

Microbiologie et maladies infectieuses

M. Philippe SANSONETTI, professeur

ENSEIGNEMENT

Cette chaire veut offrir une vision renouvelée de la microbiologie et des maladies infectieuses en présentant les travaux les plus fondamentaux en microbiologie, le cœur de la discipline, ainsi que sur ses interfaces, particulièrement avec la biologie cellulaire et l'immunologie. Ces « collisions de disciplines » sont très fécondes de découvertes originales. Sur ce socle fondamental, sont présentés les développements récents concernant les maladies infectieuses : mécanismes physiopathologiques et immunopathologiques, applications dans le domaine du diagnostic, de l'épidémiologie, de la thérapeutique et de la prévention, en particulier vaccinale.

Cependant, après quatre années de cours largement dédiés à l'analyse moléculaire et cellulaire des processus de pathogénicité et de symbiose microbe-hôte que j'avais annoncées dans ma leçon inaugurale en novembre 2008, j'ai ressenti le besoin de prendre un peu de recul sur mes thématiques classiques de « microbiologie cellulaire » et de faire pour l'année 2012-2013 un cours centré sur le thème de *l'inégalité devant les maladies infectieuses*^a.

En cette année 2012, tricentenaire de la naissance de Jean-Jacques Rousseau, il m'a semblé qu'une citation de ce maître de la multidisciplinarité (écrivain, philosophe, moraliste et musicien) s'appliquait parfaitement à l'esprit de ce cours :

Vous oubliez que les fruits sont à tous et que la terre n'est à personne
Jean-Jacques Rousseau, Discours sur l'inégalité

J'ai privilégié dans ce concept les inégalités socio-économiques, bien sûr, premières pourvoyeuses de maladies infectieuses et parasitaires, particulièrement dans les régions sous-développées qui subissent plus de 95 % de la prévalence de ces maladies avec une victime notoire : l'enfant. Je n'ai cependant pas oublié la génétique car dans

a. Les enregistrements audio et vidéo des cours et séminaires sont disponibles sur le site Internet du Collège de France : <http://www.college-de-france.fr/site/philippe-sansonetti/course-2012-2013.htm> et <http://www.college-de-france.fr/site/philippe-sansonetti/seminar-2012-2013.htm> [Ndlr].

ce domaine nous ne sommes pas égaux devant le risque, même si les bases génétiques de la sensibilité individuelle aux grandes maladies infectieuses endémiques comme le sida, la tuberculose et le paludisme sont complexes et multigéniques, laissant bien loin l'espoir du « Saint Graal », c'est à dire d'un gène, d'une mutation, ou d'un polymorphisme unique expliquant une telle sensibilité. J'ai aussi envisagé un aspect essentiel de l'inégalité devant les maladies infectieuses : l'âge. Pourquoi les très jeunes enfants et les personnes très âgées sont-elles plus sensibles aux maladies infectieuses et plus résistantes à certains vaccins ? Chaque cours a été illustré par un, voire deux séminaires donnés par des experts internationaux du domaine. Ce cours s'est conclu par un symposium international en anglais, co-organisé avec Frédéric Keck (Chaire d'Anthropologie de la nature, Collège de France), intitulé : « *Zoonoses and emergence of new infectious diseases : biology meets anthropology* ».

Cours 1 : Les maladies infectieuses de la pauvreté, l'enfant en première ligne : infections entériques et infections respiratoires aiguës

12 décembre 2012

Au-delà des notions classiques de la prédominance de la prévalence des maladies infectieuses et parasitaires dans la population pédiatrique qui y paie le plus lourd tribut en terme de morbidité et de mortalité (10 des 17 millions des décès annuels dus aux maladies infectieuses surviennent chez des enfants dans les régions les plus défavorisées de la planète), des aspects médicaux, épidémiologiques, socio-économiques, sont largement ignorés et leur reconnaissance devrait considérablement modifier la prise en charge de l'infection pédiatrique en régions endémiques. J'ai voulu insister sur un certain nombre d'exemples caractéristiques. (1) Si l'on considère l'étiologie des maladies infectieuses pédiatriques non sous l'angle de pathogènes individuels (bacille tuberculeux, paludisme, VIH), ce sont les diarrhées aiguës et chroniques et les infections respiratoires aiguës qui prennent la tête. Cette observation devrait avoir un impact majeur sur les stratégies de diagnostic, de traitement et de prévention. (2) Mortalité et morbidité ne reflètent que très partiellement l'impact en santé publique des infections pédiatriques si l'on ne fait pas appel à des paramètres plus globaux comme le DALY (*Disability-Adjusted Life Years*) qui permettent d'en mesurer le véritable impact sociétal et économique. (3) La qualité de la gouvernance, en particulier un leadership pertinent de la part des chefs d'états est essentielle au contrôle de la dissémination de pandémies comme le sida. (4) Des efforts redoublés devraient être dédiés à la recherche et aux efforts partenariaux de prise en charge de campagnes de contrôle voire d'éradication des infections tropicales négligées dans les régions d'endémie.

Séminaire 1 : Le projet d'éradication des maladies infectieuses est-il une réponse aux inégalités devant le risque microbien ?

12 décembre 2012, Anne-Marie Moulin (UMR 7219, CNRS, Université Paris Diderot)

Médecin, historienne et philosophe, Anne-Marie Moulin a pris un recul historique, sociologique, anthropologique et à certains moments politico-religieux afin d'analyser

l'évolution des idées et coutumes en matière de prévention, en particulier vaccinale, des maladies infectieuses. Avec la découverte des vaccins est né au XX^e siècle le concept de vaccination de masse qui a fait ses preuves dans l'élimination de nos régions de certaines maladies (diphtérie, tétanos, coqueluche, poliomyélite, rougeole), voire leur éradication (variole). Ce succès en a fait un pilier de notre santé publique, et même un élément de la construction de notre citoyenneté. L'émergence croissante d'une méfiance voire d'un rejet du concept de vaccination de masse, dont les bases varient selon les régions, le développement économique, les croyances philosophiques et religieuses nécessitent une réflexion collective renouvelée.

Cours 2 : Vaccins contre les maladies entériques : est-ce le chemin qui est difficile ou le difficile qui est le chemin ?

19 décembre 2012

Les infections intestinales ou diarrhées sont la seconde cause de mortalité infectieuse pédiatrique. On pourrait penser qu'elles apparaissent de ce fait comme une priorité en matière de développement vaccinal. Ce n'est pas le cas à une exception près, la vaccination anti-rotavirus, probablement du fait du nombre restreint de sérotypes, et surtout du fait de l'existence d'un marché dans les pays du Nord, permettant aux industriels un retour sur investissement. Il n'en est pas de même pour les autres pathogènes entériques les plus prévalents tels *Shigella*, *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC), *Cryptosporidium*, dont la multiplicité des espèces et sérotypes ainsi que la prévalence dans les pays les plus démunis de la planète rendent actuellement illusoire le développement d'un vaccin anti-diarrhée, même si touristes, personnels d'ONG, militaires en opération pourraient en bénéficier. Le sujet est compliqué par l'absence actuelle de consensus sur le mode optimal de conception des candidats vaccins ainsi que leur mode idéal d'administration : vaccin oral stimulant une réponse à prédominance muqueuse contre parentéral, souvent particulière, stimulant une réponse à prédominance systémique. Un dilemme très complexe émerge de cette dualité : les vaccins parentéraux conjugués classiques (polyoside-protéine porteur) protègent mal le très jeune enfant. Inversement, l'immunogénicité des vaccins oraux est significativement diminuée du fait d'une entité nouvellement reconnue en région hautement endémique, l'entéropathie environnementale pédiatrique qui diminue considérablement la capacité de colonisation, donc de prise de ces vaccins. C'est donc le chemin qui est difficile...

Séminaire 2 : Pourquoi les nourrissons sont-ils plus sensibles aux maladies infectieuses et moins répondeurs aux vaccins ?

19 décembre 2012, Arnaud Marchant (Institut d'Immunologie médicale, Université libre de Bruxelles, Charleroi)

Arnaud Marchant est un des rares immunologistes à s'être spécialisé dans l'analyse du développement de la réponse immunitaire chez le nouveau-né et le nourrisson. Il nous a montré que contrairement à ce qui est généralement affirmé, le très jeune enfant n'est pas à proprement parler immunodéprimé. Ses cellules immunitaires B, T et cellules dendritiques ont subi une empreinte maternelle durant la gestation qui comporte un certain degré d'immaturité en regard de l'enfant plus

âgé et de l'adulte mais qui correspond en réalité au déroulement d'un programme extrêmement complexe et sophistiqué d'évolution des divers paramètres de la réponse immunitaire liés à l'évolution et en particulier aux contraintes de la période d'exposition à de nouveaux environnements dont l'environnement microbien et l'alimentation lactée maternelle.

Cours 3 : Génétique de l'hôte et sensibilité aux maladies infectieuses

9 décembre 2012

Sans doute l'un des cours les plus difficiles que j'ai eu à préparer et donner compte tenu de la complexité du sujet qui requiert une maîtrise de la génétique humaine et des méthodes variées et évolutives d'identification des gènes responsables de la sensibilité à certaines maladies. Dans des contextes de forte consanguinité, des mutations transmises sur un mode mendélien donnent lieu à des situations quasi caricaturales de sensibilité à des agents infectieux, bactériens, viraux ou fongiques. Elles affectent surtout le jeune enfant et leur effet s'atténue avec l'âge chez les survivants. Ces mutations permettent des approches thérapeutiques substitutives et sont surtout de formidables fenêtres pour la compréhension des fonctions de certains effecteurs connus ou non du système immunitaire humain. La situation consistant en la tentative d'identification de mutations/polymorphismes géniques responsable de la sensibilité à de grandes maladies endémiques est plus complexes dans la mesure où cette analyse doit faire appel à de vastes cohortes étudiées à l'échelon de l'ensemble du génome (*genome-wide association studies* ou GWAS). En dehors des exemples historiques comme l'association du trait drépanocytaire ou de l'absence du gène Duffy à la résistance au paludisme, les situations de sensibilité sont complexes et multigénique, la contribution des polymorphismes responsables étant en général limitée (faible « *lodd score* »). Il s'agit néanmoins d'un domaine en plein essor qui porte beaucoup d'espoirs, grâce aux progrès dans la séquence et à la disposition de banques de diversité croissante de polymorphismes dans les gènes humains (ex : HAPMAP). Peut-être à ce compte trouvera-t-on enfin le(s) Saint Graal.

Séminaire 3 : Vieillesse du système immunitaire et sensibilité des personnes âgées aux maladies infectieuses

9 décembre 2012, Élodie Créteil-Durand (Service de gérontologie, Hôpital Sainte-Marguerite et Centre d'immunologie de Marseille-Luminy, Marseille)

Élodie Créteil-Durand est médecin, gérontologue et immunologiste. Trop peu de chercheurs s'intéressent en France au vieillissement du système immunitaire, en dépit de besoins considérables du fait du vieillissement inéluctable de la population sur l'ensemble de la planète – même dans les pays en voie de développement – de la sensibilité croissante des personnes âgées aux infections et de leur moindre réponse aux vaccins. Les travaux actuels montrent que c'est à tous les niveaux que s'engage le processus de sénescence du système immunitaire, mais avec un décalage net en fonction des individus de même âge. Les barrières de l'organisme involuent, les cellules B et T subissent un processus de sénescence amplifié par la diminution des signaux de co-activation. Par ailleurs, le rôle des virus Herpes, tel le CMV, qui nous infectent de façon latente dès le jeune âge semblent jouer

ici un rôle délétère en mobilisant la population résiduelle de lymphocytes T naïfs qui ne sont plus disponibles pour reconnaître de nouveaux antigènes exogènes microbiens ou vaccinaux.

Cours 4 : La tuberculose, paradigme de maladie inégalitaire

16 janvier 2013

Maladie devenue mythe, la tuberculose reste d'actualité et a même ré-émergé ces trente dernières années du fait de la pandémie de sida dont le déficit de l'immunité cellulaire qu'il entraîne facilite le développement. La situation s'est aggravée du fait de l'extension de souches résistantes, parfois à tous les médicaments anti-tuberculeux disponibles. La tuberculose apparaît donc actuellement comme une des priorités de santé publique à l'échelle de l'ensemble de la planète. Elle est cependant, au sein des maladies infectieuses, l'une de celles où l'injustice inégalitaire est la plus criante. Ce sont les populations les plus pauvres, celles vivant dans les pays où les systèmes médicaux sont les plus désorganisés qui y payent le plus lourd tribut : absence de surveillance et de diagnostic, traitements insuffisants en quantité, qualité et durée générant la (multi)résistance. Notre quart-monde urbain n'en est pas à l'abri en ces périodes de crise et certains environnements, comme l'environnement carcéral, sont pourvoyeurs de souches multirésistantes (100 % dans certaines prisons russes). Mais il est d'autres inégalités devant cette maladie, certaines sont médicales comme l'extrême difficulté du diagnostic chez le jeune enfant, comme l'inefficacité du BCG dans les régions intertropicales. D'autres sont sociales et culturelles comme la stigmatisation des femmes tuberculeuses rejetées de leurs communautés dans certaines cultures. La prise en charge de la tuberculose à l'échelle de la planète est un défi majeur.

Séminaire 4 : Dissection des bases génétiques de la lèpre et de la tuberculose

16 janvier 2013, Laurent Abel (Hôpital Necker et unité INSERM 980, Paris)

Laurent Abel est l'un des spécialistes mondiaux de l'épidémiologie génétique des maladies infectieuses. Ses travaux très divers ont cependant largement porté sur l'étude des bases génétiques de la sensibilité aux infections mycobactériennes : lèpre et tuberculose. Au-delà de la spécificité des maladies étudiées, c'est un spécialiste des méthodologies d'analyse « *genome wide* » avec une vue très objective sur les avantages et les limitations des diverses méthodologies disponibles.

Cours 5 : Introduction, agents anti-infectieux et résistance, où sont les inégalités ?

23 janvier 2013

Qu'il s'agisse de la tuberculose ou de toute autre infection bactérienne, hospitalière ou communautaire, les inégalités socio-économiques, la désorganisation des systèmes de santé dans certains pays, la mauvaise connaissance des règles de bases d'utilisation des antibiotiques par les médecins, la circulation libre de produits

contrefaits, sont autant de paramètres qui affectent l'efficacité et la pertinence des traitements délivrés, mais qui sont aussi cause de la sélection et de la diffusion de souches (multi)résistantes.

L'émergence récente de carbapénèmases au sein des bêta-lactamases à spectre élargi (ESBL), capables d'hydrolyser les derniers antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram négatif, les carbapénèmes, illustre la situation de crise actuelle. Issues de micro-organismes environnementaux dans le sous-continent Indien, ayant diffusé au sein des flores contaminant/infectant l'homme (*Klebsielles*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter*), les gènes codant la carbapénémase NDM-1 ont complété de manière spectaculaire la gamme de résistance déjà présente chez ces micro-organismes, les rendant essentiellement résistants à tous les antibiotiques possibles. La diffusion planétaire des clones bactériens porteurs de NDM-1 et le potentiel de transmission du gène lui-même par diffusion inter-espèces du fait de sa présence sur des éléments génétiques aisément transmissibles (plasmides, transposons, intégrons) créent une situation redoutable et son contrôle très aléatoire. C'est à la racine, par l'usage raisonné des antibiotiques que ce type d'émergence catastrophique pourra être prévenu. Les pays industriellement émergents dont le système de santé se développe rapidement doivent de toute urgence prendre cette situation à bras le corps.

Séminaire 5 : Dynamique de la diffusion des agents infectieux résistants

23 janvier 2013, Didier Guillemot (Institut Pasteur & université de Versailles-Saint-Quentin en Yvelines)

Didier Guillemot est un épidémiologiste, méthodologiste, expert dans l'épidémiologie de la résistance aux antibiotiques, particulièrement de la dynamique de sa transmission en milieu hospitalier et communautaire. Son séminaire a cependant porté sur un autre aspect de la résistance illustrant la complexité du « ménage à trois » antibiotiques, vaccins et pathogènes. Dans des espèces soumises à vaccination, des substitutions surviennent sous la pression sélective de l'état d'immunité créé, avec apparition de nouveaux sérotypes pathogènes non couverts par la vaccination. Par ailleurs, il semble que pour certaines espèces pathogènes, la résistance soit un facteur de perte de « *fitness* » pour l'hôte. De ce fait, contrôle de la résistance et utilisation de vaccins pourraient dans le futur amener l'émergence de pathogènes antibiosensibles, de « *fitness* » maximale pour l'hôte et de sérotype non couvert par les vaccins pertinents. Un comble !

Séminaire 6 : Pour un accès global aux médicaments anti-infectieux

23 janvier 2013, Bernard Pécoul (DNDi, Genève)

Bernard Pécoul est médecin, ancien Président de MSF, actuel directeur de DNDi, un consortium fondé sur un partenariat public-privé dédié à la prise en charge thérapeutique des infections tropicales négligées. Ce partenariat implique des compagnies pharmaceutiques mettant à disposition ou redémarrant le développement de molécules actives contre des pathogènes responsables de pathologies endémiques parasitaires qui demeurent très préoccupantes, comme la maladie du sommeil due

à l'inoculation à l'homme du parasite trypanosome. Seul ce type de partenariat semble être en mesure actuellement d'engager de véritables campagnes d'éradication d'infections tropicales négligées. DNDi est un modèle du genre.

Cours 6 : Introduction. Les inégalités Nord-Sud devant les maladies infectieuses

30 janvier 2013

L'objectif de ce cours était largement d'introduire les séminaires de Dominique Kérouédan et Jean-François Delfraissy. Ce fut néanmoins l'opportunité de traiter en détail le concept des maladies tropicales négligées, leur définition, leur prévalence, leur coût individuel et collectif. Les conséquences à long terme de ces infections parasitaires ou bactériennes souvent chroniques peuvent être très délétères pour les patients qui en sont atteints : cécité du trachome et de l'onchocercose, grands délabrements cutanés de l'ulcère de Buruli ou de la lèpre, insuffisance rénale, cirrhose et cancer hépatique de la bilharziose. On mesure par ailleurs très mal l'immense impact des helminthiases, en particulier sur la population pédiatrique. Des approches thérapeutiques, surtout la « chimiothérapie préventive » on fait leurs preuves, administrées dans le contexte de partenariats public-privé. L'onchocercose a d'ores et déjà pu être éradiquée de certaines régions d'Afrique.

Séminaire 7 : Infection VIH : les enjeux au Nord et au Sud

30 janvier 2013, Jean-François Delfraissy (IMMI et ANRS, Paris)

Directeur de l'ANRS, Jean-François Delfraissy est l'une des personnalités médicale française qui connaît le mieux le sida dans tous ses aspects. Il a proposé une vision rétrospective et prospective de l'évolution de la pandémie et a surtout insisté sur le rôle des pays du Nord dans le combat contre la pandémie aux côtés des pays du Sud. Cette présentation a été illustrée d'exemples concrets et complémentaires de coopération dans les domaines de la prévention et du traitement.

Séminaire 8 : L'Afrique face au défi de réaliser les « Objectifs du Millénaire » de la santé avant 2015

30 janvier 2013, Dominique Kérouédan (PSIA-Sciences Po, Paris)

Dominique Kérouédan est médecin, économiste et spécialiste de la coopération Nord-Sud. Elle est professeur à Science-Po et a tenu cette année la chaire « Savoirs contre la pauvreté » du Collège de France. Elle a beaucoup œuvré pour la mise en place de méthodologies d'implémentation et de suivi des « Objectifs du Millénaire ». Dans un séminaire très passionnant, elle a analysé les raisons des réussites et des échecs en fonction des pays africains francophones et anglophones dont elle suit attentivement l'évolution en parallèle des paramètres de développement économiques et de santé.

Ce cours s'est conclu cette année par un symposium international en anglais, intitulé : « *Zoonoses and emergence of new infectious diseases : biology meets anthropology* ». Tout à fait original et passionnant à plusieurs égards, ce symposium

était organisé conjointement par la chaire d'Anthropologie de la nature (Frédéric Keck et Philippe Descola) et la chaire de Microbiologie et maladies infectieuses (Philippe Sansonetti) sur le thème : « zoonoses et maladies infectieuses émergentes » pris sous l'angle original de la compréhension des comportements humains dans la survenue des émergences infectieuses, d'où son titre : « *Zoonoses and emergence of new infectious diseases : biology meets anthropology* ». Ce symposium avait par ailleurs été co-organisé dans le cadre de l'initiative Collège de France/Peter Wall *Institute for Advanced Studies (University of British Columbia, Vancouver, Canada)* que je pilote avec le professeur Janis Sara, directeur du PWIAS en étroite collaboration avec le professeur Brett Finlay.

RECHERCHE

Projets scientifiques

Pour le contexte scientifique et cadre de réalisation des travaux de recherche, cf. *Annuaire du Collège de France 2011-2012*, Paris, Collège de France, 2013, p. 327-329 ; en ligne : annuaire-cdf.revues.org/849.

Microbiote et homéostasie de l'axe crypto-villositaire intestinal

1. Identification d'une flore spécifique de la crypte intestinale (*Crypt-Specific Core Microbiota* ou CSCM). Par une combinaison d'approches de coloration classique et de méthodes moléculaires associant microdissection LASER, extraction de l'ADN microbien, amplification des séquences 16S et séquençage de nouvelle génération, nous avons identifié des bactéries spécifiques de la crypte intestinale, au niveau de l'intestin grêle et du colon. Nous qualifions ces bactéries de CSCM. Ceci soulève la question passionnante du rôle possible de modifications de cette CSCM dans la carcinogénèse colique, en cas de déséquilibre ou de substitution par des pathobiontes plus agressifs. Après analyse bio-informatique, nous avons pu établir une liste très courte de quelques genres bactériens retrouvés dans tous les animaux étudiés quelques soit leur lignage, leur élevage d'origine ou leur alimentation. Cette liste est dominée par des bactéries aérobies strictes inattendues dans un tel environnement, en particulier le genre *Acinetobacter*, *Deftia* et *Stenotrophomonas*, des protéobactéries aérobies strictes. Ces microorganismes ont maintenant été cultivés à partir du microbiote murin et vont pouvoir être étudiés pour leurs propriétés homéostatiques dans la crypte intestinale. Des études similaires soutenues par l'ARC et la Direction des applications de la recherche de l'Institut Pasteur (DARRI), en collaboration avec le Pr I. Sobhani (service de Gastroentérologie, Hôpital Henri Mondor), sont maintenant menées chez l'homme.

2. La CSCM identifiée ci-dessus est en contact étroit avec l'entité régénérative de la crypte intestinale, à savoir les cellules souches et leur environnement cellulaire c'est à dire les cellules de Paneth ou leur équivalent dans le colon, les cellules mésenchymateuse et les cellules du système immunitaire environnant la crypte au sein de la *lamina propria*. Nous avons fait l'hypothèse que les espèces membres de la CSCM interagissaient directement – essentiellement via leurs motifs structuraux ou PAMP – avec les cellules souches de la crypte intestinale. Nous avons mis au point la production d'organoïdes à partir des cryptes intestinales et la préparation

directe à partir des cryptes de cellules souches intestinales exprimant le marqueur Lgr5. Ces cryptes sont obtenues à partir de souris rapporteurs Lgr5-GFP. Grâce à cette nouvelle approche, nous avons démontré l'existence d'une voie de signalisation aboutissant à la protection des cellules souches, particulièrement à la suite de leur exposition à un stress toxique. Cette voie concerne le senseur intracellulaire Nod2 qui est exprimé à haut niveau dans les cellules souches elles-mêmes et son agoniste microbien, le muramyl-dipeptide ou MDP (Nigro *et al.*, en préparation). Ceci représente la première démonstration du rôle d'un composant du microbiote intestinal dans la régénération épithéliale intestinale par action directe sur les cellules souches.

3. Nous continuons par ailleurs notre approche analytique, génétique, moléculaire et cellulaire des bases fondamentales du commensalisme en utilisant *Lactobacillus casei* comme microorganisme modèle. Nous avons mis au point un système de culture de cellules de la crypte murine (lignée mICcl2) à des stades variés de densité, polarité et différenciation et exposons ces cellules à des espèces représentatives des deux groupes mentionnés, en particulier *Lactobacillus casei* et *Bifidobacterium breve*. Nous avons pu démontrer que *L. casei* affectait le cycle cellulaire, activait la différenciation et diminuait la programmation pro-inflammatoire de ces cellules épithéliales. L'arrêt du cycle cellulaire est essentiellement lié à l'arrêt de la transcription de la Cycline E1. Cet arrêt de transcription survient en réponse au lactate qui est produit par *L. casei* (Matsuki *et al.*, 2013, *PLoS One*). Il est donc intéressant de noter que le rôle des probiotiques peut être d'agir sur le compartiment prolifératif de la crypte intestinale et de permettre d'arrêter la prolifération tout en induisant la différenciation en cellules épithéliales intestinales matures.

Nous avons aussi développé un système de mutagénèse chez *Lactobacillus casei*, permettant une approche STM (*Signature Tagged Mutagenesis*) visant à identifier les effecteurs de ce commensal/probiotique affectant l'axe crypto-villositaire intestinal, ainsi que les facteurs permettant la colonisation de la niche intestinale. Ce travail est réalisé en collaboration avec le groupe de Jean-François Cavin à l'Université de Bourgogne (Dijon). Une librairie de 10 000 mutants a été obtenue. L'ensemble de ces mutants ont été séquencés et 1100 mutants indépendants sont disponibles et ont été testés par pools dans le modèle intestinal de l'anse iléale ligaturée du lapin. Nous avons identifié une quarantaine de mutants qui ont soit acquis une capacité de « supercroissance » intestinale, ou le plus souvent sont largement altérés dans leurs propriétés de survie/colonisation dans la lumière intestinale. Ces derniers mutants se réunissent dans plusieurs catégories : (i) métabolisme/synthèse des acides aminés soufrés, (ii) biosynthèse du peptidoglycane bactérien, (iii) expression de peptidases. Nous continuons à analyser le phénotype de ces mutants et à comprendre la fonction de leurs produits dans la survie/symbiose de *L. casei*.

4. Nous avons été les premiers à réussir à cultiver le *Clostridium SFB* (*Segmented Filamentous Bacterium*) *ex vivo*, dans un milieu combinant microaérophilie, milieu synthétique riche composé sur la base des déficiences métaboliques identifiées sur le génome de la bactérie, ainsi qu'une monocouche de cellules eucaryotes en culture. C'est un progrès majeur dans l'étude de cette bactérie clé de la maturation du système immunitaire muqueux (Schnupf *et al.*, en préparation). Ce travail est effectué en collaboration avec le groupe de Nadine Cerf-Benoussan (INSERM, Hôpital Necker).

Étude du dialogue moléculaire établi entre un pathogène et l'épithélium intestinal

1. L'étude des microconditions prévalant à la surface épithéliale et des mécanismes génétiques et moléculaires par lesquels la bactérie s'y adapte représente un domaine d'intérêt croissant pour notre groupe. Nous avons récemment démontré que l'appareil de sécrétion de type III de *Shigella* (TTSS) qui permet l'injection des effecteurs de pathogénicité dans les cellules eucaryotes est incompetent lorsque la bactérie fait face à des conditions d'anaérobiose, mais acquiert sa compétence en présence de faibles concentrations d'O₂ que nous avons montrées exister à la surface épithéliale intestinale. La suite de ce travail consiste à préciser les conditions précises régnant à la surface épithéliale et comment elles affectent les propriétés pathogènes du microorganisme. Nous développons des outils permettant d'analyser précisément cette zone : sonde fluorescente marquant le mucus (Coïc *et al.*, 2012, *J. Biol. Chem.*), sondes phosphorescentes permettant de mesurer la tension locale en oxygène. Nous évaluons par ailleurs le rôle d'autres facteurs anti-infectieux produits par les cellules épithéliales et myéloïdes au cours de l'infection (NO, radicaux oxygène, enzymes protéolytiques, peptides anti-microbiens), non seulement sous l'angle de la bactéricidie mais aussi de l'altération de fonctions propres à la pathogénicité, comme la sécrétion des effecteurs de pathogénicité, la motilité bactérienne intracellulaire et la capacité de tuer les cellules cibles.

2. L'étude des mécanismes de subversion des systèmes de défense innés et adaptatifs, humoraux et cellulaires par *Shigella* est un autre domaine prioritaire. Nous avons démontré que la bactérie sauvage, grâce à l'injection dans les cellules, *via* le TTSS, d'effecteurs microbiens comme les protéines Osp et IpaH, était capable de supprimer trois composants essentiels de la réponse muqueuse : la production par l'épithélium des peptides anti-microbiens, ce qui permet à *Shigella* de coloniser profondément l'épithélium, jusque dans la crypte; la production d'IL-8 qui assure le recrutement des polynucléaires neutrophiles et la production de CCL-20, bloquant ainsi le recrutement de cellules dendritiques. *Shigella* se livre donc à une subversion des mécanismes intégrés de la défense anti-infectieuse de l'épithélium intestinal. D'autres chimiokines/cytokines pro-inflammatoires sont d'ailleurs affectées. Nous avons par ailleurs observé que *Shigella* entraînait des modifications majeures du mucus de l'apex cellulaire, à la fois en composition chimique, mais aussi en organisation spatiale. Ce sujet continue d'être développé en collaboration avec le groupe de glycochimie de Jean-Pierre Michalsky à Lille (Sperandio *et al.*, *Infect. Immun.*, sous presse). Par ailleurs, nous avons démontré, dans un projet collaboratif avec Guy Tran Van Nhieu (CIRB, Collège de France) que les cellules épithéliales infectées par une bactérie produisaient de l'ATP rapidement libéré *via* l'ouverture des hémi-canaux-connexines dans le milieu extracellulaire. Cette libération est un signal de danger alertant très rapidement l'hôte de son engagement par un pathogène. Il permet aussi de stimuler les cellules à former des structures filopodiales de surface qui capturent les bactéries dans le milieu extracellulaire, se rétractent dans un processus déclenché par le phénotype invasif et impliquant l'actine et les MAPKines Erk1/2. Cependant, *Shigella* est rapidement capable, lors de l'infection, d'entraîner la fermeture des hémi-canaux-connexines, empêchant ainsi la sortie de l'ATP et supprimant de fait ce signal de danger. Nous avons pu identifier IppD, un enzyme à activité de phosphatase des inositols-phosphates (hydrolysant le PI(4,5)P₂ en PI5P) comme l'effecteur microbien injecté par le TTSS assurant cette fermeture des hémi-canaux et la suppression du signal de danger. Ce processus a

été validé *in vitro* et *in vivo* (Puhar *et al.*, en révision). Cette découverte illustre la subtilité des mécanismes de subversion immune appliqués par les pathogènes aux tissus/organes qu'ils infectent. Les mécanismes moléculaires d'action identifiés proposent une piste originale pour la découverte de nouvelles molécules anti-inflammatoires.

Autres travaux

D'autres travaux de fondamentaux se sont déroulés dans l'unité PMM, sous la supervision directe de mes collaboratrices et collaborateurs chercheurs permanents dans l'unité : Claude Parsot, Laurence Arbibe, Armelle Phalipon et Régis Tournebize.

1. Nous avons continué à identifier et caractériser la fonction d'un groupe d'effecteurs sécrétés par le TTSS de *Shigella*, les protéines Osp et IpaH qui sont pour l'essentiel des régulateurs de l'immunité innée. L'accent est actuellement mis sur l'analyse de la fonction de deux catégories d'effecteurs sécrétés: les molécules OspC1,2,3 et les molécules IpaH dont la fonction d'E3 ligase justifie maintenant d'identifier les cibles protéiques ubiquitinylées dans les cellules infectées par *Shigella*.

2. Nous avons par ailleurs montré que la subversion de la réponse innée affectait considérablement le profil de la réponse adaptative, ceci en particulier du fait de l'expression de la protéine OspF dont l'étude de la spécificité de la régulation épigénétique pour un certain nombre de promoteurs de la réponse immunitaire innée, y compris ceux qui comme l'IL-12 et l'IFN γ orientent la réponse adaptative. Nous poursuivons une analyse dynamique des interactions entre lymphocytes T et cellules présentatrices d'antigènes au sein des ganglions infectés par *Shigella*. Il s'agit d'une combinaison d'approches *in vitro* et *in vivo* par observation en microscopie bi-photonique. Une première série de données indique que l'injection d'effecteurs par le TTSS entraîne un net ralentissement de la motilité des lymphocytes T, résultant d'une incapacité à se polariser selon un gradient chémoattractant. Nous avons démontré que l'effecteur IpgD, en hydrolysant le PI(4,5)P2 associé à la membrane lymphocytaires empêchait la phosphorylation de l'ezrine qui est essentielle à l'établissement de la polarité des cellules T. Nous avons pu valider *in vivo* ce processus d'arrêt des lymphocytes T en présence de *Shigella* dans un modèle d'étude de la dynamique des bactéries et des cellules T au sein d'un ganglion infecté (Salgado-Pabon *et al.*, 2013, *PNAS*).

3. Enfin, notre projet plus récent portant sur les diverses formes de l'infection pulmonaire par *Klebsiella* émerge avec l'identification de cibles originales dans l'appareil respiratoire pour *K. pneumoniae* et la caractérisation de la nature de la cellule clé (cellule de Mickulicz) du rhinosclérome, infection chronique des voies aériennes supérieures causée par *K. rhinoscleromatis* (Fèvre C., Almeida A.M. *et al.*, 2013, *EMBO Mol. Med.*). Nous avons maintenant obtenu que soient réalisées les séquences de plusieurs génomes de klebsielles dont *K. rhinoscleromatis* et une chercheuse post-doctorale assure l'analyse génétique comparative entre ces différentes espèces et sous-espèces afin d'identifier des gènes candidats à l'expression différentielle de la pathogénicité. En parallèle, une étudiante développe une analyse génétique par mutagenèse de *K. rhinoscleromatis*, en particulier des bases moléculaires de l'induction des macrophages spumeux ou cellules de Mickulicz caractéristiques du rhinosclérome.

Enfin, depuis décembre 2010, j'assure la coordination du projet européen STOPENTERICS (FP7). Ce programme permet de stimuler la recherche européenne dans le domaine des vaccins contre des maladies infectieuses négligées comme les diarrhées, particulièrement celles, souvent graves chez le jeune enfant, causées par *Shigella* et par les *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC). Ce programme va nous permettre un véritable changement de paradigme de développement vaccinal puisque pour la première fois nous allons tenter dans les deux cas de nous extraire de la logique d'une protection dépendante des multiples sérotypes pour entrer dans la recherche d'antigènes protéiques entraînant une protection croisée sérotype-indépendante. Les premiers résultats sont encourageants. Grâce au développement d'un modèle de shigellose chez le cobaye, nous avons pu montrer les caractéristiques protectrices d'une des protéines clés de la virulence de *Shigella*, ce travail faisant l'objet d'une collaboration étroite avec Sanofi-Pasteur. Par ailleurs, nous avons progressé dans la preuve du concept d'un nouveau vaccin sous-unité basé sur la synthèse chimique de polyosides complexes couplés à une protéine porteuse. La longueur et la densité de greffage idéales ont été déterminées et l'immunogénicité prouvée chez la souris. Ce vaccin candidat dirigé contre le sérotype 2a de *S. flexneri* est maintenant arrivé au stade de production d'un lot GMP pour un essai clinique et sera testé en Israël (Professeur Dani Cohen, Université de Tel Aviv) au cours d'un essai clinique de phase 1 dans le cadre de STOPENTERICS.

PUBLICATIONS 2012-2013

Bongrand C., Sansonetti P.J., Parsot C., « Characterization of the promoter, MxiE box and 5' UTR of genes controlled by the activity of the type III secretion apparatus in *Shigella flexneri* », *PLoS One*, 7(3), 2012, e32862.

Coïc Y.M., Baleux F., Poyraz O., Thibeaux R., Labruyere E., Chretien F., Sobhani I., Lazure T., Wyplosz B., Schneider G., Mulard L., Sansonetti P.J., Marteyn B.S., « Design of a specific colonic mucus marker using a human commensal bacterium cell surface domain », *J. Biol. Chem.*, 287(19), 2012, 15916-22.

Schnupf P., Sansonetti P.J., « Quantitative RT-PCR profiling of the rabbit immune response: assessment of acute *Shigella flexneri* infection », *PLoS One*, 7(6), 2012, e36446.

Panchalingam S., Antonio M., Hossain A., Mandomando I., Ochieng B., Oundo J., Ramamurthy T., Tamboura B., Zaidi A.K., Petri W., Houpt E., Murray P., Prado V., Vidal R., Steele D., Strockbine N., Sansonetti P., Glass R.I., Robins-Browne R.M., Tauschek M., Svennerholm A.M., Kotloff K., Levine M.M., Nataro J.P., « Diagnostic microbiologic methods in the GEMS-1 case/control study », *Clin. Infect. Dis.*, 55, Suppl. 4, décembre 2012, S294-302.

Mounier J., Boncompain G., Senerovic L., Lagache T., Chretien F., Perez F., Kolbe M., Olivo-Marin J.C., Sansonetti P.J., Sauvonnnet N., « *Shigella* effector IpaB-induced cholesterol relocation disrupts the Golgi complex and recycling network to inhibit host cell secretion », *Cell. Host. Microbe*, 13;12(3), septembre 2012, 381-9.

Teo I., Toms S.M., Marteyn B., Barata T.S., Simpson P, Johnston K.A., Schnupf P., Puhar A., Bell T., Tang C., Zloh M., Matthews S., Rendle P.M., Sansonetti P.J., Shaunak S., « Preventing acute gut wall damage in infectious diarrhoeas with glycosylated dendrimers », *EMBO Mol. Med.*, 4(9), septembre 2012, 866-81.

Salgado-Pabon W., Celli S., Arena E.T., Nothelfer K., Roux P., Sellge G., Frigimelica E., Bousoo P., Sansonetti P.J., Phalipon A., « *Shigella* impairs T lymphocyte dynamics *in vivo* », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(12), 19 mars 2013, 4458-63.

Matsuki T., Pedron T., Regnault B., Mulet C., Hara T., Sansonetti P.J., « Epithelial Cell Proliferation Arrest Induced by Lactate and Acetate from *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium breve* », *PLoS One*, 8(4), 30 avril 2013, e63053.

Fevre C., Almeida A.S., Taront S., Pedron T., Huerre M., Prevost M.C., Kieusseian A., Cumano A., Brisse S., Sansonetti P.J., Tournebize R., « A novel murine model of rhinoscleroma identifies Mikulicz cells, the disease signature, as IL-10 dependent derivatives of inflammatory monocytes », *EMBO Mol. Med.*, 5(4), avril 2013, 516-30.

Tran Van Nhieu G., Kai Liu B., Zhang J., Pierre F., Prigent S., Sansonetti P., Erneux C., Kuk Kim J., Suh P.G., Dupont G., Combettes L., « Actin-based confinement of calcium responses during *Shigella* invasion », *Nat. Commun.*, 4, 2013, 1567.

Revues, chapitres d'ouvrages

Payrastré B., Gaits-Iacovoni F., Sansonetti P., Tronchère H., « Phosphoinositides and cellular pathogens », *Subcell. Biochem.*, 2012, 59, 363-88.

Karch H., Denamur E., Dobrindt U., Finlay B.B., Hengge R., Johannes L., Ron E.Z., Tønjum T., Sansonetti P.J., Vicente M., « The enemy within us : lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak », *EMBO Mol. Med.*, 4(9), septembre 2012, 841-8.

Erlich P., Sansonetti P.J., « Acute intestinal infections: current and upcoming vaccines », *Presse Med.*, 42(1), janvier 2013, 93-101.

Sperandio B. & Sansonetti P.J., Manipulation of the host-cell pathways by bacterial enteropathogens. Book chapter in « Intestinal microbiota in health and diseases: The use of probiotics », *CRC press*, 2013.

AUTRES ACTIVITÉS

Éditeur de journaux scientifiques internationaux

Durant l'année 2012-2013, j'ai poursuivi mes activités d'éditeur de *Cellular Microbiology*, le journal de référence de notre discipline que j'ai créé en 1999 avec Richard Stephens (États-Unis) et David Sibley (États-Unis).

Je suis par ailleurs « senior editor » d'un nouveau Journal de la série EMBO : *EMBO Molecular Medicine*. Je m'occupe dans ce journal de la section « *Molecular Medicine and Infectious Diseases* ». Je suis par ailleurs membre du comité éditorial et conseiller spécial pour la microbiologie de plusieurs journaux comme *EMBO Journal*, *EMBO Reports*, *Cell Host & Microbe*.

Sélection de conférences scientifiques prestigieuses en France et à l'étranger

Keynote lecture, 4th International *Clostridium difficile* Symposium, Bled, 20-22/09/2012 : « Learning from pathogens original strategies of immunomanipulation ».

Professeur invité, Fondation Cenci Bolognetti, Rome, 16-20/10/2012 : « Pathogens and symbionts: War and Peace at mucosal surfaces », « *Shigella* invasion of the intestinal barrier: the Yin and Yang of innate immunity ».

Keynote lecture IMI. Inaugural Symposium, Université de Birmingham, 17/12/2012 : « Gut symbionts and pathogens: decrypting signals in the crypt ».

Conférence, Les grands défis du XXI^e siècle, Académie des sciences, 18/03/2013 : « Le microbiote, une symbiose (presque) parfaite ».

Visite et séminaire, Université de Cologne, 25-26/03/2013 : « Commensals and pathogens: decrypting signals in the intestinal crypt ».

Visite et séminaire « Immunology Series », Cambridge, 05-06/04/2013 : « Commensals and pathogens : decrypting signals in the intestinal crypt ».

Visite et séminaire, Case Western University, Cleveland, OH, États-Unis, 23-24/04/2013 : Hanna Lecture, National Academy of Science, Annual Meeting and Reception, Washington DC, 25/04-01/05/2013.

Cell Symposia, Microbiome & Host Health, Lisbonne, 12-14/05/2013 : « From symbiosis to homeostasis, from danger signaling to pathogenesis: novel facets of gut cellular microbiology ».

Institut Français de Madrid, Collège de France, 17-18/06/2013 : Conférence grand public sur microbiote et pathogènes.

Conférence scientifique au Centre Severo Ochoa.

Keynote Lecture, FINOVI, Lyon, 25/06/2013 : « Commensals and pathogenic bacteria: decrypting signals in the intestinal crypt ».

Organisation de réunions scientifiques

J'ai organisé en décembre 2012 à Annecy la réunion annuelle du réseau européen FP7 STOPENTERICS que je coordonne, sur l'innovation en matière de vaccination contre *Shigella* et ETEC.

J'ai organisé en février 2013 le colloque Charles Nicolle en collaboration avec la Société française de microbiologie. Ce colloque vise à faire connaître les meilleurs jeunes chercheurs travaillant dans un laboratoire français de microbiologie.

DISTINCTIONS

27 avril 2013 : réception comme membre étranger de la National Academy of Sciences des États-Unis.

3 décembre 2013 : lauréat du Grand Prix de l'INSERM (Collège de France).