W., Y. E. WU, X. FU et Z. CHANG (2012). Chaperone-dependent mechanisms for acid resistance in enteric bacteria. *Trends in microbiology*, vol. 20, n° 7, p. 328–335.
- HONGPATTARAKERE, T., N. CHERNTONG, S. WICHENCHOT, S. KOLIDA et R. A. RASTALL (2012). *In vitro* prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, vol. 87, n° 1, p. 846–852.
- HOUSE, B., J. V. KUS, N. PRAYITNO, R. MAIR, L. QUE, F. CHINGCUANCO, V. GANNON, D. CVITKOVITCH et D. B. FOSTER (2009). Acid-stress-induced changes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 virulence. *Microbiology*, vol. 155, n° 9, p. 2907–2918.
- HSUEH, H.-Y., P.-Y. YUEH, B. YU, X. ZHAO et J.-R. LIU (2010). Expression of *Lactobacillus reuteri* Pg4 collagen-binding protein gene in *Lactobacillus casei* ATCC 393 increases its adhesion ability to Caco-2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 58, n° 23, p. 12182–12191.
- HUGHES, D. T., M. B. CLARKE, K. YAMAMOTO, D. A. RASKO et V. SPERANDIO (2009). The QseC adrenergic signaling cascade in enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). *PLoS pathogens*, vol. 5, n° 8, e1000553.
- HUGO, A., E. KAKISU, G. DE ANTONI et P. PEREZ (2008). Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* *in vitro*. *Letters in applied microbiology*, vol. 46, n° 6, p. 613–619.
- HUNG, D. T. et J. J. MEKALANOS (2005). Bile acids induce cholera toxin expression in *Vibrio cholerae* in a ToxT-independent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, n° 8, p. 3028–3033.
- HURLEY, B. P., C. M. THORPE et D. W. ACHESON (2001). Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infection and immunity*, vol. 69, n° 10, p. 6148–6155.
- IM, E. et C. POTHOUKAKIS (2010). Recent advances in *Saccharomyces boulardii* research. *Gastroentérologie clinique et biologique*, vol. 34, S62–S70.
- IN, J., V. LUKYANENKO, J. FOULKE-ABEL, A. L. HUBBARD, M. DELANNOY, A.-M. HANSEN, J. B. KAPER, N. BOISEN, J. P. NATARO, C. ZHU *et al.* (2013). Serine protease EspP from enterohemor-

- rhagic *Escherichia coli* is sufficient to induce Shiga toxin macropinocytosis in intestinal epithelium. *PloS one*, vol. 8, n° 7, e69196.
- JACEWICZ, M., D. ACHESON, M. MOBASSALEH, A. DONOHUE-ROLFE, K. BALASUBRAMANIAN et G. KEUSCH (1995). Maturational regulation of globotriaosylceramide, the Shiga-like toxin 1 receptor, in cultured human gut epithelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 96, n° 3, p. 1328–1335.
- JANDU, N., Z. J. ZENG, K. C. JOHNSON-HENRY et P. M. SHERMAN (2009). Probiotics prevent enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-mediated inhibition of interferon- γ -induced tyrosine phosphorylation of STAT-1. *Microbiology*, vol. 155, n° 2, p. 531–540.
- JEDIDI, H., C. P. CHAMPAGNE, Y. RAYMOND, E. FARNWORTH, M.-R. VAN CALSTEREN, P. Y. CHOUINARD et I. FLISS (2014). Effect of milk enriched with conjugated linoleic acid and digested in a simulator (TIM-1) on the viability of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, vol. 37, n° 1, p. 20–25.
- JOHANNES, L. et W. RÖMER (2010). Shiga toxins-from cell biology to biomedical applications. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, n° 2, p. 105–116.
- JOHNSON-HENRY, K. C., K. A. DONATO, G. SHEN-TU, M. GORDANPOUR et P. M. SHERMAN (2008). *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. *Infection and immunity*, vol. 76, n° 4, p. 1340–1348.
- JOHNSON-HENRY, K. C., K. E. HAGEN, M. GORDONPOUR, T. A. TOMPKINS et P. M. SHERMAN (2007). Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cellular microbiology*, vol. 9, n° 2, p. 356–367.
- JOLY, C., J. GAY-QUÉHEILLARD, A. LÉKÉ, K. CHARDON, S. DELANAUD, V. BACH et H. KHORSICAUET (2013). Impact of chronic exposure to low doses of chlorpyrifos on the intestinal microbiota in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) and in the rat. *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 20, n° 5, p. 2726–2734.
- KAKISU, E., A. IRIGOYEN, P. TORRE, G. L. DE ANTONI et A. G. ABRAHAM (2011). Physicochemical, microbiological and sensory profiles of fermented milk containing probiotic strains isolated from kefir. *Journal of Dairy Research*, vol. 78, n° 04, p. 456–463.
- KARMALI, M. A., M. MASCARENHAS, S. SHEN, K. ZIEBELL, S. JOHNSON, R. REID-SMITH, J. ISAACRENTON, C. CLARK, K. RAHN et J. B. KAPER (2003). Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, n° 11, p. 4930–4940.
- KARMALI, M. A., M. PETRIC, C. LIM, P. C. FLEMING, G. S. ARBUS et H. LIOR (1985). The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 151, n° 5, p. 775–782.
- KARMALI, M. A., M. PETRIC, B. T. STEELE et C. LIM (1983). Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *The Lancet*, vol. 321, n° 8325, p. 619–620.

- KEENEY, K. M. et B. B. FINLAY (2011). Enteric pathogen exploitation of the microbiota-generated nutrient environment of the gut. *Current opinion in microbiology*, vol. 14, n° 1, p. 92–98.
- KEMPERMAN, R. A., G. GROSS, S. MONDOT, S. POSSEMIERS, M. MARZORATI, T. VAN DE WIELE, J. DORÉ et E. E. VAUGHAN (2013). Impact of Polyphenols from Black Tea and Red Wine/Grape Juice on a Gut Model Microbiome. *Food Research International*, vol. 53, n° 2, p. 659–669.
- KENDALL, M. M., C. C. GRUBER, C. T. PARKER et V. SPERANDIO (2012). Ethanolamine controls expression of genes encoding components involved in interkingdom signaling and virulence in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *MBio*, vol. 3, n° 3, e00050–12.
- KHALF, M., N. DABOUR, I. FLISS *et al.* (2010). Viability of probiotic bacteria in maple sap products under storage and gastrointestinal conditions. *Bioresource technology*, vol. 101, n° 20, p. 7966–7972.
- KHAN, N. A., S. ROMAN, O. PEULEN et F. MION (2009). « Physiologie Digestive ». Dans : *Physiologie Humaine*. Sous la dir. de H. GUÉNARD. Pradel, p. 341–382.
- KHEADR, E., A. ZIHLER, N. DABOUR, C. LACROIX, G. LE BLAY et I. FLISS (2010). Study of the physicochemical and biological stability of pediocin PA-1 in the upper gastrointestinal tract conditions using a dynamic in vitro model. *Journal of applied microbiology*, vol. 109, n° 1, p. 54–64.
- KIM, B.-S., J. N. KIM et C. E. CERNIGLIA (2011). *In vitro* culture conditions for maintaining a complex population of human gastrointestinal tract microbiota. *BioMed Research International*, vol. 2011, p. 1–10.
- KIM, S. H., S. J. YANG, H. C. KOO, W. K. BAE, J. Y. KIM, J. H. PARK, Y. J. BAEK et Y. H. PARK (2001). Inhibitory activity of *Bifidobacterium longum* HY8001 against Vero cytotoxin of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*®, vol. 64, n° 11, p. 1667–1673.
- KIM, Y., S. OH et S. KIM (2009). Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 379, n° 2, p. 324–329.
- KIM, Y., S. OH, S. PARK, J. B. SEO et S.-H. KIM (2008). *Lactobacillus acidophilus* reduces expression of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors by inhibiting autoinducer-2-like activity. *Food control*, vol. 19, n° 11, p. 1042–1050.
- KING, L. A., E. ESPÍÉ, S. HAEGHEBAERT, F. GRIMONT, P. MARIANI-KURKIDJAN, I. FILLIOL-TOUTAIN, É. BINGEN, F.-X. WEILL, C. LOIRAT, H. DE VALK, V. VAILLANT et le réseau des néphrologues PÉDIATRES (2009). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de 15 ans et moins en France, 1996-2007. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire (BEH) du 7 avril 2009*, vol. 14, p. 125–128.
- KING, L. A., M. GOUALI, P. MARIANI-KURKIDJAN, V. VAILLANT et le réseau des néphrologues PÉDIATRES (2013a). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2012. *In VS*, p. 1–4.
- KING, L. A., M. MACÉ, P. MARIANI-KURKIDJAN, M. GOUALI, V. VAILLANT et le réseau des néphrologues PÉDIATRES (2013b). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2011. *In VS*, p. 1–4.

- KING, L. A., P. MARIANI-KURKIDJAN et M. GOUALI (2012). Encadré-Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire (BEH) du 9 mai 2012 - Hors-série Risques microbiologiques alimentaires dans les produits d'origine animale surveillance et évaluation*, p. 14.
- KING, L. A., P. MARIANI-KURKIDJAN, M. GOUALI, V. VAILLANT et le réseau des néphrologues PÉDIATRES (2014). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2013. *InVS*, p. 1–4.
- KLAENHAMMER, T. R. et M. J. KULLEN (1999). Selection and design of probiotics. *International journal of food microbiology*, vol. 50, n° 1, p. 45–57.
- KLEIN, S. M., G. W. ELMER, L. V. MCFARLAND, C. M. SURAWICZ et R. H. LEVY (1993). Recovery and elimination of the biotherapeutic agent, *Saccharomyces boulardii*, in healthy human volunteers. *Pharmaceutical research*, vol. 10, n° 11, p. 1615–1619.
- KOENIG, J. E., A. SPOR, N. SCALFONE, A. D. FRICKER, J. STOMBAUGH, R. KNIGHT, L. T. ANGENENT et R. E. LEY (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, n° Supplement 1, p. 4578–4585.
- KONG, F. et R. P. SINGH (2010). A human gastric simulator (HGS) to study food digestion in human stomach. *Journal of food science*, vol. 75, n° 9, E627–E635.
- KONG, H., M. WANG, K. VENEMA, A. MAATHUIS, R. van der HEIJDEN, J. van der GREEF, G. XU et T. HANKEMEIER (2009). Bioconversion of red ginseng saponins in the gastro-intestinal tract *in vitro* model studied by high-performance liquid chromatography-high resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, n° 11, p. 2195–2203.
- KOVATCHEVA-DATCHARY, P., M. EGERT, A. MAATHUIS, M. RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, A. A. de GRAAF, H. SMIDT, W. M. DE VOS et K. VENEMA (2009). Linking phylogenetic identities of bacteria to starch fermentation in an *in vitro* model of the large intestine by RNA-based stable isotope probing. *Environmental microbiology*, vol. 11, n° 4, p. 914–926.
- KUMURA, H., Y. TANOUE, M. TSUKAHARA, T. TANAKA et K. SHIMAZAKI (2004). Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal of dairy science*, vol. 87, n° 12, p. 4050–4056.
- KUS, J. V., A. GEBREMEDHIN, V. DANG, S.-L. TRAN, A. SERBANESCU et D. B. FOSTER (2011). Bile salts induce resistance to polymyxin in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of bacteriology*, vol. 193, n° 17, p. 4509–4515.
- LAFOND, M., B. BOUZA, S. EYRICHINE, E. BONNIN, E. H. CROST, P.-A. GERAERT, T. GIARDINA et E. H. AJANDOUZ (2011). An integrative *in vitro* approach to analyse digestion of wheat polysaccharides and the effect of enzyme supplementation. *British Journal of Nutrition*, vol. 106, n° 2, p. 264–273.
- LAIRD, B. D., D. PEAK et S. D. SICILIANO (2010). The effect of residence time and fluid volume to soil mass (LS) ratio on *in vitro* arsenic bioaccessibility from poorly crystalline scorodite. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, vol. 45, n° 6, p. 732–739.

- LAIRD, B. D., J. YEUNG, D. PEAK et S. D. SICILIANO (2009). Nutritional status and gastrointestinal microbes affect arsenic bioaccessibility from soils and mine tailings in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *Environmental science & technology*, vol. 43, n° 22, p. 8652–8657.
- LAPEYRAQUE, A.-L., M. MALINA, V. FREMEAUX-BACCHI, T. BOPPEL, M. KIRSCHFINK, M. OUALHA, F. PROULX, M.-J. CLERMONT, F. LE DEIST, P. NIAUDET et F. SCHAEFER (2011). Eculizumab in severe Shiga-toxin-associated HUS. *New England Journal of Medicine*, vol. 364, n° 26, p. 2561–2563.
- LARSEN, W. (2003). *Embryologie humaine*. De Boeck Supérieur.
- LAW, D. (2000). Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 88, n° 5, p. 729–745.
- LE BLAY, G., C. CHASSARD, S. BALTZER et C. LACROIX (2010). Set up of a new *in vitro* model to study dietary fructans fermentation in formula-fed babies. *British Journal of Nutrition*, vol. 103, n° 3, p. 403–411.
- LE BLAY, G., R. HAMMAMI, C. LACROIX et I. FLISS (2012). Stability and Inhibitory Activity of Pediocin PA-1 Against *Listeria* sp. in Simulated Physiological Conditions of the Human Terminal Ileum. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, vol. 4, n° 4, p. 250–258.
- LE BLAY, G., J. RYTKA, A. ZIHLER et C. LACROIX (2009). New *in vitro* colonic fermentation model for *Salmonella* infection in the child gut. *FEMS microbiology ecology*, vol. 67, n° 2, p. 198–207.
- LEATHAM, M. P., S. BANERJEE, S. M. AUTIERI, R. MERCADO-LUBO, T. CONWAY et P. S. COHEN (2009). Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine. *Infection and immunity*, vol. 77, n° 7, p. 2876–2886.
- LEBEER, S., J. VANDERLEYDEN et S. C. DE KEERSMAECKER (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules : comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, n° 3, p. 171–184.
- LEBLANC, J. G., C. MILANI, G. S. de GIORI, F. SESMA, D. van SINDEREN et M. VENTURA (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host : a gut microbiota perspective. *Current opinion in biotechnology*, vol. 24, p. 160–168.
- LEDOUX, M., L. du CHAFFAUT, M. OSEREDCZUK, G. CALAMASSI-TRAN et C. MENARD (2013). Élaboration et utilisation de la table de composition nutritionnelle du Ciquel-2012. *L'Information diététique* n° 4, p. 39–49.
- LEY, R. E., D. A. PETERSON et J. I. GORDON (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, vol. 124, n° 4, p. 837–848.
- LEYRAL, G. et E. VIERLING (2007). *Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaires*. Wolters Kluwer France.
- LIKOTRAFITI, E., K. M. TUOHY, G. R. GIBSON et R. A. RASTALL (2013). Development of antimicrobial synbiotics using potentially-probiotic faecal isolates of *Lactobacillus fermentum* and *Bifidobacterium longum*. *Anaerobe*, vol. 20, p. 5–13.

- LIKOTRAFITI, E., K. M. TUOHY, G. R. GIBSON et R. A. RASTALL (2014). An *in vitro* study of the effect of probiotics, prebiotics and synbiotics on the elderly faecal microbiota. *Anaerobe*, vol. 27, p. 50–55.
- LILA, M. A., D. M. RIBNICKY, L. E. ROJO, P. ROJAS-SILVA, A. OREN, R. HAVENAAR, E. M. JANLE, I. RASKIN, G. G. YOUSEF et M. H. GRACE (2011). Complementary approaches to gauge the bioavailability and distribution of ingested berry polyphenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 60, n° 23, p. 5763–5771.
- LIN, J., M. P. SMITH, K. C. CHAPIN, H. S. BAIK, G. N. BENNETT et J. W. FOSTER (1996). Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, n° 9, p. 3094–3100.
- LIVRELLI, V., N. BARNICH, A. DARFEUILLE-MICHAUD et R. BONNET (2014). « *Escherichia coli* et autres *Escherichia-Shigella* ». Dans : *Précis de Bactériologie clinique 3^e édition*. Sous la dir. de J. FRENEY, F. RENAUD, R. LECLERCQ et P. RIEGEL. Eska. in press.
- LOUKIADIS, E., H. CALLON, C. MAZUY-CRUCHAUDET, V. VALLET, C. BIDAUD, F. FERRÉ, L. GIULIANI, L. BOUTEILLER, N. PIHIER et C. DANAN (2012). Surveillance des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) dans les denrées alimentaires en France (2005-2011). *Bulletin épidémiologique - Santé animale, alimentation* n° 55, p. 3–9.
- LOZUPONE, C. A., J. I. STOMBAUGH, J. I. GORDON, J. K. JANSSON et R. KNIGHT (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, vol. 489, n° 7415, p. 220–230.
- LUKYANENKO, V., I. MALYUKOVA, A. HUBBARD, M. DELANNOY, E. BOEDEKER, C. ZHU, L. CEBOTARU et O. KOVBASNJUK (2011). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection stimulates Shiga toxin 1 macropinocytosis and transcytosis across intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 301, n° 5, p. C1140–C1149.
- LUZADER, D. H., D. E. CLARK, L. A. GONYAR et M. M. KENDALL (2013). EutR is a direct regulator of genes that contribute to metabolism and virulence in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of bacteriology*, vol. 195, n° 21, p. 4947–4953.
- LVOVA, L., S. DENIS, A. BARRA, P. MIELLE, C. SALLES, C. VERGOIGNAN, C. DI NATALE, R. PAOLLESSE, P. TEMPLE-BOYER et G. FERON (2012). Salt release monitoring with specific sensors in "*in vitro*" oral and digestive environments from soft cheeses. *Talanta*, vol. 97, p. 171–180.
- MAATHUIS, A. J., D. KELLER et S. FARMER (2010). Survival and metabolic activity of the GaneddenBC³⁰ strain of *Bacillus coagulans* in a dynamic *in vitro* model of the stomach and small intestine. *Beneficial microbes*, vol. 1, n° 1, p. 31–36.
- MAATHUIS, A. J., E. G. van den HEUVEL, M. H. SCHOTERMAN et K. VENEMA (2012). Galacto-oligosaccharides have prebiotic activity in a dynamic *in vitro* colon model using a ¹³C-labeling technique. *The Journal of nutrition*, vol. 142, n° 7, p. 1205–1212.
- MAATHUIS, A., A. HOFFMAN, A. EVANS, L. SANDERS et K. VENEMA (2009). The effect of the undigested fraction of maize products on the activity and composition of the microbiota determined in a

- dynamic *in vitro* model of the human proximal large intestine. *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 28, n° 6, p. 657–666.
- MACCAFERRI, S., A. KLINDER, P. BRIGIDI, P. CAVINA et A. COSTABILE (2012a). Potential Probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 Modulates the Immune Response in Caco-2 Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells and Impacts the Human Gut Microbiota in an *In Vitro* Colonic Model System. *Applied and environmental microbiology*, vol. 78, n° 4, p. 956–964.
- MACCAFERRI, S., A. KLINDER, S. CACCIATORE, R. CHITARRARI, H. HONDA, C. LUCHINAT, I. BERTINI, P. CARNEVALI, G. R. GIBSON, P. BRIGIDI *et al.* (2012b). In vitro fermentation of potential prebiotic flours from natural sources : Impact on the human colonic microbiota and metabolome. *Molecular nutrition & food research*, vol. 56, n° 8, p. 1342–1352.
- MACCAFERRI, S., B. VITALI, A. KLINDER, S. KOLIDA, M. NDAGIJIMANA, L. LAGHI, F. CALANNI, P. BRIGIDI, G. R. GIBSON et A. COSTABILE (2010). Rifaximin modulates the colonic microbiota of patients with Crohn’s disease : an *in vitro* approach using a continuous culture colonic model system. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 65, n° 12, p. 2556–2565.
- MACFARLANE, G. T. et J. H. CUMMINGS (1991). « The colonic flora, fermentation, and large bowel digestive function ». Dans : *The large intestine : physiology, pathophysiology and disease*. Sous la dir. de S. F. PHILLIPS, J. H. PEMBERTON et R. SHORTER. Raven Press, New York, p. 51–92.
- MACFARLANE, G. T. et L. MACFARLANE (2010). Acquisition, evolution and maintenance of the normal gut microbiota. *Digestive Diseases*, vol. 27, n° Suppl. 1, p. 90–98.
- MACFARLANE, G. T., S. MACFARLANE et G. GIBSON (1998). Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microbial Ecology*, vol. 35, n° 2, p. 180–187.
- MACFARLANE, S. et G. T. MACFARLANE (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *PROCEEDINGS - NUTRITION SOCIETY OF LONDON*. T. 62. 1, p. 67–72.
- MACFARLANE, S., E. J. WOODMANSEY et G. T. MACFARLANE (2005). Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system. *Applied and environmental microbiology*, vol. 71, n° 11, p. 7483–7492.
- MAESTRE, R., J. D. DOUGLASS, S. KODUKULA, I. MEDINA et J. STORCH (2013). Alterations in the intestinal assimilation of oxidized PUFAs are ameliorated by a polyphenol-rich grape seed extract in an *in vitro* model and Caco-2 cells. *The Journal of nutrition*, vol. 143, n° 3, p. 295–301.
- MAINVILLE, I., Y. ARCAND et E. FARNWORTH (2005). A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International journal of food microbiology*, vol. 99, n° 3, p. 287–296.
- MÄKELÄINEN, H., S. FORSSTEN, K. OLLI, L. GRANLUND, N. RAUTONEN et A. OUWEHAND (2009). Probiotic lactobacilli in a semi-soft cheese survive in the simulated human gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, vol. 19, n° 11, p. 675–683.

- MÄKELÄINEN, H., S. FORSSTEN, M. SAARINEN, J. STOWELL, N. RAUTONEN et A. OUWEHAND (2010). Xylo-oligosaccharides enhance the growth of bifidobacteria and *Bifidobacterium lactis* in a simulated colon model. *Beneficial Microbes*, vol. 1, n° 1, p. 81–91.
- MÄKIVUOKKO, H., S. FORSSTEN, M. SAARINEN, A. OUWEHAND et N. RAUTONEN (2010). Synbiotic effects of lactitol and *Lactobacillus acidophilus* NCFM? in a semi-continuous colon fermentation model. *Beneficial Microbes*, vol. 1, n° 2, p. 131–137.
- MAKIVUOKKO, H., J. NURMI, P. NURMINEN, J. STOWELL et N. RAUTONEN (2005). *In vitro* effects on polydextrose by colonic bacteria and caco-2 cell cyclooxygenase gene expression. *Nutrition and cancer*, vol. 52, n° 1, p. 94–104.
- MÄKIVUOKKO, H., P. WACKLIN, M. E. KOENEN, K. LAAMANEN, N. ALAKULPPI, K. VENEMA et J. MÄTTÖ (2012). Isolation of bifidobacteria for blood group secretor status targeted personalised nutrition. *Microbial Ecology in Health and Disease*, vol. 23, p. 28–34.
- MALAGELADA, J.-R., V. L. GO et W. SUMMERSKILL (1979). Different gastric, pancreatic, and biliary responses to solid-liquid or homogenized meals. *Digestive diseases and sciences*, vol. 24, n° 2, p. 101–110.
- MALIK-KALE, P., C. T. PARKER et M. E. KONKEL (2008). Culture of *Campylobacter jejuni* with sodium deoxycholate induces virulence gene expression. *Journal of bacteriology*, vol. 190, n° 7, p. 2286–2297.
- MALTBY, R., M. P. LEATHAM-JENSEN, T. GIBSON, P. S. COHEN et T. CONWAY (2013). Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine. *PloS one*, vol. 8, n° 1, e53957.
- MARESCA, M., E. DUMAY, J. FANTINI et B. CAPORICCIO (2007). Selective transport of staphylococcal enterotoxin A through *in vitro* generated human M cells. *Microbes and Infection*, vol. 9, n° 12, p. 1507–1510.
- MARIANI-KURKDJIAN, P. et É. BINGEN (2012). Physiopathologie et virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines. *Réanimation*, vol. 21, n° 3, p. 268–279.
- MARIANI-KURKDJIAN, P. et S. BONACORSI (2014). Diagnostic des infections à *Escherichia coli* entéro-hémorragiques. *Feuillets de Biologie*, vol. 55, n° 317, p. 42–47.
- MARSHALL, B. et J. R. WARREN (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet*, vol. 323, n° 8390, p. 1311–1315.
- MARTEAU, P., P. POCHART, J. DORÉ, C. BÉRA-MAILLET, A. BERNALIER et G. CORTIER (2001). Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Applied and environmental microbiology*, vol. 67, n° 10, p. 4939–4942.
- MARTINEZ, R. C., A.-E. AYNAOU, S. ALBRECHT, H. A. SCHOLS, E. C. DE MARTINIS, E. G. ZOETENDAL, K. VENEMA, S. M. SAAD et H. SMIDT (2011). *In vitro* evaluation of gastrointestinal survival of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698 alone and combined with galactooligosaccharides, milk and/or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. *International journal of food microbiology*, vol. 149, n° 2, p. 152–158.

- MARTINEZ, R. C., H. R. CARDARELLI, W. BORST, S. ALBRECHT, H. SCHOLS, O. P. GUTIÉRREZ, A. J. MAATHUIS, B. D. MELO FRANCO, E. C. MARTINIS, E. G. ZOETENDAL *et al.* (2013). Effect of galactooligosaccharides and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 on growth of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698, microbial community structure, and metabolite production in an *in vitro* colonic model set up with human or pig microbiota. *FEMS microbiology ecology*, vol. 81, n° 1, p. 110–123.
- MARTINS, F. S., A. C. P. RODRIGUES, F. C. TIAGO, F. J. PENNA, C. A. ROSA, R. M. ARANTES, R. M. NARDI, M. J. NEVES et J. R. NICOLI (2007). *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. *Journal of medical microbiology*, vol. 56, n° 3, p. 352–359.
- MARZORATI, M., L. MAIGNIEN, A. VERHELST, G. LUTA, R. SINNOTT, F. M. KERCKHOF, N. BOON, T. VAN DE WIELE et S. POSSEMIERS (2013a). Barcoded pyrosequencing analysis of the microbial community in a simulator of the human gastrointestinal tract showed a colon region-specific microbiota modulation for two plant-derived polysaccharide blends. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 103, n° 2, p. 409–420.
- MARZORATI, M., I. PINHEIRO, P. VAN DEN ABEELE, T. VAN DE WIELE et S. POSSEMIERS (2012). An *in vitro* technology platform to assess host-microbiota interactions in the gastrointestinal tract. *Agro Food Industry Hi-tech*, vol. 23, n° 6, S8–S11.
- MARZORATI, M., S. POSSEMIERS, P. VAN DEN ABEELE, T. VAN DE WIELE, B. VANHOECKE et W. VERSTRAETE (avr. 2013b). *Technology and method to study microbial growth and adhesion to host-related surfaces and the host-microbiota interaction*. US Patent App. 13/861,590.
- MARZORATI, M., B. VANHOECKE, T. DE RYCK, M. S. SADABAD, I. PINHEIRO, S. POSSEMIERS, P. VAN DEN ABEELE, L. DERYCKE, M. BRACKE, J. PIETERS *et al.* (2014). The HMI module : a new tool to study the Host-Microbiota Interaction in the human gastrointestinal tract *in vitro*. *BMC microbiology*, vol. 14, n° 133, p. 1–14.
- MARZORATI, M., A. VERHELST, G. LUTA, R. SINNOTT, W. VERSTRAETE, T. V. de WIELE et S. POSSEMIERS (2010). *In vitro* modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant-derived polysaccharide-rich dietary supplements. *International journal of food microbiology*, vol. 139, n° 3, p. 168–176.
- MASSEY, R., P. KEY, A. MALLETT et I. ROWLAND (1988). An investigation of the endogenous formation of apparent total N-nitroso compounds in conventional microflora and germ-free rats. *Food and chemical toxicology*, vol. 26, n° 7, p. 595–600.
- MEADER, E., M. MAYER, D. STEVERDING, S. R. CARDING et A. NARBAD (2013). Evaluation of bacteriophage therapy to control *Clostridium difficile* and toxin production in an *in vitro* human colon model system. *Anaerobe*, vol. 22, p. 25–30.
- MEDELLIN-PEÑA, M. J. et M. W. GRIFFITHS (2009). Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. *Applied and environmental microbiology*, vol. 75, n° 4, p. 1165–1172.

- MEDELLIN-PEÑA, M. J., H. WANG, R. JOHNSON, S. ANAND et M. W. GRIFFITHS (2007). Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and environmental microbiology*, vol. 73, n° 13, p. 4259–4267.
- MELLIES, J. L., A. M. BARRON et A. M. CARMONA (2007). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infection and immunity*, vol. 75, n° 9, p. 4199–4210.
- MÉNARD, O., T. CATTENOZ, H. GUILLEMIN, I. SOUCHON, A. DEGLAIRE, D. DUPONT et D. PICQUE (2014). Validation of a new *in vitro* dynamic system to simulate infant digestion. *Food Chemistry*, vol. 145, p. 1039–1045.
- MERCURI, A., A. PASSALACQUA, M. S. WICKHAM, R. M. FAULKS, D. Q. CRAIG et S. A. BARKER (2011). The effect of composition and gastric conditions on the self-emulsification process of ibuprofen-loaded self-emulsifying drug delivery systems : a microscopic and dynamic gastric model study. *Pharmaceutical research*, vol. 28, n° 7, p. 1540–1551.
- MESAROS, N., F. VAN BAMBEKE, Y. GLUPCZYNSKI, R. VANHOOF et P. M. TULKENS (2005). L’efflux des antibiotiques : Un mécanisme ubiquitaire conduisant à la résistance. État de la question et implications microbiologiques et cliniques. *Louvain médical*, vol. 124, n° 8, p. 308–320.
- MILLER, T. L. et M. J. WOLIN (1981). Fermentation by the human large intestine microbial community in an *in vitro* semicontinuous culture system. *Applied and environmental microbiology*, vol. 42, n° 3, p. 400–407.
- MILLETTE, M., F. M. LUQUET et M. LACROIX (2007). *In vitro* growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* fermented milk. *Letters in applied microbiology*, vol. 44, n° 3, p. 314–319.
- MILLSAP, K. W., H. C. MEI, R. BOS et H. J. BUSSCHER (1998). Adhesive interactions between medically important yeasts and bacteria. *FEMS microbiology reviews*, vol. 21, n° 4, p. 321–336.
- MINEKUS, M., J. LELIEVELD, B. ANNEVELD, J. DEGROOT, M. VERWEI et E. ZEIJDNER (2013). Pressure Forces in the TIM-agc, an Advanced Gastric Compartment that Simulates Shape and Motility of the Stomach. *AAPS Annual Meeting and Exposition*.
- MINEKUS, M., P. MARTEAU, R. HAVENAAR et J. HUIS IN’T VELD (1995). A multicompartamental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *ATLA. Alternatives to laboratory animals*, vol. 23, n° 2, p. 197–209.
- MINEKUS, M., M. SMEETS-PEETERS, A. BERNALIER, S. MAROL-BONNIN, R. HAVENAAR, P. MARTEAU, M. ALRIC, G. FONTY *et al.* (1999). A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 53, n° 1, p. 108–114.
- MISZCZYCHA, S. D., F. PERRIN, S. GANET, E. JAMET, F. TENENHAUS-AZIZA, M.-C. MONTEL et D. THEVENOT-SERGENTET (2013). Behavior of Different Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes in Various Experimentally Contaminated Raw-Milk Cheeses. *Applied and environmental microbiology*, vol. 79, n° 1, p. 150–158.

- MISZCZYCHA, S. D., J. THÉVENOT, S. DENIS, C. CALLON, V. LIVRELLI, M. ALRIC, M.-C. MONTEL, S. BLANQUET-DIOT et D. THEVENOT-SERGENTET (2014). Survival of *Escherichia coli* O26:H11 exceeds that of *Escherichia coli* O157:H7 as assessed by simulated human digestion of contaminated raw milk cheeses. *International journal of food microbiology*, vol. 172, p. 40–48.
- MO, H., Y. ZHU et M. NOUT (2012). *In vitro* digestion enhances anti-adhesion effect of tempe and tofu against *Escherichia coli*. *Letters in applied microbiology*, vol. 54, n° 2, p. 166–168.
- MO, H., S. KARILUOTO, V. PIIRONEN, Y. ZHU, M. G. SANDERS, J.-P. VINCKEN, J. WOLKERS-ROOIJACKERS et M. ROB NOUT (2013). Effect of soybean processing on content and bioaccessibility of folate, vitamin B12 and isoflavones in tofu and tempe. *Food Chemistry*, vol. 141, n° 3, p. 2418–2425.
- MOHAWK, K. L. et A. D. O'BRIEN (2011). Mouse Models of *Escherichia coli* O157:H7 Infection and Shiga Toxin Injection. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2011,
- MOLLY, K., M. V. WOESTYNE, I. D. SMET et W. VERSTRAETE (1994). Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganism-associated activities. *Microbial ecology in health and disease*, vol. 7, n° 4, p. 191–200.
- MOLLY, K., M. V. WOESTYNE et W. VERSTRAETE (1993). Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 39, n° 2, p. 254–258.
- MONTALTO, M., F. D'ONOFRIO, A. GALLO, A. CAZZATO et G. GASBARRINI (2009). Intestinal microbiota and its functions. *Digestive and Liver Disease Supplements*, vol. 3, n° 2, p. 30–34.
- MOORTHY, A. S. et H. J. EBERL (2014). Assessing the influence of reactor system design criteria on the performance of model colon fermentation units. *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 117, n° 4, p. 478–484.
- MORGAN, X. C., N. SEGATA et C. HUTTENHOWER (2013). Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends in Genetics*, vol. 29, n° 1, p. 51–58.
- MUKHOPADHYAY, S. et A. D. LINSTEDT (2012). Manganese blocks intracellular trafficking of Shiga toxin and protects against Shiga toxicosis. *Science*, vol. 335, n° 6066, p. 332–335.
- MURRAY, M. et D. C. BRATER (1993). Renal toxicity of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Annual review of pharmacology and toxicology*, vol. 33, n° 1, p. 435–465.
- MUTHUKUMARASAMY, P. et R. A. HOLLEY (2006). Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 111, n° 2, p. 164–169.
- MUTHUKUMARASAMY, P. et R. A. HOLLEY (2007). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, vol. 24, n° 1, p. 82–88.
- NABIL, S., S. F. GAUTHIER, R. DROUIN, P. E. POUBELLE et Y. POULIOT (2011). *In vitro* digestion of proteins and growth factors in a bovine whey protein extract as determined using a computer-controlled dynamic gastrointestinal system (TIM-1). *Food digestion*, vol. 2, n° 1-3, p. 13–22.

- NAGANO, K., K. TAGUCHI, S. TOKORO, I. TATSUNO et H. MORI (2014). Adhesion of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to the Intestinal Epithelia Is Essential for Inducing Secretory IgA Antibody Production in the Intestine of Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 37, n° 3, p. 409–416.
- NAKANISHI, N., K. TASHIRO, S. KUHARA, T. HAYASHI, N. SUGIMOTO et T. TOBE (2009). Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology*, vol. 155, n° 2, p. 521–530.
- NAKASHIMADA, Y., A. MICHINAKA, K. WATANABE, N. NISHIO et T. FUJII (2011). Brewer's yeast cell wall affects microbiota composition and decreases *Bacteroides fragilis* populations in an anaerobic gut intestinal model. *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 111, n° 2, p. 178–184.
- NATARO, J. P. et J. B. KAPER (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, vol. 11, n° 1, p. 142–201.
- NAYLOR, S. W., D. L. GALLY et J. CHRISTOPHER LOW (2005). Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *International journal of medical microbiology*, vol. 295, n° 6, p. 419–441.
- NJOROGE, J. W., Y. NGUYEN, M. M. CURTIS, C. G. MOREIRA et V. SPERANDIO (2012). Virulence meets metabolism : Cra and KdpE gene regulation in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *MBio*, vol. 3, n° 5, e00280–12.
- NJOROGE, J. W. et V. SPERANDIO (2012). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence regulation by two bacterial adrenergic kinases, QseC and QseE. *Infection and immunity*, vol. 80, n° 2, p. 688–703.
- NORTHFIELD, T. et I. MCCOLL (1973). Postprandial concentrations of free and conjugated bile acids down the length of the normal human small intestine. *Gut*, vol. 14, n° 7, p. 513–518.
- ODUMOSU, O., D. NICHOLAS, H. YANO et W. LANGRIDGE (2010). AB toxins : a paradigm switch from deadly to desirable. *Toxins*, vol. 2, n° 7, p. 1612–1645.
- OELSCHLAEGER, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions—a review. *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 300, n° 1, p. 57–62.
- OGAWA, M., K. SHIMIZU, K. NOMOTO, M. TAKAHASHI, M. WATANUKI, R. TANAKA, T. TANAKA, T. HAMABATA, S. YAMASAKI et Y. TAKEDA (2001a). Protective Effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. *Infection and immunity*, vol. 69, n° 2, p. 1101–1108.
- OGAWA, M., K. SHIMIZU, K. NOMOTO, R. TANAKA, T. HAMABATA, S. YAMASAKI, T. TAKEDA et Y. TAKEDA (2001b). Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *International journal of food microbiology*, vol. 68, n° 1, p. 135–140.
- ÖHRVIK, V., H. ÖHRVIK, J. TALLKVIST et C. WITTHÖFT (2010). Foliates in bread : retention during bread-making and *in vitro* bioaccessibility. *European journal of nutrition*, vol. 49, n° 6, p. 365–372.
- OLESEN, I. et L. JESPERSEN (2010). Relative gene transcription and pathogenicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* after long-term adaptation to acid and salt stress. *International journal of food microbiology*, vol. 141, n° 3, p. 248–253.

- OOMEN, A., C. ROMPELBERG, M. BRUIL, C. DOBBE, D. PEREBOOM et A. SIPS (2003). Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 44, n° 3, p. 281–287.
- ORTH, D., K. GRIF, A. B. KHAN, A. NAIM, M. P. DIERICH et R. WÜRZNER (2007). The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin *in vitro* correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, vol. 59, n° 3, p. 235–242.
- O'TOOLE, P. W. et M. J. CLAEISSON (2010). Gut microbiota : changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *International Dairy Journal*, vol. 20, n° 4, p. 281–291.
- OUETHRANI, M., T. VAN DE WIELE, E. VERBEKE, A. BRUNEAU, M. CARVALHO, S. RABOT et V. CAMEL (2013). Metabolic fate of ochratoxin A as a coffee contaminant in a dynamic simulator of the human colon. *Food Chemistry*, vol. 141, n° 4, p. 3291–3300.
- PACHECO, A. R. et V. SPERANDIO (2012). Shiga toxin in enterohemorrhagic *E. coli* : regulation and novel anti-virulence strategies. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, vol. 2, n° 81, p. 1–12.
- PAL, A., K. INDIRESHKUMAR, W. SCHWIZER, B. ABRAHAMSSON, M. FRIED et J. G. BRASSEUR (2004). Gastric flow and mixing studied using computer simulation. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, vol. 271, n° 1557, p. 2587–2594.
- PANOS, G., G. BETSI et M. FALAGAS (2006). Systematic review : are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection? *Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 24, n° 5, p. 731–742.
- PARK, H., S. YEO, Y. JI, J. LEE, J. YANG, S. PARK, H. SHIN et W. HOLZAPFEL (2014). Autoinducer-2 associated inhibition by *Lactobacillus sakei* NR28 reduces virulence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control*, vol. 45, p. 62–69.
- PAYNE, A. N., C. CHASSARD, Y. BANZ et C. LACROIX (2012a). The composition and metabolic activity of child gut microbiota demonstrate differential adaptation to varied nutrient loads in an *in vitro* model of colonic fermentation. *FEMS microbiology ecology*, vol. 80, n° 3, p. 608–623.
- PAYNE, A. N., A. ZIHLER, C. CHASSARD et C. LACROIX (2012b). Advances and perspectives in *in vitro* human gut fermentation modeling. *Trends in biotechnology*, vol. 30, n° 1, p. 17–25.
- PECQUET, S., D. GUILLAUMIN, C. TANCREDE et A. ANDREMONT (1991). Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* elimination from the intestines of human volunteers and effect of this yeast on resistance to microbial colonization in gnotobiotic mice. *Applied and environmental microbiology*, vol. 57, n° 10, p. 3049–3051.
- PEI, Z., E. J. BINI, L. YANG, M. ZHOU, F. FRANCOIS et M. J. BLASER (2004). Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101, n° 12, p. 4250–4255.
- PENNER, R., R. N. FEDORAK et K. L. MADSEN (2005). Probiotics and nutraceuticals : non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. *Current opinion in pharmacology*, vol. 5, n° 6, p. 596–603.

- PERNA, N. T., G. F. MAYHEW, G. PÓSFAL, S. ELLIOTT, M. S. DONNENBERG, J. B. KAPER et F. R. BLATTNER (1998). Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and immunity*, vol. 66, n° 8, p. 3810–3817.
- PERNA, N. T., G. PLUNKETT, V. BURLAND, B. MAU, J. D. GLASNER, D. J. ROSE, G. F. MAYHEW, P. S. EVANS, J. GREGOR, H. A. KIRKPATRICK *et al.* (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*, vol. 409, n° 6819, p. 529–533.
- PERRIN, F., F. TENENHAUS-AZIZA, V. MICHEL, S. MISZCZYCHA, N. BEL et M. SANAA (2014). Quantitative Risk Assessment of Haemolytic and Uremic Syndrome Linked to O157:H7 and Non-O157:H7 Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* Strains in Raw Milk Soft Cheeses. *Risk Analysis*. in press.
- PETROF, E. (2009). Probiotics and Gastrointestinal Disease : Clinical Evidence and Basic Science. *Anti-inflammatory & anti-allergy agents in medicinal chemistry*, vol. 8, n° 3, p. 260–269.
- PHILLIPS, A., S. NAVABPOUR, S. HICKS, G. DOUGAN, T. WALLIS et G. FRANKEL (2000). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer’s patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut*, vol. 47, n° 3, p. 377–381.
- PIEPER, R., Q. ZHANG, D. J. CLARK, P. P. PARMAR, H. ALAMI, M.-J. SUH, S. KUNTUMALLA, J. C. BRAISTED, S.-T. HUANG et S. TZIPORI (2013). Proteomic View of Interactions of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* with the Intestinal Environment in Gnotobiotic Piglets. *PloS one*, vol. 8, n° 6, e66462.
- POLLET, A., V. VAN CRAEYVELD, T. VAN DE WIELE, W. VERSTRAETE, J. A. DELCOUR et C. M. COURTIN (2012). *In vitro* fermentation of arabinoxylan oligosaccharides and low molecular mass arabinoxylans with different structural properties from wheat (*Triticum aestivum* L.) bran and psyllium (*Plantago ovata* Forsk) seed husk. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 60, n° 4, p. 946–954.
- POLZIN, S., C. HUBER, E. EYLERT, I. ELSENHANS, W. EISENREICH et H. SCHMIDT (2013). Growth media simulating ileal and colonic environments affect the intracellular proteome and carbon fluxes of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *Applied and environmental microbiology*, vol. 79, n° 12, p. 3703–3715.
- POMPEI, A., L. CORDISCO, A. AMARETTI, S. ZANONI, S. RAIMONDI, D. MATTEUZZI et M. ROSSI (2007). Administration of folate-producing bifidobacteria enhances folate status in Wistar rats. *The Journal of nutrition*, vol. 137, n° 12, p. 2742–2746.
- POSSEMIERS, S., M. MARZORATI, W. VERSTRAETE et T. VAN DE WIELE (2010). Bacteria and chocolate : a successful combination for probiotic delivery. *International journal of food microbiology*, vol. 141, n° 1, p. 97–103.
- POSSEMIERS, S., I. PINHEIRO, A. VERHELST, P. VAN DEN ABBEELE, L. MAIGNIEN, D. LAUKENS, S. G. REEVES, L. E. ROBINSON, T. RAAS et Y.-J. SCHNEIDER (2013). A dried yeast fermentate selectively modulates both the luminal and mucosal gut microbiota and protects against inflammation, as studied in an integrated *in vitro* approach. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 61, n° 39, p. 9380–9392.

BIBLIOGRAPHIE

- PRADEL, N., C. DE CHAMPS, J. PALCOUX, J. SIROT, C. FORESTIER, B. JOLY, F. SCHEUTZ et V. LIVRELLI (2000a). Les infections à *Escherichia coli* producteurs de vérotoxines : étude de la prévalence chez l'enfant dans la région Auvergne. *Archives de pédiatrie*, vol. 7, S544–S550.
- PRADEL, N., Y. BERTIN, C. MARTIN et V. LIVRELLI (2008). Molecular analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France. *Applied and environmental microbiology*, vol. 74, n° 7, p. 2118–2128.
- PRADEL, N., V. LIVRELLI, C. DE CHAMPS, J.-B. PALCOUX, A. REYNAUD, F. SCHEUTZ, J. SIROT, B. JOLY et C. FORESTIER (2000b). Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38, n° 3, p. 1023–1031.
- PRAGER, R., A. FRUTH, U. BUSCH et E. TIETZE (2011). Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of Shiga toxin 2g and heat-stable enterotoxin ST1a encoding *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and environmental sources. *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 301, n° 3, p. 181–191.
- PREIDIS, G. A., C. HILL, R. L. GUERRANT, B. RAMAKRISHNA, G. W. TANNOCK et J. VERSALOVIC (2011). Probiotics, enteric and diarrheal diseases, and global health. *Gastroenterology*, vol. 140, n° 1, p. 8–14.
- PRESS, A., I. HAUPTMANN, L. HAUPTMANN, B. FUCHS, M. FUCHS, K. EWE et G. RAMADORI (1998). Gastrointestinal pH profiles in patients with inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 12, n° 7, p. 673–678.
- PROUTY, A., I. BRODSKY, J. MANOS, R. BELAS, S. FALKOW et J. GUNN (2004). Transcriptional regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes by bile. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, vol. 41, n° 2, p. 177–185.
- PSANI, M. et P. KOTZEKIDOU (2006). Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 22, n° 12, p. 1329–1336.
- PUHAR, A. et P. J. SANSONETTI (2014). Type III secretion system. *Current Biology*, vol. 24, n° 17, R784–R791.
- PUTAALA, H., H. MÄKIVUOKKO, K. TIIHONEN et N. RAUTONEN (2011). Simulated colon fiber metabolome regulates genes involved in cell cycle, apoptosis, and energy metabolism in human colon cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 357, n° 1-2, p. 235–245.
- PUTAALA, H., T. SALUSJÄRVI, M. NORDSTRÖM, M. SAARINEN, A. C. OUWEHAND, E. BECH HANSEN et N. RAUTONEN (2008). Effect of four probiotic strains and *Escherichia coli* O157:H7 on tight junction integrity and cyclo-oxygenase expression. *Research in microbiology*, vol. 159, n° 9, p. 692–698.
- QUIGLEY, L., O. O'SULLIVAN, C. STANTON, T. P. BERESFORD, R. P. ROSS, G. F. FITZGERALD et P. D. COTTER (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS microbiology reviews*, vol. 37, n° 5, p. 664–698.

- RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M., A. MAATHUIS, H. G. HEILIG, K. VENEMA, W. M. de VOS et H. SMIDT (2010). Evaluating the microbial diversity of an *in vitro* model of the human large intestine by phylogenetic microarray analysis. *Microbiology*, vol. 156, n° 11, p. 3270–3281.
- RANGEL, J. M., P. H. SPARLING, C. CROWE, P. M. GRIFFIN, D. L. SWERDLOW *et al.* (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157 : H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerging infectious diseases*, vol. 11, n° 4, p. 603–609.
- RASKO, D. A. et V. SPERANDIO (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 9, n° 2, p. 117–128.
- RASOOLY, R. et P. M. DO (2010). Shiga toxin Stx2 is heat-stable and not inactivated by pasteurization. *International journal of food microbiology*, vol. 136, n° 3, p. 290–294.
- RAUCH, M. et S. LYNCH (2012). The potential for probiotic manipulation of the gastrointestinal microbiome. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 23, n° 2, p. 192–201.
- REHMAN, A., F.-A. HEINSEN, M. E. KOENEN, K. VENEMA, H. KNECHT, S. HELLMIG, S. SCHREIBER et S. J. OTT (2012). Effects of probiotics and antibiotics on the intestinal homeostasis in a computer controlled model of the large intestine. *BMC microbiology*, vol. 12, n° 47, p. 1–10.
- REID, G., G. GIBSON, M. E. SANDERS, F. GUARNER et J. VERSALOVIC (2008). Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis. *The Lancet*, vol. 372, n° 9633, p. 112–113.
- REILLY, A. (1998). Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections : memorandum from a WHO meeting. WHO Consultation on Prevention and Control of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Infections. *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 76, n° 3, p. 245–255.
- REISSBRODT, R., W. P. HAMMES, F. DAL BELLO, R. PRAGER, A. FRUTH, K. HANTKE, A. RAKIN, M. STARCIC-ERJAVEC et P. H. WILLIAMS (2009). Inhibition of growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by nonpathogenic *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, vol. 290, n° 1, p. 62–69.
- RHOADES, J., G. DUFFY et K. KOUTSOUMANIS (2009). Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain : A review. *Food microbiology*, vol. 26, n° 4, p. 357–376.
- RIBNICKY, D. M., D. E. ROOPCHAND, A. OREN, M. GRACE, A. POULEV, M. A. LILA, R. HAVENAAR et I. RASKIN (2014). Effects of a high fat meal matrix and protein complexation on the bioaccessibility of blueberry anthocyanins using the TNO gastrointestinal model (TIM-1). *Food chemistry*, vol. 142, p. 349–357.
- RICHELLE, M., B. SANCHEZ, I. TAVAZZI, P. LAMBELET, K. BORTLIK et G. WILLIAMSON (2010). Lycopene isomerisation takes place within enterocytes during absorption in human subjects. *British Journal of Nutrition*, vol. 103, n° 12, p. 1800–1807.
- RIGOBELLO, E. C., F. A. ÁVILA et N. KARAPETKOV (2013). « Strategies to reduce the shedding of *Escherichia coli* (STEC) O157 : H7 and non-O157 : H7 using probiotics strains into animals ».

- Dans : *Microbial pathogens and strategies for combating them : science, technology and education*. Sous la dir. d'A. MÉNDEZ-VILAS. Formatex Research Center, p. 1324–1332.
- RILEY, L. W., R. S. REMIS, S. D. HELGERSON, H. B. MCGEE, J. G. WELLS, B. R. DAVIS, R. J. HEBERT, E. S. OLCOTT, L. M. JOHNSON, N. T. HARGRETT *et al.* (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*, vol. 308, n° 12, p. 681–685.
- RODE, T. M., A. HOLCK, L. AXELSSON, M. HØY et E. HEIR (2012). Shiga toxigenic *Escherichia coli* show strain dependent reductions under dry-fermented sausage production and post-processing conditions. *International journal of food microbiology*, vol. 155, n° 3, p. 227–233.
- RODES, L., A. PAUL, M. COUSSA-CHARLEY, H. AL-SALAMI, C. TOMARO-DUCHESNEAU, M. FAKHOURY et S. PRAKASH (2011). Transit time affects the community stability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in an *in vitro* model of human colonic microbiota. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, vol. 39, n° 6, p. 351–356.
- RODES, L., C. TOMARO-DUCHESNEAU, S. SAHA, A. PAUL, M. MALHOTRA, D. MARINESCU, W. SHAO, I. KAHOUALI et S. PRAKASH (2014). Enrichment of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 within the human gut microbiota using alginate-poly-l-lysine-alginate microencapsulation oral delivery system : an *in vitro* analysis using a computer-controlled dynamic human gastrointestinal model. *Journal of microencapsulation*, vol. 31, n° 3, p. 230–238.
- ROSE, D. J., K. VENEMA, A. KESHAVARZIAN et B. R. HAMAKER (2010). Starch-entrapped microspheres show a beneficial fermentation profile and decrease in potentially harmful bacteria during *in vitro* fermentation in faecal microbiota obtained from patients with inflammatory bowel disease. *British Journal of Nutrition*, vol. 103, n° 10, p. 1514–1524.
- ROTH, J., J. LAWRENCE et T. BOBIK (1996). Cobalamin (coenzyme B12) : synthesis and biological significance. *Annual Reviews in Microbiology*, vol. 50, n° 1, p. 137–181.
- RUIZ-MOYANO, S., A. MARTÍN, M. J. BENITO, E. ARANDA, R. CASQUETE et M. d. G. CÓRDOBA (2009). Safety and Functional Aspects of Preselected Enterococci for Probiotic Use in Iberian Dry-Fermented Sausages. *Journal of food science*, vol. 74, n° 7, p. M398–M404.
- RUND, S. A., H. ROHDE, U. SONNENBORN et T. A. OELSCHLAEGER (2013). Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104:H4 and O157:H7. *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 303, n° 1, p. 1–8.
- SAARINEN, M. (2002). Determination of biogenic amines as dansyl derivatives in intestinal digesta and feces by reversed phase HPLC. *Chromatographia*, vol. 55, n° 5-6, p. 297–300.
- SAGAYA, F., B. HACIN, G. TOMPA, A. IHAN, Š. ŠPELA, M. ČERNE, R. HURRELL, B. MATIJAŠIĆ, I. ROGELJ et G. VERGÈRES (2014). *Lactobacillus gasseri* K7 modulates the blood cell transcriptome of conventional mice infected with *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of applied microbiology*, vol. 116, n° 5, p. 1282–1296.
- SANCHEZ, J., M. MARZORATI, C. GROOTAERT, M. BARAN, V. VAN CRAEYVELD, C. COURTIN, W. BROEKAERT, J. DELCOUR, W. VERSTRAETE et T. VAN DE WIELE (2009). Arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) affect the protein/carbohydrate fermentation balance and microbial popu-

- lation dynamics of the Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem. *Microbial biotechnology*, vol. 2, n° 1, p. 101–113.
- SANDERS, M. E. (2008). Probiotics : definition, sources, selection, and uses. *Clinical infectious diseases*, vol. 46, n° Supplement 2, S58–S61.
- SANNASIDDAPPA, T. H., A. COSTABILE, G. R. GIBSON et S. R. CLARKE (2011). The influence of *Staphylococcus aureus* on gut microbial ecology in an *in vitro* continuous culture human colonic model system. *PloS one*, vol. 6, n° 8, e23227.
- SARBINI, S. R., S. KOLIDA, T. NAEYE, A. W. EINERHAND, G. R. GIBSON et R. A. RASTALL (2013). The prebiotic effect of α -1, 2 branched, low molecular weight dextran in the batch and continuous faecal fermentation system. *Journal of Functional Foods*, vol. 5, n° 4, p. 1938–1946.
- SAXTON, K., S. D. BAINES, J. FREEMAN, R. O’CONNOR et M. H. WILCOX (2009). Effects of exposure of *Clostridium difficile* PCR ribotypes 027 and 001 to fluoroquinolones in a human gut model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 53, n° 2, p. 412–420.
- SCHEIRING, J., A. ROSALES et L. B. ZIMMERHACKL (2010). Clinical practice : Today’s understanding of the haemolytic uraemic syndrome. *European journal of pediatrics*, vol. 169, n° 1, p. 7–13.
- SCHEUTZ, F., L. D. TEEL, L. BEUTIN, D. PIÉRARD, G. BUVENS, H. KARCH, A. MELLMANN, A. CAPPRIOLI, R. TOZZOLI, S. MORABITO *et al.* (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, vol. 50, n° 9, p. 2951–2963.
- SCHMIDT, B., I. E. MULDER, C. C. MUSK, R. I. AMINOV, M. LEWIS, C. R. STOKES, M. BAILEY, J. I. PROSSER, B. P. GILL, J. R. PLUSKE *et al.* (2011). Establishment of normal gut microbiota is compromised under excessive hygiene conditions. *PloS one*, vol. 6, n° 12, e28284.
- SCHÜLLER, S. (2011). Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium. *Toxins*, vol. 3, n° 6, p. 626–639.
- SCHÜLLER, S., R. HEUSCHKEL, F. TORRENTE, J. B. KAPER et A. D. PHILLIPS (2007). Shiga toxin binding in normal and inflamed human intestinal mucosa. *Microbes and infection*, vol. 9, n° 1, p. 35–39.
- SCOTT, K. P., S. W. GRATZ, P. O. SHERIDAN, H. J. FLINT et S. H. DUNCAN (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research*, vol. 69, n° 1, p. 52–60.
- SEGARRA-NEUNHAM, M. (2007). Probiotics for *Clostridium difficile*-associated diarrhea : focus on *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii*. *Annals of Pharmacotherapy*, vol. 41, n° 7-8, p. 1212–1221.
- SERNA IV, A. et E. C. BOEDEKER (2008). Pathogenesis and treatment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Current opinion in gastroenterology*, vol. 24, n° 1, p. 38–47.
- SHEN, Q., L. ZHAO et K. M. TUOHY (2012). High-level dietary fibre up-regulates colonic fermentation and relative abundance of saccharolytic bacteria within the human faecal microbiota *in vitro*. *European journal of nutrition*, vol. 51, n° 6, p. 693–705.

- SHERMAN, P. M., K. C. JOHNSON-HENRY, H. P. YEUNG, P. S. NGO, J. GOULET et T. A. TOMPKINS (2005). Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infection and immunity*, vol. 73, n° 8, p. 5183–5188.
- SHERWOOD, L. (2006). *Physiologie humaine : a human perspective*. De Boeck Supérieur.
- SHIGENO, T., T. AKAMATSU, K. FUJIMORI, Y. NAKATSUJI et A. NAGATA (2002). The clinical significance of colonoscopy in hemorrhagic colitis due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Endoscopy*, vol. 34, n° 04, p. 311–314.
- SHU, Q. et H. S. GILL (2001). A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *Medical microbiology and immunology*, vol. 189, n° 3, p. 147–152.
- SHU, Q. et H. S. GILL (2002). Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, vol. 34, n° 1, p. 59–64.
- SHULMAN, S. T., H. C. FRIEDMANN et R. H. SIMS (2007). Theodor Escherich : the first pediatric infectious diseases physician? *Clinical infectious diseases*, vol. 45, n° 8, p. 1025–1029.
- SICILIANO, S. D., B. LAIRD et C. LEMIEUX (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons are enriched but bioaccessibility reduced in brownfield soils adhered to human hands. *Chemosphere*, vol. 80, n° 9, p. 1101–1108.
- SIEGLER, R. L., T. G. OBRIG, T. J. PYSHER, V. L. TESH, N. D. DENKERS et F. B. TAYLOR (2003). Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Nephrology*, vol. 18, n° 2, p. 92–96.
- SILVERTHORN, D. U., W. C. OBER et J.-F. BRUN (2007). *Physiologie humaine : une approche intégrée*. Pearson Education France.
- SIVIERI, K., F. BIANCHI, M. A. ADORNO et E. A. ROSSI (2011). Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183. *Funct Foods Health and Dis*, vol. 10, p. 389–402.
- SIVIERI, K., M. L. VILLARREAL, M. A. ADORNO, I. K. SAKAMOTO, S. M. SAAD et E. A. ROSSI (2013). *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 improved gut health in the SHIME® reactor. *BMC gastroenterology*, vol. 13, n° 100, p. 1–9.
- SIVIGNON, A., A. de VALLÉE, N. BARNICH, J. DENIZOT, C. DARCHA, PIGNÈDE, P. VANDEKERCKOVE et A. DARFEUILLE-MICHAUD (2014). *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 prevents colitis induced by AIEC bacteria in the transgenic mouse model mimicking Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. in press.
- SMITH, J., P. FRATAMICO, N. GUNTHER et al. (2013). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Advances in applied microbiology*, vol. 86, p. 145–197.

- SPINLER, J. K., M. TAWEECHOTIPATR, C. L. ROGNERUD, C. N. OU, S. TUMWASORN et J. VERSALOVIC (2008). Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*, vol. 14, n° 3, p. 166–171.
- STIRRUP, V., S. LEDINGHAM, M. THOMAS, G. PYE et D. EVANS (1990). Redox potential measurement in the gastrointestinal-tract in man. *Gut*. T. 31. 10, A1171.
- STÖBER, H., E. MAIER et H. SCHMIDT (2010). Protective effects of Lactobacilli, Bifidobacteria and Staphylococci on the infection of cultured HT29 cells with different enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes are strain-specific. *International journal of food microbiology*, vol. 144, n° 1, p. 133–140.
- STOCK, I., M. RAHMAN, K. J. SHERWOOD et B. WIEDEMANN (2005). Natural antimicrobial susceptibility patterns and biochemical identification of *Escherichia albertii* and *Hafnia alvei* strains. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, vol. 51, n° 3, p. 151–163.
- STOLAKI, M. (2010). The human ileal microbiota and its function : development of a dynamic *in vitro* model for the human ileum. *2nd TNO Beneficial Microbes Conference*.
- SUN, J., X.-L. HU, G.-W. LE et Y.-H. SHI (2010a). Lactobacilli prevent hydroxy radical production and inhibit *Escherichia coli* and *Enterococcus* growth in system mimicking colon fermentation. *Letters in applied microbiology*, vol. 50, n° 3, p. 264–269.
- SUN, J., T.-T. ZHOU, G.-W. LE et Y.-H. SHI (2010b). Association of *Lactobacillus acidophilus* with mice Peyer's patches. *Nutrition*, vol. 26, n° 10, p. 1008–1013.
- SURAWICZ, C. M. et C. DAMMAN (2014). « The Role of Probiotics in Prevention and Treatment of GI Infections ». Dans : *Intestinal Microbiota in Health and Disease : Modern Concepts*. Sous la dir. d'E. J. SCHIFFRIN, P. MARTEAU et D. BRASSART. CRC Press, p. 165–178.
- SWIDSINSKI, A., V. LOENING-BAUCKE, S. KIRSCH et Y. DOERFFEL (2010). Functional biostructure of colonic microbiota (central fermenting area, germinal stock area and separating mucus layer) in healthy subjects and patients with diarrhea treated with *Saccharomyces boulardii*. *Gastroentérologie clinique et biologique*, vol. 34, S79–S92.
- SZYCH, J., T. WOLKOWICZ, R. LA RAGIONE et G. MADAJCZAK (2014). Impact of Antibiotics on the Intestinal Microbiota and on the Treatment of Shiga-toxin-Producing *Escherichia coli* and *Salmonella* Infections. *Current Pharmaceutical Design*, vol. 20, n° 28, p. 4535–4548.
- TABERNERO, M., K. VENEMA, A. J. MAATHUIS et F. D. SAURA-CALIXTO (2011). Metabolite production during *in vitro* colonic fermentation of dietary fiber : analysis and comparison of two European diets. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 59, n° 16, p. 8968–8975.
- TAHAMTAN, Y., M. KARGAR, N. NAMDAR, A. RAHIMIAN, M. HAYATI et M. NAMAVARI (2011). Probiotic inhibits the cytopathic effect induced by *Escherichia coli* O157:H7 in Vero cell line model. *Letters in applied microbiology*, vol. 52, n° 5, p. 527–531.
- TAKAHASHI, M., H. TAGUCHI, H. YAMAGUCHI, T. OSAKI, R. SAKAZAKI et S. KAMIYA (1999). Antagonistic interaction between *Clostridium butyricum* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.

- Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, vol. 73, n° 1, p. 7–14.
- TAKAHASHI, M., H. TAGUCHI, H. YAMAGUCHI, T. OSAKI, A. KOMATSU et S. KAMIYA (2004). The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, vol. 41, n° 3, p. 219–226.
- TANG, Y., H. KIM, A. K. SINGH, A. AROONNUAL, E. BAE, B. RAJWA, P. M. FRATAMICO et A. K. BHUNIA (2014). Light scattering sensor for direct identification of colonies of *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, O145 and O157. *PloS one*, vol. 9, n° 8, e105272.
- TANNER, S. A., A. Z. BERNER, E. RIGOZZI, F. GRATTEPANACHE, C. CHASSARD et C. LACROIX (2014). *In Vitro* Continuous Fermentation Model (PolyFermS) of the Swine Proximal Colon for Simultaneous Testing on the Same Gut Microbiota. *PloS one*, vol. 9, n° 4, e94123.
- TARR, P. I., C. A. GORDON et W. L. CHANDLER (2005). Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet*, vol. 365, n° 9464, p. 1073–1086.
- TARR, P. I., M. A. NEILL, C. R. CLAUSEN, S. L. WATKINS, D. L. CHRISTIE et R. O. HICKMAN (1990). *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome : importance of early cultures in establishing the etiology. *Journal of Infectious Diseases*, vol. 162, n° 2, p. 553–556.
- TATEWAKI, M., K. NAKAO, H. NOGAMI et J. ABE (2000). A subunit of Shiga toxin type 2 induces interleukine-12 expression from peripheral blood mononuclear cells via activated nuclear transcription factor κ B. *4th International Symposium and Workshop on "Shiga toxin producing Escherichia coli infections"*.
- TELLEZ, A., M. CORREDIG, A. GURI, R. ZANABRIA, M. W. GRIFFITHS et V. DELCENSERIE (2012). Bovine milk fat globule membrane affects virulence expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of dairy science*, vol. 95, n° 11, p. 6313–6319.
- TERPEND, K., S. POSSEMIERS, D. DAGUET et M. MARZORATI (2013). Arabinogalactan and fructooligosaccharides have a different fermentation profile in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). *Environmental Microbiology Reports*, vol. 5, n° 4, p. 595–603.
- THÉVENOT, J., L. ETIENNE-MESMIN, S. DENIS, S. CHALANCON, M. ALRIC, V. LIVRELLI et S. BLANQUET-DIOT (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 survival in an *in vitro* model of the human large intestine and interactions with probiotic yeasts and resident microbiota. *Applied and environmental microbiology*, vol. 79, n° 3, p. 1058–1064.
- TIAGO, F. C. P., F. S. MARTINS, E. SOUZA, P. PIMENTA, H. ARAUJO, I. M. CASTRO, R. L. BRANDÃO et J. R. NICOLI (2012). Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. *Journal of medical microbiology*, vol. 61, n° 9, p. 1194–1207.
- TIAGO, F. C. P., L. P. SOUSA, H. R. ARAÚJO, P. F. PIMENTA, C. A. BONJARDIM, J. R. NICOLI et M. M. TEIXEIRA (2013). Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as ones of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. *Microbes and Infection*, vol. 20, p. 1–10. in press.

- TOBE, T., N. NAKANISHI et N. SUGIMOTO (2011). Activation of motility by sensing short-chain fatty acids via two steps in a flagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, vol. 79, n° 3, p. 1016–1024.
- TOPPING, D. L. et P. M. CLIFTON (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function : roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews*, vol. 81, n° 3, p. 1031–1064.
- TORRES, A. G., X. ZHOU et J. B. KAPER (2005). Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infection and immunity*, vol. 73, n° 1, p. 18–29.
- TORRES-ESCRIBANO, S., S. DENIS, S. BLANQUET-DIOT, M. CALATAYUD, L. BARRIOS, D. VÉLEZ, M. ALRIC et R. MONTORO (2011). Comparison of a static and a dynamic *in vitro* model to estimate the bioaccessibility of As, Cd, Pb and Hg from food reference materials *Fucus* sp.(IAEA-140/TM) and Lobster hepatopancreas (TORT-2). *Science of the Total Environment*, vol. 409, n° 3, p. 604–611.
- TOSHIMA, H., A. YOSHIMURA, K. ARIKAWA, A. HIDAKA, J. OGASAWARA, A. HASE, H. MASAKI et Y. NISHIKAWA (2007). Enhancement of Shiga toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNase colicins. *Applied and environmental microbiology*, vol. 73, n° 23, p. 7582–7588.
- TRAN, S.-L., L. BILLOUD, S. B. LEWIS, A. D. PHILLIPS et S. SCHÜLLER (2014). Shiga toxin production and translocation during microaerobic human colonic infection with Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 and O104:H4. *Cellular microbiology*, vol. 16, n° 8, p. 1255–1266.
- TSAI, Y.-T., P.-C. CHENG et T.-M. PAN (2010). Immunomodulating activity of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-infected mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 58, n° 21, p. 11265–11272.
- TURKOVÁ, K., A. MAVRIČ, M. NARAT, B. RITTICH, A. ŠPANOVÁ, I. ROGELJ et B. B. MATIJAŠIĆ (2013). Evaluation of *Lactobacillus* strains for selected probiotic properties. *Folia microbiologica*, vol. 58, n° 4, p. 261–267.
- TYÖPÖNEN, S., E. PETÄJÄ et T. MATTILA-SANDHOLM (2003). Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 83, n° 3, p. 233–244.
- ULINSKI, T. (2013). Le syndrome hémolytique et urémique à STEC - Traitement et perspectives. *Journée Parisiennes de Pédiatrie*. T. 62. 1, p. 56–61.
- VALENTINE, S., D. W. EDDY et E. A. PALOMBO (2013). « Examination of the behaviour of bacterial pathogens in raw milk ». Dans : *Microbial pathogens and strategies for combating them : science, technology and education*. Sous la dir. d'A. MÉNDEZ-VILAS. Formatex Research Center, p. 1633–1638.
- VAN DE WIELE, T., C. M. GALLAWA, K. M. KUBACHK, J. T. CREED, N. BASTA, E. A. DAYTON, S. WHITACRE, G. DU LAING et K. BRADHAM (2010). Arsenic metabolism by human gut microbiota upon *in vitro* digestion of contaminated soils. *Environmental health perspectives*, vol. 118, n° 7, p. 1004–1009.
- VAN DEN ABBEELE, P., C. BELZER, M. GOOSSENS, M. KLEEREBEZEM, W. M. DE VOS, O. THAS, R. DE WEIRDT, F.-M. KERCKHOF et T. VAN DE WIELE (2012a). Butyrate-producing *Clostridium*

- cluster XIVa species specifically colonize mucins in an *in vitro* gut model. *The ISME journal*, vol. 7, n° 5, p. 949–961.
- VAN DEN ABEELE, P., C. GROOTAERT, M. MARZORATI, S. POSSEMIERS, W. VERSTRAETE, P. GÉRARD, S. RABOT, A. BRUNEAU, S. EL AIDY, M. DERRIEN *et al.* (2010). Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for *Bacteroidetes* and *Clostridium* cluster IX. *Applied and environmental microbiology*, vol. 76, n° 15, p. 5237–5246.
- VAN DEN ABEELE, P., C. GROOTAERT, S. POSSEMIERS, W. VERSTRAETE, K. VERBEKEN et T. VAN DE WIELE (2009). *In vitro* model to study the modulation of the mucin-adhered bacterial community. *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 83, n° 2, p. 349–359.
- VAN DEN ABEELE, P., S. ROOS, V. EECKHAUT, D. A. MACKENZIE, M. DERDE, W. VERSTRAETE, M. MARZORATI, S. POSSEMIERS, B. VANHOECKE, F. VAN IMMERSEEL *et al.* (2012b). Incorporating a mucosal environment in a dynamic gut model results in a more representative colonization by lactobacilli. *Microbial biotechnology*, vol. 5, n° 1, p. 106–115.
- VAN DEN ABEELE, P., K. VENEMA, T. VAN DE WIELE, W. VERSTRAETE et S. POSSEMIERS (2013). Different human gut models reveal the distinct fermentation patterns of arabinoxylan versus inulin. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 61, n° 41, p. 9819–9827.
- VAN DORSTEN, F., S. PETERS, G. GROSS, V. GOMEZ-ROLDAN, M. KLINKENBERG, R. DE VOS, E. VAUGHAN, J. VAN DUYNHOVEN, S. POSSEMIERS, T. VAN DE WIELE *et al.* (2012). Gut microbial metabolism of polyphenols from black tea and red wine/grape juice is source-specific and colon-region dependent. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 60, n° 45, p. 11331–11342.
- VAN LOO-BOUWMAN, C. A., T. H. NABER, M. MINEKUS, R. B. van BREEMEN, P. J. HULSHOF et G. SCHAAFSMA (2014). Food Matrix Effects on Bioaccessibility of β -Carotene can be Measured in an *In Vitro* Gastrointestinal Model. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 62, n° 4, p. 950–955.
- VAN WEY, A., A. COOKSON, N. ROY, W. MCNABB, T. SOBOLEVA, R. WIELICZKO et P. SHORTEN (2014). A mathematical model of the effect of pH and food matrix composition on fluid transport into foods : An application in gastric digestion and cheese brining. *Food Research International*, vol. 57, p. 34–43.
- VAN ZANTEN, G. C., A. KNUDSEN, H. RÖYTIÖ, S. FORSSTEN, M. LAWTHORP, A. BLENNOW, S. J. LAHTINEN, M. JAKOBSEN, B. SVENSSON et L. JESPERSEN (2012). The effect of selected synbiotics on microbial composition and short-chain fatty acid production in a model system of the human colon. *PloS one*, vol. 7, n° 10, e47212.
- VANHAECKE, L., C. GROOTAERT, W. VERSTRAETE et T. VAN DE WIELE (2009). Chemopreventive effects from prebiotic inulin towards microbial 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine bioactivation. *Journal of applied microbiology*, vol. 106, n° 2, p. 474–485.
- VANHOUTTE, T., V. DE PRETER, E. DE BRANDT, K. VERBEKE, J. SWINGS et G. HUYS (2006). Molecular monitoring of the fecal microbiota of healthy human subjects during administration of lactulose and *Saccharomyces boulardii*. *Applied and environmental microbiology*, vol. 72, n° 9, p. 5990–5997.

- VAREILLE, M., T. DE SABLET, T. HINDRÉ, C. MARTIN et A. P. GOBERT (2007). Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, n° 24, p. 10199–10204.
- VATIER, J., A. HARMAN, N. CASTELA, M. DROY-LEFAIX et R. FARINOTTI (1994). Interactions of cimetidine and ranitidine with aluminum-containing antacids and a clay-containing gastric-protective drug in an "artificial stomach-duodenum" model. *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 83, n° 7, p. 962–966.
- VENEMA, K. et P. VAN DEN ABBEELE (2013). Experimental models of the gut microbiome. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol. 27, n° 1, p. 115–126.
- VERDIER-METZ, I., G. GAGNE, S. BORNES, F. MONSALLIER, P. VEISSEIRE, C. DELBÈS-PAUS et M.-C. MONTEL (2012). Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Applied and environmental microbiology*, vol. 78, n° 2, p. 326–333.
- VERDIER-METZ, I., V. MICHEL, C. DELBES et M.-C. MONTEL (2009). Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food microbiology*, vol. 26, n° 3, p. 305–310.
- VERMEIREN, J., S. POSSEMIERS, M. MARZORATI et T. VAN DE WIELE (2011). « The gut microbiota as a target for innovative drug development : perspectives and a case study of inflammatory bowel diseases ». Dans : *Drug Development - A case study based insight into modern strategies*. Sous la dir. de C. RUNDFELDT. In-Tech, p. 437–468.
- VERMEIREN, J., T. VAN DE WIELE, G. VAN NIEUWENHUYSE, P. BOECKX, W. VERSTRAETE et N. BOON (2012a). Sulfide- and nitrite-dependent nitric oxide production in the intestinal tract. *Microbial Biotechnology*, vol. 5, n° 3, p. 379–387.
- VERMEIREN, J., T. VAN DE WIELE, W. VERSTRAETE, P. BOECKX et N. BOON (2009). Nitric oxide production by the human intestinal microbiota by dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2009, p. 1–10.
- VERMEIREN, J., P. VAN DEN ABBEELE, D. LAUKENS, L. K. VIGSNÆS, M. VOS, N. BOON et T. VAN DE WIELE (2012b). Decreased colonization of fecal *Clostridium coccoides*/*Eubacterium rectale* species from ulcerative colitis patients in an *in vitro* dynamic gut model with mucin environment. *FEMS microbiology ecology*, vol. 79, n° 3, p. 685–696.
- VERNOZY-ROZAND, C., M. MONTET, M. BERARDIN, C. BAVAI et L. BEUTIN (2005). Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France. *Letters in applied microbiology*, vol. 41, n° 3, p. 235–241.
- VIDOVIC, S. et D. R. KORBER (2014). *Escherichia coli* O157 : Insights into the adaptive stress physiology and the influence of stressors on epidemiology and ecology of this human pathogen. *Critical reviews in microbiology*, p. 1–11.
- VIGSNAES, L. K., P. VAN DEN ABBEELE, K. SULEK, H. L. FRANDBSEN, C. STEENHOLDT, J. BRYNSKOV, J. VERMEIREN, T. VAN DE WIELE et T. R. LICHT (2013). Microbiotas from UC patients display altered metabolism and reduced ability of LAB to colonize mucus. *Scientific reports* 3, vol. 1110, p. 1–10.

- WAGENER, S., K. SHANKAR, R. TURNOCK, G. LAMONT et C. BAILLIE (2004). Colonic transit time? what is normal? *Journal of pediatric surgery*, vol. 39, n° 2, p. 166–169.
- WALKER, A. W., S. H. DUNCAN, P. LOUIS et H. J. FLINT (2014). Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota. *Trends in microbiology*, vol. 22, n° 5, p. 267–274.
- WALTER, J. et R. LEY (2011). The human gut microbiome : ecology and recent evolutionary changes. *Annual review of microbiology*, vol. 65, p. 411–429.
- WANG, X., S. HEAZLEWOOD, D. KRAUSE et T. FLORIN (2003). Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *Journal of applied microbiology*, vol. 95, n° 3, p. 508–520.
- WEN, S. X., L. D. TEEL, N. A. JUDGE et A. D. O'BRIEN (2006). A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, n° 18, p. 7082–7087.
- WILLFORD, J., K. MILLS et L. D. GOODRIDGE (2009). Evaluation of three commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of Shiga toxin. *Journal of Food Protection*[®], vol. 72, n° 4, p. 741–747.
- WILSON, C. G. (2010). The transit of dosage forms through the colon. *International journal of pharmaceuticals*, vol. 395, n° 1, p. 17–25.
- WODA, A., A. MISHHELLANY-DUTOUR, L. BATIER, O. FRANCOIS, J. MEUNIER, B. REYNAUD, M. ALRIC et M. PEYRON (2010). Development and validation of a mastication simulator. *Journal of biomechanics*, vol. 43, n° 9, p. 1667–1673.
- WONG, A. R., J. S. PEARSON, M. D. BRIGHT, D. MUNERA, K. S. ROBINSON, S. F. LEE, G. FRANKEL et E. L. HARTLAND (2011). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* : even more subversive elements. *Molecular microbiology*, vol. 80, n° 6, p. 1420–1438.
- WONG, C. S., S. JELACIC, R. L. HABEEB, S. L. WATKINS et P. I. TARR (2000). The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *New England Journal of Medicine*, vol. 342, n° 26, p. 1930–1936.
- WORSÖE, J., L. FYNNE, T. GREGERSEN, V. SCHLAGETER, L. A. CHRISTENSEN, J. F. DAHLERUP, N. J. RIJKHOFF, S. LAURBERG et K. KROGH (2011). Gastric transit and small intestinal transit time and motility assessed by a magnet tracking system. *BMC gastroenterology*, vol. 11, n° 145, p. 1–10.
- WRAGG, J., M. CAVE, N. BASTA, E. BRANDON, S. CASTEEL, S. DENYS, C. GRON, A. OOMEN, K. REIMER, K. TACK *et al.* (2011). An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil. *Science of the Total Environment*, vol. 409, n° 19, p. 4016–4030.
- YAMASAKI, C., Y. NATORI, X.-T. ZENG, M. OHMURA, S. YAMASAKI, Y. TAKEDA et Y. NATORI (1999). Induction of cytokines in a human colon epithelial cell line by Shiga toxin 1 (Stx1) and Stx2 but not by non-toxic mutant Stx1 which lacks N-glycosidase activity. *FEBS letters*, vol. 442, n° 2, p. 231–234.

- YOSHIMURA, K., T. MATSUI et K. ITOH (2010). Prevention of *Escherichia coli* O157:H7 infection in gnotobiotic mice associated with *Bifidobacterium* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 97, n° 2, p. 107–117.
- YU, Y.-X., J.-L. LI, X.-Y. ZHANG, Z.-Q. YU, T. VAN DE WIELE, S.-Y. HAN, M.-H. WU, G.-Y. SHENG et J.-M. FU (2009). Assessment of the bioaccessibility of polybrominated diphenyl ethers in foods and the correlations of the bioaccessibility with nutrient contents. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 58, n° 1, p. 301–308.
- YUEN, K.-H. (2010). The transit of dosage forms through the small intestine. *International journal of pharmaceutics*, vol. 395, n° 1, p. 9–16.
- YVON, M., S. BEUCHER, P. SCANFF, S. THIROUIN et J. P. PELISSIER (1992). *In vitro* simulation of gastric digestion of milk proteins : comparison between *in vitro* and *in vivo* data. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 40, n° 2, p. 239–244.
- ZANELLO, G., M. BERRI, J. DUPONT, P.-Y. SIZARET, R. D'INCA, H. SALMON et F. MEURENS (2011). *Saccharomyces cerevisiae* modulates immune gene expressions and inhibits ETEC-mediated ERK1/2 and p38 signaling pathways in intestinal epithelial cells. *PLoS One*, vol. 6, n° 4, e18573.
- ZEILMAKER, M. J., M. I. BAKKER, R. SCHOTHORST et W. SLOB (2010). Risk assessment of N-nitrosodimethylamine formed endogenously after fish-with-vegetable meals. *Toxicological sciences*, vol. 116, n° 1, p. 323–335.
- ZEINHOM, M., A. M. TELLEZ, V. DELCENSERIE, A. EL-KHOLY, S. EL-SHINAWY et M. W. GRIFFITHS (2012). Yogurt containing bioactive molecules produced by *Lactobacillus acidophilus* La-5 exerts a protective effect against enterohemorrhagic *Escherichia coli* in mice. *Journal of Food Protection®*, vol. 75, n° 10, p. 1796–1805.
- ZHANG, X., A. D. MCDANIEL, L. E. WOLF, G. T. KEUSCH, M. K. WALDOR et D. W. ACHESON (2000). Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *Journal of Infectious Diseases*, vol. 181, n° 2, p. 664–670.
- ZHAO, B. et W. A. HOURLY (2010). Acid stress response in enteropathogenic gammaproteobacteria : an aptitude for survival. *Biochemistry and Cell Biology*, vol. 88, n° 2, p. 301–314.
- ZIHLER BERNER, A., S. FUENTES, A. DOSTAL, A. N. PAYNE, P. V. GUTIERREZ, C. CHASSARD, F. GRATTEPANACHE, W. M. de VOS et C. LACROIX (2013). Novel Polyfermentor Intestinal Model (PolyFermS) for Controlled Ecological Studies : Validation and Effect of pH. *PloS one*, vol. 8, n° 10, e77772.
- ZIHLER, A., M. GAGNON, C. CHASSARD, A. HEGLAND, M. J. STEVENS, C. P. BRAEGGER et C. LACROIX (2010). Unexpected consequences of administering bacteriocinogenic probiotic strains for *Salmonella* populations, revealed by an *in vitro* colonic model of the child gut. *Microbiology*, vol. 156, n° 11, p. 3342–3353.
- ZIHLER, A., M. GAGNON, C. CHASSARD et C. LACROIX (2011). Protective effect of probiotics on *Salmonella* infectivity assessed with combined *in vitro* gut fermentation-cellular models. *BMC microbiology*, vol. 11, n° 264, p. 1–13.

BIBLIOGRAPHIE

ZWEIFEL, C., N. GIEZENDANNER, S. CORTI, G. KRAUSE, L. BEUTIN, J. DANUSER et R. STEPHAN (2010). Characteristics of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Isolated from Swiss Raw Milk Cheese within a 3-Year Monitoring Program. *Journal of Food Protection*, vol. 73, n° 1, p. 88–91.

Annexe

Survival of pathogenic and lactobacilli species of fermented olives during simulation digestion

Arroyo López FN, Blanquet-Diot S, Denis S, Thévenot J, Chalancon S, Alric M, Rodriguez-Gómez F, Romero-Gil V, Díaz RJ, García PG, Garrido-Fernandez A (2014). Survival of pathogenic and lactobacilli species in fermented olives during simulated human digestion. *Frontiers in Microbiology*, vol. 5.



Survival of pathogenic and lactobacilli species of fermented olives during simulated human digestion

Francisco N. Arroyo-López^{1*}, Stéphanie Blanquet-Diot², Sylvain Denis², Jonathan Thévenot^{2,3}, Sandrine Chalancon², Monique Alric², Francisco Rodríguez-Gómez¹, Verónica Romero-Gil¹, Rufino Jiménez-Díaz¹ and Antonio Garrido-Fernández¹

¹ Biotecnología de Alimentos, Instituto de la Grasa – Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Seville, Spain

² Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, EA 4678, Conception Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament, Clermont Université – Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France

³ Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, M2iSH, UMR INSERM/Université d'Auvergne U1071 USC-INRA 2018, Clermont Université – Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France

Edited by:

Fabio Minervini, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Italy

Reviewed by:

Chrysoula C. Tassou, Hellenic Agricultural Organization "DEMETER," Greece

Zhao Chen, Clemson University, USA

*Correspondence:

Francisco N. Arroyo-López, Biotecnología de Alimentos, Instituto de la Grasa – Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Padre García, Tejero nº 4, 41012 Seville, Spain
e-mail: fnarroyo@cica.es

The present survey uses a dynamic gastric and small intestinal model to assess the survival of one pathogenic (*Escherichia coli* O157:H7 EDL 933) and three lactobacilli bacteria with probiotic potential (*Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. pentosus* TOMC-LAB2, and *L. pentosus* TOMC-LAB4) during their passage through the human gastrointestinal tract using fermented olives as the food matrix. The data showed that the survival of the *E. coli* strain in the stomach and duodenum was very low, while its transit through the distal parts (jejunum and ileum) resulted in an increase in the pathogen population. The production of Shiga toxins by this enterohemorrhagic microorganism in the ileal effluents of the *in vitro* system was too low to be detected by ELISA assays. On the contrary, the three lactobacilli species assayed showed a considerable resistance to the gastric digestion, but not to the intestinal one, which affected their survival, and was especially evident in the case of both *L. pentosus* strains. In spite of this, high population levels for all assayed microorganisms were recovered at the end of the gastrointestinal passage. The results obtained in the present study show the potential use of table olives as a vehicle of beneficial microorganisms to the human body, as well as the need for good hygienic practices on the part of olive manufacturers in order to avoid the possibility of contamination by food-borne pathogens.

Keywords: food carrier, lactobacilli, pathogen, probiotic, survival, Shiga toxins, table olives, TIM system

INTRODUCTION

Green Spanish-style table olives are considered ready-to-eat products which are directly consumed without any prior cooking, and often, without any pasteurization or sterilization treatment. This makes olives a splendid vehicle of microorganisms (beneficial or harmful) to the human body. Thereby, the analysis of the microbiota adhered to the fruits acquires a relevant importance, although, incomprehensibly, this point has received scarce attention by researchers. Fermented olives contain biofilm structures formed mainly by lactic acid bacteria (LAB) and yeasts, which can reach population levels up to $8 \log_{10}$ CFU g^{-1} in the epidermis of the fruits (Nychas et al., 2002; Arroyo-López et al., 2012; Domínguez-Manzano et al., 2012). Native LAB or yeast strains isolated from olive microbiota which show potential probiotic characteristics could be used as starters either to initiate fermentation or to obtain a functional product after adhesion to the fruits (Rodríguez-Gómez et al., 2013; Blana et al., 2014). To exert their health effect, microorganisms to be evaluated as probiotics should be able to survive the harsh conditions found in the human digestive tract such as acidic pH or high concentrations of digestive enzymes and bile salts.

Regarding safety issues, it is necessary to provide more knowledge about the behavior of pathogens in ready-to-eat fermented olives for future risk assessments. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* is a major food-borne pathogen that causes hemorrhagic colitis and a life-threatening sequelae, the hemolytic uremic syndrome (Pennington, 2010). The behavior of the enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 during olive processing (fermentation and packing) has been reported by several authors (Spyropoulou et al., 2001; Skandamis and Nychas, 2003; Argyri et al., 2013; Grounda et al., 2013) but there is hitherto no available information about the survival of this pathogen in the case of a hypothetical intake of contaminated olives. To cause human illness, *E. coli* O157:H7 should not only survive its passage through the gastrointestinal tract but also coordinate the expression of virulence genes especially that of encoding Shiga toxins (Foster, 2013).

Most of the available data on probiotic or pathogen survival in the human digestive tract has been obtained in static *in vitro* systems that are not representative of the continuously changing variable during the gastrointestinal transit. The TNO gastrointestinal tract model (TIM system, Zeist, Netherlands) is an alternative dynamic multi-compartmental *in vitro* system which currently allows the closest simulation of *in vivo* physiological processes

occurring within the stomach and small intestine of humans (Minekus et al., 1995; Guerra et al., 2012).

In this work, we used the TIM system to assess the survival and toxin production of an enterohemorrhagic *E. coli* strain inoculated in fermented olives during its transit through the upper human gastrointestinal tract. The survival of two potential probiotic strains isolated from table olives and belonging to *Lactobacillus pentosus* species (never studied before in dynamic digestive assays) was also evaluated and compared to that of a well-recognized probiotic microorganism (*L. rhamnosus* GG).

MATERIALS AND METHODS

OLIVES AND MICROORGANISMS

Fermented olives of the *Manzanilla* variety (*Olea europaea pomifolia*) were used in the present study. The fruits were previously fermented for two months according to the Spanish-style (Garrido-Fernández et al., 1997) and then pasteurized at 80°C for 15 min to avoid any microbial presence on the olive surface. Twenty-five grams of pasteurized olives were then homogenized with 250 mL of sterile water and independently inoculated with aerobic cultures of the reference strain *E. coli* O157:H7 EDL 933 (LB, 24 h, 37°C), the probiotic *L. rhamnosus* GG, and the olive isolates *L. pentosus* TOMC-LAB2 and *L. pentosus* TOMC-LAB4 (MRS broth, 24 h, 37°C) to reach a final population in the mix of 8.2, 9.1, 9.7, and 9.4 log₁₀ CFU, respectively. Except for the pathogen strain, these inoculation levels are similar for the lactic acid population usually present in 25 g of fermented olives. The two *L. pentosus* strains, originally isolated from Spanish-style table olive fermentations and belonging to the table olive microorganisms collection (TOMC) from Food Biotechnology Department of Instituto de la Grasa (CSIC-Seville), were selected because of their previously described probiotic characteristics (Bautista-Gallego et al., 2013) and good performance as starter in previous fermentation trials carried out at laboratory scale (Rodríguez-Gómez et al., 2013). **Table 1** shows the main physicochemical conditions of the fermented olives at the moment of introduction into the TIM system.

SIMULATED HUMAN DIGESTIVE CONDITIONS

The TIM system, which simulates the physiological processes occurring in the stomach, duodenum, jejunum, and ileum, was programmed to reproduce the digestion of a solid food matrix in a healthy human adult using the protocol described by Etienne-Mesmin et al. (2011). The total duration of the digestions was 300 min with $n = 2$ digestions for each different microorganism. The parameters used for *in vitro* digestion are described in **Table 2**. Samples were taken in the test meal (initial intake) after inoculation and before its introduction into the artificial stomach, and regularly collected during digestion in the different compartments of the system (stomach, duodenum, jejunum, and ileum) as well as in the cumulative ileal effluents (CIE). Microbial counting was performed on LB agar (for *E. coli*) or on MRS agar (for the lactobacilli strains; Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England). Because food and microorganisms are in continuous transit from one compartment to the next, in order to assess microbial survival rates in the TIM system, control digestions ($n = 2$) were carried out with the same protocol conditions used

for microorganisms, but with water containing only 0.8% (w/v) of blue dextran (Minekus et al., 1995). This compound is a non absorbable transit marker, which will represent a 100% survival percentage for bacteria. Thereby, curves below the transit marker will represent the mortality of the microorganism, while curves above the transit marker will be indicative of bacteria growth renewal.

DETERMINATION OF THE PRODUCTION OF SHIGA TOXINS BY THE *E. coli* STRAIN

Shiga toxins produced by *E. coli* O157:H7 EDL 933 in the ileal effluents of the TIM system were dosed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using the Ridascreen® Verotoxin kit (R-Biopharm, Darmstadt, Germany). Purified toxin Stx2 (Toxin Technology®, Sarasota, FL, USA) was used to establish standard calibration curves. Samples were diluted to half with the provided diluent and the dosage was made according to the manufacturer's instructions. Each digestive sample was analyzed in duplicate and serial dilutions of purified toxin were analyzed in triplicate.

STATISTICAL ANALYSIS

Significant differences among treatments ($p \leq 0.05$) were tested by analysis of variance (ANOVA) followed by a Fisher-LSD *post hoc* comparison test carried out with STATISTICA 7.0 software package (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, fermented olives were independently inoculated with a food-borne pathogen and three potential beneficial microorganisms in order to determine their survival during their passage through the upper gastrointestinal tract of humans and the pathogen's ability to produce toxins. So far, there is no information available on the survival of microorganisms through the different compartments of the human gastrointestinal tract using table olives as the food matrix. The only related study was carried out by Lavermicocca et al. (2005), who fed volunteers with olives inoculated with the human origin strain *L. paracasei* IMPC2.1. These authors were able to recover the mentioned microorganism from fecal samples, but they did not obtain information on its resistance to specific gastric and intestinal conditions.

The behavior of the major food borne pathogen *E. coli* O157:H7 (strain EDL 933) during its transit through the different compartments of the TIM system is shown in **Figure 1**. In the stomach and duodenum, its population decreased considerably, probably due to the occurrence of stringent conditions such as gastric acidity, digestive enzymes, or bile salts (Smith, 2003). The highest cell mortality was observed in the artificial stomach from 90 min onward, when the pH fell below 3 units (see **Table 2**). At this time, the population decreased by more than 2 log₁₀ CFU compared to the transit marker used as control, and no living cells were recovered from this compartment at 150 min. In the duodenum, at 180 min, around 3 log₁₀ CFU were lost compared to the marker.

On the contrary, in the distal parts of the artificial gastrointestinal tract (jejunum and ileum), *E. coli* O157:H7 resumption was observed especially at the end of digestion. Thereby, at time 300 min, the counts for bacteria even exceeded that of

Table 1 | Experimental design and physicochemical conditions of the fermented olives used in the present work as food matrix.

Reference for treatment	Inoculated microorganism	Attributed effects on human health	Physicochemical conditions of fermented olives*
Ec	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL 933	Enterohemorrhagic pathogen	pH = 4.1 Salt = 50.0 g/l
Lr	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Probiotic microorganism	Sugars ≤ 2.0 g/l
Lp2	<i>L. pentosus</i> LAB2	Potential probiotic strains	Phenolic compounds = 900 mg/kg
Lp4	<i>L. pentosus</i> LAB4	Isolated from table olives	

*Fruits had an average size of 4.06 ± 0.49 g and area surface of 10.93 ± 1.07 cm².

Table 2 | Parameters of gastrointestinal digestion in the TIM system when simulating digestive conditions of a healthy adult after intake of a solid food matrix.

Compartment	Vol (ml)	pH/time (min)	Secretion	t _{1/2} (min)	β coefficient
Stomach	300	2/0, 6/5, 5.7/15, 4.5/45, 2.9/90, 2.3/120, 1.8/240, 1.6/300	0.25 ml/min of pepsin (2080 IU/ml), 0.25 ml/min of lipase (250.5 IU/ml), 0.25 ml/min of HCl (1.5 M) if necessary.	85	1.8
Duodenum	30	Maintained at 6.0	0.5 ml/min of bile salts (4% during the first 30 min of digestion and then 2%), 0.25 ml/min of pancreatic juice (10 ³ USP/ml), 0.25 ml/min of intestinal electrolyte solution, 0.25 ml/min of NaHCO ₃ (1 M) if necessary, 23,600 IU of trypsin (at the beginning of digestion).		
Jejunum	130	Maintained at 6.9	0.25 ml/min of NaHCO ₃ (1 M) if necessary.		
Ileum	130	Maintained at 7.2	0.25 ml/min of NaHCO ₃ (1 M) if necessary.	250	2.5

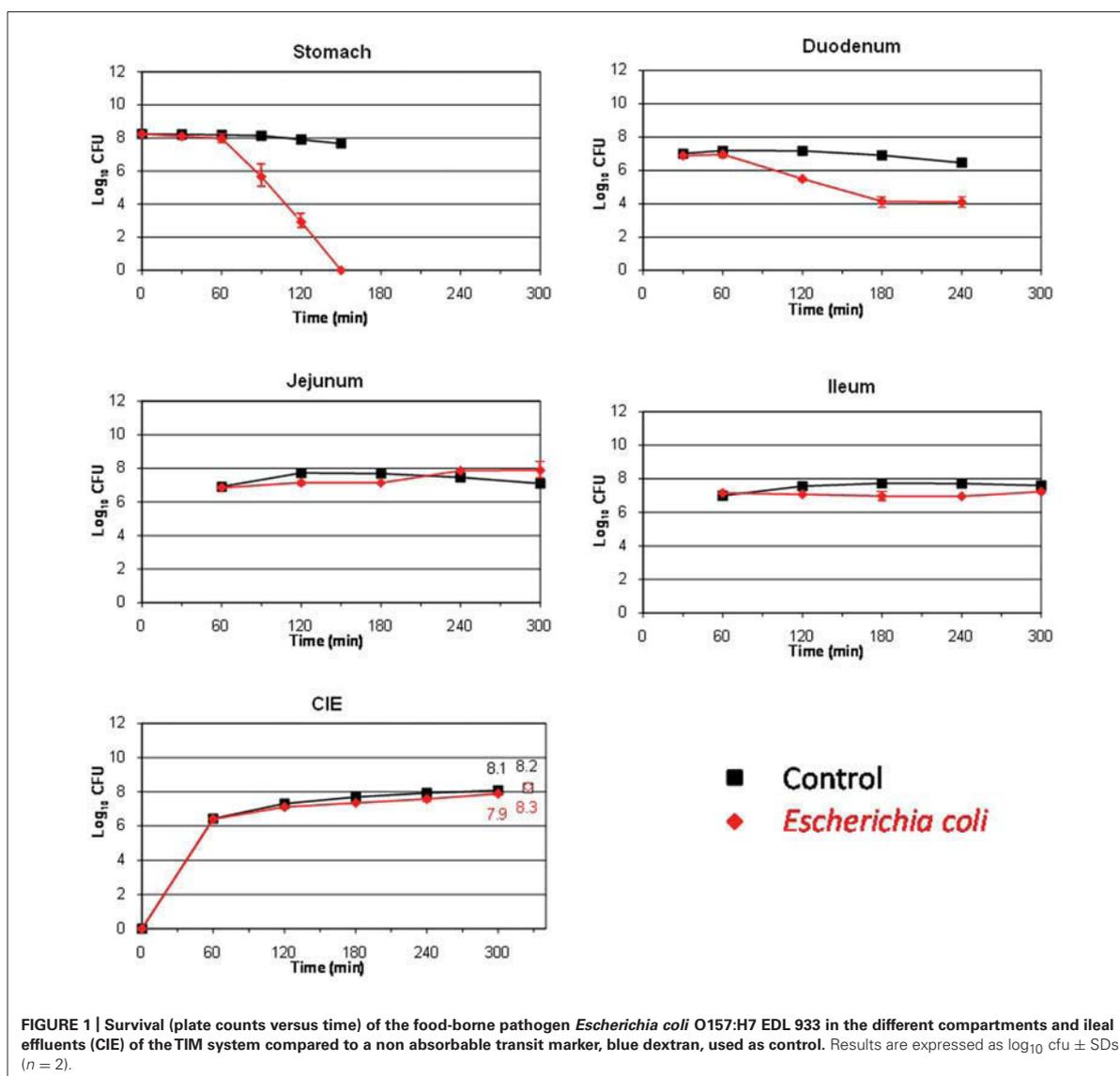
For each digestive compartment, the table gives the volume (initial volume for gastric compartment, maximal volume for intestinal compartments), the pH (depending on the time of digestion in the stomach), and the flow rates of digestive enzymes and bile salts. HCl and NaHCO₃ are added to the gastric and intestinal compartments, respectively, if the measured value of the pH deviates from the set point. The power exponential equation ($f = 1 - 2^{-t/t_{1/2}}$)^β, where f represents the fraction of meal delivered, t the time of delivery, $t_{1/2}$ half the time of delivery, and β a coefficient describing the shape of the curve) was used for the computer control of gastric and ileal deliveries into the TIM system. Parameters used for $t_{1/2}$ and β for gastric and ileal deliveries are mentioned in the table.

the transit marker, chiefly in the jejunum (increase of 0.5 log₁₀ CFU compared to the control marker). At 300 min, a high amount of viable cells were recovered from the ileal effluents, decreasing only by 0.2 log₁₀ CFU with respect to the blue dextran. Bacterial growth renewal has been previously observed in the distal compartments of the TIM system for other *E. coli* strains (Ganzle et al., 1999; Etienne-Mesmin et al., 2011; Miszczycha et al., 2014). This growth resumption was probably linked to less stringent environmental conditions, such as a pH closer to neutrality, lower concentrations of bile salts (owing to their passive reabsorption in the TIM system), and/or an increase in the residence time of bacteria. This event led to an increase in the number of bacteria which could potentially enter into the colon and may potentiate the harmfulness of the food-borne pathogen in the hypothetical case of an intake of contaminated olives.

Large variations in survival rates have been obtained for *E. coli* O157:H7 in diverse *in vitro* digestion assays (Arnold and Kaspar, 1995; Takumi et al., 2000; Foster, 2004; Tamplin, 2005; Etienne-Mesmin et al., 2011). This wide range of response may be explained by differences between culture conditions, digestive

systems (static or dynamic) and parameters, food matrices and also bacterial strains. Interestingly, the only studies that evaluated the behavior of *E. coli* O157:H7 in dynamic conditions gave survival rates after gastric digestion close to those obtained in the present work (Takumi et al., 2000; Etienne-Mesmin et al., 2011; Miszczycha et al., 2014). In table olive packing, this microorganism has shown also a considerable survival being present until 19th days of storage on olive fruits at low pH (4.2) and high salt concentration (60 g/l; Argyri et al., 2013).

Hitherto, there is no available data regarding the production (site and amount) of Shiga toxins by enterohemorrhagic *E. coli* strains during their transit through the human gastrointestinal tract. This study is the first to investigate toxin production by this food-borne pathogen in a human simulated digestive environment. Toxin levels in the ileal effluents of the TIM system were too low to be quantified by ELISA assays, which had a detection threshold value of 0.31 ng/ml (data not shown), indicating that under the tested conditions the pathogen was not able to produce Shiga toxins, its main virulence factor, at least at sufficient levels to be detected. It also suggests that toxin production, if it occurs, would rather



take place in the colon, which is already described as the main site of pathogenicity for EHEC strains (Shigeno et al., 2002).

This study also aims to assess the survival of two *L. pentosus* strains isolated from table olives for their use as putative probiotics. LAB species are well known for their ability to resist and live in many different acidified fermented vegetables, among them table olives (Hurtado et al., 2012). The *L. pentosus* strains assayed in this work were originally isolated from table olive fermentations, so, presumably, they should be well adapted to the acidic environment which governs this type of product. Figures 2 and 3 show the results obtained for the survival in the TIM system of *L. pentosus* TOMC-LAB2 and TOMC-LAB4,

respectively. Both bacteria showed a considerable resistance to gastric digestion with a slight decrease at time 150 min of less than 0.1 log₁₀ CFU with respect to the transit marker. However, their survival through the duodenum was considerably lower, especially evident in the case of the *L. pentosus* TOMC-LAB2 strain with a reduction of more than 3 log₁₀ CFU at 240 min. On the contrary, the survival of neither microorganism was affected by the conditions encountered in the distal parts of the gastrointestinal tract (jejunum and ileum). At 300 min, compared to the transit marker, the amount of bacteria recovered from the ileal effluents was reduced by 2.1 and 1.3 log₁₀ CFU for *L. pentosus* TOMC-LAB2 and TOMC-LAB4 strains, respectively.

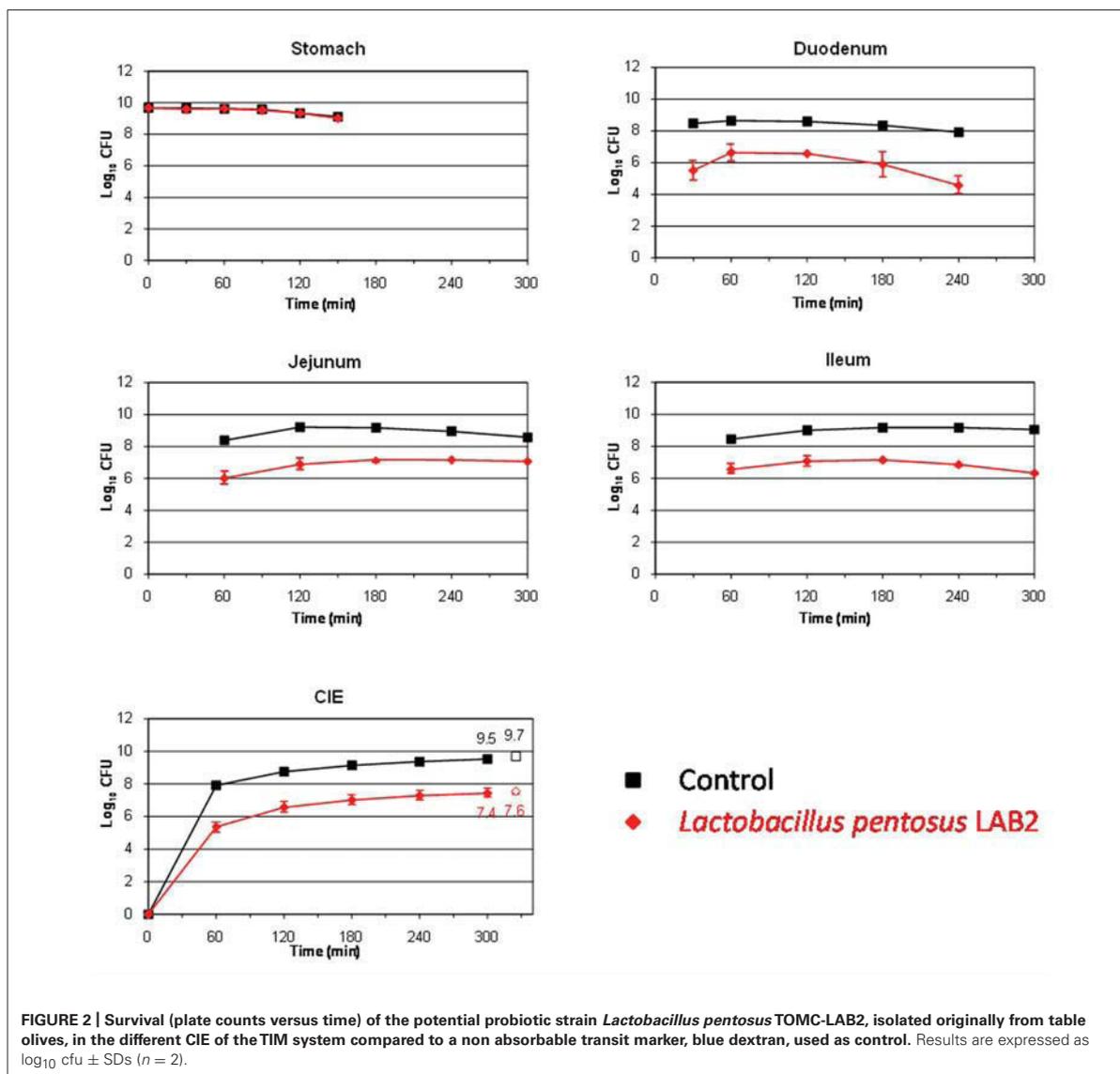


FIGURE 2 | Survival (plate counts versus time) of the potential probiotic strain *Lactobacillus pentosus* TOMC-LAB2, isolated originally from table olives, in the different CIE of the TIM system compared to a non absorbable transit marker, blue dextran, used as control. Results are expressed as \log_{10} cfu \pm SDs ($n = 2$).

To be effective and confer health benefits on the host, probiotics must be able to survive passage through the human stomach and small intestine and be present in sufficient number to colonize the colonic environment (Del Piano et al., 2006). The survival of the *L. pentosus* strains isolated from table olives was compared to that of the well-known probiotic *L. rhamnosus* GG (Figure 4). This microorganism was slightly affected during its transit through the stomach (only 0.1 \log_{10} CFU reduction at time 150 min). Pitino et al. (2012) also found a high resistance of this species to stomach digestion in a dynamic gastric model. On the contrary, the population decreased in higher proportions at the end of its transit through the duodenum ($\sim 1 \log_{10}$ CFU at time 240 min) and it seemed to be not affected by the conditions occurring in

the jejunum and ileum (no additional mortality was observed in either compartment). At 300 min, high levels for this LAB species were recovered from the ileal effluents, decreasing by only 0.3 \log_{10} CFU compared to the transit marker.

Table 3 shows the percentage of survival obtained for the four assayed bacteria after their transit through the different compartments of the TIM system as well as in the ileal effluents at the end of digestion. As can be clearly deduced even though *E. coli* O157:H7 is considered a highly acid resistant pathogen (Foster, 2004), this microorganism was the most affected bacteria by gastric digestion, with statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to lactobacilli strains. *L. rhamnosus* GG was the most resistant bacteria during its transit through duodenum, although without

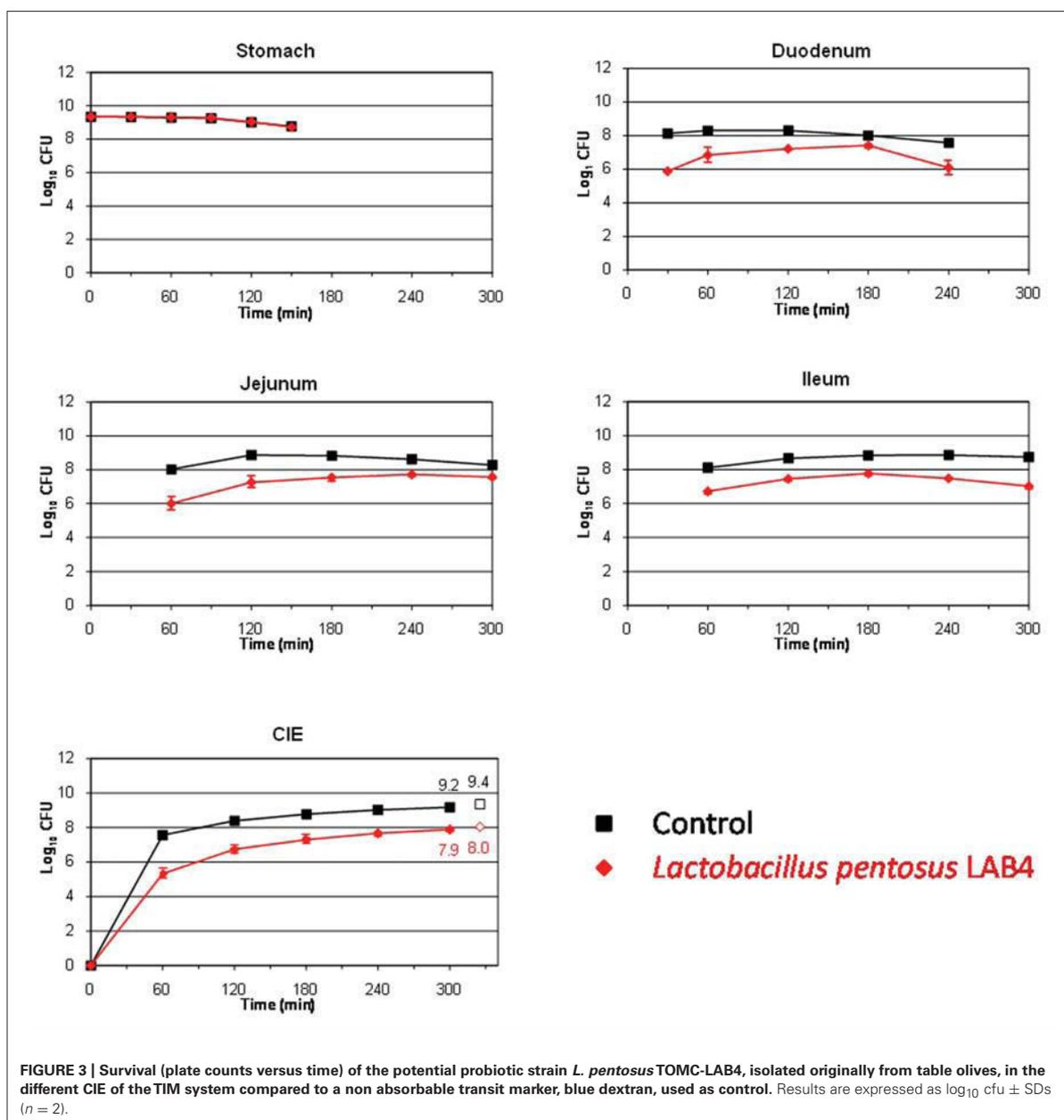


FIGURE 3 | Survival (plate counts versus time) of the potential probiotic strain *L. pentosus* TOMC-LAB4, isolated originally from table olives, in the different CIE of the TIM system compared to a non absorbable transit marker, blue dextran, used as control. Results are expressed as log₁₀ cfu ± SDs ($n = 2$).

significant differences according to a Fisher-LSD *post hoc* comparison test. This is in agreement with previous results obtained by Silva et al. (1987) and Pitino et al. (2012) who cataloged *L. rhamnosus* as an acid and bile-resistant species. Bile salts are described as toxic at high concentrations for bacterial cells by disorganizing the lipid bi-layer structure of the cellular membranes (Thanassi et al., 1997). This is presumably the reason why all assayed microorganisms reduced their population during their transit through the duodenum. On the contrary, the food-borne pathogen was the

most adapted microorganism in the distal parts of the gastrointestinal tract (jejunum and ileum), with significant differences ($p < 0.05$) compared to the lactobacilli species in the ileum. Thereby, after gastric and small intestinal transit, the survival rate was statistically higher for *E. coli* O157:H7 EDL 933 (117.5%) than for the rest of bacteria (from 0.7 to 40.5%), indicating that a higher percentage of the pathogen population could enter into the colon compared to the lactobacilli species in the case of a hypothetical intake of contaminated olives. *L. pentosus* TOMC-LAB2

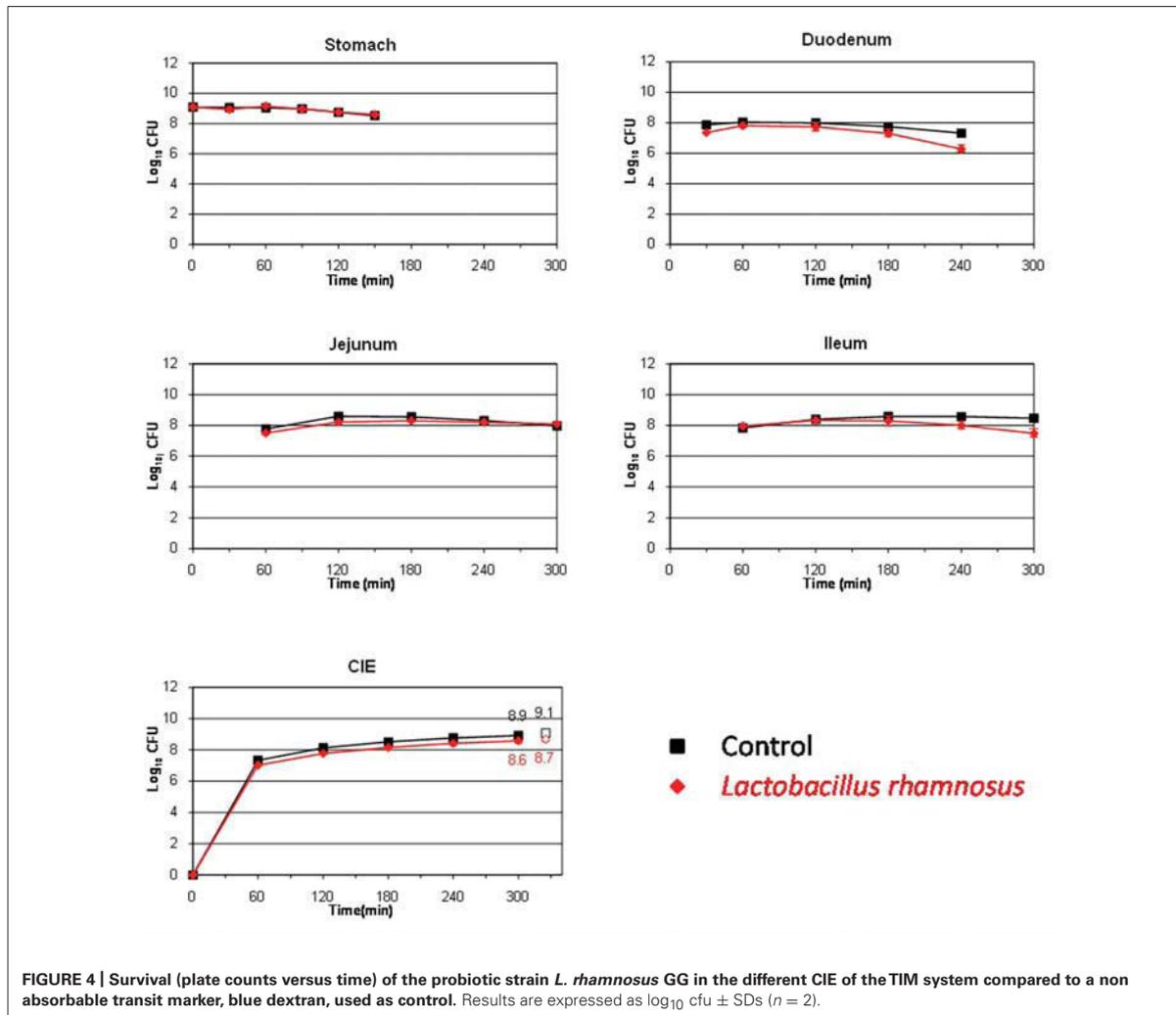


Table 3 | Survival (%) of the four tested strains at the end of *in vitro* digestions in the different compartments and ileal effluents (CIE) of the TIM system, using fermented *Manzanilla* olives as food matrix.

Microorganism	E ₁₅₀	D ₂₄₀	J ₃₀₀	I ₃₀₀	CIE ₃₀₀	TF ₃₂₅
<i>E. coli</i> O157:H7 EDL 933	0.00 (0.00) ^a	0.01 (0.00) ^a	11.55 (8.69) ^a	45.27 (4.45) ^a	45.45 (11.66) ^a	117.47 (26.68) ^a
<i>L. rhamnosus</i> GG	32.80 (3.47) ^c	0.16 (0.05) ^a	2.52 (0.01) ^a	10.97 (4.55) ^b	31.29 (5.91) ^a	40.48 (7.37) ^c
<i>L. pentosus</i> LAB2	18.13 (0.05) ^b	0.001 (0.001) ^a	0.05 (0.00) ^a	0.24 (0.02) ^c	0.55 (0.13) ^b	0.74 (0.14) ^b
<i>L. pentosus</i> LAB4	24.11 (5.22) ^{b,c}	0.07 (0.05) ^a	0.47 (0.06) ^a	1.69 (0.66) ^c	3.47 (1.03) ^b	4.91 (1.04) ^{b,c}

E₁₅₀, D₂₄₀, J₃₀₀ and I₃₀₀ stands for instantaneous percentages in the stomach (150 min), duodenum (240 min), jejunum (300 min), and ileum (300 min), respectively. CIE₃₀₀ and TF₃₂₅ stands for cumulative percentages from ileal effluents (0–300 min) and cumulative percentages from ileal effluents (0–300 min) plus final gastrointestinal residue, respectively. SD in parentheses. Values followed by different superscript letters, within the same column, are significantly different ($p < 0.05$) according to a Fisher-LSD post hoc comparison test.

and TOMC-LAB4 have already shown promising probiotic characteristics (Bautista-Gallego et al., 2013) as well as a considerable capacity for adhesion to the olive epidermis (Arroyo-López et al.,

2012). Population levels higher than 7.5 log₁₀ CFU were recovered for both strains after their transit through the artificial ileum and before entering into the colon (survival percentages of 0.6

and 3.5% for *L. pentosus* TOMC-LAB2 and TOMC-LAB4, respectively), compared to 8.5 log₁₀ CFU obtained for *L. rhamnosus* GG (survival percentage of 31.3%). This makes them good candidates for use as probiotic agents, which could increase the functional value of table olives.

CONCLUSION

In summary, these results encourage further research on the development of table olives as a functional food, because, apparently, it is a good vehicle of microorganisms to the human body. Nevertheless, at the same time, they also show the necessity of good hygienic practices by olive manufacturers to avoid any possibility of intake of EHEC-contaminated olives, even though, apparently, the pathogen was not able to produce toxins during its transit through the upper human gastrointestinal tract following olive intake.

ACKNOWLEDGMENTS

The research leading to these results has received funding from the EU's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 243471 (PROBIOLIVES). Francisco N. Arroyo-López wish to express his gratitude to the Spanish Government for his Ramón y Cajal postdoctoral research contract, as well as CSIC for financial support of the research mobility program in foreign countries (A12012PM2-PA1003309). Verónica Romero-Gil thanks to the Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3) for her predoctoral fellowship (program of formation of Ph.D. in companies).

REFERENCES

- Argyri, A. A., Lyra, E., Panagou, E. Z., and Tassou, C. C. (2013). Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes* during storage of fermented green table olives in brine. *Food Microbiol.* 36, 1–6. doi: 10.1016/j.fm.2013.04.001
- Arnold, K. W., and Kaspar, C. W. (1995). Starvation and stationary-phase induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2037–2039.
- Arroyo-López, F. N., Bautista-Gallego, J., Domínguez-Manzano, J., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., García-García, P., et al. (2012). Formation of lactic acid bacteria-yeasts communities on the olive surface during Spanish-style *Manzanilla* fermentations. *Food Microbiol.* 32, 295–301. doi: 10.1016/j.fm.2012.07.003
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Rantsiou, K., Jiménez Díaz, R., Garrido Fernández, A., and Coccolin, L. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Res. Int.* 50, 135–142. doi: 10.1016/j.foodres.2012.10.004
- Blana, V. A., Grounta, A., Tassou, C. C., Nychas, G. J., and Panagou, E. Z. (2014). Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives. *Food Microbiol.* 38, 208–218. doi: 10.1016/j.fm.2013.09.007
- Del Piano, M., Morelli, L., Strozzi, G. P., Allesina, S., Barba, M., Deidda, F., et al. (2006). Probiotics: from research to consumer. *Dig. Liver Dis.* 38, 248–255. doi: 10.1016/S1590-8658(07)60004-8
- Domínguez-Manzano, J., León-Romero, Á., Olmo-Ruiz, C., Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Garrido-Fernández, A., et al. (2012). Biofilm formation on abiotic and biotic surfaces during Spanish style green table olive fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 230–238. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.011
- Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Privat, M., Denis, S., Cardot, J. M., Alric, M., et al. (2011). Effect of a new probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1127–1131. doi: 10.1128/AEM.02130-10
- Foster, D. B. (2013). Modulation of the enterohemorrhagic *E. coli* virulence program through the human gastrointestinal tract. *Virulence* 4, 315–323. doi: 10.4161/viru.24318
- Foster, J. W. (2004). *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 898–907. doi: 10.1038/nrmicro1021
- Ganzle, M. G., Hertel, C., Van der Vossen, J. M., and Hammes, W. P. (1999). Effect of bacteriocin-producing *Lactobacilli* on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *Int. J. Food Microbiol.* 48, 21–35. doi: 10.1016/S0168-1605(99)00025-2
- Garrido-Fernández, A., Fernández Diez, M. J., and Adams, R. M. (1997). *Table Olives. Production and Processing*. London: Chapman & Halls. doi: 10.1007/978-1-4899-4683-6
- Grounda, A., Nychas, G. J. E., and Panagou, E. Z. (2013). Survival of foodborne pathogens on natural black table olives after post-processing contamination. *Int. J. Food Microbiol.* 161, 197–202. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.017
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., and Alric, M. (2012). Relevance and challenges of in vitro gastrointestinal models in simulating human digestion. *Trends Biotechnol.* 30, 591–600. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.08.001
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., and Rozès, N. (2012). Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiol.* 31, 1–8. doi: 10.1016/j.fm.2012.01.006
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Lisa Lonigro, S., De Angelis, M., Morelli, L., Callegari, M. L., et al. (2005). Study of adhesion and survival of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4233–4240. doi: 10.1128/AEM.71.8.4233-4240.2005
- Minikus, M., Marteau, P., Havenaar, R., and Huis in't Veild, J. H. (1995). A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *ATLA* 23, 197–209.
- Miszczucha, S. D., Thévenot, J., Denis, S., Callon, C., Livrelli, V., Alric, M., et al. (2014). Survival of *Escherichia coli* O26:H11 exceeds that of *Escherichia coli* O157:H7 as assessed by simulated human digestion of contaminated raw milk cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 172, 40–48. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.029
- Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., Parker, M. L., Waldron, K. W., and Tassou, C. C. (2002). Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Let. Appl. Microbiol.* 34, 173–177. doi: 10.1046/j.1472-765x.2002.01077.x
- Pennington, H. (2010). *Escherichia coli* O157. *Lancet* 376, 1428–1435. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60963-4
- Pitino, I., Randazzo, C. L., Cross, K. L., Parker, M. L., Bisignano, C., Wickham, M. S. J., et al. (2012). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains inoculated in cheese matrix during simulated human digestion. *Food Microbiol.* 31, 57–63. doi: 10.1016/j.fm.2012.02.013
- Rodríguez-Gómez, F., Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Romero-Gil, V., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., et al. (2013). Table olive fermentation with multifunctional *Lactobacillus pentosus* strains. *Food Control* 34, 96–105. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.04.010
- Shigeno, T., Akamatsu, T., Fujimori, K., Nakatsuji, Y., and Nagata, A. (2002). The clinical significance of colonoscopy in hemorrhagic colitis due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Endoscopy* 34, 311–314. doi: 10.1055/s-2002-23644
- Silva, M., Jacobus, N. V., Deneke, C., and Gorbach, S. L. (1987). Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 1231–1233. doi: 10.1128/AAC.31.8.1231
- Skandamis, P. N., and Nychas, G. J. E. (2003). Modeling the microbial interaction and the death of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation of Spanish style green table olives. *J. Food Prot.* 66, 1166–1175.
- Smith, J. L. (2003). The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *J. Food Prot.* 66, 1292–1303.
- Spyropoulou, K. E., Chorianopoulos, N. G., Skandamis, P. N., and Nychas, G. J. E. (2001). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation of Spanish-style green table olives (Conservolea variety) supplemented with different carbon sources. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 3–11. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00510-9
- Takumi, K., De Jonge, R., and Havelaar, A. (2000). Modelling inactivation of *Escherichia coli* by low pH: application to passage through the stomach of

young and elderly people. *J. Appl. Microbiol.* 89, 935–943. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.01193.x

Tamplin, M. L. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in simulated human gastric fluid. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 320–325. doi: 10.1128/AEM.71.1.320-325.2005

Thanassi, D., Cheng, G. W. L., and Nikaido, H. (1997). Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179, 2512–2518.

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.

Received: 23 July 2014; paper pending published: 26 August 2014; accepted: 29 September 2014; published online: 14 October 2014.

Citation: Arroyo-López FN, Blanquet-Diot S, Denis S, Thévenot J, Chalancon S, Alric M, Rodríguez-Gómez F, Romero-Gil V, Jiménez-Díaz R and Garrido-Fernández A (2014) Survival of pathogenic and lactobacilli species of fermented olives during simulated human digestion. *Front. Microbiol.* 5:540. doi: 10.3389/fmicb.2014.00540
This article was submitted to Food Microbiology, a section of the journal *Frontiers in Microbiology*.

Copyright © 2014 Arroyo-López, Blanquet-Diot, Denis, Thévenot, Chalancon, Alric, Rodríguez-Gómez, Romero-Gil, Jiménez-Díaz and Garrido-Fernández. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont des pathogènes zoonotiques responsables de toxi-infections alimentaires pouvant évoluer vers des atteintes potentiellement mortelles chez l'Homme. La survie des EHEC et l'expression des gènes de virulence dans l'environnement digestif humain sont des facteurs essentiels dans la physiopathologie de ces infections mais sont mal connus, essentiellement par manque de modèles d'études adaptés. L'absence de traitement spécifique a conduit à s'intéresser à des moyens préventifs et/ou curatifs alternatifs, comme l'utilisation de probiotiques. L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier le comportement de souches EHEC dans l'ensemble du tractus digestif et l'influence de souches probiotiques, en utilisant des approches *in vitro* et *in vivo* complémentaires.

In vitro, dans le tractus gastro-intestinal supérieur, on observe une mortalité bactérienne dans l'estomac, suivie d'une reprise de croissance dans les parties distales de l'intestin grêle. De plus, la survie des EHEC dépend à la fois de la souche/sérotype étudié et de la matrice alimentaire dans laquelle les bactéries sont ingérées. En conditions coliques humaines simulées, les EHEC sont progressivement éliminés du milieu colique et leurs principaux gènes de virulence (*stx1* codant la Shiga-toxine 1 et *eae* codant l'intimine) sont surexprimés dans les heures suivant l'inoculation du pathogène. L'ajout de levures probiotiques du genre *Saccharomyces* ne modifie pas la survie du pathogène dans l'environnement colique, que celles-ci soient administrées en traitement « curatif » ou « prophylactique ». Par contre, l'administration de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 permet (i) de moduler favorablement l'activité fermentaire du microbiote intestinal, en augmentant la production d'acétate et en réduisant celle du butyrate et (ii) de diminuer significativement l'expression de *stx1*. Par ailleurs, l'effet du pathogène et des probiotiques sur le microbiote colique est individu dépendant, confortant l'hypothèse que des facteurs associés à l'hôte, comme le microbiote, pourraient conditionner l'évolution clinique des infections à EHEC et l'efficacité d'une stratégie probiotique. Enfin, dans un modèle murin d'anses iléales, l'administration préventive de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 limite significativement l'interaction d'O157:H7 avec les plaques de Peyer et les lésions hémorragiques associées.

Ces résultats confirment donc l'intérêt d'une stratégie probiotique dans le contrôle des infections à EHEC. Une étude plus approfondie du transcriptome du pathogène dans l'environnement digestif humain, en présence ou non de probiotiques, permettrait de mieux comprendre la physiopathologie des infections à EHEC et les mécanismes associés à l'effet antagoniste des probiotiques.

The enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are zoonotic pathogens that cause food-borne infection with which leads to life-threatening damage in humans. EHEC survival and expression of virulence genes in the human digestive track are key factors in the pathogenesis of these infections, but little is known, mainly due to lack of appropriate study models. The absence of specific treatment has led to an interest in preventive and/or alternative measures healing, such as the use of probiotics. The objective of this study is the behavior of EHEC strains in the entire digestive tract and the influence of probiotic strains, using *in vitro* and *in vivo* complementary approaches.

In vitro, in the upper gastrointestinal tract, a bacterial mortality was observed in the stomach, followed by a bacterial resumption in the distal segment of the small intestine. Moreover, survival depends on both the EHEC strain/serotype studied and the food matrix in which the bacteria are ingested. In simulated human colon conditions, EHEC was progressively eliminated from the bioreactor and the major virulence genes (*stx1* encoding Shiga-toxin 1 and *eae* encoding intimin) are overexpressed in the hours following the inoculation of pathogen. Probiotic yeasts *Saccharomyces* genus does not modify the survival of the pathogen in the *in vitro* colonic environment, that they be administered in treatment "curative" or "prophylactic". Still, the administration of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 allows (i) to favorably modulate fermentation activity of the intestinal microbiota, by increasing the production of acetate and reducing that of butyrate and (ii) reduce significantly the expression of *stx1*. Furthermore, the effect of pathogenic and probiotic on colonic microbiota is donor-dependent, supporting the hypothesis that factors associated with the host, as the microbiota could condition the clinical course of EHEC and efficiency a probiotic strategy. Finally, in a murine model of ileal loops, preventive administration of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 significantly limits the interaction of O157:H7 with the Peyer's patches and results hemorrhagic lesions.

These results confirms the interest of probiotic strategy in controlling EHEC infections. Further transcriptome studies are warranted for the pathogen in the human digestive environment, with or without probiotics for the better understanding of the pathophysiology of EHEC and so on the mechanisms involved in the antagonistic effect of probiotics.