

UNIVERSITE DE LILLE

ECOLE DOCTORALE : Biologie Santé de Lille

SPECIALITE : Sciences de la vie et de la santé

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Présentée et soutenue publiquement par

Marjorie CORNU

Mycobiome et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : Impact de la dysbiose sur l'inflammation intestinale et le processus fibrotique

Thèse dirigée par le Pr Boualem SENDID,

Soutenue le 24 avril 2024

Membres du jury :

Monsieur le Professeur Mathurin FUMERY	Président du jury
Monsieur le Professeur Stéphane RANQUE	Rapporteur
Madame le Docteur Alicia MORENO SABATER	Rapporteuse
Madame le Docteur Silvia SPECA	Examinatrice
Monsieur le Professeur Boualem SENDID	Directeur de thèse

Inserm | U1285 - UGSF UMR 8576 CNRS - Glycobiologie de pathogénèse fongique et applications cliniques

Mycobiome et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : Impact de la dysbiose sur l'inflammation intestinale et le processus fibrotique

Résumé

Introduction. Alors que le mycobiote représente une part quantitative négligeable, en apparence, du microbiote intestinal, les preuves de son rôle dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, et notamment la maladie de Crohn (MC), sont croissantes. Ce travail avait pour objectif d'évaluer l'impact de *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* sur l'inflammation et la fibrose intestinale (FI), mais également sur la production des anticorps anti-*S. cerevisiae* (ASCA), reconnaissant des séquences oligomannosidiques de faible degré de polymérisation ayant un résidu α ,1-3 mannose terminal.

Méthodes. Des modèles murins (C57BL/6, axénique et CEABAC10 exprimant CEACAM6 humaine) et cellulaires (fibroblaste CCD-18Co et cellule épithéliale intestinale Caco-2) d'inflammation et de FI induites (par sulfate de dextrane sodique ou TGF- β) ont été utilisés pour évaluer les réponses cellulaires, tissulaires et systémiques aux levures et à la souche bactérienne LF82, souche adhérente invasive d'*Escherichia coli* (AIEC) utilisée comme témoin, par analyse histologique, RT-q-PCR et détermination des ASCA. Parallèlement, une analyse métagénomique (MTG) du mycobiote fécal et la détermination des ASCA et de la calprotectine fécale étaient réalisés dans le cadre d'une étude cas-témoins, « MAGIC », incluant des sujets atteints de la MC de diagnostic récent et en rémission clinique comparés à leurs apparentés sains du premier degré, ainsi qu'à des témoins sains appariés. Cette étude était réalisée en collaboration avec d'autres équipes de recherche, analysant notamment le microbiote fécal bactérien et caractérisant les souches AIEC.

Résultats. Dans le modèle murin de FI chimio-induite, LF82 aggravait l'inflammation et la FI cliniquement, microscopiquement et à l'échelle de l'expression génique (EG). *C. albicans* augmentait l'EG surtout des marqueurs de l'inflammation alors que *S. cerevisiae* n'avait pas d'effet. *In vitro*, seules les cellules épithéliales répondaient au TGF- β et/ou à LF82 et l'EG des marqueurs pro-fibrotiques était augmentée, tandis que les levures n'avaient pas d'effet sur la FI. Par ailleurs, les levures n'induisaient pas la synthèse d'ASCA chez les différents modèles murins étudiés. Dans l'étude clinique MAGIC, 41,7% des patients atteints de la MC étaient porteurs d'ASCA, 2,9% des apparentés sains et 1,8% des témoins sains, aucune différence n'était observée selon l'âge. L'analyse MTG bactérienne, montrait un profil spécifique chez les apparentés sains (richesse et AIEC plus élevées) vs. témoins et patients atteints de MC, liée notamment à la présence de bactéries symbiontes, mais également la présence plus élevée d'AIEC vs. témoins ; les patients atteints de MC présentaient une diversité plus basse vs. témoins et apparentés sains, ainsi que la présence d'AIEC plus élevée vs. témoins. Cependant, le mycobiote fécal était similaire entre les différents groupes, que ce soit en abondance relative (notamment pour *C. albicans* et *S. cerevisiae*), ou en alpha-, beta-diversités. Aucune association n'a été retrouvée entre micromycètes et les différents paramètres évalués (calprotectine, ASCA, AIEC).

Conclusion. Dans les limites des modèles utilisés, les levures ici étudiées n'avaient pas d'impact sur la FI, contrairement à LF82, et ne semblaient pas être responsables de la synthèse d'ASCA. L'hypothèse de l'auto-anticorps reste à approfondir. L'analyse MTG fongique des selles des sujets de l'étude MAGIC fait suggérer que les modifications observées dans d'autres études seraient une conséquence de la MC. En effet, l'absence de profil fongique spécifique pourraient s'expliquer par le fait que les sujets inclus atteints de MC présentaient un diagnostic récent et donc un profil fongique peu modifié à ce stade de la maladie. Toutefois, la qualité de ces données justifie que ces résultats soient confirmés sur une large cohorte de patients atteints de MC suivis de manière séquentielle en début et au décours de la maladie.

Mots clés. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin – Maladie de Crohn – Fibrose intestinale – Mycobiote intestinal – Anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* – Dysbiose intestinal

Mycobiome and inflammatory bowel diseases: Impact of dysbiosis on intestinal inflammation and the fibrotic process

Abstract

Introduction. While the mycobiota represents a seemingly negligible quantitative proportion of the intestinal microbiota, evidence of its role in chronic inflammatory bowel diseases, and in particular in Crohn's disease (CD), is growing. This work aimed to evaluate the impact of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* on inflammation and intestinal fibrosis (IF), but also on the production of anti-*S. cerevisiae* antibodies (ASCA), recognizing oligomannosidic sequences of low degree of polymerization having a terminal α , 1-3 mannose residue.

Methods. Murine (C57BL/6, axenic and CEABAC10 expressing human CEACAM6) and cellular (CCD-18Co fibroblast and Caco-2 intestinal epithelial cell) models of induced inflammation and IF (by DSS or TGF- β) were used to evaluate cellular, tissue and systemic responses to yeasts and bacterial strain LF82, invasive adherent strain of *E. coli* (AIEC) used as control, by histological analysis, RT-q-PCR and determination of ASCA. Alongside, a metagenomic (MTG) analysis of the fecal mycobiota and the determination of ASCA and fecal calprotectin were carried out as part of a case-control study, "MAGIC". This study included subjects with recently diagnosed CD and in clinical remission in comparison to their healthy first-degree relatives, as well as to matched healthy controls. This study was carried out in collaboration with other research teams, analyzing in particular the bacterial fecal microbiota and carrying out the characterization of AIEC strains.

Results. In the mouse model of chemo-induced IF, LF82 worsened inflammation and IF, clinically, microscopically and at the level of gene expression (GE). *C. albicans* increased the GE especially of markers of inflammation. *S. cerevisiae* had no effect. In vitro, only epithelial cells responded to TGF- β and/or LF82 and the GE of pro-fibrotic markers was increased, while yeast had no effect on IF. Furthermore, yeasts did not induce the synthesis of ASCA in the different mouse models studied. In the MAGIC clinical study, 41.7% of CD patients carried ASCA, 2.9% of healthy relatives and 1.8% of healthy controls and no difference was observed according to age. Bacterial MTG analysis showed a specific profile in healthy relatives (higher richness and AIEC) vs. controls and MC patients, particularly linked to the presence of symbionts bacteria, but also the higher presence of AIEC vs. controls; patients with CD had lower diversity vs. healthy controls and relatives, as well as the presence of higher AIEC vs. controls. However, the fecal mycobiota was similar between the different groups, whether in relative abundance (notably for *C. albicans* and *S. cerevisiae*), or in alpha- beta-diversity. No association between micromycetes and the different parameters evaluated (calprotectin, ASCA, AIEC) was found.

Conclusion. These results suggest, within the limits of the models used, that the studied yeasts do not have an impact on IF, unlike LF82, and do not seem responsible for the synthesis of ASCA. The autoantibody hypothesis remains to be further explored. Fecal fungal MTG analysis of the individuals included in the MAGIC study suggests that the changes observed in other studies are a consequence of CD. Indeed, the absence of a specific fungal profile could be explained by the fact that the included subjects suffering from CD had a recent diagnosis and therefore had a little modified fungal profile at this stage of the disease. However, the quality of these data warrants that these results be confirmed in a large cohort of patients with CD followed sequentially at the beginning and throughout the course of the disease.

Key words. Inflammatory bowel diseases – Crohn's disease – Intestinal fibrosis – Intestinal mycobiota – Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies – Intestinal dysbiosis

Thèse effectuée au sein du laboratoire dirigé par le Pr Boualem SENDID :
Unité Inserm U1285 - Glycobiology in Fungal Pathogenesis and Clinical Applications
4ème étage Centre
Faculté de Médecine - Pôle Recherche
Place Verdun, F-59045 Lille Cedex

Remerciements

Au Professeur Stéphane Ranque : je vous remercie d'avoir accepté de me suivre au rythme des comités de suivi de thèse et de me faire l'honneur de rapporter ce travail. Je vous remercie pour vos messages d'encouragements et vos précieux conseils. Soyez assuré de toute ma gratitude.

Au Professeur Mathurin Fumery : depuis les bancs de la faculté de médecine d'Amiens, en passant par un master 2, nos chemins se croisent pour l'aboutissement de ce long travail, je suis particulièrement honorée que tu aies accepté de participer à ce jury et de juger mon travail.

Au Docteur Alicia Moreno y Sabater : ayant, quelques centres d'intérêts scientifiques et médicaux avec vous, je suis très honorée que vous me fassiez l'honneur de rapporter ce travail. Soyez assurée de toute ma reconnaissance.

Au Docteur Silvia Speca : je te remercie infiniment pour ton aide au cours de ces dernières années. Je suis ravie d'avoir appris à tes côtés, c'était une belle expérience humaine et professionnelle.

Au Professeur Geneviève Hery-Arnaud : je vous remercie d'avoir accepté de me suivre au cours de mon doctorat dans le cadre de mes comités de suivi de thèse. Merci pour vos messages d'encouragements et vos précieux conseils. Soyez assurée de toute ma reconnaissance.

Au Professeur Boualem Sendid : je vous remercie de m'avoir accueillie dans vos structures - hospitalière et de recherche - et de m'avoir encadré pendant ces nombreuses années. Après une thèse de médecine, vous avez tenu bon pour renouveler et faire aboutir cette seconde expérience. Soyez assuré de mon profond respect.

Au Professeur Daniel Poulain : je vous remercie de m'avoir permis de travailler à vos côtés, j'ai beaucoup appris à vos côtés. Soyez assuré de mon profond respect.

Je remercie l'équipe du Professeur Mahmoud Ghannoum à Cleveland dont Mauritio Retuerto et le Docteur Iman Salem pour leur accueil et leur initiation à la métagénomique. Et je remercie le collègue doctoral Lille Nord de France pour avoir financé cette formation.

Je remercie le Docteur Corinne Gower et toute l'équipe du projet MAGIC pour les échanges constructifs et de m'avoir permis de participer à ce projet.

Je remercie Nathalie Ballet et Pascal Vandekerckove, Département R&D, Société Lesaffre International, pour leur soutien financier et les échanges enrichissants.

Je remercie infiniment mes collègues, les Docteurs Camille Cordier, Pauline Coulon, Anne-Sophie Deleplancque, Jordan Leroy et Séverine Loridant, pour m'avoir soutenue toutes ces années, de m'avoir permis de consacrer du temps à ce travail avec l'urgence de l'échéance, de m'avoir longuement écoutée et encouragée.

Je remercie les techniciens de Parasito-Mycologie du CHU de Lille, spécialement Rachid Aijjou, Jean-Michel Dewitte et Nadine François, pour leur aide sur ce projet.

Je remercie les membres de l'équipe de recherche U1285, particulièrement les Docteurs Rogatien Charlet, Dina Chokr, Faustine Dubar et Karine Lecointe, Clovis Bortolus et Sabrina Bouzerar pour leur entraînement, leurs conseils et leur aide sur les manips.

Je remercie le Docteur Guillaume Millot pour son aide sur le logiciel R et les discussions intéressantes sur le microbiote, l'analyse bio-informatique, les règles d'orthographe et de grammaire, ...

Je remercie mes parents, mes proches et mes amis d'avoir supporté mon absence prolongée en raison du travail accompli. Merci pour votre bienveillance et vos nombreux encouragements.

Et j'espère n'avoir oublié personne.

Abréviations

α -SMA : α -smooth muscle actin

ACCA : anti-chitobioside carbohydrate antibodies

ADN : acide désoxyribonucléique

AIEC : adherent invasive *Escherichia coli*

ALCA : anti-laminaribioside carbohydrate antibodies

AMCA : anti-mannobioside carbohydrate antibodies

p-ANCA : perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies

anti-C : anti-chitin antibodies

anti-CBir1 : anti-flagellin antibodies

anti-GMCSF : granulocyte macrophage-colony stimulating factor antibodies

anti-GP2 : anti-glycoprotein 2 antibodies

anti-L : anti-laminarin antibodies

anti-OmpC : anti-outer membrane protein C antibodies

ARN : acide ribonucléique

ASCA : anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies

ASV : amplicon sequencing variants

CEACAM6 : carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6

CF : calprotectine fécale

CRP : C-reactive protein

CS : calprotectine sérique

d-NTP : désoxyribonucléotide triphosphate

DO : densité optique

DSS : Dextran sodium sulfate

e-ATP : adénosine triphosphate extracellulaire

FI : fibrose intestinale

FimH : fimbrial adhesin

HBI : Harvey Bradshaw index

IFN : interféron

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

ITS : internal transcribed spacer

LSU : large sub-unit

MC : maladie de Crohn

MEC : matrice extra-cellulaire

MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

NMDS : non-metric multi-dimensional scaling

OTU : operational taxonomic unit

PBS : phosphate buffer saline

PCoA : analyse en coordonnée principale

PCR : polymerase chain reaction

PNN : polynucléaire neutrophile

RCH : rectocolite hémorragique

RT-q-PCR : reverse transcriptase quantitative PCR

SPF : specific pathogen free

SSU : small sub-unit

TCSH : transplantation de cellules souches hématopoïétiques

TGF : transforming growth factor

TLR : Toll like receptor

TNF : tumor necrosis factor

UFC : unit forming colony

Table des matières

Introduction	1
<i>La maladie de Crohn, une maladie inflammatoire chronique de l'intestin</i>	1
<i>Aspects immunologiques et susceptibilités génétiques de la maladie de Crohn</i>	4
<i>La fibrose intestinale, une complication de l'inflammation chronique</i>	6
<i>Les biomarqueurs dans la maladie de Crohn</i>	9
<i>Le rôle du microbiote fongique (appelé aussi mycobiote) dans la maladie de Crohn</i>	11
<i>Méthodes d'analyse du mycobiote digestif</i>	13
<i>Le rôle de S. cerevisiae dans l'inflammation et dans la fibrose intestinale ?</i>	17
Objectifs	19
Partie 1. Evaluation de l'effet de souches de levures du genre Saccharomyces, fournies par la société Lesaffre International, sur l'inflammation et la fibrose intestinale	21
<i>P1. Introduction</i>	21
<i>P1. Matériels et méthodes</i>	22
<i>Souches d'Escherichia coli AIEC et de levures</i>	22
<i>Animaux</i>	23
<i>Modèle murin de fibrose et évaluation de la colonisation</i>	23
<i>Évaluation microscopique de la fibrose</i>	24
<i>Extraction d'ARN et RT-q-PCR</i>	25
<i>Analyses statistiques</i>	26
<i>P1. Résultats</i>	26
<i>Rôle des souches de S. cerevisiae dans la fibrose intestinale chimio-induite sur un modèle murin</i>	26
<i>Développement et validation du modèle cellulaire de fibrose intestinale</i>	34
<i>E. coli adhérent invasif (AIEC), souche LF82, joue un rôle pro-fibrotique au niveau intestinal, mais pas Candida albicans</i>	37
Partie 2. L'origine des ASCA dans la maladie de Crohn : réflexions et expériences	49
<i>P2. Introduction</i>	49
<i>P2. Matériels et méthodes</i>	51
<i>Souches de C. albicans et de S. cerevisiae</i>	51
<i>Animaux</i>	51
<i>Protocole de colite aiguë chimio-induite et colonisation</i>	51
<i>Détermination des ASCA</i>	52
<i>Analyses statistiques</i>	52
<i>P2. Résultats</i>	53

<i>Revue de la littérature. Depuis la découverte des ASCA dans la maladie de Crohn et son lien éventuel avec C. albicans, trente années de recherche consacrées à leur signification en santé humaine</i>	53
<i>La colonisation digestive par S. cerevisiae n'induit pas la synthèse d'ASCA chez les modèles murins de colite aiguë induite par le DSS</i>	71
<i>La colonisation digestive par S. cerevisiae n'induit pas non plus la synthèse d'ASCA dans le modèle de fibrose intestinale chimio-induite</i>	72
Partie 3. Analyse du mycobiote et de l'association entre la présence des ASCA et colonisations par Candida, Saccharomyces et AIEC dans la maladie de Crohn. Résultats de l'étude MAGIC	75
<i>P3. Introduction</i>	75
<i>P3. Matériels et méthodes</i>	76
<i>Design et population de l'étude MAGIC</i>	76
<i>Détermination des biomarqueurs</i>	77
<i>Métagénomique fongique ciblée</i>	78
<i>Composition et caractérisation du microbiote fécal bactérien</i>	78
<i>Analyses statistiques</i>	79
<i>P3. Résultats</i>	79
<i>Descriptif des caractéristiques cliniques et biologiques des sujets inclus dans l'étude MAGIC</i>	79
<i>Signatures du microbiote fécal de l'individu sain présentant un risque élevé d'apparition de la maladie de Crohn</i>	83
<i>Le mycobiote fécal des patients atteints de la maladie de Crohn n'est pas modifié en début de maladie</i>	84
<i>La présence des ASCA n'est pas associée à un profil fongique spécifique au début de l'évolution de la maladie et n'est pas corrélée avec la détection de S. cerevisiae</i>	93
<i>C. albicans et S. cerevisiae dans la maladie de Crohn, recueil des études de métagénomique fongique</i>	95
Discussion	103
Conclusions et perspectives	115
Références	117

Introduction

La maladie de Crohn, une maladie inflammatoire chronique de l'intestin

La maladie de Crohn (MC) est caractérisée par une inflammation chronique, susceptible d'affecter l'intégralité du tube digestif, débutant majoritairement chez le jeune adulte (Saad *et al.*, 2016). Son étiologie précise reste inconnue à ce jour, plusieurs facteurs ont été impliqués. Ainsi, la pathogenèse de cette maladie serait la conséquence de l'interaction entre susceptibilité génétique et impact environnemental sur le microbiome, lequel, à travers une barrière intestinale fragile, mènerait à une activation intestinale immunitaire inappropriée (Ramos & Papadakis, 2019). Les apparentés des patients atteints de la MC ont un risque multiplié par 10 ou 15 de développer eux-mêmes la maladie (Spehlmann *et al.*, 2008). Environ 12 % des patients atteints de la MC ont des antécédents familiaux de MC (Moller *et al.*, 2015). Ces familles partagent une partie de leur patrimoine génétique mais présentent également des similarités dans la composition de leur microbiote intestinal (Dill-McFarland *et al.*, 2019).

Alors que l'incidence de la MC semble stable dans les pays occidentaux, à l'exception de celle de la population pédiatrique (Ghione *et al.*, 2018), celle-ci est en pleine croissance dans le reste du globe nouvellement industrialisés (Kaplan & Ng, 2017). Récemment, l'incidence annuelle de la MC a été estimée à 12,7/100 000 habitants en Europe avec une prévalence estimée à 322 cas pour 100 000 habitants (Ng *et al.*, 2018). En France, selon les dernières observations du registre EPIMAD (www.observatoire-crohn-rch.fr/wp-content/uploads/2015/09/EPIMAD-donne%CC%81es-re%CC%81centes.pdf), la prévalence en France était estimée à 118 835 cas de MC, soit 2 pour 1000 habitants. Au-delà de la souffrance physique et du handicap qu'elle provoque, cette maladie chronique présente un fort retentissement psychosocial. Il s'agit d'un véritable problème de santé publique mondial ayant d'importantes répercussions médico-économiques (Burisch *et al.*, 2013).

Le diagnostic de la MC requiert une évaluation globale basée sur i) l'histoire et l'examen clinique du patient, ii) les résultats des tests biologiques (sériques et fécaux) et des examens complémentaires (imagerie et endoscopie), ainsi que sur iii) l'analyse histologique de biopsies digestives (Maaser *et al.*, 2019). Les symptômes digestifs varient selon le stade de la maladie au moment du diagnostic. Ils associent principalement diarrhée chronique, douleur abdominale et perte de poids. Bien que moins fréquentes que dans la rectocolite hémorragique (RCH) – autre maladie inflammatoire chronique de l'intestin –, la présence de sang et/ou de mucus dans les selles est possible chez un patient sur 2 (Gomollon *et al.*, 2017). Des manifestations extra-intestinales sont souvent associées à la MC, apparaissant parfois en amont des symptômes

digestifs, affectant de multiples organes tels que le système musculosquelettique, l'œil, la peau, le foie ou les voies biliaires (Vavricka *et al.*, 2011). Lorsqu'une MC est évoquée, la réalisation de biopsies des lésions inflammatoires, lors d'une iléo-colonoscopie, est nécessaire pour obtenir un diagnostic fiable (Maaser *et al.*, 2019).

La muqueuse digestive présente des lésions habituellement segmentaires, asymétriques, et des zones inflammatoires séparées par des zones saines. Les lésions inflammatoires sont constituées d'ulcérations plus ou moins profondes telles que des ulcérations aphtoïdes et plus ou moins larges de la muqueuse (**Figure 1**). À l'examen microscopique, sont visualisées des érosions de la muqueuse, des distorsions glandulaires, une infiltration lympho-plasmocytaire du chorion, voire transmurale (intéressant toute la paroi intestinale), souvent sous forme de nodules lymphoïdes. La paroi intestinale est épaissie, l'inflammation affectant l'ensemble de la paroi. Des granulomes épithélioïdes et géantocellulaires très évocateurs de la MC sont observés dans 20 à 30 % des cas (**Figure 2**). Les fissures transmuraux, les fistules et les abcès sont fréquents (Collège de Gastro-entérologie).

Même si certains éléments sont très évocateurs, aucun n'est pathognomonique. Le diagnostic ne peut être posé que devant l'ensemble des différents arguments cliniques, endoscopiques, radiologiques, biologiques et histologiques.

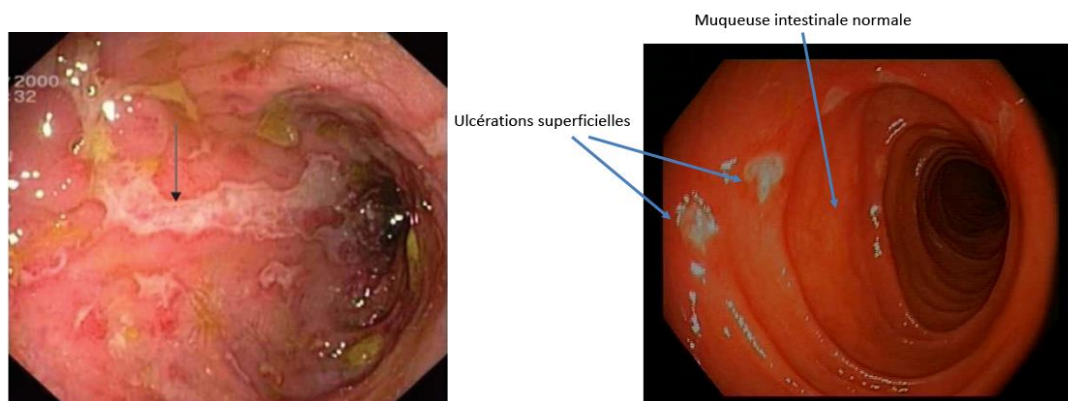
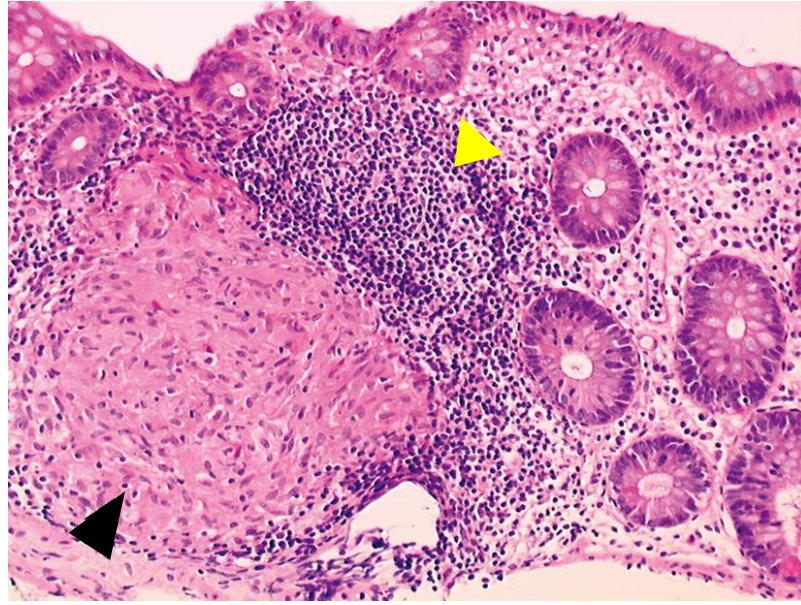


Fig. 1. Aspects endoscopiques de la maladie de Crohn.
Ulcération en carte de géographie (flèche noire) au cours d'une maladie de Crohn.
(Photo de gauche, Collégiale des Universitaires en Hépatogastro-Entérologie).
Ulcérations superficielles reposant sur une muqueuse d'aspect normal.
(Photo de droite, Image : © Pr David Laharie, CHU de Bordeaux).



***Fig. 2. Aspects histologiques de la maladie de Crohn.
Muqueuse colique avec un infiltrat inflammatoire (amas lymphoïde, flèche jaune) et un granulome
épithélioïde sans nécrose (flèche noire). (Collège Français des Pathologistes)***

L'évolution de la MC est caractérisée par une succession de poussées inflammatoires entrecoupées de phases de rémission clinique. Puisque l'étiologie de la MC n'est pas connue, il n'existe pas de traitement curatif. L'objectif principal du traitement est d'entraîner le plus précocement possible, la rémission clinique et endoscopique afin d'empêcher la progression de la maladie pour prévenir les dommages irréversibles et l'invalidité intestinale. Les traitements actuels ne ciblent que la maladie établie (« treat-to-target strategy »), aucun n'est capable de prévenir ou d'inverser les dommages occasionnés (Colombel *et al.*, 2017). Les molécules actuellement couramment utilisées sont les corticoïdes, les immunosuppresseurs (thiopurines), et les biothérapies (principalement anti-TNF- α). Des recommandations issues d'un consensus national français ont récemment été établies pour le traitement de la MC, intégrant une molécule récente, l'ustekinumab, anticorps monoclonal dirigé contre les interleukines 12 et 23 (Amiot *et al.*, 2021).

L'inflammation chronique conduit à des formes compliquées graves telles que l'occlusion intestinale, les fistules, les abcès et suppurations chroniques du périnée. Ces complications sont considérées comme des changements de phénotype et nécessitent une prise en charge chirurgicale. Plus tardivement, la MC peut également se compliquer de cancer (Torres *et al.*, 2017). La MC est complexe et cela se reflète dans la grande variabilité des présentations cliniques. A des fins de recherche et de prise en charge adaptée du patient, une classification clinique est devenue nécessaire avec le temps. Les gastro-entérologues s'appuient

aujourd'hui encore et depuis 2005 sur la classification de Montréal pour déterminer les entités cliniques (Silverberg *et al.*, 2005). Cette classification prend en compte l'âge au diagnostic, la localisation de la maladie et son comportement. Pour chaque patient, elle est susceptible d'évoluer avec la maladie (**Tableau 1**). En pratique clinique, l'indice d'Harvey Bradshaw (HBI) est également très utile (Harvey & Bradshaw, 1980). Il a été développé dans les années 1980 pour remplacer l'indice d'activité de la MC, le CDAI (Crohn disease activity index), jugé trop compliqué et incluant des éléments biologiques, empêchant une évaluation immédiate du patient (Best *et al.*, 1976). L'HBI est donc un score uniquement clinique, prenant en compte 5 éléments : les douleurs abdominales (cotées de 0 à 3), le nombre de selles liquides par jour (0 à 9), le bien être général du patient (0 à 4), la présence d'une masse abdominale (0 à 3) et la présence de complications extra-intestinales (1 point par complication). Cet indice a pour limite de surestimer l'activité de la maladie en présence de troubles intestinaux concomitants ou de la sous-estimer chez les patients ayant des complications infracliniques de type sténose ou fistule. Cependant, les patients ayant un score ≤ 3 ont une forte probabilité d'être en rémission, alors que les patients ayant un score ≥ 8 sont considérés comme ayant une maladie sévère (Sturm *et al.*, 2019).

Tableau 1. Classification de Montréal. 2005. (Silverberg *et al.*, 2005)

Age au diagnostic (A)	A1 : < 16 ans A2 : 17-40 ans A3 : > 40 ans
Localisation (L)	L1 : iléon terminal L2 : côlon L3 : iléo-colique ± L4 : en amont de l'iléon terminal
Comportement (B)	B1 : non sténosant, non fistulisant B2 : sténosant B3 : fistulisant ± p : atteinte périanale

Aspects immunologiques et susceptibilités génétiques de la maladie de Crohn

Parallèlement à l'utilisation de molécules immunosuppressives multiples, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (TCSH) fut envisagée comme perspective thérapeutique de la MC. En effet, une évolution favorable de la MC suite à la transplantation de certains patients atteints concomitamment de lymphome ou de leucémie fut observée. Ces observations ont ouvert la voie vers cette option thérapeutique de la MC, mais également d'autres maladies auto-immunes. Ce traitement est alors envisagé sous certaines conditions dans des cas d'évolution

sévère de la maladie. Beaucoup d'interrogations persistent encore 25 ans après la première greffe dans ce contexte (Ruiz *et al.*, 2018). La TCSH est envisagée comme une reprogrammation du système immunitaire.

L'immunité de la muqueuse joue un rôle déterminant dans l'apparition de la MC et dans la réponse immunitaire innée, notamment par interaction avec les différentes cellules présentatrices d'antigènes. La muqueuse intestinale constitue la première barrière physico-chimique contre le contenu intraluminal indésirable tels que les microorganismes, les toxines, ou différents antigènes, tout en restant perméable aux nutriments. Des altérations de la muqueuse sont observées dans la MC et il n'est toujours pas tranché si ces altérations sont une cause ou une conséquence de la maladie. Cependant, les recherches menées sur l'immunopathogénèse ont permis au fil du temps de proposer des thérapeutiques de plus en plus adaptées. Ces altérations de la muqueuse exposent à une activation des cellules de l'immunité, impliquant des mécanismes appartenant à l'immunité innée et adaptative et la production incontrôlée de nombreuses molécules inflammatoires (Ahluwalia *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2017). L'exposition de la muqueuse pourrait être liée à l'altération de la couche de mucus intestinal. Pour exemple, un variant du gène *Muc2* codant pour une mucine prépondérante, rend susceptible génétiquement aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et à la perte de l'intégrité épithéliale, exposant en continu aux antigènes microbiens et à l'activation du système immunitaire (Choy *et al.*, 2017).

Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs ou *pattern recognition receptors*) sont présents à la surface des différentes cellules impliquées dans l'immunité innée et représentent l'interface entre le microbiote et le système immunitaire. Les récepteurs de type Toll (TLRs ou *Toll-like receptors*) et les récepteurs de type NOD (NLRs ou nucleotide oligomerization domain receptors) sont les récepteurs de reconnaissance des antigènes microbiens. Les TLRs, membranaires, induisent la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interféron de type 1 (IFN) et jouent un rôle important dans l'activation des lymphocytes T et de l'immunité adaptative. Une réponse inflammatoire chronique pourra être provoquée par l'activation persistante de l'expression des TLRs, et notamment les TLRs 2 et 4 dans les MICI. Les NLRs agissent comme récepteurs intracellulaires dépendants de l'activation des TLRs. Certaines mutations du gène codant pour NOD2 (R702W, G908R, and 3020insC) ont été décrites comme associées à une susceptibilité génétique augmentée à la MC (de localisation iléale notamment) (Choy *et al.*, 2017).

Une réponse inflammatoire plus spécifique aux antigènes est obtenue avec le système immunitaire adaptatif. Les MICI sont fortement médiées par les lymphocytes T, anormalement activés. Au début de la maladie, une réponse de type Th-1 anormale, dues notamment à l'augmentation de production des IL-18 et 12, serait associée à l'inflammation intestinale. La réalité est bien plus compliquée qu'un déséquilibre de la balance Th-1/Th-2, puisque la réponse de type Th-17 semble également être impliquée dans la MC. La réponse de type Th-17 est induite par IL-23, *in vivo*, et TGF- β et IL-6, *in vitro*. Les cellules Th-17 produisent les interleukines IL-17A, IL-17F, IL-21, et IL-22 et expriment le facteur de transcription ROR- γ . Des gènes de susceptibilité aux MICI ont également été identifiés dans la voie de type Th-17, impliquant IL-23R, IL-12B, JAK2, STAT3, et CCR6. Les modèles expérimentaux ont montré des effets opposés de la voie Th-17. Il s'agit d'un fait important à prendre en compte, puisque dans les essais cliniques impliquant des anticorps monoclonaux ciblant cette voie, le secukinumab (dirigé contre IL-17A) était inefficace et causait des effets indésirables, alors que l'ustekinumab semble bien plus prometteur (Choy *et al.*, 2017; Hayashi & Nakase, 2022). Fait intéressant, la réponse de type Th-17 est également impliquée dans les infections fongiques. Pour exemple, la candidose cutanéomuqueuse chronique est associée à une altération de la réponse des cellules Th-17 (Humbert *et al.*, 2018). D'une manière générale, la différenciation cellulaire de type Th-17 est notamment déterminée par la composition du microbiote intestinal (S. H. Lee *et al.*, 2018).

La fibrose intestinale, une complication de l'inflammation chronique

La fibrose intestinale (FI) est une complication fréquente de la MC conduisant à l'occlusion intestinale (**Figure 3**). Jusqu'à 10% des patients atteints de la MC présentent des complications liées à la fibrose dès le diagnostic, et 50% des patients vont évoluer vers un phénotype fibrosant au cours du suivi (Ma *et al.*, 2019). Les complications liées à la fibrose nécessitent une hospitalisation et une intervention chirurgicale, à l'origine d'une bonne partie des coûts financiers de la prise en charge de cette maladie. Malgré les avancées thérapeutiques permettant le contrôle de l'inflammation dans la MC, il y a eu peu de progrès dans le développement de thérapeutique curative ou préventive de la FI. Les mécanismes impliqués dans l'apparition de la FI ne sont probablement pas très éloignés de ceux impliqués dans la fibrose d'autres organes tels que le foie ou le poumon. La réversibilité des lésions de fibrose hépatiques, rénales ou pulmonaires a été observée, permettant le développement de thérapeutique anti-fibrose (Ma *et al.*, 2019). Un espoir réside donc dans la compréhension des mécanismes de la FI.

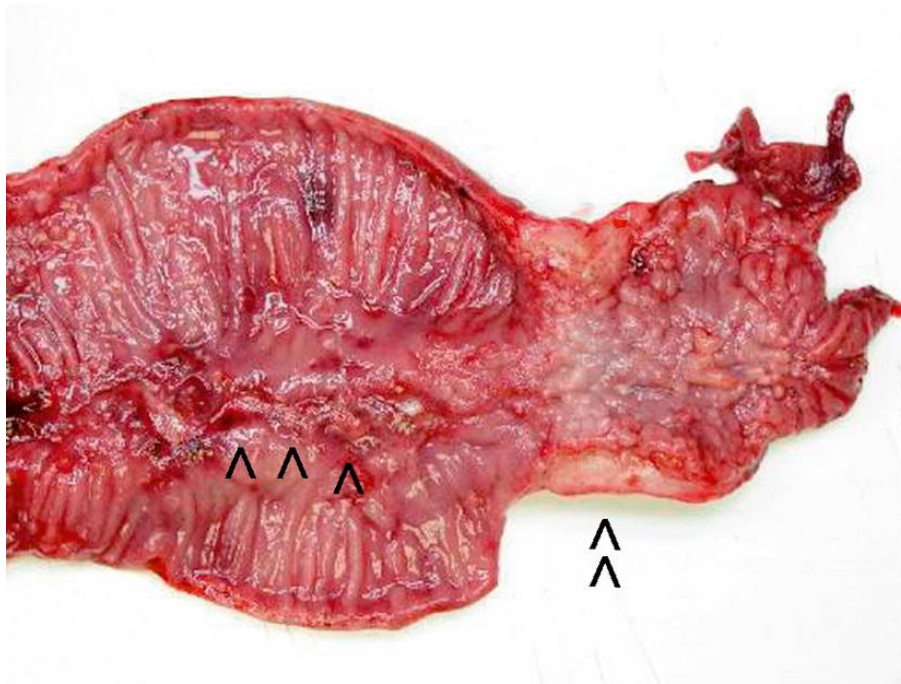


Fig. 3. Pièce de résection iléale. Sténose (double flèche) avec épaissement de la paroi en regard et ulcération de la muqueuse en rail (flèche). (Collège Français des Pathologistes)

La restauration de l'intégrité après un dommage tissulaire dépend d'un processus physiologique de réparation. Dans la fibrose, la régulation de ce processus est défective et mène à une réponse exagérée. L'inflammation chronique est un prérequis à l'apparition de la FI, mais n'est pas le seul facteur déclenchant de ce processus. La progression de la fibrose vers la sténose implique des modifications phénotypiques cellulaires (des fibroblastes, myofibroblastes et cellules musculaires lisses) et des interactions de ces cellules avec les cellules de l'immunité encore mal comprises (Alfredsson & Wick, 2020). Au cours de la MC, la FI conduit à des formes sténosantes dues à une hyper-expression des composants de la matrice extracellulaire (MEC) par activation des myofibroblastes en réponse à une inflammation chronique faisant intervenir une réponse immunitaire inadaptée (Latella *et al.*, 2015; Speca *et al.*, 2012). Sous un stimulus inflammatoire chronique et continu, l'environnement cytokinique varie. Une prédominance de la cytokine TGF- β mène à une transformation phénotypique des différentes populations cellulaires (mésenchymateuses et non mésenchymateuses) en myofibroblastes, caractérisés par l'expression spécifique de α -SMA (α -Smooth Muscle Actin). Ce phénotype cellulaire qui sécrète les composants de la MEC (collagène, fibronectine) présente à la fois les propriétés des fibroblastes et celles des cellules musculaires lisses (Rieder, 2013). Les fibroblastes et myofibroblastes issus du processus de réparation tissulaire physiologique sont normalement voués à l'apoptose. La dérégulation du processus de cicatrisation est probablement d'origine multifactorielle. Différents acteurs

pourraient être impliqués tels que l'environnement inflammatoire chronique, le microbiote et des facteurs alimentaires (Alfredsson & Wick, 2020) (**Figure 4**).

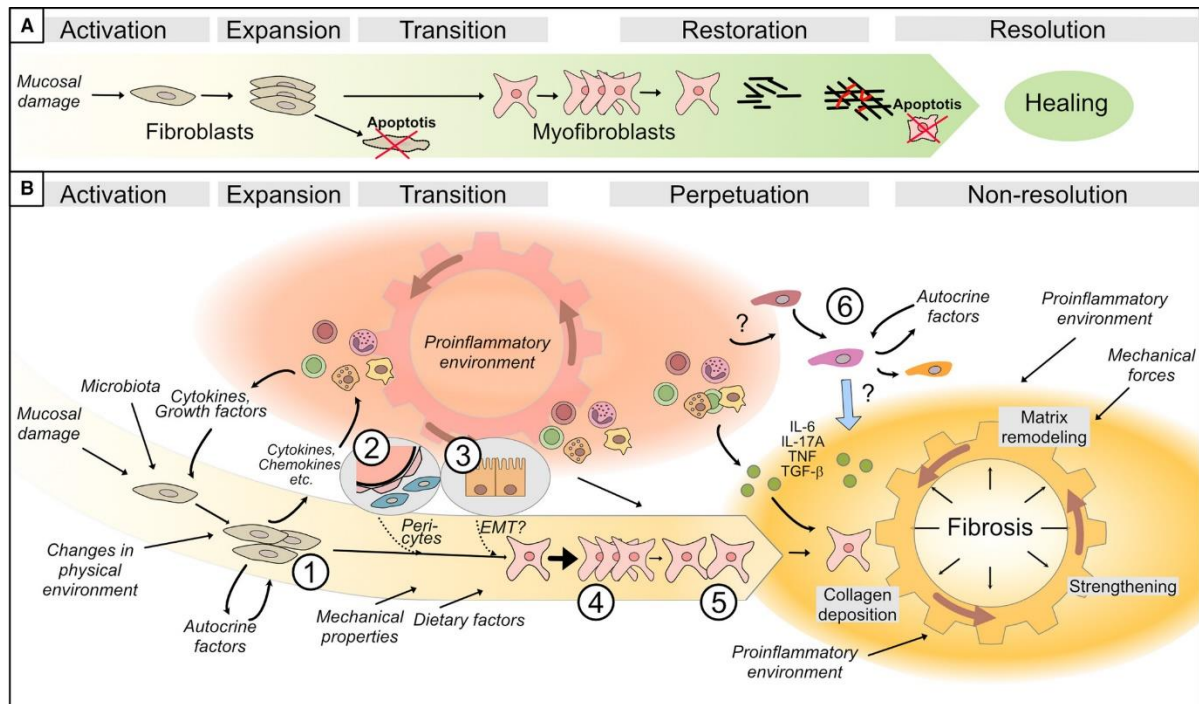


Fig. 4. Cellules et facteurs impliqués dans le processus de sténose dans le tissu intestinal.
Issu de Alfredsson et al. (Alfredsson & Wick, 2020)

(A) Séquence des événements du processus normal de guérison simplifié et idéalisé. Celle-ci implique l'activation et l'expansion des fibroblastes et la transition ultérieure des fibroblastes en myofibroblastes, qui finalisent la restauration de la matrice extracellulaire. Le processus se produit sur un temps limité. Lorsque le processus de réparation est terminé, les cellules restauratrices devenues inutiles subissent l'apoptose et la cicatrisation est obtenue.

(B) Chez certains patients atteints de la maladie de Crohn, le processus de guérison « normal » de la paroi intestinale est aberrant. L'environnement pro-inflammatoire (roue dentée rouge) active et alimente l'activation et le recrutement des précurseurs des myofibroblastes, qui comprennent (1) les fibroblastes résidant dans la matrice, (2) les péricytes et (3) les cellules épithéliales. La transition vers les myofibroblastes peut être davantage facilitée en présence de certains signaux environnementaux. Les produits libérés par les fibroblastes activés et les cellules immunitaires, créent une boucle de rétroaction positive afin que la roue dentée continue d'être alimentée. Cela entraîne le passage d'un processus initial induit par l'inflammation à un processus facilité par l'inflammation, car les cellules mésenchymateuses activées montrent successivement leur indépendance par rapport aux signaux de stimulation. Par la suite, les myofibroblastes (4) se dilatent et (5) migrent vers le site « lésé » où ils sécrètent du collagène. La matrice nouvellement formée est renforcée par contraction et réticulation, comme indiqué dans la zone « Fibrosis » (roue dentée jaune). Cependant, dans un contexte où les médiateurs pro-inflammatoires sont également fournis par les cellules immunitaires, et peut-être aussi par (6) les cellules musculaires lisses infiltrantes, la dégradation de la matrice est également stimulée. Cela conduit à un cercle vicieux avec une alternance de dépôt et de dégradation de la matrice, conduisant à une non-résolution du processus de cicatrisation et à la fibrose.

Pour étudier la fibrogenèse, différents modèles animaux ont été développés. Le plus souvent ces modèles font appel à une fibrose induite chimiquement, par exemple par le Dextran Sulfate Sodium (DSS). Cependant, l'érosion épithéliale provoquée par ces produits ne reflète pas fidèlement le processus à l'origine de la fibrose observée dans les MICI. L'utilisation de *Salmonella typhi* et de streptomycine chez la souris pourrait mimer plus exactement les mécanismes à l'origine de la FI, mais cette bactérie n'a jamais été impliquée dans la pathogénèse des MICI. Il n'est pas non plus certain que l'injection de composants peptidoglycane-

polysaccharide de bactéries dans la paroi intestinale de souris reflète réellement les mécanismes impliqués, mais elle induit aussi une inflammation et une FI. Les souris SAMP1/YitFcsJ développe une iléite spontanée selon des caractéristiques proches évolutives de la MC, mais l'élevage de ces souris est difficile et coûteux. D'autres modèles ont été utilisés plutôt dans une perspective d'étude de molécules agissant contre la fibrose, sans que ceux-ci ne reflètent le processus observé dans les MICI (Rieder *et al.*, 2017).

Les biomarqueurs dans la maladie de Crohn

Les intérêts des biomarqueurs sont multiples. Ils peuvent être utilisés pour le diagnostic, en remplacement de procédures invasives, pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique et le suivi de l'évolution de la maladie. Le diagnostic de la MC étant parfois difficile, les biomarqueurs ont d'abord trouvé leurs places dans ce contexte. Dans la MC, les biomarqueurs sont sériques et fécaux. Pour affirmer l'origine inflammatoire des symptômes digestifs, chaque patient doit bénéficier d'un bilan biologique standard comprenant une numération formule sanguine, une évaluation de la CRP (C-reactive protein), un ionogramme, les enzymes hépatiques et un échantillon de selles pour analyse microbiologique. Une hyperleucocytose associée à une élévation du taux de la CRP permet d'associer les troubles digestifs au syndrome inflammatoire, non spécifique des MICI et parfois absent dans ce contexte.

La calprotectine fécale (CF), protéine synthétisée par les polynucléaires neutrophiles (PNN), est un marqueur particulièrement intéressant dans les MICI pour sa sensibilité. La calprotectine est une protéine de liaison au calcium et au zinc de la famille S100. Elle constitue environ 60% des protéines cytosoliques des PNN. Il s'agit d'une protéine complexe hétérodimérique, formé de 2 sous-unités, S100A8 et S100A9, ayant des propriétés antimicrobiennes et immunomodulatrices, lorsqu'elle est externalisée de la cellule. Ses autres propriétés sont antitumorales et pro-apoptotiques. La calprotectine est un marqueur du renouvellement des PNN et est synthétisée et externalisée en grande quantité en cas d'inflammation (Poullis *et al.*, 2003). La valeur de la CF est bien corrélée avec l'activité de la maladie évaluée lors de l'endoscopie, surtout pour une inflammation de localisation colique dans la MC. Cependant, une méta-analyse démontre également un bon rendement diagnostique d'une maladie active de l'intestin grêle, avec une bonne valeur prédictive négative (90% pour une valeur < 50 µg/g de selle). Son utilisation est donc recommandée par les sociétés savantes européennes et américaines (American College of Gastroenterology (ACG), European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) et European Society of Gastrointestinal and

Abdominal Radiology (ESGAR)) à des fins diagnostiques mais également pour anticiper les rechutes et la réponse aux traitements utilisés. Il n'existe pas de valeur seuil réellement objectivée. Les résultats d'une méta-analyse suggéraient la valeur de 150 µg/g de selle pour distinguer les MICI des autres causes d'inflammation intestinale (Lichtenstein *et al.*, 2018; Maaser *et al.*, 2019).

Le rôle de la calprotectine sérique (CS) dans la MC, mais également et plus généralement dans les MICI, a fait l'objet de peu d'études, ne permettant pas de préciser son rôle en tant que marqueur diagnostique ou pronostique. Des associations entre élévation de la CS et la charge de morbidité, le pronostic ou les rechutes ont été retrouvées dans les MICI. Selon une revue de la littérature, l'augmentation de la CS serait plutôt représentative d'une inflammation systémique que localisée, étant donné une corrélation avec les taux de CRP, contrairement à la CF (Azramezani Kopi *et al.*, 2019). Depuis la publication de cette revue, certains travaux montrent une corrélation entre les taux de CS et l'inflammation évaluée par endoscopie dans la RCH (Carlsen *et al.*, 2019; Suarez Ferrer *et al.*, 2019), alors que selon l'étude de Mori *et al.*, la CS semblait être un marqueur plus approprié pour évaluer les poussées de la MC que celles de la RCH (Mori *et al.*, 2021).

Dans les années 1980, certaines hypothèses émises, concernant l'étiologie de la MC, amenaient sur les pistes de l'allergie ou de l'hypersensibilité aux antigènes d'origine alimentaire. C'est ainsi que furent découverts les anticorps sériques anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) qui avaient été proposés pour le diagnostic différentiel entre MC et RCH (Main *et al.*, 1988). Alors que l'association des ASCA (anticorps d'isotype A ou G, reconnaissant des séquences oligomannosidiques de degré de polymérisation 3 à 4 avec un motif Man α -1,3 Man terminal exprimées sur le phosphopeptidomannane) et des anticorps périnucléaires anti-cytoplasme de PNN (p-ANCA) a montré des performances notables pour la distinction entre la MC et la RCH, d'autres anticorps principalement dirigés contre des antigènes microbiens ont été identifiés et évalués dans ces pathologies. Il s'agit essentiellement des anticorps anti-glycans tels que les ACCA (chitobioside ; GlcNAc(β 1,4)GlcNAc(β) ; IgA), les ALCA (laminaribioside ; Glc(β 1,3)Glc(β) ; IgG), les AMCA (mannobioside ; Man(α 1,3)Man α ; IgG), les anti-L (laminarin ; (Glc(β 1,3))₃n (Glc(β 1,6))_n ; IgA) et les anti-C (chitin ; (GlcNAc(β 1,4))_n ; IgA), mais également des anticorps anti-OmpC (porine d'*Escherichia coli* ; IgA), les anti-I2 (séquence I2 associée à *Pseudomonas aeruginosa* ; IgA) et les anti-CBir1 (flagelline de bactéries Gram positive ; IgG) (Bonneau *et al.*, 2015; Papp *et al.*, 2007; Prideaux *et al.*, 2012). A ces anticorps anti-microbiens s'ajoutent des auto-anticorps tels que les anticorps

dirigés contre la glycoprotéine 2 (anti-GP2) et contre le facteur de croissance GM-CSF (anti-GM-CSF) (Bonneau *et al.*, 2015). De nombreuses études avaient pour objectifs de déterminer si ces biomarqueurs sériques, en association ou isolément, permettaient de classer la maladie ou de prédire son évolution clinique (Ince & Elliott, 2019). Finalement, par manque de preuve, les recommandations établies récemment par les sociétés d'experts américains et européens n'impliquent pas ces biomarqueurs sériques à des fins diagnostiques, ni pour le monitoring des complications (Lichtenstein *et al.*, 2018; Maaser *et al.*, 2019). La prévalence des ASCA est estimée entre 29 et 71% dans la MC, 0 à 29% dans la RCH et 0 à 16% chez des témoins sains (Ince & Elliott, 2019). Le manque de sensibilité des tests de détection des ASCA est principalement en cause dans l'absence de recommandation de ceux-ci, y compris lors d'une utilisation combinée avec les anticorps p-ANCA (Maaser *et al.*, 2019). Les ASCA restent cependant couramment utilisés en pratique clinique et largement étudiés (Siegel *et al.*, 2016). De façon intéressante, il a été observé et confirmé que l'association de biomarqueurs sériques, dont les ASCA de type IgA permettait de prédire l'apparition de la MC jusque 5 ans avant l'apparition des symptômes, ce qui n'est pas le cas dans la RCH (Torres *et al.*, 2020). Une fois détectés, les ASCA et d'autres biomarqueurs sont généralement stables au cours du temps (Prideaux *et al.*, 2012). La positivité de plusieurs de ses marqueurs et l'amplitude des réponses sérologiques est corrélée avec la sévérité de la MC (Choung *et al.*, 2016; Joossens *et al.*, 2010; Z. Z. Wang *et al.*, 2017). Certains auteurs rapportent également que la présence des ASCA est un facteur de gravité dans la MC, et un facteur prédictif d'évolution vers la fibrose (Kim *et al.*, 2021; Rieder *et al.*, 2017).

Le potentiel pathogène des différents anticorps identifiés dans la MC, et notamment des ASCA, n'a pas encore été élucidé. L'origine et l'implication de ces anticorps dans la physiopathologie de la MC restent à découvrir, la nature de l'immunogène des ASCA reste également inconnue même si certaines études suspectent l'implication de *C. albicans* (Standaert-Vitse *et al.*, 2006). Il apparaît de plus en plus improbable que *Saccharomyces cerevisiae* soit responsable de cette réponse humorale et qu'une nouvelle dénomination de ces anticorps s'impose. En attendant l'identification de l'immunogène, nous suggérons désormais de dénommer ces anticorps AMA (*anti-mannosides antibodies*).

Le rôle du microbiote fongique (appelé aussi mycobiote) dans la maladie de Crohn

Depuis le début des années 2000, la description des anticorps anti-glycanes fongiques dirigés contre les fragments de mannane (ASCA), de β -(1,3)-D-glucane (ALCA) et de chitine (ACCA),

a amené certains auteurs à suspecter l'implication des agents fongiques dans le déclenchement ou le maintien de l'inflammation intestinale associée à la MC. L'étude du microbiote intestinal par séquençage à haut débit ayant élargi les possibilités d'analyse, la dysbiose bactérienne, résultant d'une diminution de la diversité des populations, est largement rapportée au cours de la MC (Ramos & Papadakis, 2019). Il reste cependant à déterminer si ces observations sont une cause ou une conséquence de la maladie. Il a notamment été montré une diminution de la diversité bactérienne avec implantation de souches pathogènes (pathobiontes) d'*Escherichia coli* dites AIEC (adherent invasive *E. coli*) (Boudeau *et al.*, 1999) et diminution de certaines espèces non pathogènes (symbiontes), douées de propriétés anti-inflammatoires, telles que *Faecalibacterium prausnitzii* (Fujimoto *et al.*, 2013; Sokol *et al.*, 2008). Parallèlement à la dysbiose bactérienne, différents travaux ont suggéré l'implication du mycobiote intestinal dans la MC (Miyoshi *et al.*, 2018). Précédant les études métagénomiques, les travaux de notre équipe ont montré la présence d'ASCA chez 60% des patients atteints de la MC avec une fréquence plus élevée de la colonisation digestive par *Candida albicans* chez les patients atteints de la MC et leurs parents sains du 1^{er} degré (Quinton *et al.*, 1998; Sendid *et al.*, 1998; Standaert-Vitse *et al.*, 2009). Une autre analyse concernant des familles de patients atteints de MC a montré une dysbiose fongique avec une diminution de la diversité des espèces et une exclusion mutuelle des espèces *C. albicans* et *S. cerevisiae*, cette dernière espèce étant généralement utilisée pour ses propriétés probiotiques. Par ailleurs, l'interaction entre *C. tropicalis* et *E. coli* et/ou *Serratia marcescens*, induit la formation d'un épais biofilm, forme de protection des microorganismes contre le système immunitaire et les médiateurs anti-microbiens. Une forte interaction entre ces 3 microorganismes existe, cependant, les mécanismes moléculaires impliqués et leur rôle dans la MC n'ont pas encore été identifiés (Hoarau *et al.*, 2016; Sokol *et al.*, 2016). De manière intéressante, alors que *Candida* semble être associé à un profil pro-inflammatoire et présente la capacité à s'associer pour nuire avec d'autres pathogènes bactériens, il a été montré que *S. cerevisiae* semblait interagir plutôt bénéfiquement contre la nuisance de *C. albicans* ou *E. coli*. En effet, dans un contexte inflammatoire, alors que *C. albicans* prolifère et colonise volontiers les muqueuses lésées, le probiotique *S. boulardii* (variété de *S. cerevisiae*) inhibe la colonisation par *C. albicans*, mais également diminue la gravité de l'inflammation provoquée par le DSS dans un modèle murin de colite inflammatoire (Jawhara & Poulain, 2007). De la même façon, *S. cerevisiae* inhibe l'adhésion d'*E. coli* AIEC (souche LF82) aux entérocytes, ainsi que l'inflammation provoquée par *E. coli* dans un modèle murin surexprimant la glycoprotéine CEACAM6 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6, ou CD66c) humaine, glycoprotéine favorisant l'adhésion d'*E. coli* et l'inflammation de cette

bactérie (Sivignon *et al.*, 2015). Il a été montré également qu'une fraction extraite de la paroi cellulaire de cette même souche de *S. cerevisiae* et constituée de mannane et de glucane inhibe fortement l'adhésion d'*E. coli* AIEC *in vivo* (Sivignon *et al.*, 2021).

Méthodes d'analyse du mycobiote digestif

Il existe différents moyens d'analyser le mycobiote digestif. Chaque méthode comporte ses écueils. Alors qu'il serait possiblement plus pertinent d'étudier les microorganismes endoluminaux (résidents) situés au plus proche des lésions, sur des biopsies digestives, la plupart des études se concentrent plutôt sur les selles, de par la facilité à les obtenir sans caractère invasif. Cependant, la défécation n'est pas réalisée sur demande et les conditions de recueil, de conservation (température, tampon stabilisateur) et de transport peuvent influencer sur les résultats en matière d'abondance, de richesse et de diversités (alpha, beta) microbiennes, comme cela a été rapporté pour le microbiote bactérien (Choo *et al.*, 2015). De plus, dans les conditions du recueil à domicile, la stérilité des échantillons peut être affectée, des contaminations d'origine environnementale peuvent biaiser les résultats. Le microbiote digestif est le plus abondant du corps humain avec une abondance bactérienne qui augmente depuis l'estomac (10^1 à 10^3 cfu/ml) vers le côlon (10^{10} à 10^{13} cfu/ml). Dans le côlon, le mycobiote représente, en raison d'un volume cellulaire important par rapport à celui des bactéries, 1 à 2% de la biomasse microbienne totale et <1% du matériel génétique (Iliev & Cadwell, 2021). L'extraction d'ADN peut donc être la source de biais lors de l'analyse du mycobiote fécal. En effet, la présence d'ADN bactérien en grande quantité va limiter l'extraction d'ADN fongique. Ainsi, les conditions et méthodes d'extraction sont des paramètres importants à prendre en considération. Selon l'étude de Huseyin *et al.*, une pré-lyse mécanique est une étape indispensable lors de l'extraction d'ADN précédant les analyses du mycobiome. Par contre, le rendement d'extraction d'ADN, ne semble pas forcément être un facteur limitant (Huseyin *et al.*, 2017). Alors que les réactifs peuvent être source de contamination en ADN, il est indispensable d'ajouter un contrôle négatif dès cette étape d'extraction. Après extraction, il est possible d'envisager deux types d'analyse : i) analyse selon des méthodes de métagénomique ciblée ou ii) analyse après séquençage du génome entier. Même si la seconde méthode permet de s'affranchir d'une étape de PCR et permet d'obtenir des informations taxonomiques très complètes, le coût, la durée et la quantité de données générées lors de l'analyse représentent un frein à son utilisation. De plus, face à l'expérience accumulée en matière de métagénomique

ciblée, la conception et le développement des outils d'analyse et de calculs semblent répondre aujourd'hui favorablement à nos besoins.

Plusieurs facteurs concourent aux biais liés à l'étape de la PCR. L'utilisation des selles, comme matrice initiale, implique un grand nombre d'inhibiteurs de PCR. La méthode d'extraction peut jouer un rôle dans le contrôle de ces inhibiteurs, en limitant leurs interférences. Ainsi, l'utilisation de tampons spécifiques à l'extraction des selles ou encore une extraction d'ADN par des billes magnétiques peuvent réduire l'effet des inhibiteurs de PCR. La qualité de la polymérase va être un facteur de la fiabilité des données. Une polymérase de haute-fidélité (taux d'erreur limité) et la faible taille des amplicons vont tout de même limiter les erreurs de copie. Le choix de la cible à amplifier est un facteur déterminant de l'analyse. Plusieurs choix s'offrent à l'opérateur. Il est reconnu que le code-barre fongique universel est l'ADN ribosomal, répété de nombreuses fois dans le génome et possédant des régions suffisamment variables entre genres voire espèces pour une caractérisation taxonomique acceptable (Schoch *et al.*, 2012). Cependant, les cibles utilisées peuvent être l'ADN codant pour les petite (SSU 18S) ou grande (LSU 28S) sous-unités ribosomales ou les régions ITS (*internal transcribed spacer*). Les données accumulées sur les régions ITS durant ces dernières années sont un atout en raison d'un enrichissement plus important des bases de référence et d'une plus grande fiabilité des données qui y sont incluses. Mais là encore, il existe plusieurs choix possibles de régions, la région ITS1, ITS2 ou la région ITS totale (**Figure 5**), ainsi que différents jeux d'amorces universelles pour chacune de ces régions. Les études comparatives ne s'accordent pas sur une région en particulier. Huseyin *et al.* préconisaient plutôt l'utilisation de la région ITS1 ciblée par le couple d'amorces « ITS1F/ITS2 » (performances > ITS2 > ITS totale), alors que Hoggard *et al.* étaient favorables à l'utilisation de la région ITS2 ciblée par le couple d'amorces « ITS3/ITS4 » (performances > ITS1 > LSU) en raison de l'obtention d'un nombre de taxons plus pertinent en pratique et du profil des données obtenues plus proche de celui de la communauté microbienne étudiée (Hoggard *et al.*, 2018; Huseyin *et al.*, 2017). Il est à noter que la région ITS ne permet pas l'identification de tous les champignons, ce qui reste une limite à l'analyse du mycobiome (Schoch *et al.*, 2012).

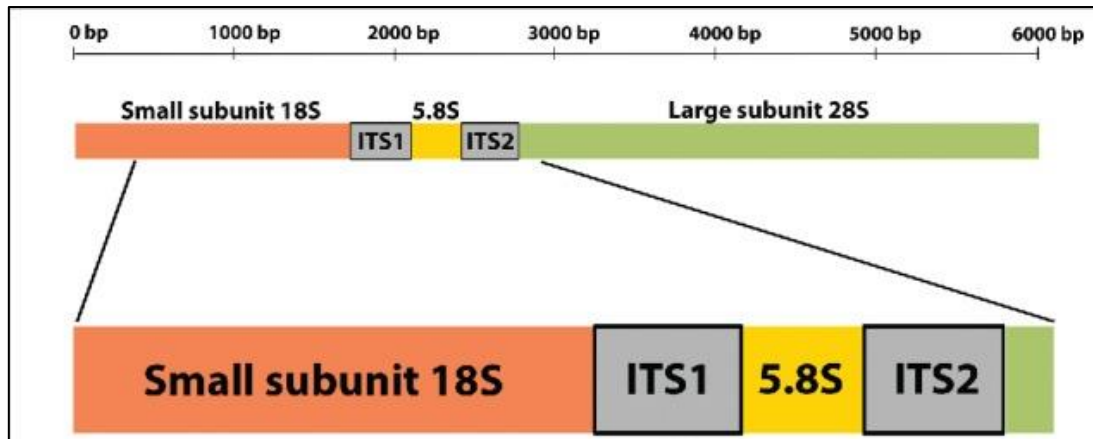


Fig. 5. Diagramme schématique de l'unité de répétition ribosomale nucléaire chez les champignons. Cette région comprend les séquences codant pour les ARN ribosomiaux 18S, 5,8S et 28S et les espaceurs transcrits internes (ITS) 1 et 2. Extrait de Diaz et al. (Diaz et al., 2017)

Les plateformes de séquençage de 2^{ème} génération, utilisées pour la métagénomique ciblée, sont également source de biais. Les plus fréquentes sont les plateformes Illumina (MiSeq) et Ion Torrent (PGM). Les technologies diffèrent notamment de par la méthode d'amplification des séquences (PCR en ponts ou par émulsion, respectivement) et la lecture de séquences (utilisant la fluorescence ou la détection d'une variation de pH, respectivement). Alors qu'un taux d'erreur de séquençage plus important a été relevé avec la plateforme Ion Torrent qu'avec la plateforme Illumina, il existe des possibilités d'optimisation du processus permettant de réduire les différences entre les résultats, telles que faire varier l'ordre du flux des désoxynucléotides triphosphate (d-NTP) et/ou combiner les séquences sens et antisens obtenues pour approcher les résultats attendus pour une communauté bactérienne connue (Salipante *et al.*, 2014). En raison de biais importants constatés avec Ion Torrent pour les séquences ITS de longueurs inférieures (250 pb) ou supérieures (450 pb) à 320 pb, une étape de fragmentation post-PCR des amplicons en fragments de 300 pb a été proposée pour obtenir des résultats concordants avec ceux attendus pour une communauté microbienne fongique (Tang *et al.*, 2015). Le séquençage de troisième génération s'affranchit de l'étape d'amplification et permet d'obtenir un résultat en quelques heures, alors que le séquençage de 2^{ème} génération permet un résultat en plusieurs jours. Pacific Biosciences (PacBio RS) a lancé une plateforme technologique reposant sur une technologie de molécule unique en temps réel, ou « SMRT » pour *Single Molecule Real-Time sequencing*. Cette plateforme permet de séquencer des séquences d'ADN de longueur supérieure à 1000 pb. Dans une étude de Motooka *et al.*, une grande variabilité des résultats était obtenue, en matière d'abondance relative d'une communauté microbienne fongique, avec la plateforme Ion Torrent selon la valeur moyenne de la qualité des séquences, cette variabilité reposant essentiellement sur le nombre de paires de bases (pb). Les séquences les plus longues n'étaient pas bien représentées.

La plateforme Illumina permettait d'obtenir des résultats approchant le profil attendu de la communauté microbienne, indépendamment de la valeur moyenne de la qualité. Cependant, la plateforme PacBio (PacBio RS II system) permettait des résultats encore plus précis et de bonne qualité en moyenne pour toutes les longueurs de séquences à partir de 8 *full-passes* (un *full-pass* correspondant au nombre de sous-lectures complètes entre deux adaptateurs) (Motooka *et al.*, 2017).

Enfin, des biais non négligeables proviennent de l'analyse des séquences obtenues. La plupart des outils utilisés en analyse des données issues du séquençage restent des approches basées sur des calculs de probabilité et un compromis est nécessaire pour réduire le bruit non spécifique sans utiliser des filtres trop stricts pour ne pas sous-estimer des clusters spécifiques. Les outils et les méthodes d'approche sont variés. Les choix de chacun doivent être adaptés. La qualité des *reads* issus du séquençage doit être contrôlée. L'analyse primaire des données brutes permet donc de regrouper les séquences en *clusters* grâce à des outils de probabilité. L'étape de *clustering* permet généralement d'obtenir des OTUs (unité opérationnelle taxonomique). L'assignation taxonomique se fait par comparaison des séquences représentatives des OTUs à celles d'une base de données. Le choix de la banque de données est primordial. Celle-ci doit être le plus fiable possible avec vérification des séquences et mises à jour régulières, les séquences étant parfois incomplètes ou mal annotées. Cependant, les bases de données restent limitées en mycologie et la taxonomie fongique change constamment avec notamment différents noms pour un même champignon ou encore différents genres auparavant nommés *Candida* appartenant aujourd'hui à d'autres genres. Une étape de normalisation par raréfaction est également nécessaire pour comparer les échantillons entre eux, mais entraîne une large perte de séquences ou d'échantillons, notamment en cas de grande disparité du nombre de séquences entre les échantillons. Malgré l'utilisation de multiples filtres et les optimisations incluses dans les *pipelines* d'analyse, les erreurs de séquençage et celles liées à la préparation des échantillons ne peuvent être complètement évitées. L'analyse bio-informatique peut malgré tout être standardisée par l'utilisation de serveurs web et de *pipelines* étendus (Thielemann *et al.*, 2022).

Aujourd'hui, notamment en raison du coût des instruments, chaque équipe de recherche fait avant tout avec les ressources dont elle dispose. Étant donné que des optimisations sont possibles pour approcher au mieux les résultats attendus, notamment avec la plateforme Ion Torrent qui semble la plateforme la moins fiable selon certaines études. C'est finalement à partir d'études réalisées entre différentes équipes expertes en vue d'un consensus, que nous pourrions comparer les différents résultats obtenus d'une étude à l'autre (Gangneux *et al.*, 2019).

La culturomique est une alternative intéressante, elle consiste à multiplier les milieux de culture, les températures d'incubation, les dilutions de l'échantillon initial afin d'obtenir une diversité des isolats et une quantification ne reposant pas sur la biologie moléculaire, plus approximative de par la répétition variable des séquences analysées d'un champignon à l'autre. Hamad *et al.* ont comparé les données de métagénomique obtenues en séquençage à haut débit avec celles issues de la culturomique. Étonnamment, les données issues de la culturomique viennent compléter celles issues du séquençage, ajoutant de l'information (Hamad *et al.*, 2017).

L'un des aspects limitant de la culturomique est la mise en évidence des champignons non viables ou non cultivables, sachant que ces champignons ou leurs composés dérivés peuvent tout de même avoir un impact sur la réaction immunitaire de l'hôte. Cependant, en matière de métagénomique, il reste de nombreuses questions en suspens : peut-on interpréter les données sans savoir quel est l'apport de la part alimentaire, qui malgré tout peut interagir avec l'hôte également ? peut-on interpréter les données à un instant t lorsque la maladie est déjà établie, sachant que les événements digestifs reposant sur différents facteurs interviennent au stade précoce de la maladie (Wu *et al.*, 2021) ? quel est l'impact réel de ce qui est identifié (mort, vivant, transitoire, adhérent, alimentaire, environnemental) ? Quelles réponses vont nous apporter l'étude du mycobiote étant donné que les facteurs d'hôte entre 2 individus ne sont pas les mêmes ?

Le rôle de *S. cerevisiae* dans l'inflammation et dans la fibrose intestinale ?

S. cerevisiae est une levure largement utilisée en tant que probiotique (principalement sous le nom de *S. boulardii*) ou dans l'industrie alimentaire telle que la panification, la vinification, la brasserie et la distillerie. Malgré ces nombreuses applications de longue date, cette levure reste rarement impliquée en pathologie humaine en tant qu'agent d'infection fongique invasive, il s'agit le plus souvent d'infections opportunistes principalement associées à l'utilisation de probiotiques chez des patients ayant les muqueuses digestives fragilisées (Enache-Angoulvant & Hennequin, 2005; Munoz *et al.*, 2005).

Hormis l'étude de Chiaro *et al.* (Chiaro *et al.*, 2017), ne prouvant pas directement le rôle de *S. cerevisiae* dans la MC, les études impliquant *Saccharomyces* sp. (*cerevisiae/boulardii*) ont montré une amélioration de l'inflammation de la muqueuse colique et une réduction de la colonisation par *C. albicans* ou AIEC (eux-mêmes impliqués dans une exacerbation de l'inflammation) chez l'animal (Jawhara & Poulain, 2007; Sivignon *et al.*, 2015), et, entrainerait chez l'Homme une rémission de la RCH et améliorerait cliniquement les patients atteints de la

MC (diminution du taux de rechute, réduction de la fréquence des selles) (Ganji-Arjenaki & Rafieian-Kopaei, 2018) (Patent number: 10543239, Lesaffre compagnie).

Il reste un certain nombre de questions en suspens concernant le rôle de *S. cerevisiae* dans la MC. Sachant que les ASCA sont également un marqueur prédictif de la fibrose intestinale dans la MC (Rieder *et al.*, 2017), cela nous amène indirectement à nous demander si *S. cerevisiae* pourrait être impliqué dans l'initiation des processus fibrotiques, mais également évaluer les effets bénéfiques de cette levure dans ce contexte.

Objectifs

L'exposé de ce travail est proposé en trois parties, chacune découpée en 3 paragraphes : introduction, matériels et méthodes et résultats, et sera suivi d'une discussion commune. La première partie de ce projet était réalisée dans le cadre d'une collaboration avec la société Lesaffre International, leader mondial dans le domaine de la levure et de la fermentation. Les objectifs étaient d'évaluer des souches utilisées comme probiotique, pour la panification et la brasserie, sur un modèle murin de colite chimio-induite chronique utilisant le DSS à 2,5%, mimant une évolution de l'inflammation vers la fibrose. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Silvia Speca (UMR Inserm U1286 -Infinite, Dr Dubuquoy) et le Dr Dina Chokr, post-doctorante dans notre unité. Dans le cadre de cette évaluation, nous souhaitons, d'une part, vérifier l'absence d'aggravation par *S. cerevisiae* du processus fibrotique, et, d'autre part, évaluer le potentiel préventif des levures industrielles. Les connaissances sur le rôle des levures dans le processus fibrotique associé aux MICI étant limité, et *C. albicans* étant régulièrement pointé du doigt pour son rôle aggravant l'inflammation, cette levure était utilisée dans nos expériences, ainsi qu'une souche adhérente invasive d'*Escherichia coli* (LF82), comme contrôles. Enfin, dans un objectif de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ces investigations, satisfaisant à la règle des 3R, un modèle de fibrose *in vitro* était développé afin de pouvoir tester à terme l'ensemble des souches de la société Lesaffre.

La seconde partie de ce travail était orientée sur les ASCA, biomarqueur largement utilisé dans la MC mais dont l'origine est toujours inconnue. De nombreuses hypothèses quant à leur génération ont émergées depuis leur découverte dans les années 1990. Une revue de la littérature était donc réalisée afin de définir des pistes à explorer dans des modèles *in vivo* : i) la piste de l'origine fongique, en explorant l'impact de *C. albicans* et *S. cerevisiae* sur la production des ASCA en contexte inflammatoire chez la souris, ii) la piste auto-immune, *via* un modèle murin exprimant CEACAM6 humaine, glycoprotéine exprimée à la surface des entérocytes chez l'Homme, exposé à ces mêmes levures pour vérifier si CEACAM6 était capable de générer une réponse de type ASCA et iii) les ASCA étant un marqueur pronostic, associé à la fibrose, nous voulions vérifier si dans ce modèle *in vivo* exposé dans la première partie, la production d'ASCA était associée ou non à la fibrose et/ou aux microorganismes étudiés. Les partenaires et collaborateurs de ces travaux étaient la société Lesaffre, les Drs S. Speca et D. Chokr.

La troisième partie de ce travail portait sur notre participation au projet hospitalier de recherche clinique national multicentrique (MAGIC), dont l'objectif était de mettre en évidence

des anomalies du microbiote fécal chez des sujets sains à risque élevé de MC, les sujets apparentés aux patients atteints de la MC. Cette étude était coordonnée par le Dr Corinne Gower (Département de gastroentérologie, CHU de Lille). Le volet microbiologique de cette étude a été mené par plusieurs équipes partenaires citées dans la troisième partie. Notre contribution à cette étude était d'analyser les marqueurs inflammatoires associés à la MC (calprotectine fécale et ASCA sériques) et de caractériser le microbiote fécal. L'originalité de ce travail reposait sur l'inclusion de patients (enfants et adultes) exclusivement atteints de la MC, de diagnostic récent et en rémission clinique, de leurs apparentés sains au premier degré et de témoins appariés aux patients atteints de la MC. L'analyse des marqueurs inflammatoires, sérologiques et la caractérisation du microbiome a fait l'objet d'un contrat de recherche avec la société Lesaffre international.

Partie 1. Evaluation de l'effet de souches de levures du genre *Saccharomyces*, fournies par la société Lesaffre International, sur l'inflammation et la fibrose intestinale

P1. Introduction

Bien que l'étiologie de la MC reste à établir, il est aujourd'hui reconnu que cette entité résulterait d'une réaction immunitaire inappropriée du tractus digestif d'individus génétiquement prédisposés, en réponse à des facteurs environnementaux (Ramos & Papadakis, 2019), menant à une inflammation chronique. La chronicité de la maladie entraîne une fibrose des tissus digestifs, caractérisée par la production d'une MEC anormalement enrichie en collagène, pour laquelle il existe un échec des facteurs physiologiques correctifs. Le caractère initialement pensé irréversible de la fibrose intestinale est aujourd'hui remis en question suite aux travaux menés notamment sur la fibrose cutanée, hépatique ou rénale (Rieder *et al.*, 2017). Ce processus est essentiellement médié par les myofibroblastes, caractérisés par l'expression d' α -SMA (Hayashi & Nakase, 2022). La fibrose peut mener au développement de complications chez la majorité des patients, telles que les sténoses ou les fistules digestives, qui requièrent un traitement mécanique, chirurgical ou endoscopique, et présentent un risque non négligeable de récurrence (Rieder *et al.*, 2017). Ainsi, comprendre la physiopathologie de la fibrose intestinale et explorer de nouvelles approches visant à lutter contre ce processus sont essentiels. Certaines études suggèrent qu'une dysbiose, influant sur l'état d'inflammation, est associée à la pathogenèse de la MC. Dans les faits, les patients atteints de la MC sont moins colonisés par des bactéries aux propriétés anti-inflammatoires (telles que les Firmicutes) et possèdent une plus grande abondance de bactéries au potentiel pro-inflammatoire (telles que les AIEC) (Rieder, 2013). Les bactéries migrant vers la sous-muqueuse sont susceptibles d'interagir avec la graisse mésentérique hypertrophiée vers la paroi intestinale, spécifique de la MC et appelée sclérolipomatose lorsque la fibrose y est associée (Hayashi & Nakase, 2022). Sur le versant fongique, ces patients sont bien moins colonisés par la levure peu pathogène *Saccharomyces cerevisiae* et présentent une abondance plus élevée d'espèces de *Candida* sp. connues pour accentuer l'inflammation (*C. albicans*, *C. tropicalis*) (Hoarau *et al.*, 2016; Iliev *et al.*, 2012; Jawhara & Poulain, 2007; Sokol *et al.*, 2016). Le rôle de la flore fongique sur la fibrogenèse n'a jamais été étudié. Malgré une large utilisation de la levure *Saccharomyces* – dans l'industrie alimentaire, la brasserie, la distillerie et en tant que probiotique –, le rôle de *Saccharomyces* a récemment fait l'objet d'une controverse dans une étude de Chiaro *et al.*, où *Saccharomyces cerevisiae* aurait été considéré comme cause potentielle de la MC (Chiaro *et al.*, 2017).

L'objectif de cette première partie était donc d'évaluer l'impact des souches de *Saccharomyces* (LV1 à 3), fournies par la société Lesaffre International, sur la sévérité de l'inflammation intestinale et la progression de la FI, en comparaison avec les effets de *C. albicans* et de la souche AIEC LF82, utilisées comme témoins pathobiontes, puisque précédemment incriminés dans l'aggravation de l'inflammation (Carvalho *et al.*, 2009; Jawhara *et al.*, 2008). Une première série d'expériences permettait d'évaluer l'effet des souches LV1 à 3 *in vivo*, sur un modèle murin de fibrose intestinale obtenue après une colite chronique induite par DSS. Une seconde série d'expériences permettait d'évaluer l'effet de la souche LV1 *in vitro* sur la transition des fibroblastes et les cellules épithéliales intestinales humains en myofibroblastes, après stimulation par TGF- β . Les travaux de cette seconde série d'expérience étaient essentiellement réalisés en collaboration avec le Dr Dina Chokr. L'objectif de cette seconde série d'expériences était de valider un modèle *in vitro*, corrélé au modèle *in vivo*, afin de tester chaque souche de la société Lesaffre.

P1. Matériels et méthodes

Souches d'Escherichia coli AIEC et de levures

La souche LF82 d'AIEC, provenant d'une lésion chronique iléale d'un patient atteint de la MC, était fournie par le Dr Christel Neut (Inserm U1286-INFINITE, Lille, France) et cultivée sur milieu gélosé de MacConkey. Une souche clinique de *C. albicans* était isolée d'une selle de patient atteint de la MC et cultivée sur milieu gélosé de Sabouraud additionné d'amikacine. Avant le début des expériences chez l'animal, les souches d'*E. coli* et de *C. albicans* étaient incubées une nuit à 37°C sous agitation en milieu liquide, bouillons de Luria-Bertani et yeast peptone dextrose, respectivement. Les microorganismes étaient ensuite récoltés par centrifugation (3 min à 3000 g et 500 g, respectivement). Les culots étaient ensuite suspendus dans du tampon PBS (phosphate-buffered saline) 1X stérile pour calibrer des suspensions à 3.10^8 et 10^7 pour 200 μ L, respectivement.

Trois souches de *Saccharomyces* sp. ont été fournies par la société Lesaffre (LV1 à 3), utilisées dans la panification, la brasserie et comme probiotique. Ces souches, fournies lyophilisées, étaient conservées aliquotées sous vide d'air, à réception des lots. Une suspension de chaque souche était préparée dans du PBS stérile 1X de façon extemporanée pour une quantité finale de 10^7 levures /200 μ L de PBS pour le gavage des souris.

Animaux

La fibrose intestinale était induite chez des souris mâles C57BL/6 âgées de 7 à 8 semaines élevées chez Janvier Laboratories (France) et hébergées dès leur arrivée dans des conditions « specific pathogen-free » (SPF). Toutes les expériences ont été menées selon un protocole approuvé par le Comité d’Ethique en Expérimentation Animale CEEA Nord - Pas de Calais n°75 et le Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation (201701408265726, 23/2/2018).

Modèle murin de fibrose et évaluation de la colonisation

La fibrose intestinale était obtenue après induction d’une colite chronique par administration orale de dextran sulfate de sodium (DSS) 2,5 % (TdB Consultancy, Uppsala, Sweden) dans l’eau de boisson et administrée sur 3 cycles (5 jours de DSS suivis de 7 jours d’eau du robinet), selon un protocole décrit précédemment (Specia *et al.*, 2016). Pour la colonisation, les souris étaient gavées par 200 µL de PBS contenant $3 \cdot 10^8$ de LF82 une fois par semaine (Carvalho *et al.*, 2009) ou 10^7 de levures, au début de chaque cycle pour *C. albicans* et tous les 2 jours pour LV1 à 3 (fréquence établie par une expérience préliminaire car *S. cerevisiae* est rapidement éliminée du tractus digestif des animaux). Le plan expérimental est décrit dans la **Figure 6**.

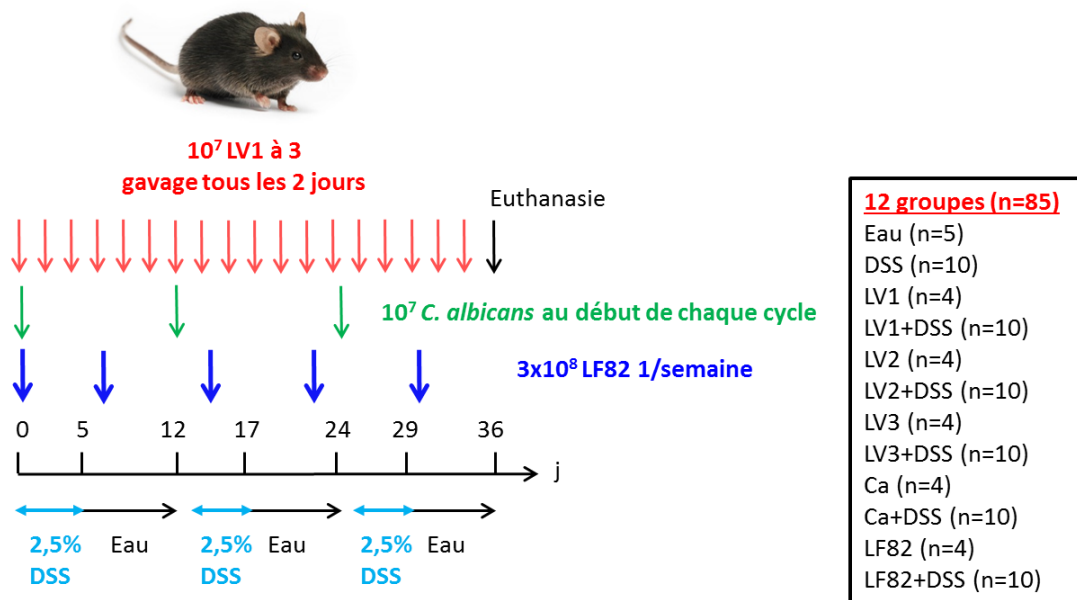


Fig.6. Plan expérimental de l’étude de l’impact des microorganismes sur la fibrose intestinale induite par le DSS

En plus des temps de gavage, les animaux étaient suivis tous les 2 jours afin de suivre le poids et évaluer le score clinique. Le score clinique d'inflammation reposait sur la somme des scores attribués à 3 facteurs dont la présence de sang dans les selles (0= absence de sang ; 1= présence de sang ; 2= présence abondante de sang dans les selles et au niveau de la marge anale), la consistance des selles (0= selles normales ; 1= selles molles ; 2= diarrhée) et le comportement des souris (0= aspect général de l'animal normal ; 1= poils hérissés ou l'animal est prostré ; 2= poils hérissés + animal prostré ou en retrait). Les trois facteurs sont additionnés allant d'un score compris entre 0, animal en bonne santé, et 6, inflammation maximale du côlon, permettant de s'assurer de la réussite de la colite. La colonisation était vérifiée régulièrement et jusqu'au sacrifice par comptage du nombre d'unités formant colonies (UFC) /mg de selles cultivées sur gélose au sang pour *E. coli*, milieux de Sabouraud additionnés d'amikacine et géloses chromogéniques (BBL™ CHROMagar™ Candida, BD) pour les levures. Les milieux étaient incubés de 24h à 7 jours à 37°C pour estimer la colonisation par *E. coli* et *C. albicans* et 30°C pour estimer la colonisation par LV1 à 3. L'identification des microorganismes était réalisée par spectrométrie de masse. Lors du sacrifice, le sang était collecté par ponction intracardiaque et centrifugé rapidement pour conserver le sérum à -20°C jusqu'à analyse. La taille et le poids du côlon étaient mesurés. Un score macroscopique de la fibrose était calculé par addition de différents paramètres : i) adhésions coliques (0 = absence, 1 = modérées ou localisées, 2 = sévères ou diffuses), ii) dilatation colique (0 = absence, 1 = modérée, 2 = sévère), iii) sténose colique (0 = absence, 1 = modérée, 2 = sévère) et iv) épaissement de la muqueuse (0 = normal, 1 = modéré, 2 = > 3 mm). Des morceaux de côlon étaient prélevés pour fixation dans le paraformaldéhyde 4% et analyse histologique. Le reste du côlon était congelé à -80°C pour l'extraction d'ARN et analyse en RT-q-PCR.

Évaluation microscopique de la fibrose

Les prélèvements coliques étaient fixés une nuit dans une solution de paraformaldéhyde à 4%, puis inclus en paraffine. Des coupes de 4 µm étaient ensuite colorées au rouge Picro-Sirius et au trichrome de Masson. Les lames étaient ensuite scannées avec le scanner de lames ZEISS Axio Scan et les images étaient analysées avec le logiciel ImageJ. La fibrose était évaluée par estimation des dépôts de collagène.

Extraction d'ARN et RT-q-PCR

Après une pré-lyse mécanique, l'extraction d'ARN sur côlon entier a été réalisée en utilisant le Trizol (Thermo Fisher Scientific). Une séparation des phases a été réalisée avec le chloroforme. L'ARN contenu dans le surnageant a ensuite été précipité avec de l'alcool isopropylique, lavé à l'éthanol 75% puis séché avant d'être solubilisé dans l'eau. La quantification d'ARN était réalisée au Nanodrop. 1 µg d'ARN était utilisé avec le kit High Capacity cDNA reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) pour obtenir l'ADN complémentaire et la q-PCR était réalisée avec le Fast SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific ; Illkirch-Graffenstaden, France) selon les recommandations du fabricant. L'expression génique était normalisée en fonction de l'expression du gène de la Polr2a. Les séquences des amorces utilisées sont listées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Séquences des amorces utilisées.

Gène	Amorce sens	Amorce antisens
<i>Acta2</i>	ACTGGGACGACATGGAAAAG	G TTCAGTGGTGCCTCTGTCA
<i>Colla1</i>	GAGTACTGGATCGACCCTAACCAA	ACACAGGTCTGACCTGTCTCCAT
<i>Fn1</i>	CGAAGCCGGGAAGAGCAAG	CGTTCCCACTGCTGATTTATCTG
<i>Il1b</i>	AGCTCTCCACCTCAATGGAC	AGGCCACAGGTATTTTGTCG
<i>Il6</i>	TACACATGTTCTCTGGGAAATCGT	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
<i>Tnfa</i>	CCACCACGCTCTTCTGTCTA	GAGGCCATTTGGGA ACTTCT
<i>Il10</i>	CAGTACAGCCGGGAAGACAATAA	CCGCAGCTCTAGGAGCATGT
<i>Il12b</i>	GGAAGCACGGCAGCAGAAT	GGCGGGTCTGGTTTGATG
<i>Il17a</i>	GCAAGAGATCCTGGTCCTGA	AGCATCTTCTCGACCCTGAA
<i>Ifng</i>	CAGCAACAGCAAGGCGAAA	CTGGACCTGTGGGTTGTTGAC
<i>Ccl2</i>	GGTGACAAAACTACAGCTTC	CTGCTGCTACTCATTACC
<i>Ccl3</i>	ATTCCACGCCAATTCATCGT	TCTTAGTCAGGAAAATGACACC
<i>Ccl4</i>	CCACTTCCTGCTGTTTCTCT	TTGGTCAGGAATAACCACAGC
<i>Adgre1</i>	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG
<i>Tbx21</i>	TTCCCATTCCTGTCCTTCAC	CCACATCCACAAACATCCTG
<i>Gata3</i>	GGAAACTCCGTCAGGGCTA	AGAGATCCGTGCAGCAGAG
<i>Rorc</i>	GAAAGCAGGAGCAATGGAAG	GATGGAAAGCCAGTTCCAAA
<i>Polr2a</i>	GGTGCTGTGGGTACGGATACA	CCCACAACCAGCTATCCTCAA

Analyses statistiques

Les données étaient exprimées en médiane \pm interquartile range. Les différences statistiques entre les groupes ont été évaluées par des tests non paramétriques d'analyse de variance (Kruskal-Wallis, tests de comparaison multiple de Dunn). Le test ANOVA avec une correction de Bonferroni post hoc a été utilisé pour les comparaisons intergroupes multiples. Les résultats ont été considérés statistiquement significatifs pour des valeurs de $p \leq 0,05$. L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé au moyen du logiciel Prism V10 software (Graphpad, La Jolla, CA).

P1. Résultats

Rôle des souches de *S. cerevisiae* dans la fibrose intestinale chimio-induite sur un modèle murin

La mortalité liée au DSS des souris était faible et compensée par l'effectif de chaque groupe (1 décès maximum par groupe). La persistance d'une charge fongique ou bactérienne digestive dans les selles tout au long de l'expérience, principalement dans les groupes DSS, était vérifiée. La charge fongique était plus faible pour LV1 que pour LV2 ou LV3, alors que la charge en *C. albicans* était généralement plus élevée. Il existait une forte charge fécale d'*E. coli* dans les groupes DSS seuls et DSS+LF82. Cependant, la méthode d'identification utilisée (spectrométrie de masse) ne permettait pas de distinguer les souches AIEC d'*E. coli* (LF82) des autres souches d'*E. coli* (**Figure 7**).

L'effet du DSS était évalué par la mesure du poids et l'évaluation clinique régulière des animaux et de leurs selles. Le poids des souris exposées au DSS était significativement plus bas que celui des souris contrôles. Les groupes DSS+LV1 et DSS+LF82 se distinguaient par un poids significativement plus bas après le 3^{ème} cycle de DSS (**Figure 8**).

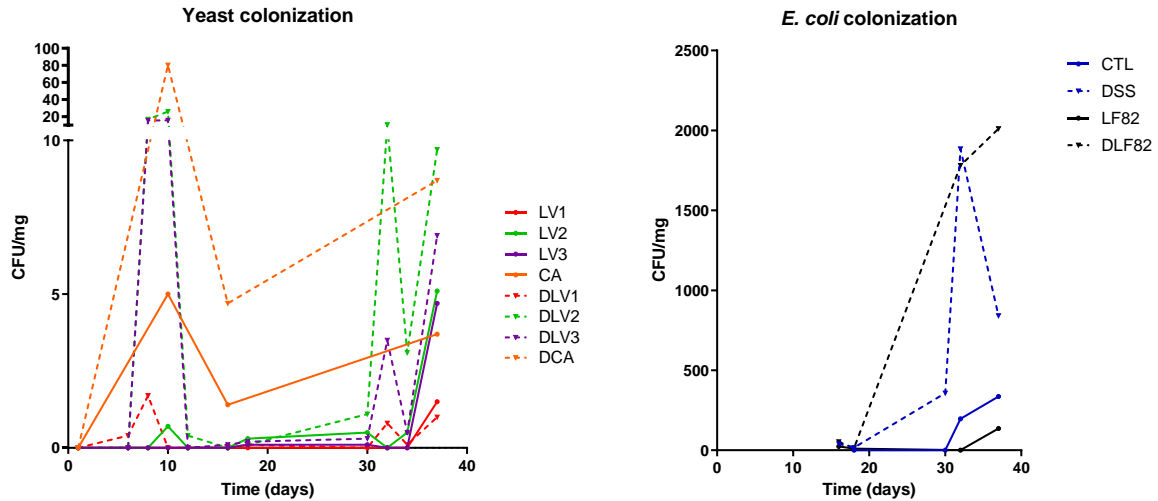
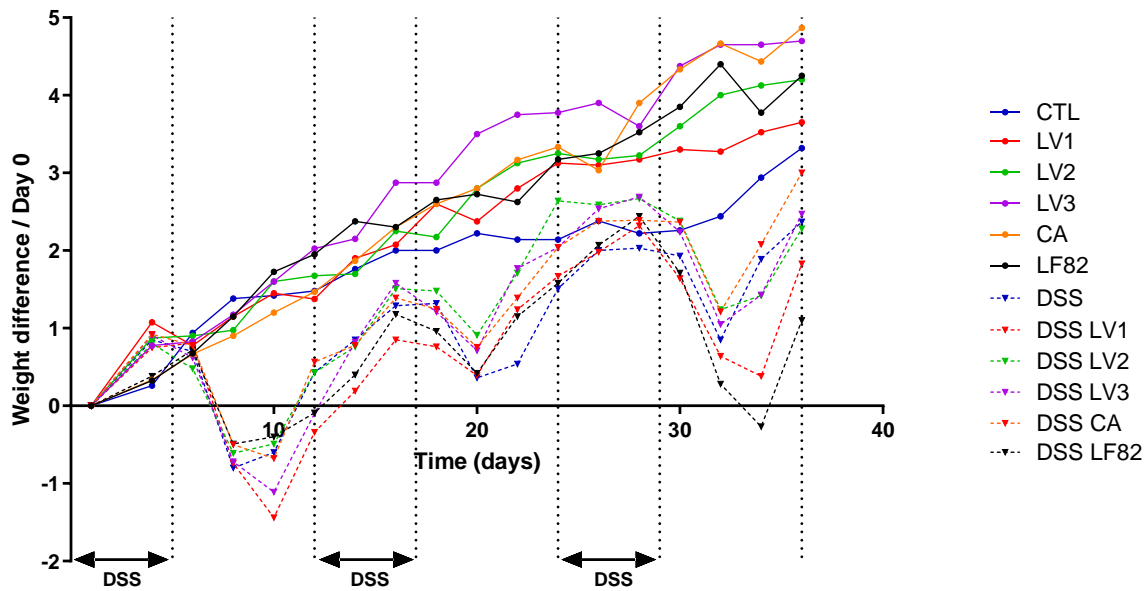


Fig.7. Évaluation de la persistance fécale des microorganismes étudiés au cours de l'expérience de fibrose intestinale chez la souris. (Courbes en pointillé : souris sous DSS)



Day	1	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
LV2 vs. CTL ↑															*	**		
LV3 vs. CTL ↑										*	**	**	**	*	****	****	**	*
CA vs. CTL ↑														**	***	***	*	*
LF82 vs. CTL ↑														*	**	***		
DSS vs. CTL ↓				****	****	*				****	***					***	*	
DLV1 vs. DSS ↓																	*	
DLF82 vs. DSS ↓																		****

Fig.8. Suivi du poids des souris au cours de l'expérience de fibrose intestinale. (L'indicateur de dispersion n'est pas représenté par souci de lisibilité du graphe)
 Tableau indiquant uniquement les différences significatives entre les groupes sans DSS ou DSS seul vs. CTL et les groupes avec DSS vs. DSS seul.
 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$)

Pour évaluer l'inflammation et la fibrose macroscopiquement, l'examen du côlon lors du sacrifice a montré un effet notable du DSS – raccourcissement du côlon et score macroscopique de fibrose plus élevé – sans effet supplémentaire, positif ou négatif, des différents microorganismes administrés (**Figure 9**).

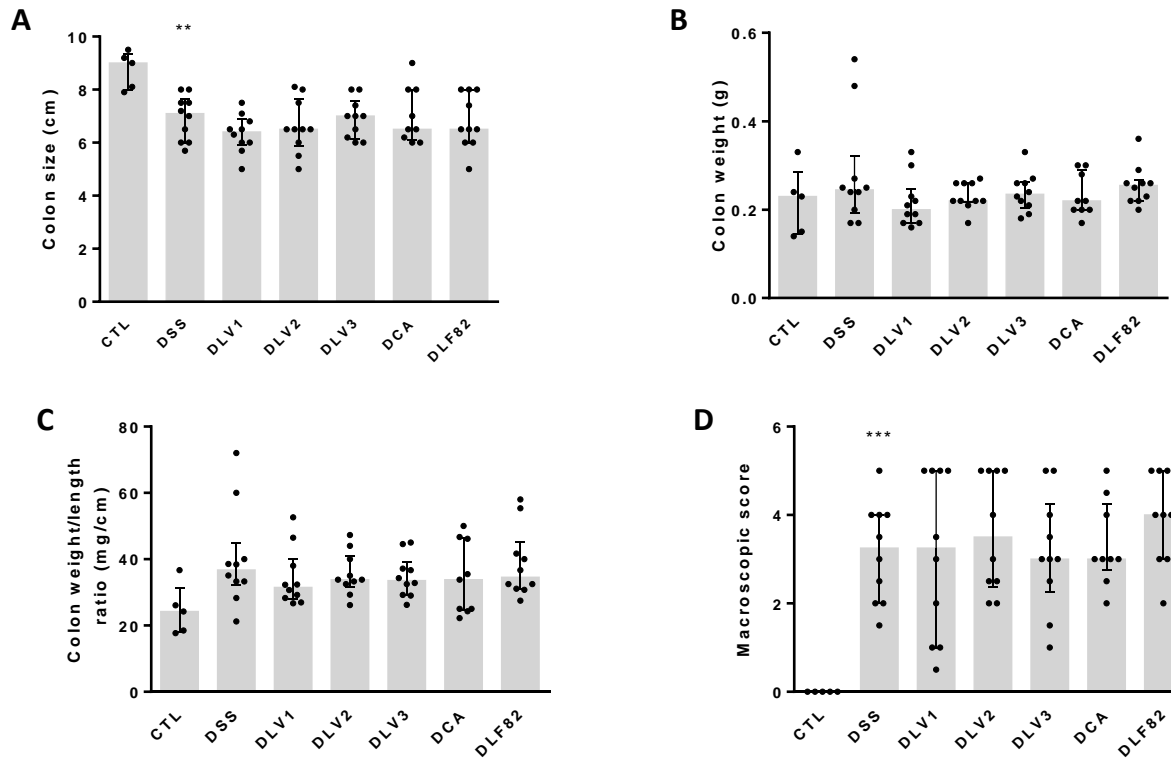


Fig.9. Poids (A) et taille du côlon (B) à l'autopsie. Ratio des 2 mesures (C) et score macroscopique du côlon à l'autopsie (D). Seules les mesures des groupes DSS sont indiquées et comparées au groupe CTL. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

L'évaluation microscopique de la fibrose a mis en évidence une augmentation des dépôts de collagène de manière significative dans le groupe DSS seul par rapport au groupe CTL et dans le groupe DSS+LF82 par rapport au groupe DSS seul. Les levures associées au DSS n'avaient aucun effet significatif sur le développement de la fibrose (**Figure 10**).

Le **Tableau 3** résume les résultats statistiquement significatifs concernant l'expression génique relative des gènes impliqués dans l'inflammation, le recrutement des cellules de l'inflammation et la fibrose. De façon homogène, le DSS a entraîné l'augmentation, de manière significative, de l'expression génique des marqueurs de l'inflammation et du recrutement des cellules de l'inflammation, avec une augmentation de l'expression génique des chimiokines, mais pas des marqueurs de fibrose. De façon plus disparate, mais relativement homogène tout de même, en présence de LF82 et de DSS, les expressions géniques des marqueurs de

l'inflammation et du recrutement des cellules de l'inflammation, ainsi que des marqueurs de la fibrose étaient augmentées significativement par rapport au DSS seul. En présence de DSS, *C. albicans* avait des effets contradictoires sur l'expression génique des marqueurs de l'inflammation, mais augmentait, de façon homogène, l'expression génique des marqueurs du recrutement cellulaire. Seule l'expression génique du marqueur de transition cellulaire α -SMA était augmenté en présence de *C. albicans* et de DSS. *Saccharomyces* en présence de DSS n'a pas eu d'impact sur l'expression génique des marqueurs de l'inflammation. Seule une légère augmentation de l'expression génique du collagène était observée avec LV1 et LV2, sans atteinte de l'expression de la fibronectine (**Figure 11-14**).

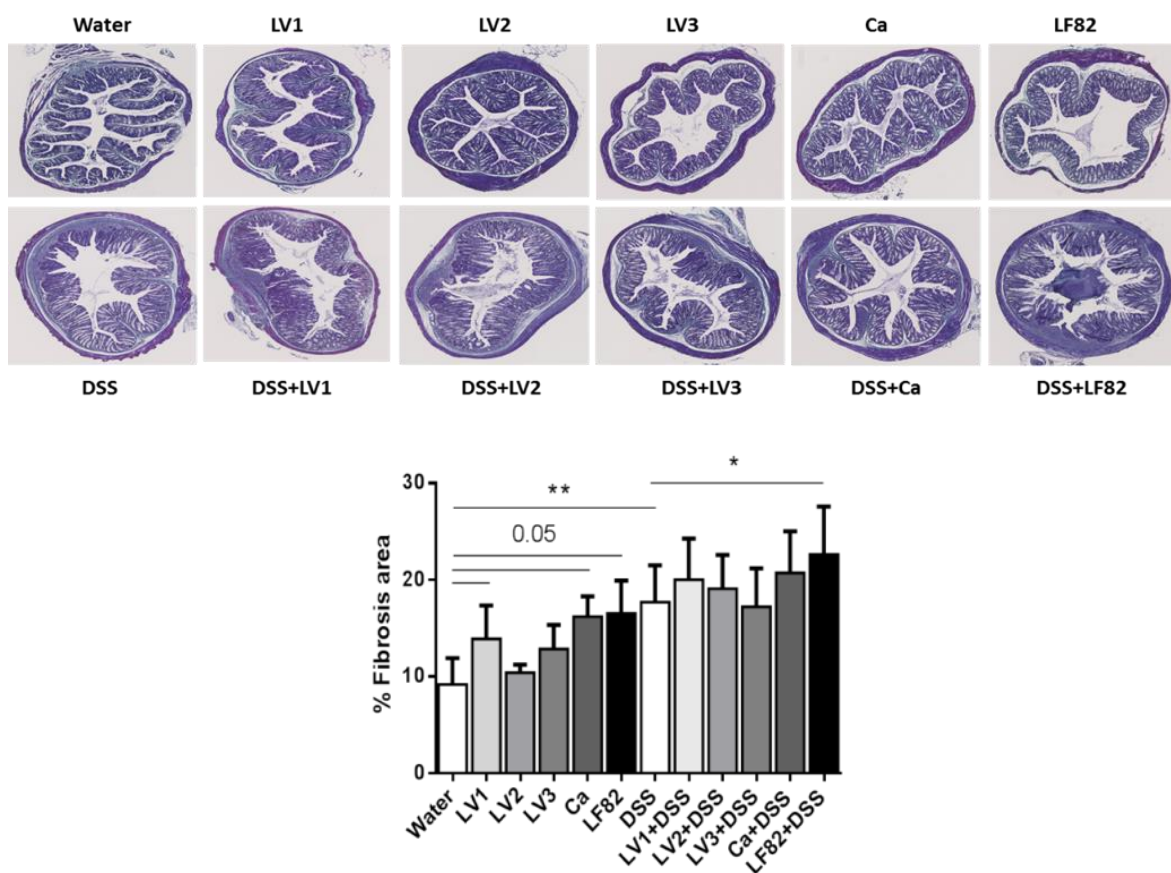


Fig.10. Coupes transversales de côlon colorées au trichrome de Masson, (coloration mettant en évidence le collagène de type I-III). Graphe représentant le pourcentage de fibrose sur les coupes évaluée avec le logiciel image J.

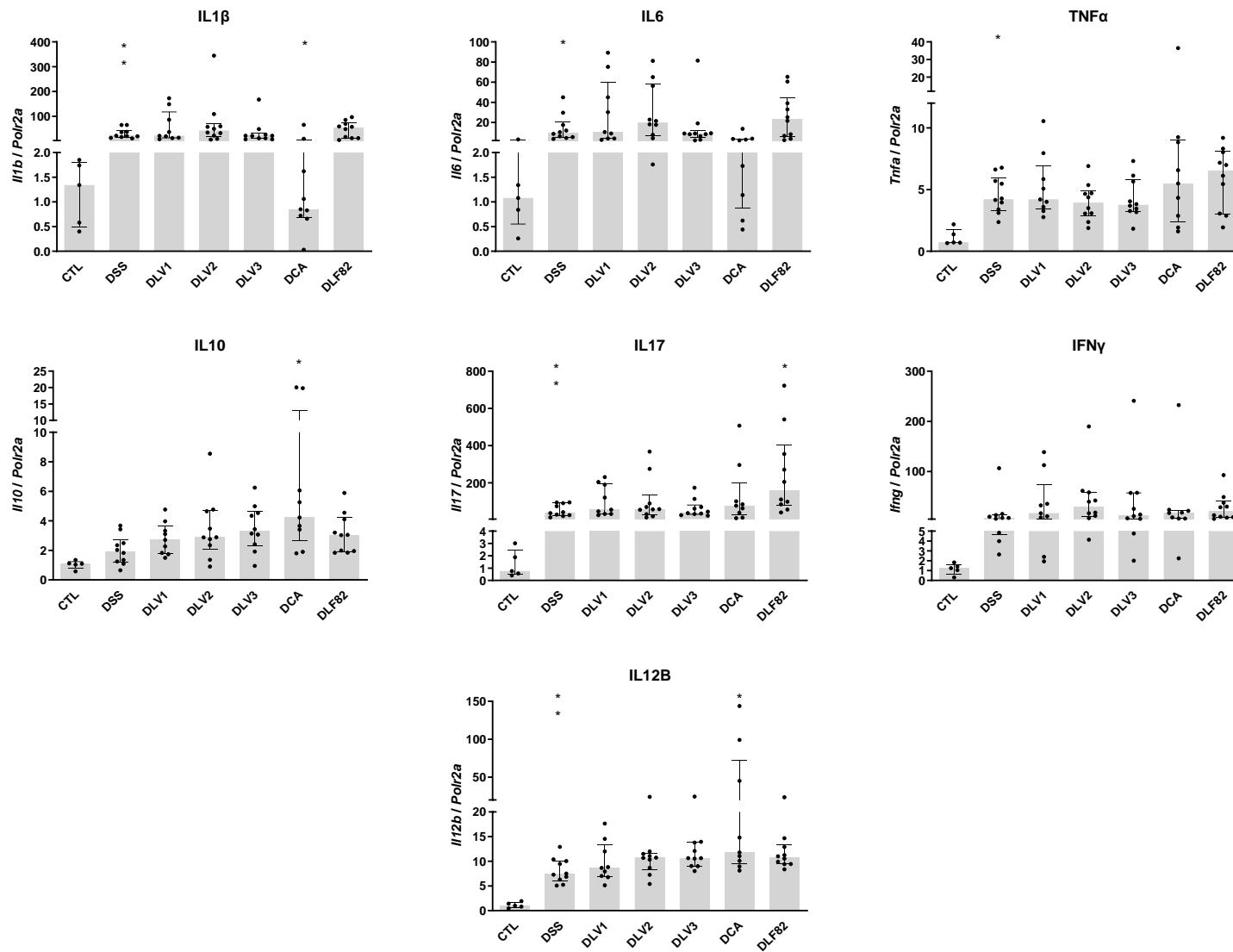


Fig.11. Expression génique des principales cytokines de l'inflammation relative à l'expression du gène *Polr2a*. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

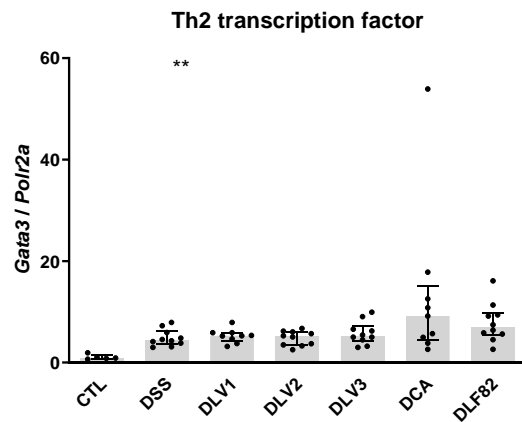
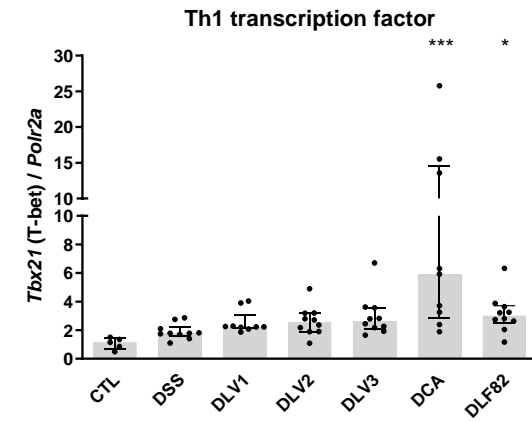
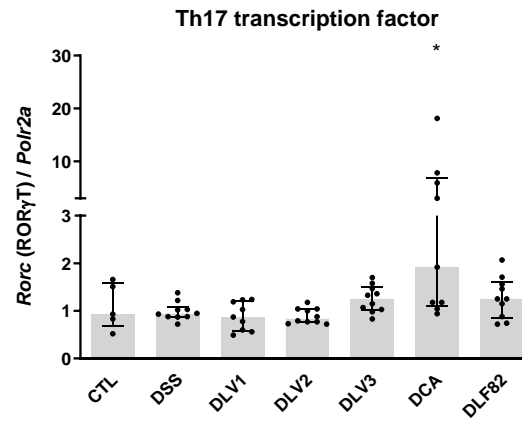
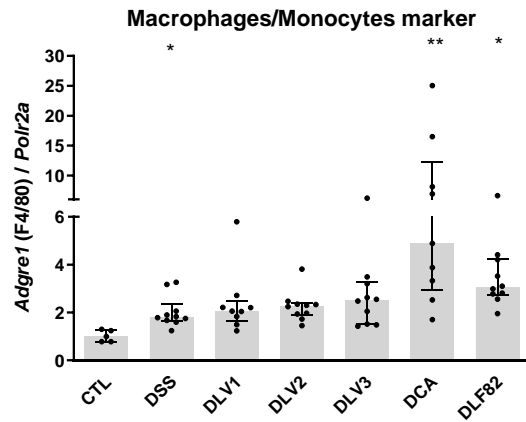


Fig.12. Expression génique des facteurs de recrutement des cellules de l'inflammation relative à l'expression du gène Polr2a. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

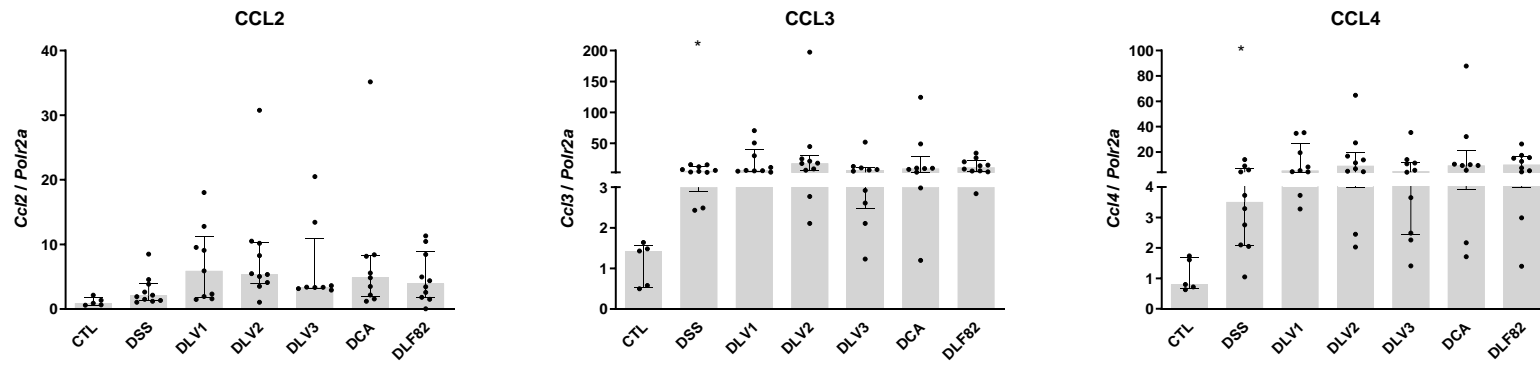


Fig.13. Expression génique des chimiokines relative à l'expression du gène Polr2a. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

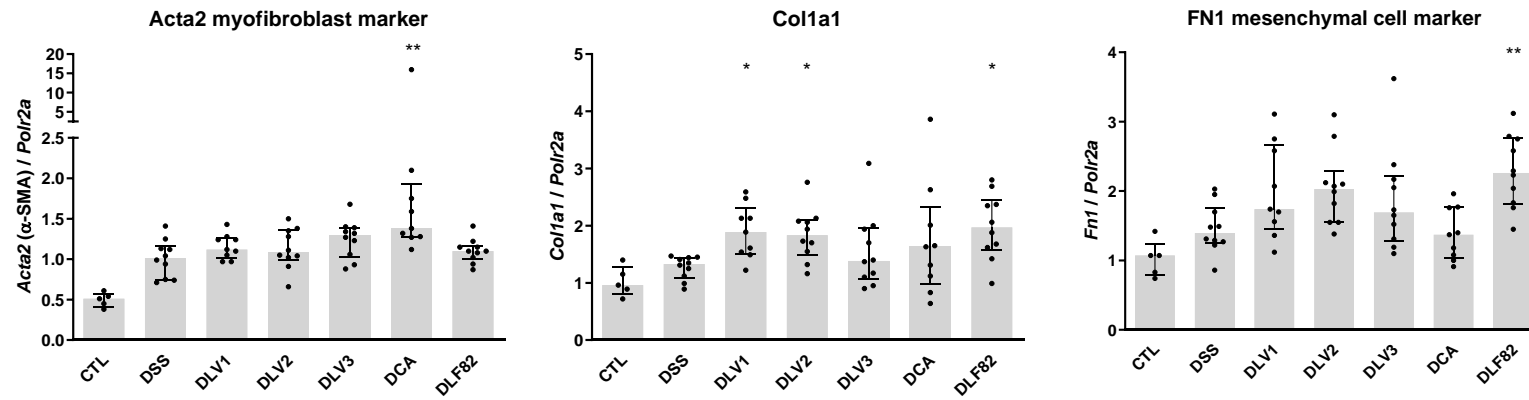


Fig.14. Expression génique des marqueurs de fibrose relative à l'expression du gène Polr2a. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

Tableau 3. Expression génique relative des marqueurs de l'inflammation et de la fibrose, degré de significativité statistique (*p*)

	CTL	LV1	LV2	LV3	CA	LF82	DSS	DLV1	DLV2	DLV3	DCA	DLF82
<i>Il1b</i>							0,005				0,03	
<i>Il6</i>							0,02				0,05	
<i>Tnfa</i>							0,05					
<i>Il12b</i>							0,001			0,08	0,01	0,1
<i>Ifng</i>							0,05					
<i>Il17</i>							0,005					0,02
<i>Il10</i>											0,01	
<i>Tbx21</i> T-bet							0,06				0,0002	0,02
<i>Gata3</i>							0,005					
<i>Adgre1</i> F4/80							0,01				0,002	0,02
<i>Rorc</i> RORγ											0,03	
<i>Acta2</i> α-SMA		0,005	0,0009	0,001							0,002	
<i>Col1a1</i>								0,04	0,05			0,02
<i>Fn1</i>					0,02	0,04			0,07			0,006
<i>Ccl2</i>									0,06			
<i>Ccl3</i>							0,03					
<i>Ccl4</i>							0,05					

En rouge, valeur proche des 5% de significativité. En blanc, différences non significatives. Dégradé de jaune et vert, différences significatives.

↑ : surexpression génique ; ↓ répression génique.

Les résultats des groupes témoins (LV1 à DSS) sont comparés au groupe témoin (eau = CTL). Les groupes soumis au DSS sont comparés au groupe DSS seul.

Développement et validation du modèle cellulaire de fibrose intestinale

En parallèle des expériences menées *in vivo*, une collaboration avec le Dr Dina Chokr nous a permis de disposer d'un modèle *in vitro* de fibrose afin de pouvoir tester l'ensemble des souches de levures de la société Lesaffre International et s'assurer *a minima* de l'absence d'effet aggravant sur la fibrose intestinale. Ces expériences *in vitro* avait également pour objectif, en cas de cohérence entre les résultats de l'expérience *in vivo*, de limiter l'utilisation des souris dans un souci éthique de respecter la règle des 3R. Ainsi, deux lignées cellulaires intestinales d'origine humaine ont été étudiées : les fibroblastes de la lignée CCD-18Co (ATCC CRL-1459) et les cellules épithéliales de la lignée Caco-2 (ATCC HTB-37). Les fibroblastes étaient cultivés dans un milieu minimum essentiel de Eagle (MEM) supplémenté en pénicilline, streptomycine et sérum de veau fœtal. Le reste de la méthode de culture des cellules des 2 lignées était identique et précisé dans l'article publié en co-premier auteur avec le Dr Chokr (*Chokr et al., 2021*). Les cellules étaient soumises à l'action de TGF β 1 tel qu'il est indiqué dans le schéma expérimental de la **Figure 15** pour induire une différenciation cellulaire en faveur d'un profil pro-fibrotique. Les cellules étaient enfin soumises en fin d'expérience à l'action des levures LV1 ou *C. albicans* ou à la bactérie LF82. L'expression génique des gènes de la fibrose (*ACTA1*, *COL1A1* et *FN1* ; codant respectivement pour α -SMA, le collagène de type 1 et la fibronectine) et des marqueurs épithéliaux (*OCLN* et *GPA33* ; codant respectivement pour l'occludine et l'antigène de surface GPA33) était ensuite étudiée par RT-q-PCR. Dans un premier temps, seule LV1 a été sélectionnée pour tester le modèle et faire la mise au point.

Pour les fibroblastes, aucune différence significative d'expression relative des gènes de fibrose n'était observée en présence de TGF β ou en présence des microorganismes, associés ou non à l'action du TGF β par rapport à la situation contrôle ou TGF β seul (**Figure 16**). Cependant, pour les cellules épithéliales, l'expression relative des gènes *COL1A* et *FN1* avait tendance à augmenter en présence de TGF β par rapport au contrôle, sans effet sur l'expression génique des marqueurs épithéliaux. Les levures étaient sans effet sur les Caco-2, alors que LF82, en présence de TGF β , augmentait l'expression relative des gènes *ACTA1* et *FN1* de manière significative par rapport à TGF β seul. De façon intéressante, LF82 seul augmentait également l'expression génique relative d'*ACTA1* et *FN1* par rapport à la situation contrôle, mais également du gène *OCLN*. (**Figure 17**).

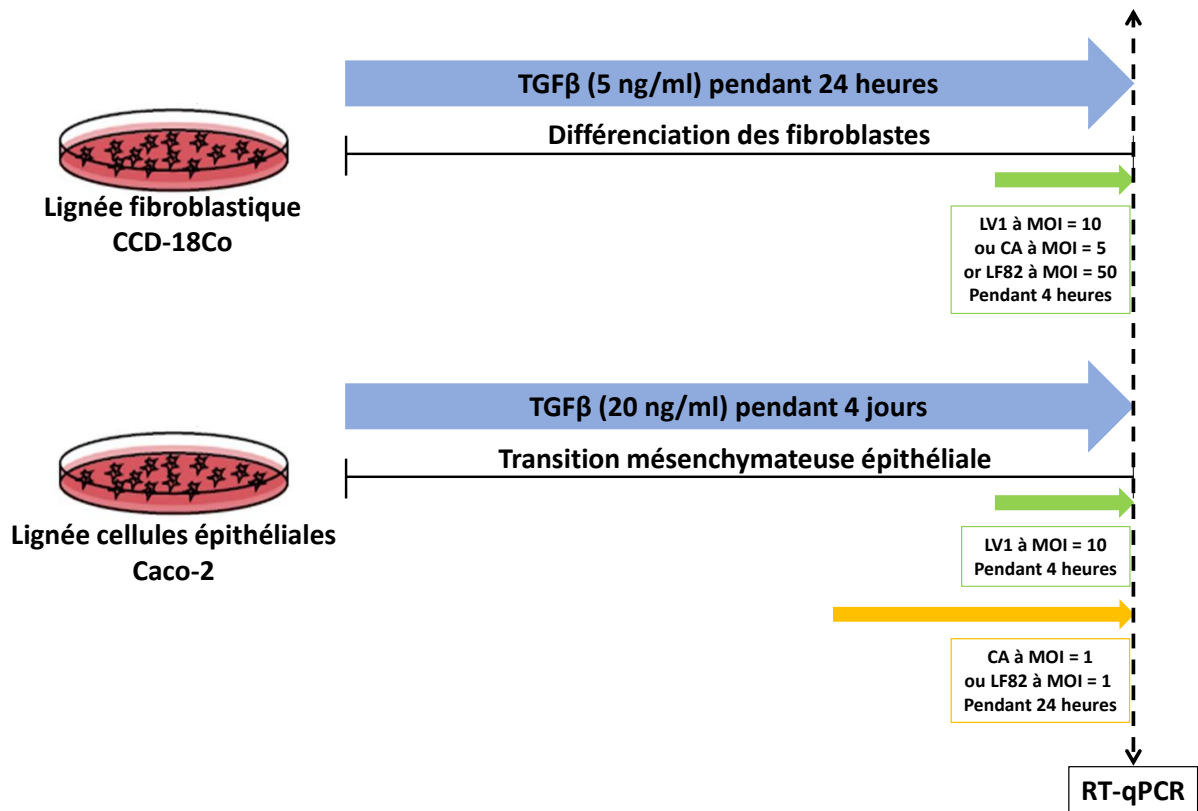


Fig.15. Schéma expérimental de la fibrose induite in vitro par TGFβ sur les lignées cellulaires humaines de fibroblaste CCD-18Co et épithéliale intestinale Caco-2. Les lignées cellulaires étaient soumises en fin d'expérience à l'action de LV1, *C. albicans* (CA) ou LF82. (MOI : multiplicity of infection)

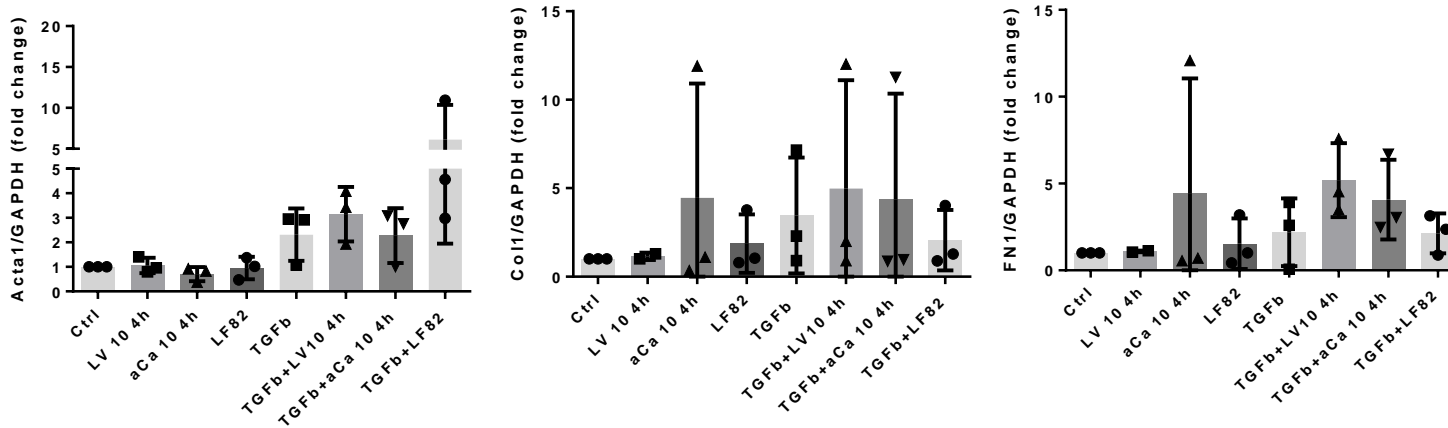


Fig.16. Expression génique des marqueurs de fibrose relative à l'expression du gène GAPDH dans les fibroblastes CCD-18Co.

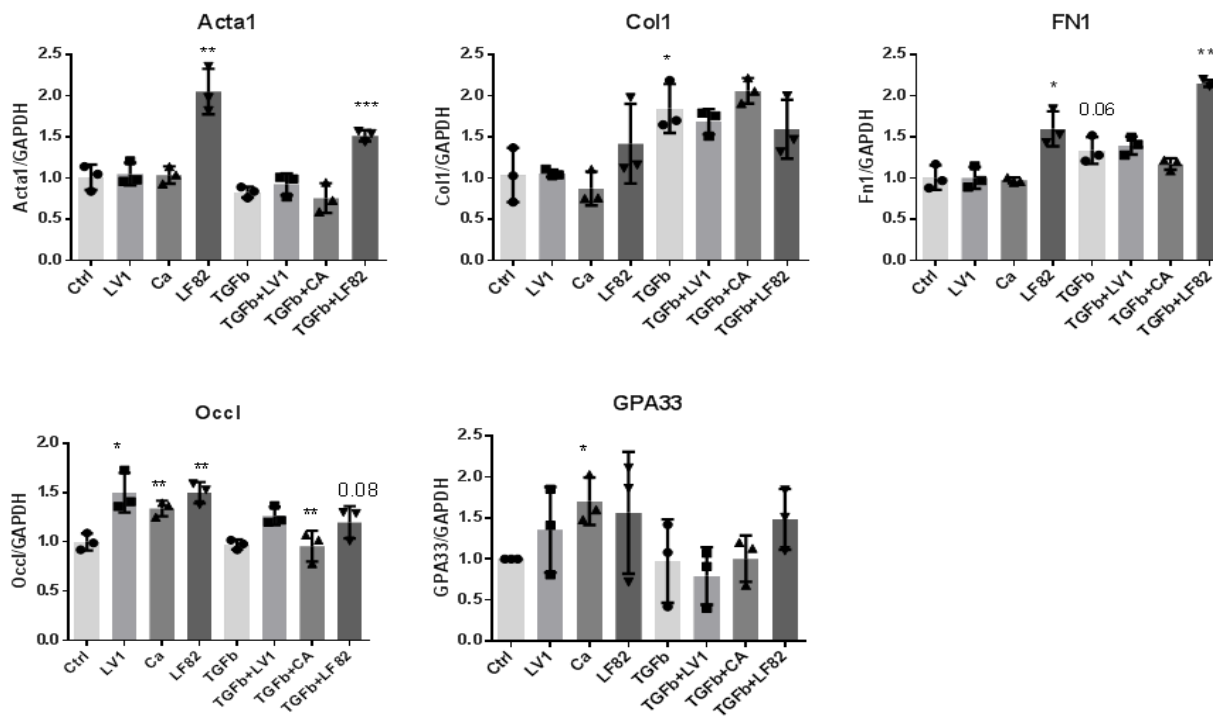


Fig.17. Expression génique des marqueurs de fibrose et épithéliaux relative à l'expression du gène GAPDH dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2.

E. coli* adhérent invasif (AIEC), souche LF82, joue un rôle pro-fibrotique au niveau intestinal, mais pas *Candida albicans

L'ensemble des analyses réalisées a montré une trop grande variabilité des effets des levures industrielles sur la fibrose induite *in vivo* et *in vitro* sans corrélation entre les observations macroscopiques, histologiques et les expressions géniques. L'analyse de l'expression protéique permet généralement d'appuyer les conclusions obtenues à l'échelle des ARN, mais n'a cependant pas été possible en raison de l'utilisation des côlons murins dans leur intégralité pour l'analyse de l'expression génique. Seuls les résultats obtenus avec LF82 et *C. albicans* étaient suffisamment cohérents pour être publiés. Dans ces conditions, il n'a pas été possible de poursuivre le développement d'un modèle cellulaire ou animal approprié pour tester l'ensemble des souches de Lesaffre.

Les résultats combinés de ces expériences ont ainsi conduit à la publication de l'article intitulé « **Adherent invasive *Escherichia coli* (AIEC) strain LF82, but not *Candida albicans*, plays a profibrogenic role in the intestine** » dans *Gut Pathogens* (Chokr *et al.*, 2021). Ces travaux ont montré que, dans un modèle murin de fibrose intestinale chimio-induite, la souche AIEC LF82, à la différence de *C. albicans*, pouvait jouer un rôle péjoratif dans la fibrose (article joint ci-après).

This article was published in Gut Pathogens, Vol 13, Issue 1, Chokr D., Cornu M., Neut C., Bortolus C., Charlet R., Desreumaux P., Specca S., Sendid B., Adherent invasive Escherichia coli (AIEC) strain LF82, but not Candida albicans, plays a profibrogenic role in the intestine, Article 5, (2021). Copyright on any open access article in a journal published by BioMed Central is retained by the authors.

Partie 2. L'origine des ASCA dans la maladie de Crohn : réflexions et expériences

P2. Introduction

Parmi les hypothèses explorées pour expliquer la pathogénèse des MICI, le rôle de l'alimentation a largement été exploré. Due à l'inflammation intestinale et aux lésions observées dans les MICI, l'exposition aux antigènes d'origine alimentaire est probablement accrue, permettant la détection de différents anticorps sériques en lien avec ces antigènes pour les populations atteintes. Dans les années 1990, les anticorps anti-*S. cerevisiae* (levure de boulanger) se sont démarqués, en raison de leur capacité à distinguer les populations atteintes de la MC, des populations atteintes de RCH. A cette époque, de nombreuses questions ont été soulevées et il n'était pas exclu que l'antigène d'un autre microorganisme que *S. cerevisiae* soit à l'origine de cette réponse immunitaire spécifique (Main *et al.*, 1988). Ces anticorps ont probablement été nommés trop rapidement et à tort, ASCA, incriminant directement *S. cerevisiae* (Quinton *et al.*, 1998). Les travaux réalisés depuis leur découverte ont finalement exploré les différences de réactivité selon les souches utilisées et selon différentes espèces de levures, l'épitope à l'origine de la réponse sérologique, et cherché à connaître l'origine des ASCA dans la MC (Heelan *et al.*, 1991; McKenzie *et al.*, 1990; Sendid *et al.*, 1996; Standaert-Vitse *et al.*, 2006). La glycosylation est un processus crucial dans le corps humain. Une dérégulation de la glycosylation est fréquemment associée à des maladies incluant des mutations génétiques et des troubles auto-immuns (McDonnell *et al.*, 2020). Initialement, la mannosylation telle qu'observée chez *S. cerevisiae* (α -1,3 Man transfert) semblait ne pas exister chez l'Homme, cependant il s'agit d'un processus précoce dans la construction des protéines glycosylées (M. H. Lee *et al.*, 2020). En parallèle des investigations menées sur l'immunogène des ASCA, un nombre croissant d'études a permis de détecter des ASCA chez des patients atteints notamment de maladies auto-immunes (Rinaldi *et al.*, 2013), mais également d'autres pathologies telles que l'obésité (Kvehaugen *et al.*, 2017), la mucoviscidose (Hirche *et al.*, 2011) ou l'infarctus du myocarde (Cinemre *et al.*, 2007), rendant plus complexe la réflexion sur l'origine des ASCA.

Devant la multitude des candidats potentiels à l'origine des ASCA, en raison d'un épitope commun partagé entre ces différents candidats, il paraissait injustifié d'incriminer directement *S. cerevisiae* sans avoir la preuve formelle directe et irréfutable que nous pourrions détecter des ASCA sériques chez des individus soumis à cette seule levure dans un contexte d'inflammation digestive. Les modèles *in vivo* nous offrent la possibilité de réaliser ces expériences. Aucune étude, ni expérience n'a été réalisée afin de prouver que *S. cerevisiae*,

levure transitoire dans le tube digestif, très rarement mise en évidence dans les cultures de selles de patients étaient l'origine des ASCA. Le modèle murin axénique offre la possibilité d'étudier de façon isolée l'impact de *S. cerevisiae* sur la synthèse des ASCA sériques.

La stabilité des ASCA dans la MC au cours du temps, incite à considérer l'hypothèse, selon laquelle, la MC pourrait être une maladie auto-immune. En effet, contrairement au taux d'ASCA, les études réalisées sur le microbiote intestinal de manière séquentielle nous indiquent que ce dernier n'est pas stable au cours du temps (Balderramo *et al.*, 2023; Kansal *et al.*, 2019a). Une production d'ASCA soumise à un stimulus microbien inconstant seul ne pourrait pas expliquer ce fait, il y aurait forcément des variations des taux d'ASCA au cours du temps. Ainsi, la production des ASCA pourrait être initiée par un stimulus microbien. Cependant la stabilité dans le temps des ASCA ne semble se concevoir que par l'existence d'un auto-antigène. Elle serait alors suivie d'une absence de régulation immunitaire par reconnaissance d'un auto-antigène de structure proche de l'antigène microbien et de la production permanente d'ASCA en tant qu'auto-anticorps par la suite. Les protéines glycosylées seraient des candidats potentiels pour générer ce processus. Parmi ces protéines, CEACAM6 a retenu notre attention. Les pili de type 1 des AIEC expriment FimH à leur extrémité, une adhésine de type *mannose binding lectin*, capable de se lier notamment à la partie glycosylée de CEACAM6 exprimée à la surface des entérocytes humains (Barnich & Darfeuille-Michaud, 2010). Cette glycoprotéine est anormalement exprimée sur la muqueuse iléale des patients atteints de la MC, permettant aux AIEC d'induire ou de maintenir une inflammation intestinale, et dans le sang des patients, alors marqueur pronostique d'inflammation (Barnich *et al.*, 2007). Certaines stratégies thérapeutiques visent à empêcher la reconnaissance entre CEACAM6 et FimH. *S. cerevisiae* ou sa paroi ont été étudiés dans cet objectif, permettant de bloquer l'adhésion dans des modèles expérimentaux (Sivignon *et al.*, 2021). Cependant, nous ne savons pas si CEACAM6 est capable de générer une réponse de type ASCA. Selon l'une de nos hypothèses, *S. cerevisiae* et/ou *C. albicans* interagirait avec CEACAM6 de la même façon qu'avec *E. coli* via FimH pour finalement créer un auto-antigène par mimétisme et permettre la génération d'ASCA.

Les objectifs de cette seconde partie étaient, après avoir rédigé une revue de la littérature sur les origines potentielles des ASCA, d'explorer expérimentalement *in vivo* certaines des pistes suggérées dans cette revue. Ainsi, 2 modèles animaux ont été utilisés. Les souris CEABAC10, capables d'exprimer CEACAM6 humaine, et des souris axéniques, soumises au DSS afin d'induire une colite aiguë. L'objectif était d'évaluer la synthèse d'ASCA chez ces souris atteintes de colite aiguë colonisées par *C. albicans*, *S. cerevisiae* et une autre souche de

S. cerevisiae de la société Lesaffre (LV1). L'évaluation a également été réalisée dans le modèle de fibrose intestinale (Partie 1).

P2. Matériels et méthodes

Souches de C. albicans et de S. cerevisiae

Les souches de *C. albicans* et *S. cerevisiae* étaient isolées de selles de patients atteints de MC, cultivées sur une gélose Sabouraud, après congélation dans un milieu glycérolé, et enrichies dans un milieu de Sabouraud liquide sous agitation 24h avant le gavage des souris, à 37°C et 30°C, respectivement. La souche LV1 était fournie lyophilisée par la société Lesaffre, conservée aliquotée par gramme à réception du lot, sous vide d'air. Une suspension des souches dans du PBS stérile 1X était préparée de façon extemporanée pour une suspension finale de 10^7 levures /200 µL de PBS pour le gavage des souris.

Animaux

La lignée de souris CEABAC10, surexprimant CEACAM6 humaine (hétérozygotie) (Carvalho *et al.*, 2009), a été élevée par l'équipe du Pr Nicolas Barnich (M2ISH, Clermont Ferrand). L'expérience sur cette lignée a été menée par le Dr Adeline Sivignon dans leur animalerie. Il s'agissait de femelles âgées de 7 à 8 semaines, hébergées dans des conditions « specific pathogen-free ». Les souris mâles C57BL/6 axéniques ont été fournies par Charles River US. Les souris âgées de 8 semaines ont été hébergées et manipulées en conditions stériles pendant toute la durée de l'expérience.

Protocole de colite aiguë chimio-induite et colonisation

Les souris ont reçu 7 jours de DSS 1,5% (MP Biomedicals) dans l'eau de boisson, disponible à volonté. La solution était changée quotidiennement. Les gavages de 200 µL ont été effectués quotidiennement pour les souches LV1 et *S. cerevisiae* et tous les 3 jours pour la souche de *C. albicans*. Le sang des souris a été prélevé en rétro-orbital à J0 et J7 de l'expérience, et par ponction intracardiaque à J14, le jour du sacrifice. Celui-ci était centrifugé rapidement et le sérum conservé à -20°C jusqu'à analyse. Une évaluation clinique des souris était effectuée tous les 3 jours afin de surveiller la présence de sang dans les selles, la consistance de celles-ci et le poids des souris. Les souris étaient observées et pesées quotidiennement afin d'évaluer la nécessité ou non d'une euthanasie précoce en cas de souffrance. Une surveillance de la colonisation digestive fongique était régulièrement effectuée par mise en culture des selles

comme précédemment énoncé. Le plan expérimental est résumé dans la **Figure 18**. La répartition des souris dans les différents groupes est indiquée dans le **Tableau 4**.

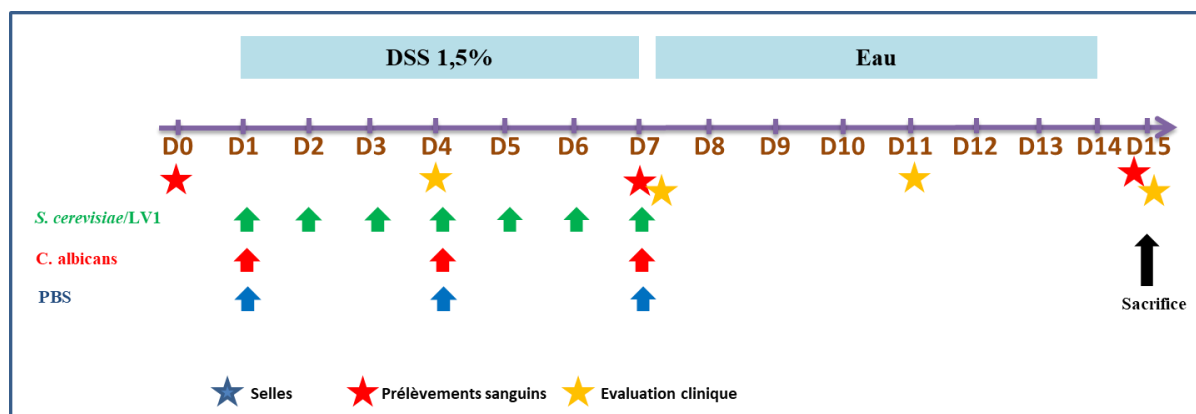


Fig.18. Plan expérimental de l'évaluation de la production d'ASCA par les souris avec colite chimio-induite exposées aux microorganismes

Détermination des ASCA

La mesure des ASCA a été effectuée par méthode ELISA. Brièvement, un volume de 100 µL d'une dilution au 1/100^{ème} de sérum de souris était déposé sur des plaques préalablement sensibilisées avec du mannane de *S. cerevisiae*. Puis, 100 µL de conjugué HRP dilué au 1/1000^{ème} (anti-immunoglobulines totales de souris) étaient ajoutés. Une lecture d'absorbance à 450 nm était effectuée après révélation par le substrat chromogénique.

Tableau 4. Répartition des souris dans les groupes expérimentaux selon l'étude menée

	Etude souris CEABAC10	Etude souris axéniques
Groupes expérimentaux	6 souris CEABAC10 + DSS + <i>C. albicans</i>	6 souris DSS + <i>C. albicans</i>
	6 souris CEABAC10 + DSS + <i>S. cerevisiae</i>	6 souris DSS + <i>S. cerevisiae</i>
	6 souris CEABAC10 + DSS + LV1	6 souris DSS + LV1
Groupes témoins	6 souris CEABAC10 + DSS	6 souris DSS
	6 souris CEABAC10 + <i>S. cerevisiae</i>	6 souris <i>S. cerevisiae</i>
	6 souris CEABAC10 + LV1	6 souris LV1
	4 souris CEABAC10	
	4 souris WT + DSS	
	4 souris WT	

Analyses statistiques

Le test des rangs signés de Wilcoxon pour les échantillons appariés a été utilisé pour comparer les médianes de densité optique entre les groupes de souris, entre J0 et J14.

Pour les données non appariées, fibrose intestinale, les données étaient exprimées en médiane \pm interquartile range. Les différences statistiques entre les groupes ont été évaluées par des tests non paramétriques d'analyse de variance (Kruskal-Wallis, tests de comparaison multiple de Dunn). Les résultats ont été considérés statistiquement significatifs pour des valeurs de $p \leq 0,05$. L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé au moyen du logiciel Prism V6 et V7 software (Graphpad, La Jolla, CA).

P2. Résultats

Revue de la littérature. Depuis la découverte des ASCA dans la maladie de Crohn et son lien éventuel avec C. albicans, trente années de recherche consacrées à leur signification en santé humaine

Dans cette revue, après avoir exposé les caractéristiques connues des ASCA dans la MC dans une brève introduction — telles que la précocité de leur apparition avant les premiers symptômes de la MC, la persistance au cours de la maladie ou encore la valeur pronostique de ces anticorps —, la question de l'épitope reconnu par les ASCA a été discutée. Le rôle de la levure *C. albicans* ayant été particulièrement exploré dans les MICI, son implication dans la génération des ASCA a également été discuté, ainsi que l'implication d'autres genres microbiens, fongique, bactérien ou viral. Enfin, la MC ayant des caractéristiques de maladie auto-immune, l'hypothèse qu'un auto-antigène soit à l'origine des ASCA a été explorée. Une revue non exhaustive des maladies pour lesquelles des ASCA ont été détectés a également été réalisée. La mise en parallèle avec les études ayant exploré le microbiote, voire, ayant évoqué une dysbiose associée à ses maladies soulève pas mal de questions et d'hypothèses à vérifier expérimentalement. Les aspects immuno-glycobiologiques, microbiologiques et cliniques sont abordés dans cette revue, s'appuyant sur des études fondamentales expérimentales (*in vitro* et *in vivo*) et cliniques (Sendid *et al.*, 2023).

This article was published in Autoimmunity Reviews, Vol 23, Issue 2; Boualem Sendid, Marjorie Cornu, Camille Cordier, Julie Bouckaert, Jean Frederic Colombel, Daniel Poulain; From ASCA breakthrough in Crohn's disease and Candida albicans research to thirty years of investigations about their meaning in human health; Copyright Elsevier (2024).

La colonisation digestive par *S. cerevisiae* n'induit pas la synthèse d'ASCA chez les modèles murins de colite aiguë induite par le DSS

L'analyse de la synthèse d'ASCA a été réalisée chez des souris exprimant le récepteur CEACAM6 humain, appelées CEABAC10, présentant une colite aiguë induite par du DSS et gavées avec des levures présumées pathogènes (*C. albicans*) ou non pathogènes (*S. cerevisiae*). Les expériences ont été réalisées à Clermont-Ferrand dans le laboratoire de l'équipe du Pr Nicolas BARNICH (M2ISH, UMR 1071 Inserm) par le Dr Adeline Sivignon. Le poids des souris était relativement stable au cours du temps. Des rectorragies ont été observées entre J7 et J11 après le début de l'expérience chez les souris traitées par DSS. Les échantillons sériques étaient adressés congelés dans notre laboratoire pour le dosage des ASCA.

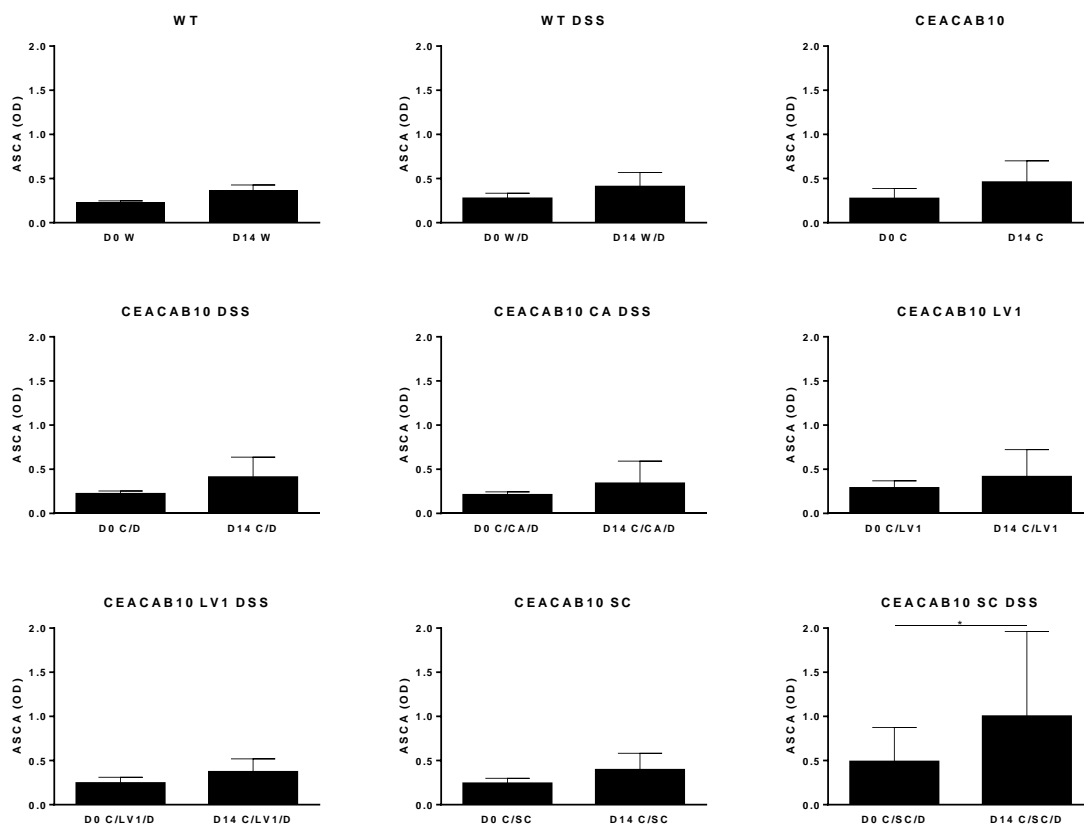


Fig. 19. Dosage d'ASCA sériques (densité optique) à J0 et J14 pour chaque groupe de souris WT ou CEABAC10. (WT : wild-type ; DSS : dextran sulfate sodium ; SC : souche clinique de *S. cerevisiae* ; CA : souche clinique de *C. albicans* ; LV1 : souche probiotique de *S. cerevisiae*) (* $p = 0,05$)

Comme observé dans la **Figure 19**, seul le groupe de souris CEABAC10 traitées par DSS et *S. cerevisiae* présentait une augmentation significative des taux d'ASCA entre J0 et J14 ($p = 0,05$). Il est à noter que ce groupe en particulier présentait une variabilité inter-individuelle importante compliquant l'interprétation de ce résultat. Dans nos conditions expérimentales, ni

LV1, ni l'expression de CEACAM6 humaine en présence de LV1 ou *C. albicans* n'a influencé la synthèse d'ASCA par la souris.

Les souris axéniques étaient également soumises à une colite aiguë chimio-induite par du DSS et étaient gavées avec des levures présumées pathogènes (*C. albicans*) ou non pathogènes (*S. cerevisiae*). Le poids des souris décroissait parallèlement à l'apparition des signes de colite (sang, selles molles ou diarrhéiques) dans les différents groupes soumis au DSS, confirmant l'efficacité de ce traitement. Il est à noter que le poids des souris soumises à la souche clinique de *S. cerevisiae* et DSS baissait de manière significative par rapport au groupe DSS seul (**Figure 20**). Des rectorragies ont été observées entre J6 et J11 après le début de l'expérience chez les souris traitées par DSS. Une souris appartenant au groupe DSS, a été euthanasiée à la suite d'un prélèvement sanguin à J0. La colonisation par *C. albicans* persistait jusqu'à la fin d'expérience alors que la colonisation par *S. cerevisiae* et LV1 décroissait rapidement après le dernier gavage.

Les résultats des dosages d'ASCA (en densité optique) entre J0 et J14 pour chaque groupe de souris sont présentés **Figure 21**. Dans nos conditions expérimentales, les taux d'ASCA étaient faibles et stables entre J0 et J14 pour chaque groupe de souris axéniques, que ce soit en contexte d'inflammation et/ou en présence des différentes souches.

La colonisation digestive par *S. cerevisiae* n'induit pas non plus la synthèse d'ASCA dans le modèle de fibrose intestinale chimio-induite

Nous avons évalué les taux d'ASCA synthétisés par les groupes murins de l'étude de la fibrose intestinale exposée dans la première partie. Pour rappel, les souris étaient exposées à différentes souches de levures (*C. albicans*, LV1, LV2 et LV3) ou à *E. coli* (LF82) en contexte de fibrose intestinale induite par le DSS. Les prélèvements sanguins n'ayant pas été réalisés à J0 de l'expérience, les dosages d'ASCA sériques n'ont été réalisés qu'au jour du sacrifice.

Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes CTL et DSS seul, ni entre le groupe DSS et les groupes exposés aux microorganismes en condition inflammatoire (**Figure 22**). Cependant, les valeurs extrêmes obtenues pour quelques souris dans certains groupes semblaient aberrantes et montraient une certaine hétérogénéité des réponses.

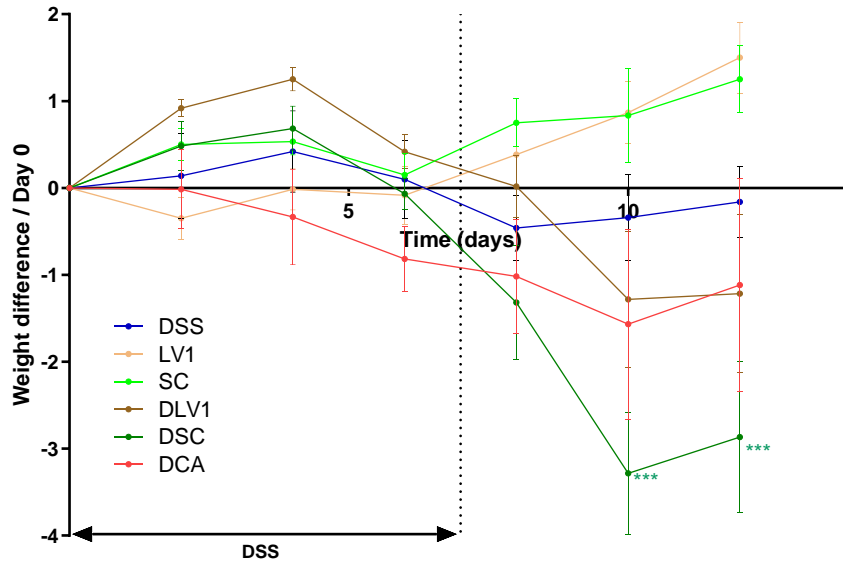


Fig. 20. Cinétique de l'évolution du poids des souris axénique au cours de l'expérience par rapport à J0. (DSS : dextran sulfate sodium ; SC : souche clinique de *S. cerevisiae* ; CA : souche clinique de *C. albicans* ; LV1 : souche probiotique de *S. cerevisiae*) (***) $p = 0,001$

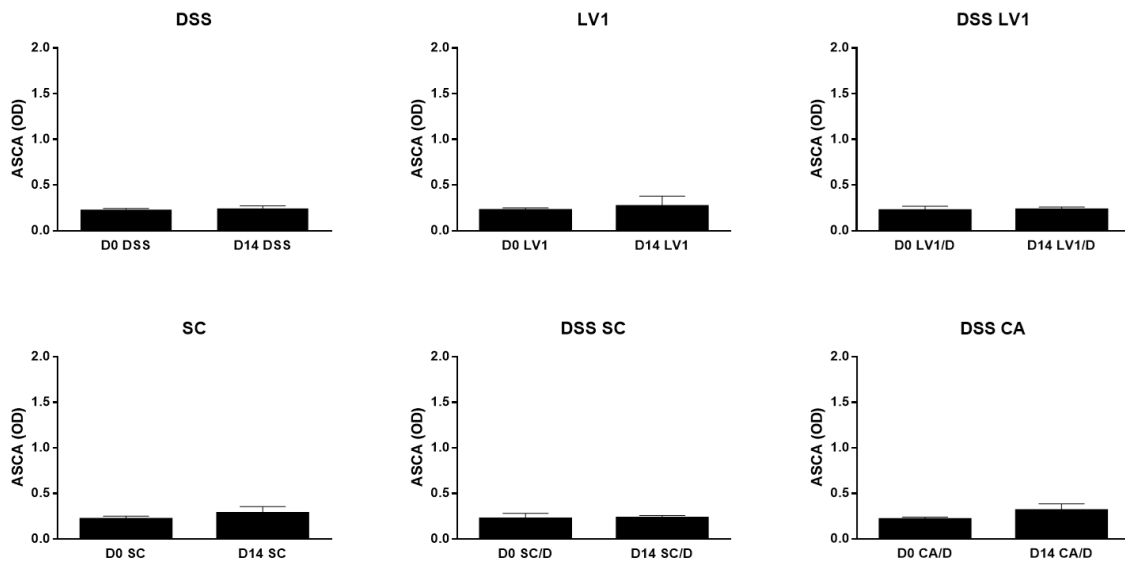


Fig. 21. Dosage d'ASCA sériques (densité optique) entre J0 et J14 pour chaque groupe de souris axéniques. (DSS : dextran sulfate sodium ; SC : souche clinique de *S. cerevisiae* ; CA : souche clinique de *C. albicans* ; LV1 : souche probiotique de *S. cerevisiae*)

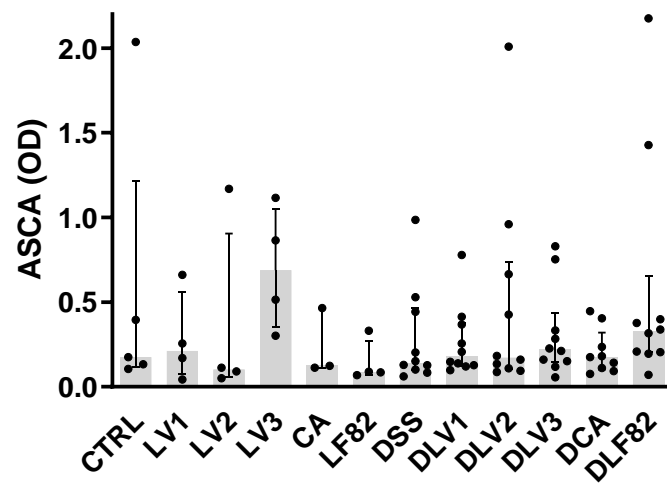


Fig. 22. Dosage d'ASCA sériques (densité optique) au jour du sacrifice. Modèle murin de fibrose intestinale. (DSS : dextran sulfate sodium ; CA : *C. albicans* ; LV1/2 et 3 : souches probiotiques de *S. cerevisiae* ; LF82 : *E. coli* AIEC)

Partie 3. Analyse du mycobiote et de l'association entre la présence des ASCA et colonisations par *Candida*, *Saccharomyces* et AIEC dans la maladie de Crohn. Résultats de l'étude MAGIC

P3. Introduction

La prévalence des ASCA dans la MC (50 à 60%) plus élevée que dans la RCH (11,9%) a entraîné l'utilisation des tests de détection de ces anticorps pour distinguer les deux maladies notamment en cas de colite d'origine indéterminée (Sendid *et al.*, 2023). La présence de ces ASCA a toujours laissé suspecter l'implication des champignons dans l'apparition de la maladie. En ont résulté de nombreux articles sur l'implication potentielle notamment de *Candida spp* dans ces processus inflammatoires (Kreulen *et al.*, 2023). Les innovations technologiques toujours plus performantes, permettant le séquençage à haut débit du métagénome, ont conduit à décrire le mycobiote intestinal et les dysbioses potentielles impliquées dans la MC. Les facteurs impliqués dans les variations observées du mycobiote chez les patients atteints de MC sont notamment le phénotype de la maladie, l'activité de la maladie et le pronostic (Balderramo *et al.*, 2023). Les études regroupent souvent des patients atteints de la MC, mais également de RCH, en poussées ou en rémission, de diagnostic récent ou ancien, avec des thérapeutiques différentes et pour lesquels les prélèvements analysés peuvent être différents d'une étude à l'autre. La grande variété des patients inclus est liée aux difficultés de recrutement des patients à grande échelle, empêchant d'obtenir des groupes homogènes et amputant la qualité des résultats et des conclusions. Aujourd'hui, certains chercheurs émettent l'hypothèse que la MC est bien plus qu'une seule maladie, en raison, par exemple, d'apparitions plus ou moins tardives de la maladie, de MC apparaissant en contexte familial, d'évolution différentes avec des pronostics variables, de réponses variables aux différentes thérapeutiques. Les différents facteurs impliqués dans les causes de la maladie en font un trouble à facettes multiples (Underhill & Braun, 2022).

Parmi les patients atteints de MC et dits ASCA-positifs, il est apparu que des patients étaient déjà porteurs de ces anticorps parfois plusieurs années avant l'apparition des symptômes de la maladie (Israeli *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2020; van Schaik *et al.*, 2013). Il était donc primordial de mener une étude multicentrique sur des sujets plus homogènes par rapport aux spécificités cliniques de leur maladie et de diagnostic récent. Les recherches menées sur l'association entre le mycobiote intestinal et la présence des ASCA dans la MC sont peu nombreuses et leurs résultats ne sont pas unanimes quant à l'implication d'une espèce fongique en particulier. Alors que l'espèce *C. albicans* est sur toutes les lèvres lorsqu'on évoque les

ASCA, à ce jour il n'existe pas d'étude ayant mis en évidence un lien entre le portage de *C. albicans* et la détection des ASCA (Carlson *et al.*, 2023). De façon inattendue, *C. tropicalis* s'est démarqué dans une étude par une corrélation positive avec la présence d'ASCA (Hoarau *et al.*, 2016). Le genre *Malassezia* étant identifié comme associé à la MC dans l'étude de Limon *et al.*, il a également été montré que les sérums de patients atteints de MC avec des taux élevés d'ASCA réagissaient plus avec l'espèce *M. restricta* que les sérums de patients avec des taux faibles d'ASCA (Limon *et al.*, 2019). Enfin, concernant, *S. cerevisiae*, dans une étude de Ventin-Holmberg *et al.* menée sur des patients atteints de MICI active, ni l'abondance de *S. cerevisiae*, ni celle de *C. albicans*, n'était corrélée aux valeurs d'ASCA (Ventin-Holmberg *et al.*, 2021). Par ailleurs, il n'existe à notre connaissance, qu'une seule étude ayant étudié le microbiome bactérien sur une population pédiatrique et déterminé une association entre la présence d'ASCA et certaines espèces bactériennes, *Ruminococcus torques* et *Yersinia enterocolitica* (Kansal *et al.*, 2019b), dans cette étude le mycobiote n'était pas analysé.

Les objectifs principaux de cette dernière partie était i) d'étudier le mycobiote fécal de patients atteints de la MC en comparaison avec leurs apparentés sains au premier degré et des témoins sains appariés selon le sexe, l'âge et la localisation géographique, inclus dans l'étude MAGIC (projet hospitalier de recherche clinique national), et ii) d'étudier la relation entre les ASCA et le profil du mycobiote des patients atteints de la MC, notamment *C. albicans* et *S. cerevisiae*, ou encore la présence d'AIEC. Un recueil des études de métagénomique fongique impliquant des patients atteints de la MC, et le rôle de *C. albicans* et *S. cerevisiae* dans celle-ci était ensuite réalisé.

P3. Matériels et méthodes

Design et population de l'étude MAGIC

L'étude MAGIC, intitulée « *Mise en évidence d'anomalies du microbiote fécal chez des sujets sains à risque élevé de maladie de Crohn : études familiales et relations avec un profil génétique et sérologique particulier. Comparaison entre sujets atteints, leur fratrie et sujets sains* », est une étude cas-témoins prospective multicentrique française ayant inclus 3 groupes de sujets : i) des patients atteints de la MC en rémission clinique et de diagnostic inférieur à 2 ans au moment de l'inclusion, ii) leurs apparentés sains du premier degré, sélectionnés sur l'absence de symptômes gastro-intestinaux et iii) des témoins sains appariés aux sujets atteints de MC selon le sexe, l'âge et la localisation géographique (**ClinicalTrials.gov Id NCT02826330**). Les critères d'exclusion des sujets sains (groupes ii et iii) incluaient une

calprotectine fécale (CF) > 250 µg/g de selles, des antécédents de colectomie, une prise récente d'antibiotiques et/ou d'antiparasitaires et antifongiques dans les 6 semaines précédant leur inclusion. La cohorte incluait à la clôture de l'étude 222 sujets (60 sujets atteints de la MC, dont 34 adultes et 26 enfants, 104 apparentés dont 84 adultes et 20 enfants et 58 témoins dont 37 adultes et 21 enfants). La contribution de notre équipe à cette étude concernait le dosage des biomarqueurs fécaux et sériques et la caractérisation du mycobioïme fécal par métagénomique.

Détermination des biomarqueurs

Un échantillon sanguin et une selle étaient récupérés pour chaque sujet inclus. Les échantillons sanguins étaient centrifugés et les sérums étaient conservés à -80°C jusqu'à leur analyse. Les titres d'ASCA IgG et IgA étaient déterminés par une méthode ELISA automatisée selon les instructions du fabricant (IBDX® gASCA IgG and IgA ELISA kits ; Glycominds, Lod, Israel). Brièvement, 50 µL de sérum dilué au 1/101^{ème} étaient déposés sur la plaque préalablement sensibilisée avec l'antigène. Après une incubation à température ambiante de 30 min, puis plusieurs lavages, 100 µL d'anticorps anti-IgG (ou IgA) humaines conjugués à la peroxydase étaient ajoutés, et la plaque était incubée 30 min à température ambiante. Après plusieurs lavages, 100 µL de substrat chromogénique étaient ajoutés, et la plaque était incubée 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière. La lecture d'absorbance était réalisée pour une longueur d'onde de 450 nm dans les 30 min après l'ajout de la solution d'arrêt. Les résultats, exprimés en unités arbitraires (UA), sont calculés selon le rapport de la densité optique (DO) de l'échantillon / la moyenne des DO du calibrateur, multiplié par la valeur attribuée au calibrateur. Les seuils de positivité étaient de 45 UA et 20 UA pour les IgG et les IgA, respectivement.

Un kit de recueil à domicile de selles associé à une notice explicative d'utilisation étaient remis à chaque participant de l'étude. Le kit permet le recueil de selles de 0,1 à 0,3 g/échantillon. Les échantillons de selles étaient conservés à -80°C jusqu'à leur analyse. Dans un premier temps, la CF était extraite de 80 mg de selles par l'utilisation du dispositif Smart Prep de Roche (BÜHLMANN Laboratories AG; Basel, Switzerland). Les surnageants étaient ensuite conservés à -20°C jusqu'à réalisation du dosage par méthode ELISA. Les concentrations en CF étaient évaluées par un test ELISA automatisé utilisant le kit fCal® ELISA test (BÜHLMANN Laboratories AG; Basel, Switzerland), selon les instructions du fabricant. Les calculs de concentration étaient réalisés d'après une courbe de calibration. Le seuil retenu pour évoquer une maladie inflammatoire active était de 250 µg/g.

Métagénomique fongique ciblée

Les selles étaient conservées à -80°C jusqu'à extraction d'ADN. L'ADN était extrait à partir de 200 mg de selles homogénéisées dans 1 mL de tampon de lyse (InhibitEX), avec le kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), selon les instructions du fabricant. Une étape de pré-lyse mécanique était réalisée au préalable par un mélange de billes de verre de différents calibres (500 et 1000 µm, Sigma), à l'aide de l'instrument Fastprep 96 (MP Biomedicals), 2 séries de 300 secondes à 1800 rpm. L'amplification des régions ITS des champignons était réalisée avec les amorces sens ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') et antisens ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Le programme d'amplification était constitué de 30 cycles de dénaturation (10 secondes à 98°C) – hybridation (20 secondes à 58°C) – élongation (10 secondes à 72°C), précédés d'une dénaturation initiale de 3 min à 98°C et suivis d'une étape d'élongation finale de 3 min à 72°C. La qualité de l'amplification était vérifiée par électrophorèse sur un gel d'agarose (1,5%) contenant 7 µg/ml de bromure d'éthidium. Les amplicons étaient quantifiés par fluorimétrie sur le fluoromètre Qubit 2.0 (Life Technologies), par l'utilisation du kit Qubit™ dsDNA HS (Life Technologies). L'ADN était purifié par des billes magnétiques (AMPure XP beads, Beckman Coulter, CA, USA). L'étape de purification était suivie d'une fragmentation enzymatique (Ion shear Plus Reagents, Ion torrent) pour obtenir des fragments de 300 pb, à nouveau purifiés. L'étape de ligation des code-barres et adaptateurs était réalisée grâce aux réactifs (Ion torrent Ion Plus Fragment Library kit et Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit). Une nouvelle étape de purification des fragments « barcodés » était réalisée. La librairie était ensuite amplifiée et quantifiée avec le kit Ion Library TaqMan Quantitation Kit. Le séquençage des librairies était réalisé sur un séquenceur Ion Torrent S5 (Thermo Fisher Scientific). Les échantillons étaient analysés sur un pipeline personnalisé utilisant la base de données Unite V7.2, conçue pour la classification taxonomique des séquences ITS des champignons. Les séquences étaient regroupées en unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) en retenant 99% d'homologie, classées avec Qiime 1.8.

Composition et caractérisation du microbiote fécal bactérien

Parallèlement, la caractérisation du microbiote fécal bactérien a été réalisée par les Drs Patricia Lepage et Stanislas Mondot (UMR1319 - MICALIS – INRAE), et le phylotypage des souches d'*E. coli* AIEC, par l'équipe du Pr Nicolas Barnich (UMR U1071, M2iSH). Les isolats d'*E. coli* ont été caractérisés comme souches adhérentes et invasives selon leur capacité à adhérer à une

lignée de cellules épithéliales intestinales et de les envahir, ainsi qu'à survivre et à se multiplier dans une lignée de macrophages (O'Brien *et al.*, 2017). Le microbiote bactérien fécal a été séquencé après extraction par le kit Power Fecal DNA Isolation Kit (Mobio, Qiagen, Hilden, Allemagne), précédée d'une pré-lyse mécanique. Les séquences étaient déterminées par les amorces V3/V4 ciblant l'ADN codant pour l'ARN ribosomal 16S (sens 5'-TAC GGR AGG CAG CAG-3' et antisens 5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT-3'). Le séquenceur utilisé était le MiSeq, Illumina (séquences de 250 pb). Le séquençage a été réalisé par la plateforme Genotoul (Toulouse). La classification taxonomique des variants de séquence d'amplicons (Amplicon Sequencing Variants – ASV–) a été réalisée par utilisation de l'outil « RDPTools ».

Analyses statistiques

Les données étaient exprimées en moyenne \pm écart-type ou médiane \pm interquartile range selon la distribution des données ou l'effectif analysé. Les différences statistiques entre les groupes ont été évaluées par des tests paramétriques (ANOVA, test de comparaisons multiples de Tukey) ou non paramétriques d'analyse de variance (Kruskal-Wallis, test de comparaisons multiples de Dunn), si le nombre de groupes était supérieur à 2. Les tests de Student ou de Mann-Whitney étaient utilisés en cas de comparaison de 2 groupes selon l'effectif ou la distribution des données. Les résultats ont été considérés statistiquement significatifs pour des valeurs de $p \leq 0,05$. L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé au moyen des logiciels Prism (Graphpad, La Jolla, CA) et R (R Foundation for Statistical Computing).

P3. Résultats

Descriptif des caractéristiques cliniques et biologiques des sujets inclus dans l'étude MAGIC

Les caractéristiques démographiques, cliniques et thérapeutiques des sujets inclus dans l'étude sont résumées dans le **Tableau 5**. Les patients atteints de la MC étaient des patients relativement jeunes, la médiane d'âge étant de 18,5 [Q1, 13,6 ; Q3, 24,8] ans. La maladie était relativement peu avancée avec une médiane d'évolution de la maladie d'1 [Q1, 0,6 ; Q3, 1,5] an, avec une localisation majoritairement iléo-colique (L3) et un profil de la maladie plutôt non sténosant et non fistulisant (B1). Les patients présentaient à l'inclusion une maladie majoritairement non active avec un HBI de médiane faible à 1 [Q1, 0 ; Q3, 3]. Les patients étaient majoritairement traités par immunosuppresseurs (55%), puis par

biothérapies (31,7%), et moins fréquemment par corticoïdes (21,7%) ou mesalazine (5-ASA) (20%).

Tableau 5. Caractéristiques démographiques, cliniques et thérapeutiques par groupes.

	Maladie de Crohn	Apparentés sains	Témoins
Nombre	60	104	58
Masculin ; n (%)	28 (46,7)	47 (45,2)	27 (46,5)
Age à l'inclusion (années) ; médiane [Q1 ; Q3]	18,5 [13,6 ; 24,8]	34,7 [20,9 ; 45,3]	20,1 [14,1 ; 25,3]
Enfants ; n (%)	26 (43,3)	20 (19,2)	21 (36,2)
Histoire familiale de la maladie ; n (%)	14 (23,3 %)		
Localisation de la maladie ; n (%)			
L1 (iléon terminal)	15 (25,0 %)		
L2 (côlon)	10 (16,7 %)		
L3 (iléo-colique)	35 (58,3 %)		
L4 (tractus digestif haut)	13 (21,7 %)		
Comportement de la maladie ; n (%)			
B1 (non sténosant, non fistulisant)	46 (76,7 %)		
B2 (sténosant)	7 (11,7 %)		
B3 (fistulisant)	7 (11,7 %)		
Atteinte périanale	9 (15,0 %)		
HBI ; médiane [Q1 ; Q3]	1 [0 ; 3]		
Traitements à l'inclusion ; n (%)			
5-ASA (mesalazine)	12 (20)		
Corticoïdes	13 (21,7)		
Nutrition artificielle	9 (15)		
Immunosuppresseurs	33 (55)		
Biothérapie	19 (31,7)		

HBI, indice d'Harvey Bradshaw

Les sujets sains, regroupant les parents sains du premier degré et les témoins, ont été sélectionnés selon le résultat de la CF. Les sujets sains étaient exclus si la valeur de la CF à l'inclusion dépassait 250 µg/g de selle. Les valeurs maximales atteignaient donc 163 et 103 µg/g de selle, pour des médianes de 30 [Q1 : 15 ; Q3 : 37] et 30 [Q1 : 30 ; Q3 : 36] µg/g, respectivement dans ces groupes, contre une médiane de 527 [Q1 : 42 ; Q3 : 1800] µg/g de selle chez les patients atteints de la MC. Malgré l'inclusion de patients présentant un score médian d'activité clinique relativement faible, 26/59 (44,1%) de ces patients testés présentaient une CF > 1000 µg/g de selle, et 62,7% avaient une CF > 250 µg/g de selle (**Figure 23**). Aucune différence, entre les taux de CF selon la localisation ou le phénotype de la MC, n'était significative. Chez les patients atteints de la MC, les patients inclus à l'âge pédiatrique avaient une CF plus élevée que chez les patients inclus à l'âge adulte (médiane de CF de 1706 [Q1 : 223 ; Q3 : 1800] vs. 260 [Q1 : 39 ; Q3 : 1650] µg/g de selle ; $p = 0,04$) (**Figure 24**).

Parmi les patients atteints de la MC, 41,7% étaient porteurs d'ASCA de type IgG (seuil ≥ 45 UA), 2,9% des apparentés sains et 1,8% des témoins. Les valeurs d'ASCA chez les patients atteints de la MC étaient significativement plus élevées que chez leurs apparentés sains et chez les témoins (41 [Q1 : 18 ; Q3 : 63] vs. 15 [Q1 : 8 ; Q3 : 24] et 12 [Q1 : 8 ; Q3 : 18], respectivement ; $p < 10^{-4}$) (**Figure 25**). Sur les 60 patients atteints de la MC, 14 patients avaient des résultats discordants entre les IgG (10 positifs seuls) et les IgA (4 positifs seuls ; seuil ≥ 25 UA). Selon l'étude de la courbe ROC, les performances diagnostiques étaient légèrement meilleures pour les IgG que pour les IgA, avec une corrélation modérée entre les deux isotypes ($r = 0,53$; $p < 10^{-4}$) (**Figure 26**). Les IgG présentant de meilleures performances, nous avons fait le choix par la suite d'analyser les résultats uniquement avec les ASCA de type IgG. Chez les patients atteints de MC, les valeurs d'ASCA de type IgG n'étaient pas différentes chez les enfants en comparaison avec celles des adultes. Aucune différence n'a été observée selon la localisation ou le comportement de la maladie.

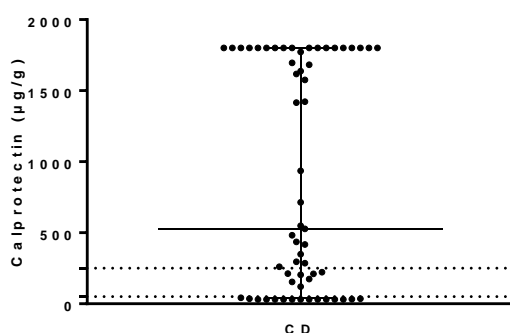


Fig. 23. Calprotectine fécale des patients atteints de la maladie de Crohn (CD).

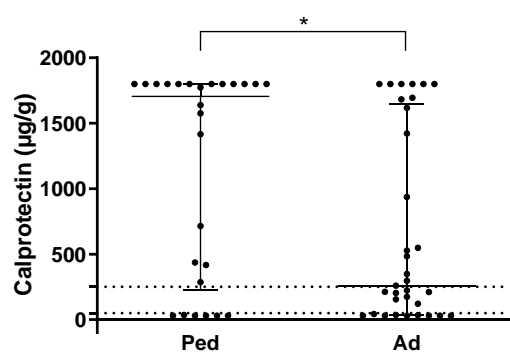


Fig. 24. Calprotectine fécale des patients atteints de la maladie de Crohn selon le groupe d'âge. (Ped, pédiatrique ; Ad, adulte)

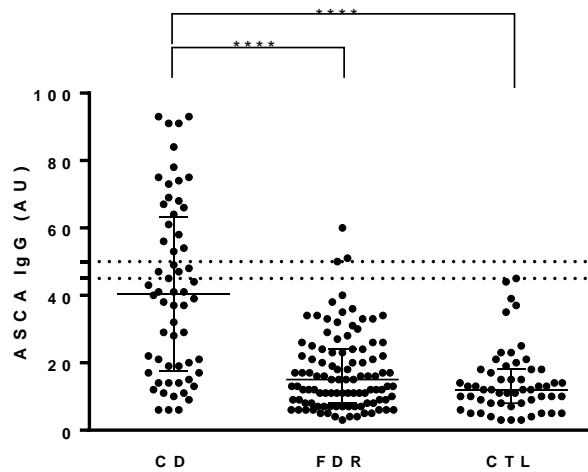


Fig. 25. ASCA IgG selon le groupe d'inclusion.
 (CD : patients atteints de la maladie de Crohn ; FDR : apparentés sains du premier degré ;
 CTL : témoins sains). (**** $p = 0,0001$)

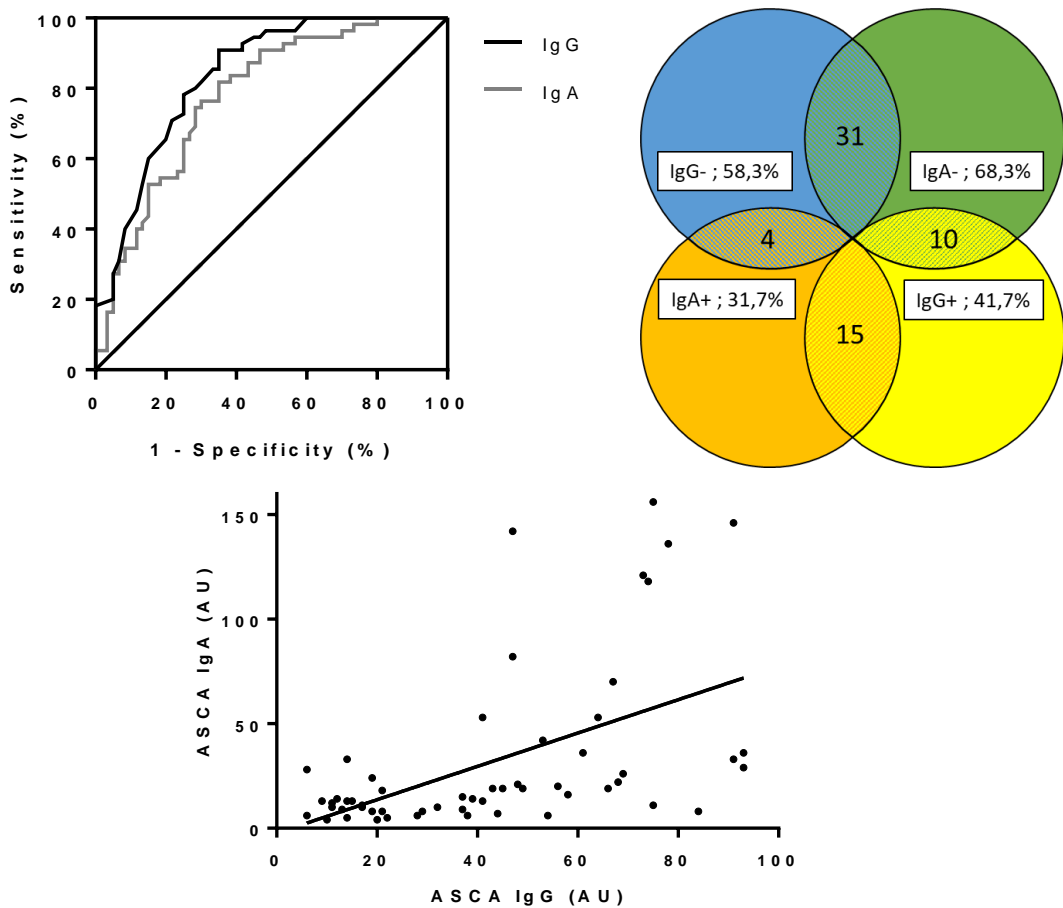


Fig. 26. Courbe ROC des ASCA IgG et IgA (Graphe du haut à gauche). Aire sous la courbe des IgG = 0,84 et des IgA = 0,78. Diagramme de répartition des valeurs positives et/ou négatives d'ASCA IgG et IgA (Graphe du haut à droite). Corrélation entre les deux isotypes (Graphe du bas). Coefficient de corrélation : 0,53 ($p = 0,0001$).

Signatures du microbiote fécal de l'individu sain présentant un risque élevé d'apparition de la maladie de Crohn

Lors de l'analyse du microbiote fécal, richesses et α -diversités étaient significativement plus basses chez le patient atteint de la MC que chez leurs apparentés sains ou les témoins sains. Ces mêmes différences apparaissaient lors de l'analyse en sous-groupes, adultes *versus* enfants (**Figure 27**). Les analyses de β -diversité, montraient également des profils différents entre les patients atteints de MC et les sujets sains, également lors de l'analyse en sous-groupe (**Figure 28**). Le microbiote fécal était caractérisé, à l'échelle du genre chez l'adulte atteint de MC, par une abondance plus faible de bactéries productrices d'acides gras à chaîne courte (*Faecalibacterium*, *Oscillibacter*, *Kineothrix*, *Odoribacter*, *Clostridium_XIVa*) et un niveau plus élevé d'*Enterocloster*, *Intestinibacter* et *Bacteroides* par rapport aux sujets sains. Quatre genres microbiens ont été identifiés spécifiquement associés au microbiote des apparentés sains adulte, notamment *Anaerobutyricum*, *Neglecta*, *Clostridium_IV* et *Coprococcus*, par rapport aux groupes MC et témoins sains. La population pédiatrique atteinte de MC présentait une diminution de l'abondance de *Lawsonibacter* et de *Coprobacter* et une augmentation du niveau de *Flavonifactor* et d'*Enterocloster*. Chez l'enfant, les apparentés sains avaient une abondance plus faible de *Clostridium_XIVa* par rapport aux patients atteints de MC et aux témoins et une abondance plus élevée d'*Alistipes*, *Paludicola*, *Coprococcus* et *Clostridium_IV* que les patients atteints de MC. *Odoribacter* et *Parasutterella* étaient diminués chez les enfants atteints de MC tandis que *Blautia* était augmenté par rapport aux témoins sains. Enfin, aucune association entre les niveaux d'ASCA ou calprotectine et la composition du microbiote bactérien fécal n'a été mise en évidence chez l'adulte, alors qu'une association entre la composition bactérienne et le taux de calprotectine était retrouvée chez l'enfant atteint de MC ($r = 0,54$; $p = 0,025$), en analyse en coordonnées principales.

Une prévalence significativement plus élevée des AIEC était observée dans la population adulte (37% des cas) par rapport à la population pédiatrique (20,7%), en majorité de phylogroupe B2, indépendamment des groupes d'inclusion ($p = 0,03$). Les souches d'*E. coli* isolées de patients atteints de MC et des apparentés sains présentaient une capacité d'invasion des cellules épithéliales intestinales plus élevée que les souches d'*E. coli* isolées des témoins sains.

Ce travail a fait l'objet de deux présentations affichées aux congrès de l'United European Gastroenterology Week de Barcelone du 19 au 23 Octobre 2019 et des Journées

Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive de Paris du 26 au 29 mars 2020.

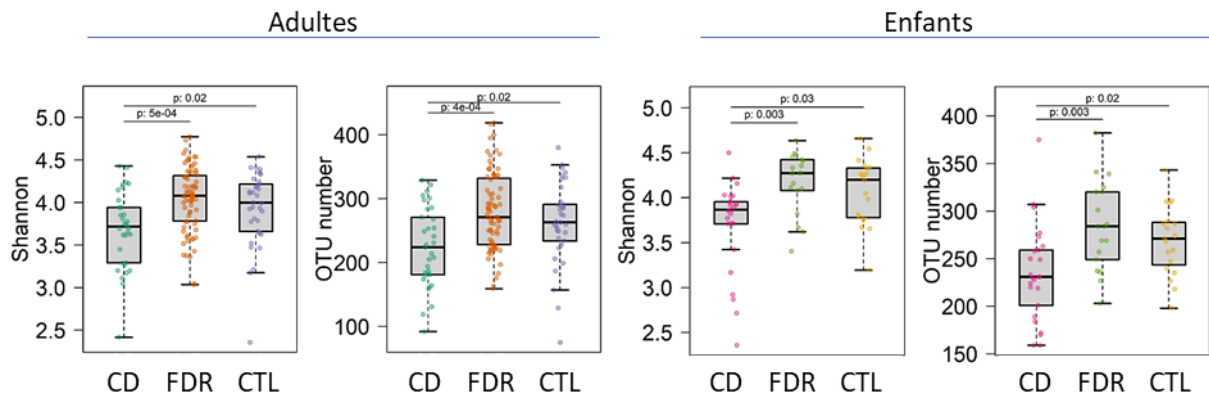


Fig. 27. Indice de diversité Shannon et richesse (nombre d'OTUs) par sous-groupes adultes (à gauche) et enfants (à droite) chez les patients atteints de la maladie de Crohn (33 et 25 CD, respectivement), leurs apparentés sains (75 et 18 FDR, respectivement) et les témoins appariés (37 et 19 CTL, respectivement).

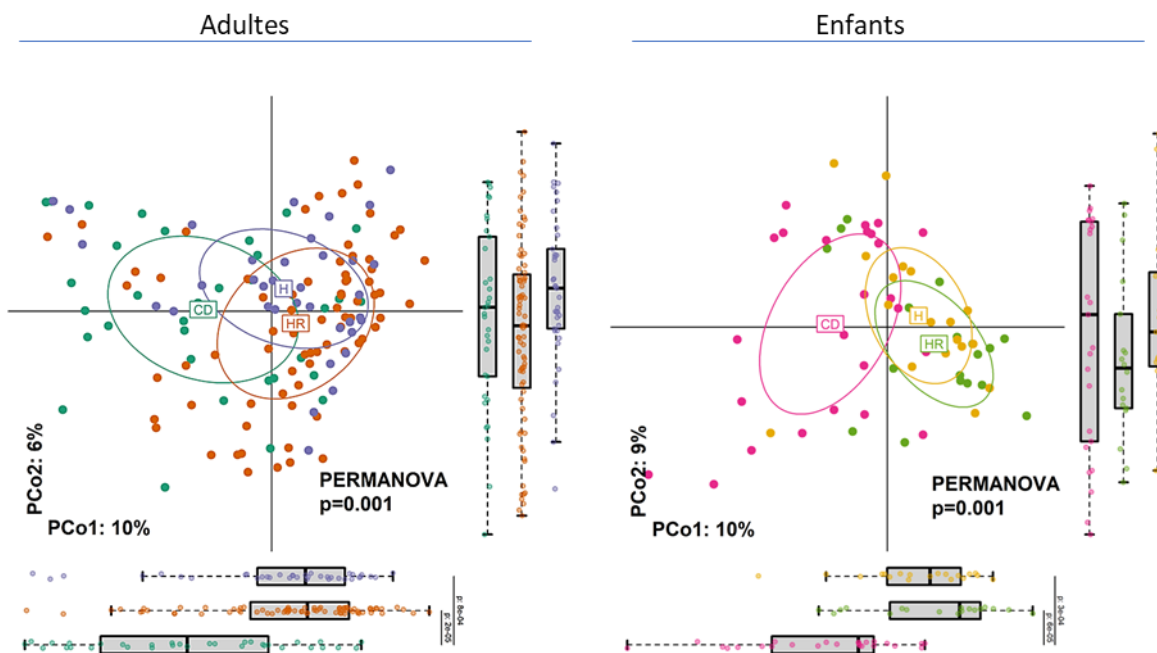


Fig. 28. Beta-diversité par analyse des coordonnées principales basée sur la distance de Bray-Curtis des différents groupes de l'étude MAGIC, patients atteints de la maladie de Crohn (CD), leurs apparentés sains (HR) et témoins appariés (H) chez l'adulte (à gauche) et l'enfant (à droite).

Le mycobiote fécal des patients atteints de la maladie de Crohn n'est pas modifié en début de maladie

Après avoir exclu les échantillons pour lesquels moins de 1000 reads avaient été obtenus lors du séquençage, les échantillons analysables étaient au total de 139, 42 patients atteints de la MC, 70 apparentés sains et 35 témoins. Les médianes pour chacun des groupes étaient de 6422 [Q1 : 3655 ; Q3 : 18450], 6348 [Q1 : 2299 ; Q3 : 14226] et 6425 [Q1 : 3051 ; Q3 : 20904]

reads, respectivement (**Figure 29**). La médiane du nombre d'OTUs selon les groupes étaient de 24 [Q1 : 13 ; Q3 : 49], 23 [Q1 : 13 ; Q3 : 40,25] et 22 [Q1 : 17 ; Q3 : 45] (**Figure 30**). Ainsi concernant la richesse du mycobiote fécale fongique, aucune différence significative n'a été retrouvée.

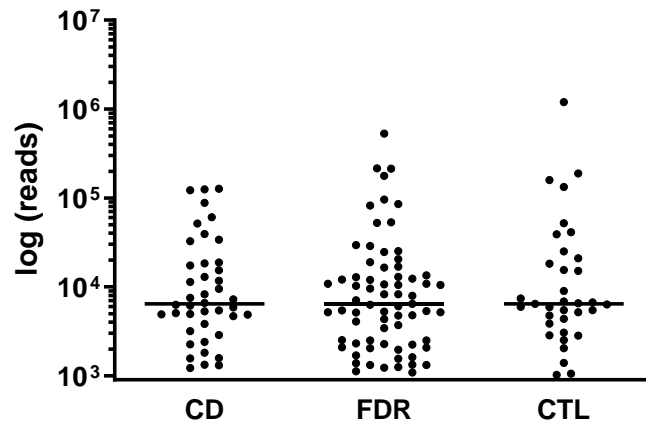


Fig. 29. Répartition des reads selon les groupes d'inclusion, patients atteints de la maladie de Crohn (42 CD), leurs apparentés sains (70 FDR) et les témoins (35 CTL). (Echelle logarithmique, médianes)

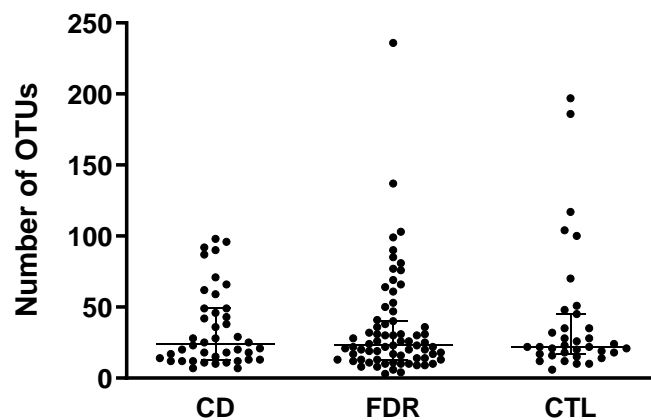


Fig. 30. Richesse (nombre d'OTUs) selon les groupes d'inclusion, patients atteints de la maladie de Crohn (42 CD), leurs apparentés sains (70 FDR) et les témoins (35 CTL). (Médiane [Q1 ; Q3])

L'analyse des profils fongiques selon les différents groupes, à l'échelle du phylum, n'a montré aucune différence significative. Le phylum des Ascomycètes était largement majoritaire sur les Basidiomycètes pour l'ensemble des groupes (**Figure 31**).

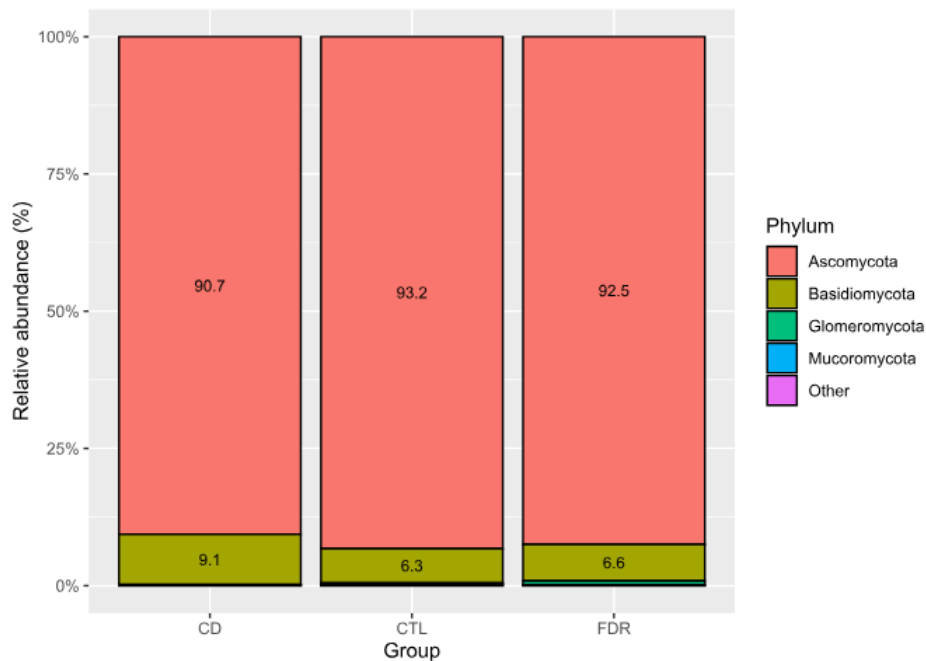


Fig. 31. Répartition des phylums fongiques les plus fréquents (abondance relative) chez les patients atteints de la maladie de Crohn (42 CD), leurs apparentés sains (70 FDR) et les témoins appariés (35 CTL).

Parmi les genres fongiques prépondérants, étaient présents les genres *Daldinia*, *Dipodascus*, f__Dipodascaceae.g__unidentified, f__Sclerotiniaceae.g__unidentified, p__Ascomycota.g__unidentified, *Candida*, *Tomentella*, *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Coprinus*, *Puccinia*, *Geotrichum*, *Clavispora*, *Wickerhamomyces* et *Kazachstania* (**Figure 32**). Aucune différence significative d'abondance relative des différents genres n'a été mise en évidence entre les groupes. A l'échelle de l'espèce, les résultats étaient similaires à ceux du genre, avec les espèces *C. albicans* et *S. cerevisiae* présents parmi les genres prédominants (**Figure 33**).

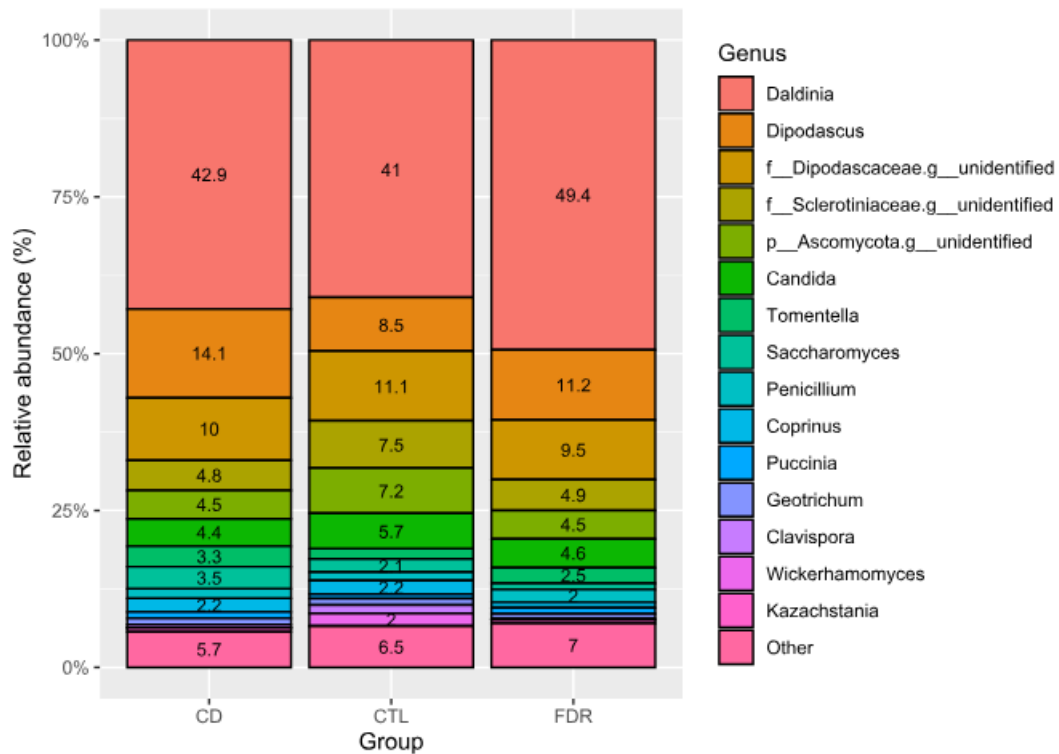


Fig. 32. Répartition des genres fongiques (abondance relative) chez les patients atteints de la maladie de Crohn (42 CD), leurs apparentés sains (70 FDR) et les témoins appariés (35 CTL).

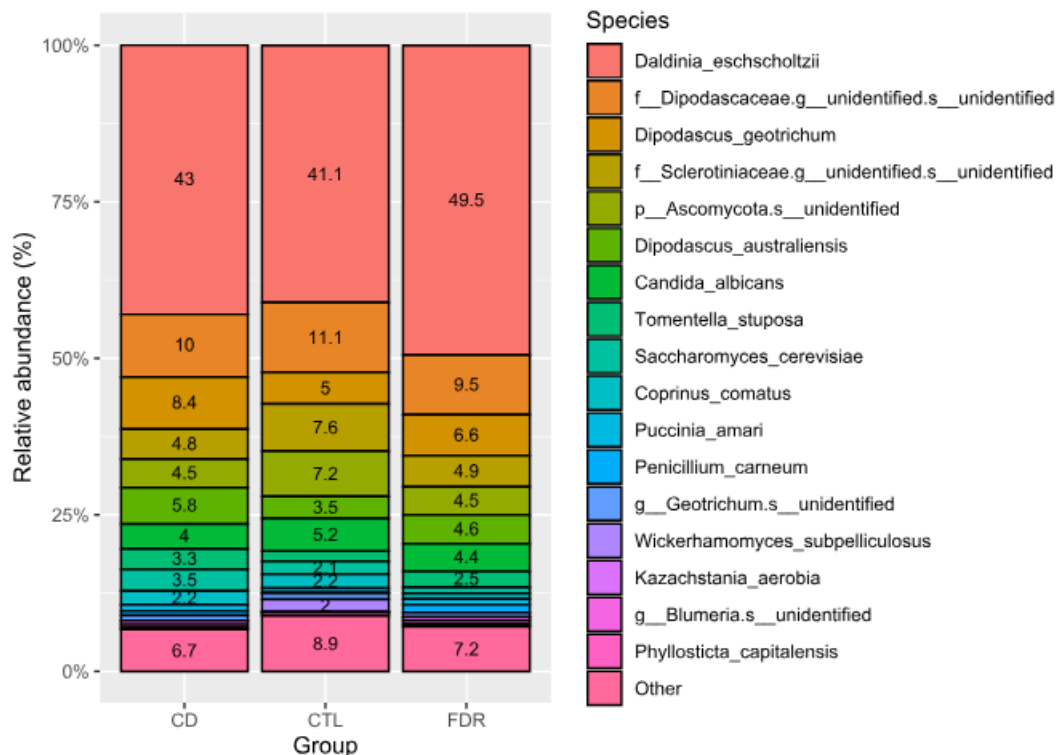


Fig. 33. Répartition des espèces fongiques (abondance relative) chez les patients atteints de la maladie de Crohn (42 CD), leurs apparentés sains (70 FDR) et les témoins appariés (35 CTL).

L'alpha-diversité peut être exprimée par l'indice de Chao 1, de Shannon ou de Simpson. L'indice de Chao 1 est une estimation de la richesse taxonomique prenant en compte les OTUs

et les taxons non observés. L'indice de Shannon exprime une homogénéité de répartition ou non des entités fongiques observés, il tend vers 0 quand le nombre d'espèces est faible et qu'une ou quelques espèces dominant, et il est d'autant plus grand que le nombre d'espèces est élevé et l'abondance est répartie équitablement. Quant à l'indice de Simpson inversé, il permet d'exprimer s'il existe une dominance d'une entité fongique (indice tend vers 0) ou une codominance avec les autres entités (tend vers 1). La beta-diversité peut être analysée en coordonnée principale (PCoA) ou selon une variante, le cadrage non métrique (NMDS). Dans l'étude MAGIC, l'indice Chao 1 est relativement faible pour chacun des groupes, sans différence significative entre les groupes (**Figure 34**). L'indice de Shannon est également similaire entre les différents groupes et en faveur d'une faible diversité des échantillons en général (**Figure 35**). Quant à l'indice de Simpson inversé, il tend plutôt à exprimer une codominance des entités fongiques, sans différence significative inter-groupe (**Figure 36**). De la même façon, les profils observés en beta-diversité entre les groupes sont similaires après 999 permutations (**Figure 37**).

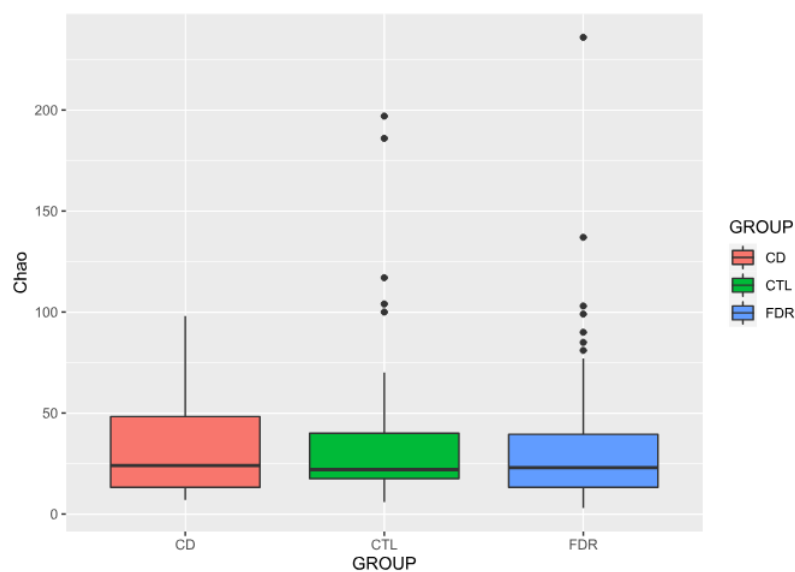


Fig. 34. *Indice de Chao1 chez les patients atteints de la maladie de Crohn (42 CD), leurs apparentés sains (70 FDR) et les témoins appariés (35 CTL).*

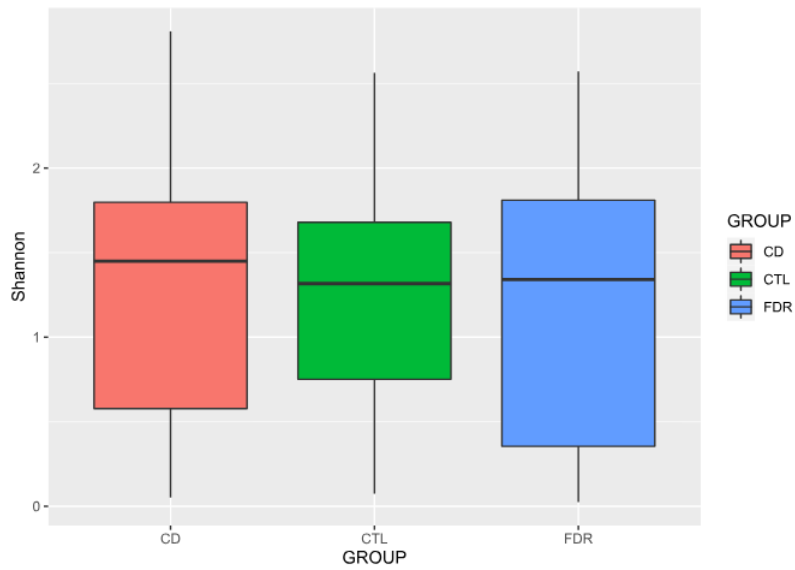


Fig. 35. Indice de Shannon chez les patients atteints de la maladie de Crohn (42 CD), leurs apparentés sains (70 FDR) et les témoins appariés (35 CTL).

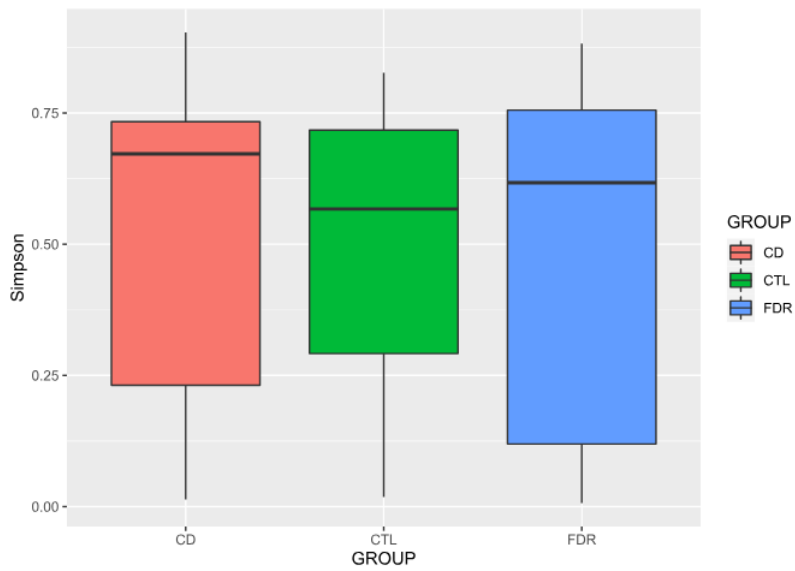


Fig. 36. Indice de Simpson inversé chez les patients atteints de la maladie de Crohn (42 CD), leurs apparentés sains (70 FDR) et les témoins appariés (35 CTL).

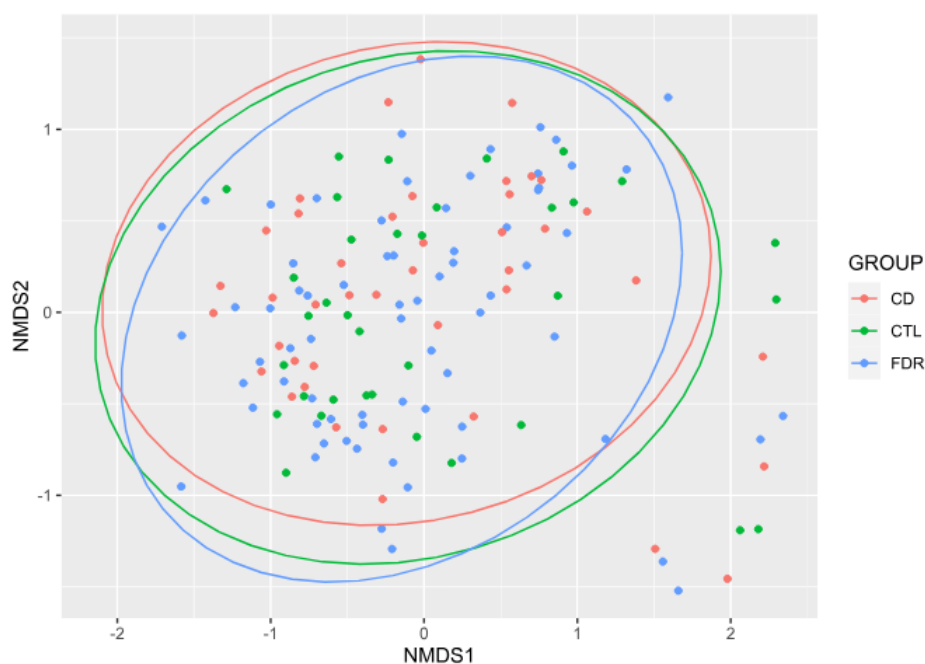


Fig. 37. Beta-diversité (cadrage non métrique, NMDS) des différents groupes de l'étude MAGIC, patients atteints de la maladie de Crohn (42 CD), leurs apparentés sains (70 FDR) et témoins appariés (35 CTL).

Quelques particularités ayant été mises en évidence suite à l'analyse du microbiote bactérien en fonction de l'âge, nous avons analysé la composition du mycobiote fécal selon l'âge. Les différences d'abondance relative entre les groupes sont indiquées dans le **Tableau 6**. Les différences entre les enfants et les adultes constatées dans le groupe atteint de la MC étaient probablement liées à un effet âge (**Figure 38**). Les indices d' α -diversité influencés par l'âge concernait les indices de Shannon et de Simpson seuls (**Figures 39 et 40**, respectivement). De la même façon, la β -diversité était influencée par l'âge sans profil particulier lié au groupe d'inclusion.

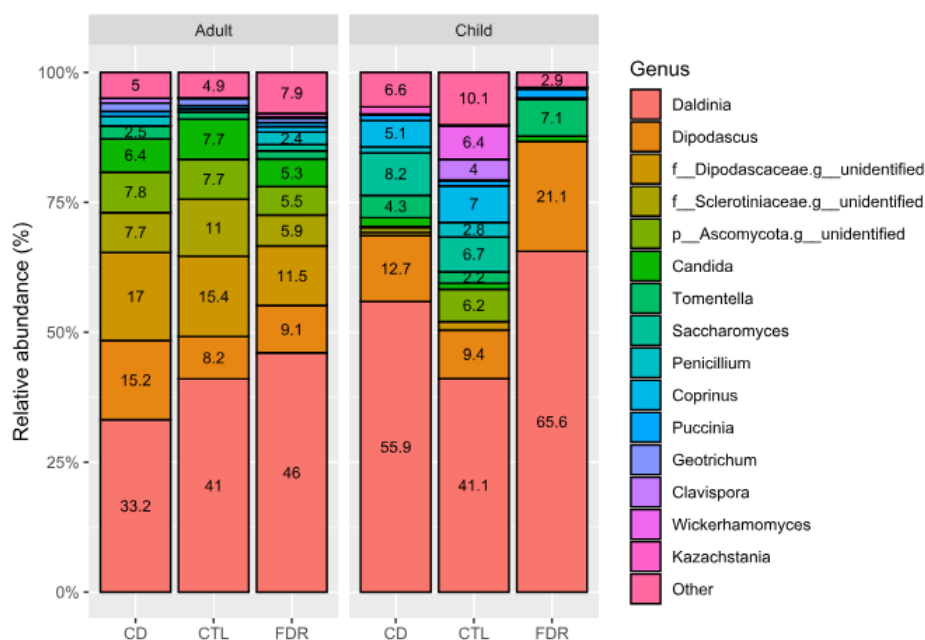


Fig. 38. Répartition des genres fongiques (abondance relative) chez les patients atteints de la maladie de Crohn (42 CD), leurs apparentés sains (70 FDR) et les témoins appariés (35 CTL), selon la catégorie d'âge.

Tableau 6. Différences significatives à l'échelle du genre après analyse en sous-groupes selon l'âge et le groupe d'inclusion.

	Global			Enfant				MC		
	Adulte	Enfant	<i>p</i>	MC	FDR	CTL	<i>p</i>	Adulte	Enfant	<i>p</i>
<i>Dipodascus</i>								↑	↓	0.007
f_Dipodascaceae;g_unidentified	↑	↓	5.4e-06	↓		↑	0.02	↑	↓	5.0e-05
f_Sclerotiniaceae;g_unidentified	↑	↓	9.2e-05					↑	↓	2.8e-05
p_Ascomycota;g_unidentified	↑	↓	0.01					↑	↓	2.9e-05
<i>Saccharomyces</i>	↑	↓	0.007					↓	↑	0.03
<i>Coprinus</i>	↑	↓	0.02					↓	↑	0.02
<i>Geotrichum</i>	↑	↓	9.3e-05					↑	↓	5.4e-05
<i>Kazachstania</i>								↓	↑	0.01

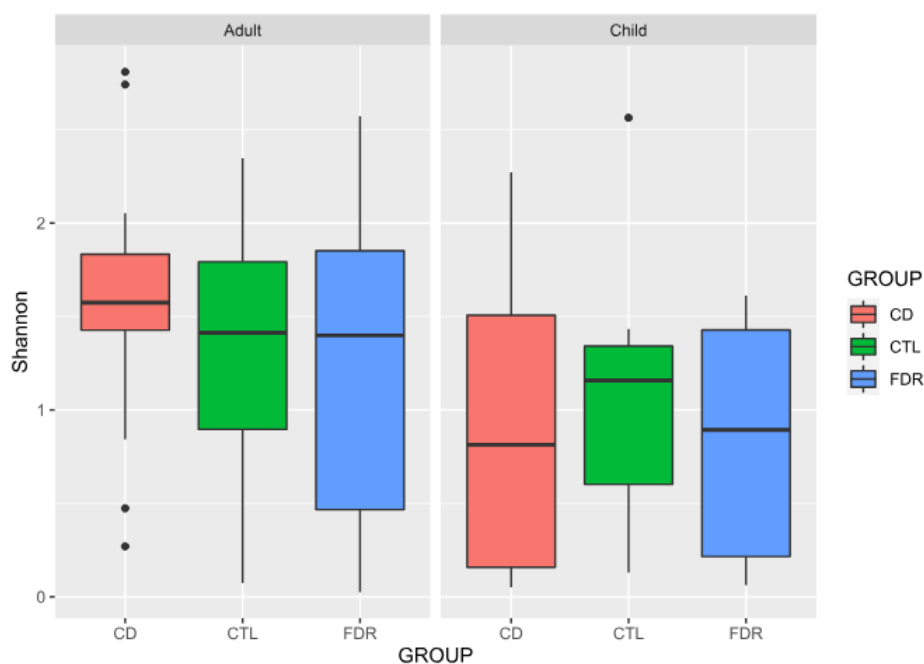


Fig. 39. Indice de Shannon chez les patients atteints de la maladie de Crohn (42 CD), leurs apparentés sains (70 FDR) et les témoins appariés (35 CTL), selon la catégorie d'âge ($p = 0,0008$ adultes vs. enfants).

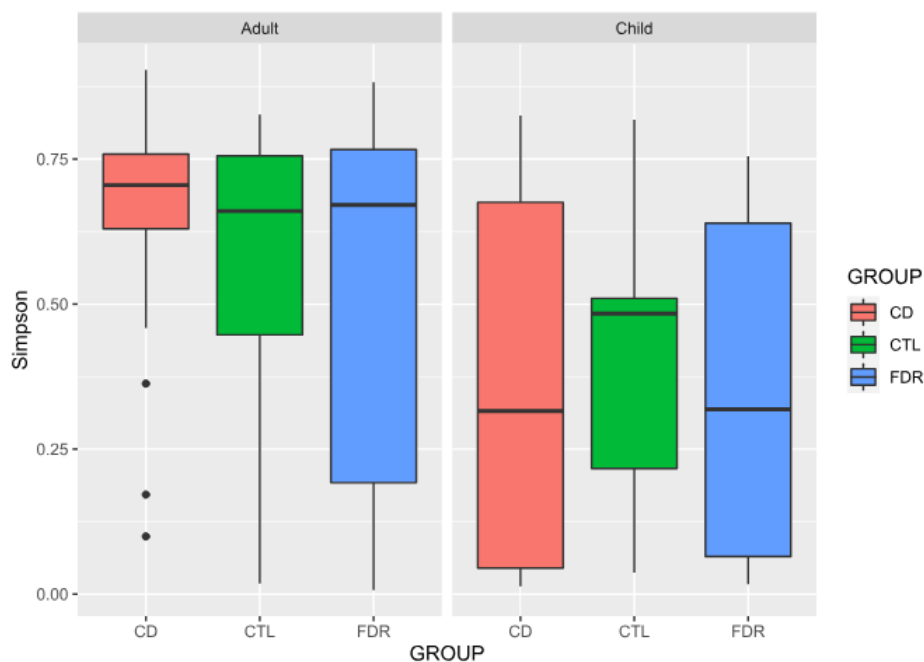


Fig. 40. Indice de Simpson chez les patients atteints de la maladie de Crohn (42 CD), leurs apparentés sains (70 FDR) et les témoins appariés (35 CTL), selon la catégorie d'âge ($p = 0,0004$ adultes vs. enfants).

Aucune différence significative n'a été retrouvée en matière d'alpha- ou beta-diversités chez l'enfant par rapport aux groupes d'apparentés ou de témoins sains ou par rapport aux adultes au sein de la population atteinte de la MC. Il n'y avait aucune association avec le phénotype ou la localisation de la maladie à l'inclusion. Aucune association avec les taux de calprotectine ou la présence d'AIEC n'a été mise en évidence.

Il est intéressant d'observer les profils obtenus en culture. Le rendement de la culture était faible avec seulement 10 à 16% d'échantillons positifs selon les groupes sur 190 échantillons testés au total. Le faible rendement de la culture provient probablement de la congélation au préalable des échantillons. La diversité semblait plus importante pour le groupe des apparentés sains, alors que les patients atteints de MC ne présentaient que du *C. albicans*. Les résultats positifs des cultures ne reflétaient pas l'abondance majoritaire des échantillons analysés au cours de l'étude métagénomique (**Figure 41**).

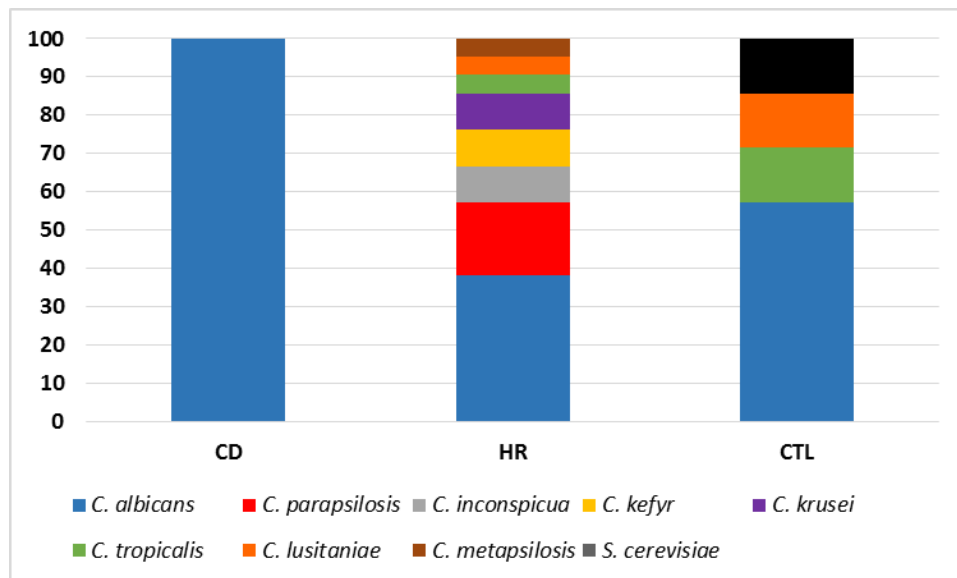


Fig. 41. Composition du mycobiote fécal obtenu en culture (Pourcentage des cultures positives, 10 à 16%). Incubation sur milieux chromogéniques à 37°C et sur gélose Sabouraud à 24°C pendant une semaine. Identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Biotyper, Bruker).

La présence des ASCA n'est pas associée à un profil fongique spécifique au début de l'évolution de la maladie et n'est pas corrélée avec la détection de S. cerevisiae

L'objectif de cette analyse était de rechercher une éventuelle association entre les colonisations des sujets de l'étude MAGIC par *C. albicans*, *S. cerevisiae* ou AIEC et les taux d'ASCA sériques. Aucune corrélation n'a été observée entre les taux d'ASCA IgG ou d'IgA et l'intensité de la colonisation par *C. albicans* ou *S. cerevisiae*. Pour l'ensemble des individus, quel que soit le groupe d'inclusion, l'absence totale de *C. albicans*, selon les résultats du séquençage, était rare dans les selles des différents sujets inclus, tout comme la présence de *S. cerevisiae*. La présence d'ASCA n'était pas associée à la présence dans les selles de *C. albicans*, de *S. cerevisiae* ou d'AIEC (**Figure 42**), mais également quel que soit le groupe d'inclusion (**Figure 43**).

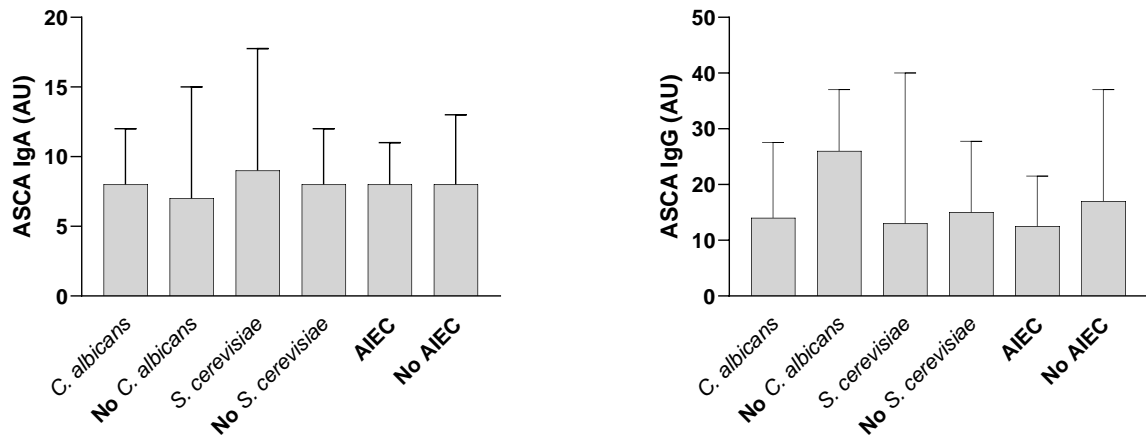


Fig. 42. ASCA IgA (à gauche) / IgG (à droite) selon la présence ou non de *C. albicans*, de *S. cerevisiae* ou d'AIEC dans les selles des sujets inclus, indépendamment du groupe d'inclusion.

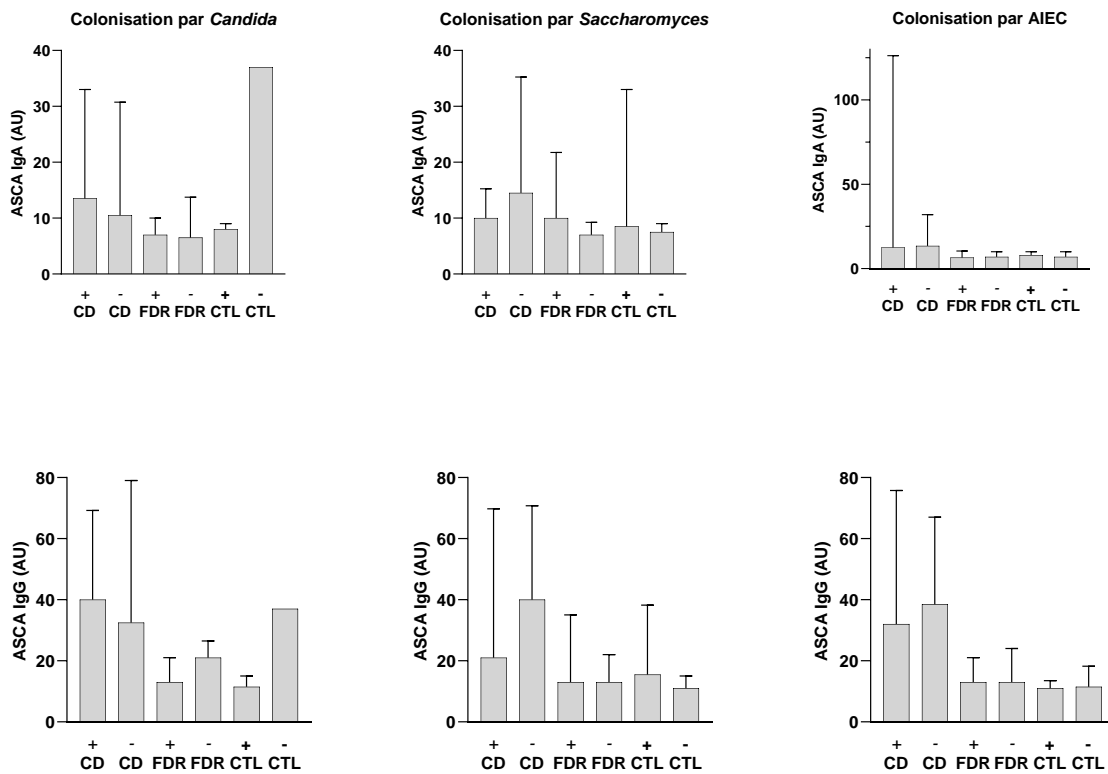


Fig. 43. ASCA IgA (en haut) / IgG (en bas) selon la présence de *C. albicans* (à gauche), de *S. cerevisiae* (au milieu) ou d'AIEC (à droite) dans les selles des sujets inclus selon le groupe d'inclusion. (CD : patients atteints de la maladie de Crohn ; FDR : apparentés sains ; CTL : témoins sains)

Ce travail a fait l'objet de deux présentations affichées, l'une à la 18^{ème} journée André Verbert à Lille en septembre 2018 et la seconde à l'United European Gastroenterology Week, Virtual, du 11 au 13 octobre 2020.

C. albicans et S. cerevisiae dans la maladie de Crohn, recueil des études de métagénomique fongique

Le **Tableau 7** fait état des études du métagénome fongique digestif dans la MC impliquant les genres *Candida* et *Saccharomyces*, dans les populations pédiatriques (n = 8) et adultes (n = 14). Le nombre de sujets inclus y est généralement relativement faible (allant de 15 à 105 patients atteints de MC), avec une grande diversité des profils (MICI sans distinction, MC et RCH, maladie active et/ou rémission). Les populations ciblées couvrent les populations nord-américaines, asiatiques, européenne et du Moyen-Orient. Le type de prélèvement analysé varie également d'une étude à l'autre (selles, biopsies, biopsies paraffinées, lavages de muqueuses), certaines comparant les résultats des selles avec ceux des biopsies. Les méthodes d'extraction (pré-lyse mécanique, kits), de séquençage (séquence ciblée, plateforme) et d'analyse (pour exemple, la base de comparaison de séquences utilisée) sont également très variables d'une étude à l'autre. L'ensemble mène à des résultats particulièrement difficiles à comparer et parfois contradictoires, notamment en matière de genres et d'espèces retrouvées, ou d'alpha- et beta-diversités. Il ressort tout de même que le genre *Candida*, plus particulièrement les espèces *C. albicans* et *C. tropicalis* présentent une abondance relative plus élevée en présence d'inflammation *versus* absence d'inflammation, de maladie active *versus* maladie non active, ou *versus* sujets sains. La prépondérance de *C. albicans* pourrait même être associée à un profil de patient non répondeur aux anticorps monoclonaux, réactivant la possibilité d'un traitement personnalisé, selon le profil métagénomique sous-jacent. L'espèce *C. tropicalis* est incriminée dans trois études, dont une pédiatrique, comme étant associée à la MC ou à la MC active. A l'opposé, il ressort de quelques études également, que *Saccharomyces* serait relativement moins abondant en présence d'inflammation, en cas de maladie active, chez les patients atteints de la MC, les 2 genres *Candida* et *Saccharomyces* semblant s'exclure, surtout pour les populations adultes. Cependant, *Saccharomyces* est parfois associée positivement à la MC, alors que *Candida* ne l'est pas. Il arrive parfois que certaines études (trois, dont deux chez l'enfant) ne montrent aucune différence entre les patients atteints de MC et les autres sujets, par rapport aux genres *Candida* et *Saccharomyces*. Les analyses de diversités offrent des résultats très variables et difficiles à interpréter sur l'ensemble des études, même si l'alpha-diversité semble diminuée en cas de MC.

Tableau 7. *Candida* et *Saccharomyces* dans les études du métagénome fongique digestif des patients atteints de maladie de Crohn. (Populations pédiatriques et adultes)

Authors Year Country	Subjects	Material and DNA extraction	Sequencing method and reference database	<i>Candida/Saccharomyces</i>	Main results
Adults					
Ott <i>et al.</i> (Ott <i>et al.</i> , 2008) 2008 Germany	31 active CD 26 active UC CTL: 15 inflam/32 non inflam	Biopsies of colon Stool Bead beating, FastDNA SPIN Kit for Soil	Electrophoresis band analysis 18S (nested PCR protocol) NCBI database		↑ Fungal richness/diversity in patients with CD vs. CTL group
Li <i>et al.</i> (Li <i>et al.</i> , 2014) 2014 China	19 active CD 7 HS	7CD: ileal mucosal specimens (inflamed and noninflamed) QIAamp DNA Mini Kit 12 CD and 7 HS: QIAampDNA Stool Mini Kit	Electrophoresis band analysis 18S (nested PCR protocol) NCBI database	↑ <i>C. albicans</i> and <i>C. tropicalis</i> in inflamed vs. non inflamed regions ↑ <i>C. albicans</i> in CD ↓ <i>S. cerevisiae</i> and <i>S. castellii</i> in inflamed mucosa ↓ <i>S. cerevisiae</i> in CD	Mucosal samples : The inflamed group appeared close and clustered together, but the noninflamed groups were dispersed and far from the inflamed data sets ↑ Species richness in the inflamed vs. non inflamed area; ↑ fungal diversity in the inflamed mucosa ↑ <i>Gibberella moniliformis</i> , <i>Alternaria brassicicola</i> and <i>C. neoformans</i> in the inflamed vs. noninflamed areas Fecal samples : CD and healthy groups were assigned into 2 separated clusters Richness and Shannon index ↑ in CD ↑ Relative abundance of the Basidiomycota class in the CD patients ↑ <i>Aspergillus clavatus</i> and <i>C. neoformans</i> in a subset of CD patients, whereas they were absent in healthy controls. <i>C. albicans</i> was prevalently detected in CD patients. <i>Moniliophthora perniciosa</i> , <i>Neurospora tetrasperma</i> , <i>Malassezia restricta</i> , and <i>Neotyphodium gansuense</i> were occasionally present in healthy individuals.

Liguori <i>et al.</i> (Liguori <i>et al.</i> , 2016) 2015 Italy	23 patients with CD (16 active and 7 inactive) 10 HS	Biopsies of colonic mucosa Bead beating, chemical extraction	454 ITS2, Unite	↑ <i>C. glabrata</i> ↑ <i>S. cerevisiae</i> in non- inflamed mucosa	↑ Fungal load in CD flare vs. HS alpha-div => no difference Basidio/Asco => no difference Eurotiomycetes only in CD Most represented genera were <i>Candida</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Malassezia</i> , <i>Sporobolomyces</i> , <i>Trichosporon</i> , <i>Wallemia</i> , unidentified Filobasidiaceae, and unidentified Xylariales Saccharomycetes, Exobasidiomycetes, and Sordariomycetes ↑ in CD vs. HS Cystofilobasidiaceae family, <i>Dioszegia</i> genera, and <i>Candida</i> <i>glabrata</i> species ↑ in CD <i>Leptosphaeria</i> and <i>Trichosporon</i> genera ↓ vs. HS Cystofilobasidiaceae family ↑ in CD samples in flare vs. remission <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Filobasidium uniguttulatum</i> species were associated with non-inflamed mucosa Xylariales order was associated with inflamed mucosa Ascomycota being the most abundant in both CD and HR groups No significant differences between CD and HR groups (abundances) <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. tropicalis</i> were the most commonly known fungal species in CD group <i>S. cerevisiae</i> and <i>G. geotrichum</i> were the most abundant in the HR group Negative correlation between <i>Candida</i> and <i>Saccharomyces</i> No difference was observed between samples from patients with CD and UC or between samples from patients with IBD in remission and HS (beta-div) Difference between IBD in flare and HS or patients with IBD in remission with a higher intensity in UC than in CD (beta- div) Alpha diversity of the fungal microbiota ↓ in patients with IBD (UC) Fungi/bacteria diversity ratio => This ratio ↑ in IBD samples and particularly in CD flare (ileal+++) Most dominant genera were <i>Saccharomyces</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Kluyveromyces</i> and <i>Candida</i> Abundance of Basidiomycota ↑ in IBD and particularly in flare <i>Malassezia sympodialis</i> ↓ in IBD and in flare, with <i>Saccharomyces</i> genus and particularly <i>S. cerevisiae</i> exhibited the strongest signals
Hoarau <i>et al.</i> (Hoarau <i>et al.</i> , 2016) 2016 France	9 families CD patients (CD; n = 20 / HR; n = 28) 4 unrelated healthy families with no history of CD (NCDU; n = 21)	Stool Bead beating QIAamp DNA stool minikit	Ion Torrent (PGM) ITS1, Unite	↑ <i>C. tropicalis</i> CD vs. HR	
Sokolet <i>et al.</i> (Sokol <i>et al.</i> , 2017) 2017 France	235 patients with IBD 38 HS	Stool Bead beating, chemical extraction	454 ITS2, Unite (alpha 12_11)	↑ <i>C. albicans</i> in IBD flare vs. IBD in remission (qPCR only) ↓ <i>S. cerevisiae</i> in IBD and flare (confirmed by qPCR)	

<p>Imai <i>et al.</i> (Imai <i>et al.</i>, 2019) 2019 Japan</p>	<p>20 inactive CD 18 inactive UC 20 HS</p>	<p>Stool Quick Gene DNA tissue kits</p>	<p>Illumina MiSeq ITS1, Unite</p>	<p>↑ <i>Candida</i> in CD patients vs. HS and UC patients</p>	<p>No differences in alpha-diversity indices CD different from UC/HS => beta-div No difference in Basidiomycota/Ascomycota ratio <i>Candida</i>, <i>Entyloma</i> and <i>Trichosporon</i> ↑ in CD vs. HS <i>Dipodascus</i> and <i>Entyloma</i> ↑ in UC vs. HS <i>Hanseniaspora</i>, <i>Hypsizygus</i> and <i>Wallemia</i> ↓ in CD vs. HS <i>Candida</i> and <i>Pichia</i> were the most highly detected, although there was considerable heterogeneity, even among healthy control samples While many samples were dominated by <i>Candida</i>, other groups of samples were dominated by <i>Pichia</i> or <i>Fusarium</i> CD samples are associated with a ↓ of Ascomycota and an ↑ in Basidiomycota (due to <i>Malassezia</i>) <i>Malassezia</i> ↑ (identified as 65% <i>M. restricta</i> and 34% <i>M. globosa</i>), <i>Cladosporium</i> ↑, <i>Aureobasidium</i> ↑, and <i>Fusarium</i> ↓ stand out as associated with CD ↑ of <i>Malassezia</i> and <i>Cladosporium</i> were mainly in patients with ileocolonic disease, while ↓ <i>Fusarium</i> in patients with colonic disease <i>Malassezia</i> spp. was the most strongly linked to CARD9S12N <i>Malassezia</i> spp. ↑ as the number of CARD9S12N alleles ↑ (AA). In contrast, <i>Pichia</i> was nearly absent in patients homozygous for the CARD9S12N risk allele ASCA-high (IgA/IgG) patient sera are substantially more reactive against <i>M. restricta</i> than ASCA-low sera (CD sera from biobank)</p>
<p>Limon <i>et al.</i> (Limon <i>et al.</i>, 2019) 2019 USA</p>	<p>Inactive CD (34 sigmoid / 22 cecum) HS (55 sigmoid / 55 cecum)</p>	<p>Mucosal lavage Bead-beating PowerSoil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories)</p>	<p>Illumina MiSeq ITS1 custom fungal ITS database (version 1.6) (Tang <i>et al.</i>, 2015), using BLAST v2.2.2</p>		<p>Ratio of Ascomycota/Basidiomycota or Ascomycota/Mortierellomycota was not significantly different between the HS, CD-active, and CD-remission groups The <i>Aspergillus</i>, unclassified_ <i>Sordariomycetes</i>, and <i>Penicillium</i> genera had greater representation in the HS vs. CD CD group : negative correlation between the abundance of <i>Bifidobacterium</i> and <i>Candida</i>; and a positive correlation between <i>Roseburia</i> and <i>Ruminococcus</i> as well as <i>Fusicatenibacter</i>; <i>Fusicatenibacter</i> abundance was positively correlated with that of a genus belonging to unclassified_ <i>Sordariomycetes</i> HS group : <i>Romboutsia</i> showed a positive correlation with <i>Gemmiger</i>, but a negative correlation with <i>Penicillium</i>; <i>Ruminococcus</i> showed a positive correlation with unclassified_ <i>Sordariomycetes</i>; <i>Candida</i> showed a positive correlation with <i>Ruminococcus</i> and <i>Aspergillus</i> alpha-div : Chao1 and ACE index ↓ in active CD</p>
<p>Qiu <i>et al.</i> (Qiu <i>et al.</i>, 2020) 2020 China</p>	<p>25 CD (19 active and 6 inactive) 20 HS</p>	<p>Stool FastDNA® SPIN Kit for Feces (MP Biomedicals)</p>	<p>Illumina MiSeq ITS1 Unite (v. 8.0)</p>	<p>↑ <i>Candida</i> in CD active vs. HS <i>Candida</i> and <i>Saccharomyces</i> among 18 major genera identified</p>	<p>Ratio of Ascomycota/Basidiomycota or Ascomycota/Mortierellomycota was not significantly different between the HS, CD-active, and CD-remission groups The <i>Aspergillus</i>, unclassified_ <i>Sordariomycetes</i>, and <i>Penicillium</i> genera had greater representation in the HS vs. CD CD group : negative correlation between the abundance of <i>Bifidobacterium</i> and <i>Candida</i>; and a positive correlation between <i>Roseburia</i> and <i>Ruminococcus</i> as well as <i>Fusicatenibacter</i>; <i>Fusicatenibacter</i> abundance was positively correlated with that of a genus belonging to unclassified_ <i>Sordariomycetes</i> HS group : <i>Romboutsia</i> showed a positive correlation with <i>Gemmiger</i>, but a negative correlation with <i>Penicillium</i>; <i>Ruminococcus</i> showed a positive correlation with unclassified_ <i>Sordariomycetes</i>; <i>Candida</i> showed a positive correlation with <i>Ruminococcus</i> and <i>Aspergillus</i> alpha-div : Chao1 and ACE index ↓ in active CD</p>

Nelson <i>et al.</i> (Nelson <i>et al.</i> , 2021) 2021 UK	34 inactive CD 47 non-CD	Stool DNeasy PowerLyzer PowerSoil kit (Qiagen)	Illumina MiSeq ITS1, Unite v8	<i>Candida</i> most associated with CD (beta-diversity)	Observed OTU ↑ in CD (Shannon => no difference) Difference between CD and non-CD => beta-div <i>Candida</i> was most associated with CD and <i>Cryptococcus</i> was most associated with non-CD ↓ Basidiomycota/Ascomycota ratio in CD
Ventin-Holmberg <i>et al.</i> (Ventin-Holmberg <i>et al.</i> , 2021) 2021 Finland	25 CD 47 UC	Stool Bead beating QIAampDNA Stool Mini Kit (optimized)	Illumina MiSeq ITS1, Blast	↑ <i>Candida</i> (<i>C. albicans</i>) in non-responders vs. responders before infliximab	Ascomycota > Basidiomycota (significant in CD vs. UC), no difference concerning ratio Asco/Basidio <i>Candida</i> was the most abundant, followed by <i>Clavispora</i> and uncultured <i>Galactomyces</i> <i>Candida</i> (<i>C. albicans</i>) ↑ in non-responders vs. responders before infliximab
Schierova <i>et al.</i> (Schierova <i>et al.</i> , 2021) 2021 Czech Republic	34 CD 18 UC tracked over 38 weeks of anti-TNFα 37 HC	Stool ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit	Illumina Miseq ITS1, Unite v8		Composition was dominated by the genera <i>Saccharomyces</i> , <i>Penicillium</i> , and <i>Candida</i> Ascomycota/Basidiomycota ratio was skewed towards Ascomycota in all three groups Composition of IBD was not different from that of HC No change during therapy course
Frau <i>et al.</i> (Frau <i>et al.</i> , 2021) 2021 UK, Netherlands	UK => CD (12 inactive, 11 active) UC (11 inactive, 9 active) 20 HS Dutch => 26 CD (18 inactive, 8 active) 15 HS	Stool and Biopsies Bead beating modified version of the PSP stool DNA kit (Stratec) and the QIAamp Fast DNA Stool mini kit (Qiagen) QIAamp cador Pathogen Mini Kit	Illumina HiSeq 18S, SILVA_123	↓ <i>Candida</i> in CD (sigmoid colon and stool) vs. HS Negative correlation between <i>Candida</i> and <i>B. thetaiotamicron</i> OTUs assigned to <i>Pichia</i> , <i>Candida</i> and <i>Aspergillus</i> (higher in HS), negatively correlated with both <i>Saccharomyces</i> and BCFA (higher in active CD) Dutch cohort: ↑ <i>Candida</i> in CD vs. HS Immunosuppressants => ↑ <i>Candida</i> Positive correlation between BCFA and <i>Saccharomyces</i> <i>Saccharomyces</i> and BCFA positively correlated to many bacterial OTUs assigned to <i>Hafnia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Lachnoclostridium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Proteus</i> Dutch cohort: ↑ <i>Saccharomyces</i> in HS vs. CD	Alpha-div no difference, beta-div stool => no difference beta-div biopsies : difference CD vs. UC or HS, difference CD active vs. inactive, difference between active IBD vs. HS <i>Saccharomyces</i> => present in every stool sample and was the most abundant genus in biopsies Other common genera were <i>Candida</i> and <i>Malassezia</i> <i>Malassezia</i> increased in the transverse colon and stool of CD patients but was reduced in the ileum in the same patients Dutch cohort : ↓ α-div (richness, Fisher) in CD, difference beta-div CD vs. HS (CD Immunosuppressants vs. non Immunosuppressants, CD biologics medication vs. absence) number of OTU low, <i>Saccharomyces</i> abundant, followed by <i>Candida</i> ↑ <i>Saccharomyces</i> in HS and <i>Candida</i> in CD patients ↑ <i>Malassezia</i> in CD (low abundance) Immunosuppressants => ↑ <i>Candida</i> and <i>Malassezia</i>

Cimická <i>et al.</i> (Cimicka <i>et al.</i> , 2022) 2022 Czech Republic	CTL, CD, UC	FFPE Biopsies	?	?	Ascomycota proportion ↑ from CTL, through CD to UC Fungal genera <i>Malassezia</i> , <i>Cladosporium</i> and <i>Toninia</i> common components of the intestinal mycobiome? ↓ <i>Malassezia</i> in inflam tissues
Zeng <i>et al.</i> (Zeng <i>et al.</i> , 2022) 2022 China	45 CD (34 active, 11 inactive) 17 HS	Stool HiPure Stool DNA Kit	Illumina MiSeq ITS2, RDP 2.2	↑ <i>Saccharomyces</i> in CD vs. HS ↑ <i>C. tropicalis</i> in CD vs. HS ↓ <i>Candida (albicans)</i> in CD vs. HS ↑ <i>Candida</i> with non B1 CD	Phyla Rozellomycota and Mortierellomycota not present in CD vs. HS ↑ Ascomycota in CD Fewer interactions among the fungal communities in CD vs. HS <i>Exophiala dermatitidis</i> positively associated with clinical active stage and platelet count <i>Clonostachys</i> , <i>Humicola</i> , and <i>Lophiostoma</i> enriched in CD with perianal lesions
Children					
Chehoud <i>et al.</i> (Chehoud <i>et al.</i> , 2015) 2015 USA	3 to 21 years of age CD, UC, or indeterminate colitis (n=32; 26 CD) vs. healthy pediatric and adult subjects studied previously (n=90)	Stool PSP Spin Stool DNA Plus Kit	454 ITS1, Unite	<i>Cyberlindnera jadinii</i> ↑ in pediatric IBD vs. total HS or pediatric HS <i>C. parapsilosis</i> ↑ in pediatric IBD	Lower fungal diversity than healthy children (Shannon) Separation between healthy and IBD pediatric subjects (beta- div) ↓ <i>Cladosporium cladosporioides</i> in IBD vs. total HS
Mukhopadhyaya <i>et al.</i> (Mukhopadhyaya <i>et al.</i> , 2015) 2015 UK	<i>de novo</i> IBD: 13 CD (4 samples) 12 UC (2 samples) 12 CTL (2 samples) Adults: 2 UC (1 sample), 2 CTL (2 samples)	Mucosal biopsies QIAamp Mini kit	454 18S, SILVA		Basidiomycota predominance in pediatric IBD patients
Lewis <i>et al.</i> (Lewis <i>et al.</i> , 2015) 2015 Canada, USA Previous study (Lee <i>et al.</i> 2015. IBD)	< 22 years old 90 active CD Longitudinal study 26 HS	Stool MoBio PowerSoil kit	Illumina HiSeq Sequence? fungal reference genomes obtained from the CAMERA project (Sun <i>et al.</i> , 2011)	<i>S. cerevisiae</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>Cyberlindnera</i> <i>jadinii</i> (also known as <i>Pichia</i> <i>jadinii</i> and <i>Candida utilis</i>), <i>C. albicans</i> , and <i>Kluyveromyces marxianus</i> (<i>C. kefyi</i>), more represented in CD subjects, particularly those in the more dysbiotic far cluster as defined by the bacterial taxonomic analysis	Abundance of the different fungi were highly correlated with each other The most predictive fungus was <i>C. lusitaniae</i> At baseline, <i>Candida</i> , <i>Clavispora</i> , <i>Cyberlindnera</i> , and <i>Kluyveromyces</i> were all enriched in CD samples vs. HS Antibiotic treated vs. not treated patients showed enrichment of all these fungi plus <i>Saccharomyces</i> After one week of diet therapy, <i>Candida</i> , <i>Clavispora</i> , and <i>Cyberlindnera</i> were all reduced in abundance Abundance of <i>Clavispora</i> , <i>Cyberlindnera</i> , and <i>Kluyveromyces</i> were significantly reduced from baseline to week 8 only in the exclusive enteral nutrition treated group At week 8, overall response to therapy after adjusting for treatment and antibiotic use was not associated with a change in fungal abundance

El Mouzan <i>et al.</i> (M. El Mouzan <i>et al.</i> , 2017) 2017 Saudi Arabia	15 CD 20 CTL (abdominal pain/polypes, no inflammation) treatment naive children	78 samples (stool and mucosal biopsies) Mobio PowerSoil kit	Illumina MiSeq ITS1 BLASTn against a curated NCBI-derived database		CD-associated taxa included <i>Psathyrellaceae</i> , <i>Cortinariaceae</i> , <i>Psathyrella</i> , and <i>Gymnopilus</i> <i>Monilinia</i> was depleted
El Mouzan <i>et al.</i> (M. I. El Mouzan <i>et al.</i> , 2018) 2018 Saudi Arabia (idem El Mouzan 2017)	15 CD 20 CTL (Abdominal pain/polypes, no inflammation) treatment naive children	58 samples vs. 20 samples (stool and mucosal biopsies) Mobio PowerSoil kit	Illumina MiSeq ITS1 curated database derived from RDPH and NCBI	<i>S. cerevisiae</i> and <i>S. bayanus</i> were more abundant in stools than in mucosal samples	CD-associated taxa included <i>Psathyrellaceae</i> , <i>Cortinariaceae</i> , <i>Psathyrella</i> , and <i>Gymnopilus</i> ; <i>Monilinia</i> was significantly depleted Fungal dysbiosis score classification curve (prediction analysis) : higher AUC in stools than in mucosa Controls : <i>Volvariella dunensis</i> , <i>Lepraria humida</i> were less abundant in stool than in mucosal samples CD : 50 species were less abundant in stools of children with CD vs. CTL samples Alpha-div : ↓ in stools of children with CD vs. mucosa Beta diversity : difference in fungal community separation between mucosal and stool samples (independently of CTL or CD)
Krawczyk <i>et al.</i> (Krawczyk <i>et al.</i> , 2021) 2021 Poland	54 active CD 37 inactive CD 33 CTL	Stool Bead beating increased efficiency Genomic Mini AX Stool kit	specific qPCR <i>C. tropicalis</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>Malassezia spp.</i>	Percentage of patients positive to <i>C. tropicalis</i> ↑ in active CD (vs. CTL or inactive CD)	In positive qPCR, <i>Malassezia</i> ↓ in active CD (vs. CTL) and ↑ in inactive CD (vs. HC)
Wang <i>et al.</i> (Y. Wang <i>et al.</i> , 2021) 2021 China	29 CD (18 treated with anti-TNFα) 20 HS (16 CD vs. 9 HS for mycobiome analysis)	Stool Bead beating QIAamp DNA Stool Mini Kit	Illumina NovaSeq ITS2, RDP	Most commonly observed genera were <i>Saccharomyces</i> , <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> , and <i>Gibberella</i>	Alpha div : No difference between samples from CD patients and HS Beta-div : no difference between CD and HS Most commonly observed genera were <i>Saccharomyces</i> , <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> , and <i>Gibberella</i> CD (vs. HS) : ↑ <i>Alternaria</i> and <i>Thielavia</i> , and ↓ <i>Botryotinia</i> , <i>Coprinellus</i> , <i>Eupenicillium</i> , <i>Exophiala</i> , <i>Geosmithia</i> , <i>Hyphopichia</i> , <i>Myrmecridium</i> , <i>Phellinidium</i> , <i>Trichosporon</i> , and <i>Wicherhamomyces</i> No change in alpha-div detected after infliximab treatment ↑ <i>Galactomyces</i> after infliximab PCDAI score was negatively correlated with the relative abundances of <i>Galactomyces</i> , while positively correlated with <i>Rhodospodium</i> and <i>Kabatiella</i> Non-sustained response subjects showed ↑ <i>Chaetomium</i> and ↓ <i>Malassezia</i> after infliximab treatment

Krawczyk <i>et al.</i> (Krawczyk <i>et al.</i> , 2023) 2023 Poland	105 CD (50 newly diagnosed and active 16 active previously diagnosed and treated 39 inactive) 40 HS	Stool Bead beating increased efficiency Genomic Mini AX Stool kit	Illumina MiSeq ITS, Unite v7.2	<p>↑ <i>Candida</i> spp in CD vs. HS ↑ <i>C. albicans</i> and <i>C. tropicalis</i> in newly diagnosed vs. active treated CD ↑ <i>Debaryomyces hansenii</i> in active CD vs. non active and HS Positive correlation between <i>C. tropicalis</i> and PCDAI</p> <p><i>Saccharomyces</i> most abundant in HS</p> <p><i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> dominant in all groups (50% of all fungi)</p>	<p>↑ <i>Malassezia</i> in CD ↓ α-diversity in active, newly diagnosed CD vs. HS B-diversity different between active, newly diagnosed CD and HS</p>
--	--	--	-----------------------------------	---	--

Abbreviations: BCFA, branched chain fatty acids; CD, Crohn’s disease; CTL, controls; FFPE, formalin-fixed paraffin embedded; HC, healthy controls; HR, healthy relatives; HS, healthy subjects; IBD, inflammatory bowel disease; inflam, inflammatory; NCDU, non-CD unrelative; OTU, operational taxonomic unit; PCDAI, pediatric CD activity index; UC, ulcerative colitis.

Discussion

Dans les premiers paragraphes, les résultats majeurs obtenus dans les 3 parties exposées dans ce mémoire (travaux sur la fibrose intestinale, sur l'origine des ASCA, l'étude MAGIC) vont être présentés. Je discuterai ensuite chacune de ces parties.

D'étiologie encore inconnue, la MC est une maladie multifactorielle impliquant des facteurs génétiques, environnementaux et immunologiques. L'hypothèse la plus communément partagée fait intervenir une dérégulation du système immunitaire intestinal en lien avec un déséquilibre du microbiote intestinal dénommé « dysbiose ». L'évolution de la maladie est marquée par des poussées entrecoupées de périodes de rémission avec, parfois, des complications pouvant justifier de multiples interventions pour résection intestinale. La fibrose intestinale est une complication courante des MICI, et surtout de la MC, 50% des patients évoluant vers un phénotype fibrosant. Elle implique des mécanismes dépendants et indépendants de l'inflammation (Ma *et al.*, 2019). Il a été montré que les patients atteints de la MC avaient une colonisation digestive plus importante par *C. albicans* en culture (Standaert-Vitse *et al.*, 2009) mais également après analyse métagénomique (**Tableau 7**). Cependant les analyses de métagénomique impliquent également le genre *Candida* au sens large, notamment les espèces *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*) ou encore des genres proches et auparavant nommés *Candida*, tels que *Pichia*, *Cyberlindnera*, *Kluyveromyces*. Le genre *Candida* est volontiers associés à un processus inflammatoire (régions digestives inflammatoires, maladie en poussée) (**Tableau 7**) et très rarement mis en évidence dans le processus fibrotique, puisqu'il a été retrouvé associé aux comportements non B1 de la maladie selon la classification de Montréal dans une étude présentant des résultats discordants avec la tendance vis-à-vis de *Candida* (Zeng *et al.*, 2022). *C. albicans* a également été impliqué *in vivo* dans l'aggravation de l'inflammation (Jawhara & Poulain, 2007; Jawhara *et al.*, 2008).

A notre connaissance, aucune étude n'avait évalué l'impact des levures sur la fibrose intestinale. *S. cerevisiae* est une levure rarement identifiée en culture sur les prélèvements d'origine digestive, malgré une utilisation importante dans l'industrie alimentaire et la brasserie, mais également comme probiotique (Waitzberg *et al.*, 2024). L'analyse métagénomique serait un outil de meilleure sensibilité que la culture permettant d'approcher le microbiote intestinal différemment de la culture, cette dernière reposant sur des organismes viables. Il a été rapporté que *S. cerevisiae* faisait généralement partie des genres

majoritairement identifiés dans les selles, tout comme *Candida*. Cependant, les résultats des études publiées sur la MC sont relativement discordants entre, d'une part, une association de *S. cerevisiae* avec le caractère non inflammatoire (maladie en rémission, localisation tissulaires indemnes d'inflammation) ou l'absence de MICI et, à l'opposé, une association avec la MC (**Tableau 7**). *In vivo*, *S. cerevisiae* permet une diminution de la colonisation digestive par *C. albicans* et AIEC, ainsi qu'une amélioration de l'inflammation (Jawhara & Poulain, 2007; Sivignon *et al.*, 2015). *S. cerevisiae* avait été pointé du doigt comme responsable de l'exacerbation de la colite chimio-induite dans un modèle murin, par le biais d'une augmentation de la production d'acide urique, lié au métabolisme des purines de l'hôte (Chiaro *et al.*, 2017). De façon intéressante, récemment, un probiotique modifié de l'espèce *S. cerevisiae* a été synthétisé, sécrétant une apyrase en réponse à la détection d'ATP extracellulaire (eATP), lui-même sécrété par les bactéries intestinales commensales et les cellules immunitaires activées de l'hôte en conditions inflammatoires et exacerbant l'inflammation par l'activation d'un signal purinergique. La levure détecte l'eATP via un récepteur (couplé à la protéine G) humain P2Y2 modifié et sécrète en conséquence l'enzyme apyrase dégradant l'eATP. L'utilisation de cette levure probiotique dans un modèle murin de colite induite permettait de supprimer l'inflammation et de réduire la fibrose intestinale et la dysbiose bactérienne avec une efficacité au moins semblable à celle d'un anti-TNF α . Cette étude met en lumière un probable effet souche-dépendant et laisse envisager des perspectives thérapeutiques aux effets secondaires limités (Scott *et al.*, 2021).

Bien que certaines études aient rapporté une interaction possible entre *C. albicans* et les constituants de la matrice extracellulaire (Annaix *et al.*, 1990; Bouali *et al.*, 1986), dans notre étude sur la fibrose intestinale expérimentalement induite chez la souris, ni *S. cerevisiae*, ni *C. albicans* n'ont eu d'effet majorant la fibrose, ni même un effet préventif de la fibrose. Seule l'administration d'AIEC LF82 avait un effet aggravant, observé à la fois en microscopie, mais également sur l'expression génique des marqueurs de l'inflammation, des recrutements cellulaires de l'inflammation et des marqueurs de fibrose par rapport au DSS seul. Cependant, faute d'échantillons suffisants, ces résultats n'ont pas pu être confirmés par les mesures d'expression protéique. En effet, les premiers résultats obtenus à partir de l'extraction d'ARN sur des fragments tissulaires sélectionnés selon des critères macroscopiques étaient hétérogènes et nous avons dû extraire la totalité du côlon pour obtenir des résultats interprétables. Malgré l'absence d'effet de *C. albicans* sur la fibrose, il semble que cette levure soit capable d'initier le processus fibrotique de par la surexpression de certains marqueurs pro-inflammatoires et d' α -

SMA, marqueur des myofibroblastes, ce qui n'était pas le cas des souches industrielles de *S. cerevisiae*. Dans les conditions évaluées, le développement de modèles *in vitro* de fibrose a atteint son objectif avec les cellules épithéliales intestinales humaines, au contraire des fibroblastes. Ce qui a permis de tester les effets des souches de *C. albicans*, de LF82 et d'une des souches industrielles de *S. cerevisiae*. Ainsi, *C. albicans* et *S. cerevisiae* n'ont pas eu d'effet sur la lignée Caco-2, alors que LF82 était capable d'induire une réponse partielle de la transition vers un phénotype mésenchymateux. La corrélation entre le modèle animal et le modèle cellulaire étant incomplète et les résultats obtenus avec l'une des souches Lesaffre étant trop hétérogènes, il n'a pas été possible dans les délais impartis de tester l'ensemble des souches industrielles. Ces résultats méritent d'être confirmés sur d'autres bactéries pathogènes particulièrement associées à la MC pour développer de nouvelles stratégies de prévention contre l'initiation des processus fibrotiques au cours de l'inflammation intestinale.

Parmi les biomarqueurs de la fibrose intestinale proposés, il nous est apparu intéressant de nous focaliser sur les ASCA dont l'origine reste inconnue. Leur présence est un facteur de gravité, mais également un facteur prédictif d'évolution vers la fibrose dans la MC (Kim *et al.*, 2021; Rieder *et al.*, 2017). Cependant, les études ne permettent pas de mettre en évidence que la détermination seule des ASCA sériques puisse indiquer l'apparition de lésions fibrotiques, les ASCA n'étant pas corrélés à un phénotype fibrosant. Il n'existe donc pas de marqueur non invasif de la fibrose (Giuffrida *et al.*, 2016). Les ASCA ont été découverts en raison de leur réactivité avec les phosphopeptidomannanes de *S. cerevisiae* et un doute subsiste sur l'immunogène responsable de la production des ASCA. L'étude de Chiaro *et al.* avait suggéré une corrélation entre les taux d'ASCA et d'acide urique sériques chez les patients atteints de la MC, sans indiquer les valeurs des coefficients de corrélations. Il suggère également une augmentation de la synthèse d'acide urique au niveau digestif en cas d'administration de *S. cerevisiae* (Chiaro *et al.*, 2017). Cependant, ces constatations n'avaient pas été confirmées dans une autre étude (Sendid *et al.*, 2018). C'est la raison pour laquelle, nous avons évalué la production d'ASCA sur différents modèles animaux d'inflammation ou de fibrose chimio-induites. Dans nos conditions expérimentales, il n'a pas été mis en évidence l'implication de *S. cerevisiae* ou de *C. albicans* dans la production d'ASCA que ce soit sur des modèles d'inflammation (modèle axénique, expression de CEACAM6 humaine par les souris) ou de fibrose. La présence de ces levures ne permettrait pas d'expliquer la prévalence des ASCA dans la MC. Dans le modèle de fibrose, les AIEC n'étaient pas non plus responsables d'une surproduction d'ASCA.

Les études sur le mycobiote intestinal dans la MC sont rares et peu comparables, incluant des profils de patients d'une grande diversité. L'étude MAGIC a permis d'inclure des patients de diagnostic récent et en rémission clinique, ainsi que des apparentés sains au premier degré. Ces derniers sont considérés comme ayant un risque plus important de développer la MC par rapport à la population générale. En effet, ces individus partagent des éléments génétiques et environnementaux communs. Les ASCA sont des anticorps dont la prévalence varie avec les études, étant plutôt associés à une localisation iléale, présents précocement dans l'histoire de la maladie et stables au cours du temps (Sendid *et al.*, 2023). Dans l'étude MAGIC, 41,7% des patients atteints de la MC étaient porteurs d'ASCA, 2,9% des apparentés sains et 1,8% des témoins sains, aucune différence n'était observée selon l'âge. Concernant l'analyse bactérienne de la cohorte MAGIC, les richesses et α -diversités étaient significativement plus basses chez le patient atteint de la MC que chez leurs apparentés sains ou les témoins sains, différences qui persistaient lors de l'analyse en sous-groupe liée à l'âge. Alors que les patients avaient une abondance plus faible de bactéries productrices d'acides gras à chaîne courte, certains genres microbiens étaient plus ou moins abondants chez les apparentés sains par rapport aux témoins sains et leurs proches atteints de la MC. Chez l'adulte, la prévalence des AIEC était plus élevée que chez l'enfant et les souches d'*E. coli* isolées des patients atteints de la MC ou de leurs proches avaient une capacité d'invasion plus élevée que chez les témoins. Par contre, le mycobiote fécal était similaire entre les différents groupes, que ce soit en abondance relative (notamment pour *C. albicans* et *S. cerevisiae*), ou concernant les alpha- et beta-diversités. Aucune association n'a été retrouvée entre la présence de micromycètes et les différents paramètres évalués (calprotectine fécale, ASCA, AIEC).

En ce qui concerne l'interprétation de nos résultats obtenus sur le modèle fibrose intestinale, la souris pourrait ne pas être un modèle adapté pour évaluer l'impact des levures sur la fibrose digestive. En effet, contrairement à l'Homme, *Candida*, tout comme *Saccharomyces* ne sont pas des levures qui colonisent naturellement le tube digestif des souris. Ce modèle a donc nécessité des gavages répétés de ces levures, *Saccharomyces* demeurant de façon plus transitoire que *Candida*. La réussite de notre expérience était basée sur le score d'évaluation clinique de la souris et tissulaire du côlon macro- et microscopiquement suite à l'action du DSS. Alors qu'il a été montré que *C. albicans* aggravait l'inflammation (Jawhara *et al.*, 2008) et que l'inflammation est un prérequis au développement initial de la fibrose (Hayashi & Nakase, 2022), cette levure ne semble pas être incriminée dans une aggravation de la fibrose, au contraire de la souche AIEC LF82. Il est intéressant de constater que dans l'étude MAGIC, la

présence d'AIEC était surtout liée à l'âge, avec une prévalence plus importante à l'âge adulte. C'est dans le groupe des adultes que les AIEC étaient associés à la MC par rapport aux témoins. Aucun facteur clinique n'était associé à la présence d'AIEC dans la MC, notamment concernant la fibrose. Le comportement de la maladie était majoritairement inflammatoire (76,7% B1), limitant peut être la possibilité de trouver une association avec des comportements associés à la fibrose (B2/B3).

Dans les expériences menées chez la souris, l'absence de production d'ASCA dans le contexte d'inflammation et de fibrose digestive est inattendu. En effet, il avait été montré que les souris produisaient des ASCA lors d'une colonisation digestive par *C. albicans* en contexte d'inflammation induite par le DSS, que ce soit chez la souris C57BL/6 ou sur une lignée déficiente en galectine 3, par rapport à la condition inflammation seule par DSS (Jawhara *et al.*, 2008). Dans cette étude, les souris étaient exposées à 7 jours de DSS comme dans notre expérience et à un seul gavage par *C. albicans*, contrairement à 3 gavages par *C. albicans* selon notre plan expérimental. Cependant, dans l'étude de Jawhara *et al.*, il n'est pas réalisé de prélèvements sanguins à J0, or, nous avons constaté que certaines souris avaient des taux plus élevés d'ASCA avant exposition aux microorganismes non commensaux de la souris, comme pour le groupe CEABAC10 DSS exposé au *S. cerevisiae*, avec une plus grande hétérogénéité des résultats au sein de ce même groupe. Il faut tout de même souligner la limite du modèle axénique pour l'étude des réactions immunitaires. En effet, ces souris n'ayant jamais été exposées à un quelconque microorganisme en théorie, elles possèdent un système immunitaire immature, bien que capables de produire des IgG, et sont donc plus limitées pour l'obtention d'une réponse humorale durable (Lamouse-Smith *et al.*, 2011). Un modèle d'éradication d'agents bactériens et fongiques par décontamination du tractus digestif par un mélange de molécules antibiotiques et antifongiques à large spectre aurait alors peut-être été plus adapté pour observer la production d'ASCA (Kennedy *et al.*, 2018). Cependant, il est plus compliqué de maintenir une élimination durable et totale du microbiote dans ses conditions.

Chez la souris CEABAC10, il avait été mis en évidence qu'une souche de *S. cerevisiae* était capable de prévenir l'adhésion d'AIEC aux cellules épithéliales de ces souris, en inhibant l'interaction entre FimH et CEACAM6. CEACAM6 est un récepteur du mannose dont la structure glycanique n'est pas connue. Selon l'hypothèse stipulant que les ASCA seraient des auto-anticorps, et la MC, une maladie auto-immune, une réaction croisée entre l'épitope reconnu par les ASCA d'origine microbienne et la partie glycanique de CEACAM6 pourrait être à l'origine de la production d'ASCA par l'organisme humain. Il existe une surexpression

de CEACAM6 par les cellules épithéliales iléales dans la MC et 2 sites de CEACAM6 présentent une mannosylation qui pourrait, après interaction avec les mannanes de levures constituer un auto-antigène à l'origine des ASCA (Dumych, Yamakawa, *et al.*, 2018). *C. albicans* est capable de se lier à CEACAM6 (Klaile *et al.*, 2017), comme *S. cerevisiae* pourrait l'être étant donné, que certaines souches ou des fragments de sa paroi cellulaire peuvent bloquer l'adhésion d'*E. coli* et plus spécifiquement de FimH (Dumych, Bridot, *et al.*, 2018; Sivignon *et al.*, 2015; Sivignon *et al.*, 2021). Dans notre expérience, une stimulation par *C. albicans* ou *S. cerevisiae*, des souris CEABAC10, n'a pas permis de valider cette hypothèse, en dépit d'un contexte inflammatoire induit par le DSS.

Ces travaux réalisés chez la souris rejoignent les résultats déjà observés précédemment par Müller *et al.*, qui avaient montré qu'une administration de *S. cerevisiae per os* n'entraînait pas la production d'ASCA chez des souris exposées au DSS de façon chronique. La production d'ASCA était obtenue chez la souris après injection intrapéritonéale répétée de phosphopeptidomannane et seulement en cas d'ajout d'un adjuvant, 3 semaines après la première injection et 7 jours après la seconde (Muller *et al.*, 2005). Une autre expérience montrait que *C. albicans* et *S. cerevisiae*, administrés *per os* chez la souris soumise au DSS, étaient capables d'induire la production d'ASCA de type IgM, mais pas de type IgG, seulement après immunisation intrapéritonéale par des levures vivantes (Schaffer *et al.*, 2007).

Dans l'étude MAGIC, les taux d'ASCA déterminés chez les patients atteints de la MC et leurs apparentés sains sont plus faibles que ce qui a été observé auparavant. Des prévalences allant de 29 à 72% chez le patient atteint de la MC et de 20 à 34% chez leurs apparentés ont été rapportées (Ince & Elliott, 2019; Sendid *et al.*, 1998; Standaert-Vitse *et al.*, 2009). Il est possible que cette faible prévalence soit liée au design de l'étude, pour lequel les patients inclus étaient de diagnostic récent, et les apparentés avaient été sélectionnés sur le critère calprotectine fécale $\leq 250 \mu\text{g/g}$, mais également du fait d'un biais de sélection lié aux caractéristiques cliniques des patients inclus : la majorité des patients MC inclus dans l'étude était de phénotype B1 (non sténosant, non fibrosant) / L3 (localisation iléocolique) et la plupart en rémission (HBI médian de 1). Des taux d'ASCA IgA ont été rapportés plus élevés en cas de comportement fistulisant, et les patients ayant une localisation non iléale étaient susceptibles de voir augmenter leur taux d'ASCA IgG déterminés lors du suivi de la maladie (jusque 3 ans) (Muller *et al.*, 2005). Les ASCA étaient généralement positifs en cas de localisation iléale ou iléocolique (Kaul *et al.*, 2012), ce que nous n'avons pas mis en évidence. La calprotectine fécale est un marqueur très sensible de l'activité de la maladie dans les MICI. Le suivi de la calprotectine fécale permet

d'anticiper la rechute de la maladie encore non détectable cliniquement et de prédire les risques de récurrence post-opératoire. Dans l'étude MAGIC, alors que les patients atteints de MC étaient majoritairement en rémission clinique, le taux médian était tout de même de 527 µg/g, élévation encore plus marquée chez l'enfant que chez l'adulte. Ce résultat concorde avec le fait que les MC diagnostiquées chez l'enfant sont généralement rapportées comme étant de pronostic plus sévère (Pigneur *et al.*, 2010). Une des limites de nos résultats est la détermination de la calprotectine fécale sur un seul prélèvement, détermination qu'il est conseillé de vérifier sur un nouveau prélèvement pour éviter de prendre en compte un faux positif. Cependant, la forte proportion de taux élevés de CF en cas de MC serait en partie liée au nombre de jeunes patients dans le groupe MC (26/60). Une calprotectine fécale élevée chez l'enfant est associée, comme chez l'adulte, à un risque de rechute de la maladie (Diederer *et al.*, 2017).

Chez les patients atteints de MC, une association entre calprotectine fécale et la composition du microbiote bactérien était retrouvée. Dans ce groupe, le microbiote bactérien était caractérisé par une plus faible abondance de bactéries productrices d'acides gras à chaîne courte aux propriétés anti-inflammatoires, tels que *Faecalibacterium*, par rapport aux sujets sains. Il n'est pas toujours évident de comparer les études de métagénomique entre elles. Le projet Microbiome Quality Control a montré que de nombreux biais étaient introduits à chaque étape de l'analyse biologique et de l'analyse bio-informatique. C'est le cas notamment de la façon dont sont récoltés/conservés les échantillons, de la méthode d'extraction d'ADN, du choix des amorces et des séquences ciblées, de la profondeur de séquençage ou des procédures de contrôle qualité en bio-informatique (Sinha *et al.*, 2015). Le choix du modèle statistique lui-même peut influencer les résultats, et il n'existe aujourd'hui aucune référence en matière de conduite d'études sur le microbiote (Nearing *et al.*, 2022). Les biais, une fois pris en compte, peuvent en partie être corrigés par l'analyse bio-informatique. Récemment, des données primaires du microbiote libres d'accès en ligne, obtenues par des méthodes différentes, issues de 45 cohortes concernant les MICI ont été réanalysées au sein d'un même projet. Comme recommandé, trois méthodes statistiques pour analyser les associations entre genre et maladie ont été utilisées, seules les données confirmées par ces 3 méthodes étaient rapportées. Cela a permis d'extraire des modifications communes du microbiote intestinal au cours de la MC et de la RCH, mettant en évidence une signature spécifique de chacune de ces maladies. Certains genres connus comme étant moins abondants en cas de MICI tels que *Lachnospiraceae* NK4A136 group, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Alistipes* and *Parabacteroides* étaient confirmés par cette réanalyse, alors que d'autres genres ont été mis en évidence comme

impliqués et n'avaient jamais été rapportés auparavant (Vestergaard *et al.*, 2024). La concordance entre nos résultats et cette étude est variable, cependant, une comparaison des résultats selon 3 méthodes statistiques n'a pas été réalisée dans l'étude MAGIC. Les résultats concernant les AIEC sont intéressants, à savoir qu'il a été découvert que les AIEC sont également présents chez les individus sains et de nombreux animaux (Rahmouni *et al.*, 2018) mais ont probablement un comportement qui s'adapte en fonction de l'environnement tissulaire propre à chaque patient, permettant d'induire un phénotype plus invasif chez le patient atteint de la MC. Cependant, la différence observée entre les sous-groupes adultes et enfants - à savoir que les adultes atteints de MC et leurs apparentés sains adultes présentent des AIEC au phénotype plus invasif que chez les témoins sains et cette différence n'a pas été mise en évidence chez l'enfant - reste un mystère qui pourrait être exploré par l'analyse du microbiote adhérent.

L'analyse du mycobiote fécal de l'étude MAGIC a donné des résultats entraînant quelques interrogations. En comparant avec d'autres études menées sur la MC (**Tableau 7**), seule une étude avait été menée sur la plateforme PGM, mais ciblait la séquence ITS1 et non l'ensemble des séquences ITS1 et ITS2. L'étude était menée sur des échantillons fécaux, le délai entre le diagnostic et l'inclusion n'était pas renseigné et 8/20 patients inclus étaient en rémission (dans 9 cas, l'activité de la maladie n'était pas renseignée), tous étaient âgés de plus de 17 ans. Dans cette étude réalisée avec des méthodes s'apparentant aux nôtres, les résultats sont globalement différents, avec une augmentation de la richesse bactérienne et une diminution de la richesse fongique au sein des familles ayant des cas de MC par rapport aux familles saines, et *C. tropicalis* était plus abondant dans la MC que pour leur apparentés sains (Hoarau *et al.*, 2016). Cette prépondérance de *C. tropicalis* a été retrouvée dans d'autres études, associée aux tissus inflammatoires, associée à la MC en général, ou à la maladie en poussée (**Tableau 7**). Il est intéressant d'observer que ces données ont été également obtenues par q-PCR spécifique d'espèce. Dans notre étude, nous n'avons pas réalisé de q-PCR spécifique. En effet, aucune espèce ne semblait être associée à un statut en particulier. Rares sont les études comparant mycobiote adhérent et mycobiote fécal. Dans l'étude de Li *et al.*, en ce qui concerne le mycobiote adhérent, il a été observé que *C. albicans* et *C. tropicalis* étaient plus abondants sur les tissus inflammatoires vs. non inflammatoires, et seul *C. albicans* était détecté dans les échantillons fécaux des patients atteints de MC. A l'opposé, *S. cerevisiae* était moins abondant dans la MC vs. témoins et dans les tissus inflammatoires vs. non inflammatoires, mais cette particularité n'était pas retrouvée dans les échantillons fécaux (Li *et al.*, 2014).

Bien que des différences entre le microbiote fécal et adhérent aient été mises en évidence, les investigations du mycobiote adhérent restent rares et limitées par la difficulté à obtenir des biopsies (Nowicki *et al.*, 2023). Certains auteurs proposent d'analyser chez un même patient les tissus sains vs. tissus lésés. Analyser les biopsies apporterait probablement d'autres informations utiles pour la compréhension de la maladie et de sa physiopathologie.

Une première assignation taxonomique avait été réalisée avec la version 7.2 de la base de données Unite. En tant que mycologue, les abondances relatives des genres *Lacazia* et *Gymnoascus* obtenues dans les échantillons fécaux avec cette base de données plus ancienne nous avait alertés (**Figure 44**). Il apparaît qu'une étude réalisée sur des sujets totalement différents était menée au même moment, au même endroit et que ces 2 genres étaient parmi les 4 plus abondants de cette étude, avec *Glomerella* et *Penicillium* (El Jurdi *et al.*, 2019). Nous avions donc 4 genres en commun parmi les 8 plus abondants de notre étude. Deux hypothèses étaient soulevées à la lecture de ces résultats : i) un problème d'assignation taxonomique de certaines séquences représentatives et ii) l'absence de filtre lors de l'analyse bio-informatique des reads correspondants aux contaminants de l'environnement du laboratoire. La première hypothèse pouvait être explorée par une réanalyse des séquences avec une version plus récente de Unite v8.3. La seconde hypothèse pouvait être vérifiée par l'utilisation d'un contrôle négatif pendant le processus depuis l'extraction, permettant de filtrer les contaminations lors de l'analyse bio-informatique primaire et il n'a pas été fait mention de l'utilisation d'un contrôle négatif par l'équipe de recherche. Il est intéressant d'observer la disparition des genres *Lacazia* et *Gymnoascus* après réanalyse des données à l'aide d'une version plus récente de Unite. Cependant l'importance de l'abondance relative du genre *Daldinia* après réanalyse est surprenante également. En observant la répartition des échantillons lors de l'analyse de β -diversité, quelques échantillons apparaissent isolés sur la droite de la **Figure 37**. Ces échantillons ont été adressés pour analyse dans un second temps par rapport aux autres échantillons. Finalement, une analyse globale de répartition des échantillons selon le genre, révèle que les résultats sont dépendants de la série passée sur le séquenceur (**Figure 45**). Des problèmes liés à l'interprétation avaient également été confirmés par la société Genoscreen avec laquelle nous avons interagi pour vérifier nos résultats, leur conclusion était claire : « au vu de la quantité de données éliminées et de la grande disparité du nombre de lectures au sein de vos échantillons, nous souhaitons vous mettre en garde quant à l'utilisation de ces données pour l'interprétation biologique de votre projet : que ce soit à partir des indices de diversité alpha et matrices de distance que nous avons générés que pour la comparaison de vos groupes

d'échantillons ». Compte-tenu de cet avis, nous avons fait le choix de ne pas les publier et de privilégier la communication des autres résultats de l'étude MAGIC. Ces résultats soulignent l'importance de s'assurer de la comparabilité des méthodes d'analyse du mycobiote (Gangneux *et al.*, 2019; Thielemann *et al.*, 2022), mais également de réaliser les analyses en respectant de certaines précautions. Celles-ci reposent notamment sur i) l'utilisation de témoins positif (*MOCK community*) (Xue *et al.*, 2018) et négatif permettant de s'assurer de la qualité des résultats obtenus, du bon fonctionnement du pipeline d'analyse bio-informatique et de filtrer les contaminations, ii) sur le fait de réaliser les analyses d'une même étude au même moment avec les mêmes méthodes tant que nous n'avons pas la certitude que les méthodes sont comparables, iii) sur le fait de vérifier par q-PCR la charge fongique ou bactérienne de l'échantillon, et les résultats significatifs par des q-PCR spécifiques. Il existe malgré tout certains paramètres sur lesquels il est possible de jouer pour approcher des résultats obtenus d'une plateforme à l'autre. C'est l'exemple de la fragmentation enzymatique avant séquençage, réduisant les différences entre les 2 plateformes Illumina MiSeq et PGM Ion Torrent et diminuant les biais du séquençage avec la plateforme PGM (Tang *et al.*, 2015).

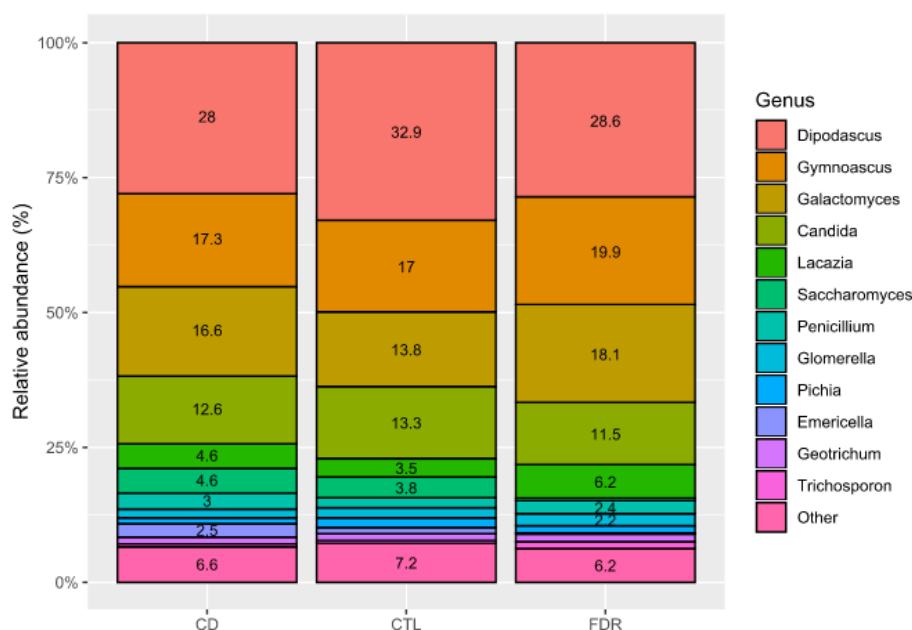


Fig. 44. Répartition des genres fongiques (abondance relative) chez les patients atteints de la maladie de Crohn (CD), leurs apparentés sains (FDR) et les témoins appariés (CTL).
 Attribution taxonomique à partir de la base de données Unite v7.2.

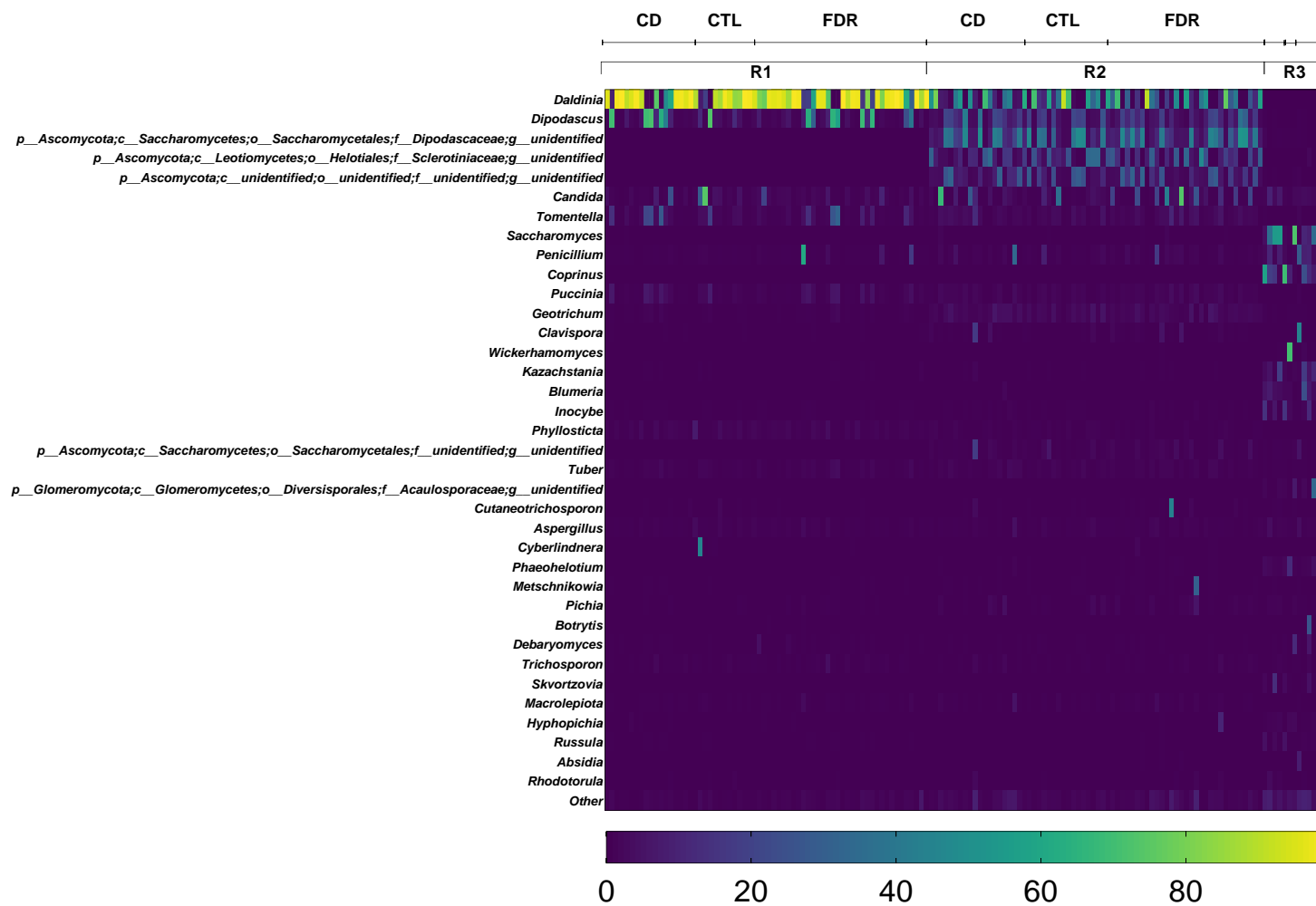


Fig. 45. Carte de chaleur obtenue avec la répartition des principaux genres fongiques (abondance relative) chez les patients atteints de la maladie de Crohn (CD), leurs apparentés sains (FDR) et les témoins appariés (CTL), selon la série de séquençage (R1, R2 et R3).

Conclusions et perspectives

Plusieurs hypothèses concernant l'origine de la MC ont été émises ces dernières années, sans que son étiologie exacte ne soit identifiée. La découverte des ASCA associés à la MC dans les années 1990 a également orienté une partie des recherches sur le rôle éventuel des micromycètes dans la maladie. Alors que nous souhaitons connaître l'impact de *C. albicans* et *S. cerevisiae* sur la fibrose intestinale, complication fréquente observée dans la MC, nous avons confirmé les résultats de certaines études réalisées *in vivo*, sur le rôle des AIEC dans l'induction de la fibrose intestinale, mais non confirmé chez l'homme à ce jour. Alors qu'il a été montré précédemment que *C. albicans* jouait un rôle dans l'inflammation, dans nos mains, son rôle dans la fibrose intestinale apparaît peu probable, de même que celui de *S. cerevisiae*.

En ce qui concerne l'acronyme « ASCA » qui pouvait évoquer l'implication de *S. cerevisiae* dans le déclenchement/maintien de l'inflammation intestinale, de plus en plus de preuves nous amènent à disculper le rôle de *S. cerevisiae* et à proposer un changement de dénomination de ce marqueur. En effet, la reconnaissance d'une séquence oligomannosidique possiblement exprimée en situation physiologique ou pathologique au sein du vivant pourrait être à l'origine de la génération de ces anticorps dans la MC. De plus, nous n'avons pas pu montrer, dans la limite de nos modèles et des souches utilisés, que *C. albicans* ou *S. cerevisiae* étaient capables d'induire la production d'ASCA en contexte inflammatoire ou fibrotique. *C. albicans* et *S. cerevisiae* sont souvent rapportés dans les études métagénomiques et présentent des associations opposées dans la MC. *C. albicans* est souvent plus abondant dans la MC, alors que *S. cerevisiae* est généralement plus abondant chez les individus sains. L'analyse du mycobiote fécal dans l'étude MAGIC n'a pas permis de retrouver ces différences et a permis de soulever des problèmes méthodologiques à prendre en compte pour nos futures investigations.

Ce travail de thèse ouvre plusieurs perspectives pour l'analyse du mycobiome digestif des patients atteints de MC. Pour l'analyse du mycobiome digestif des patients MC, nous envisageons d'entreprendre une étude nationale pour recruter des sujets sains sans antécédents de MICI et d'analyser leur microbiote intestinal avec la même approche méthodologique (extraction, séquençage, pipeline d'analyse bio-informatique) en évitant les écueils cités précédemment. L'objectif étant de disposer des espèces fongiques colonisant la muqueuse digestive en situation physiologique (« mycobiome normal ») en utilisant les approches métagénomique et culturomique. Nous souhaitons ensuite réaliser une nouvelle étude prospective longitudinale pour suivre le mycobiome intestinal (adhérent et fécal) des patients

atteints de MC durant les phases actives et quiescentes de la maladie. Il est important de bien sélectionner les patients selon des critères phénotypiques permettant d'analyser les résultats obtenus sur des groupes homogènes. En ce qui concerne l'influence du microbiote sur l'évolution de la maladie vers un processus fibrotique, nous pourrions également comparer les patients ayant une évolution vers un phénotype fibrotique (B2/B3) nécessitant une résection intestinale *versus* les patients dont la maladie évolue selon un comportement inflammatoire (B1). Cela permettrait d'évaluer la relation entre présence de micromycètes et l'apparition d'un processus fibrotique. Il s'agit également de vérifier si d'autres bactéries du microbiote intestinal que *E. coli* participe à la promotion d'une fibrose intestinale.

Nos investigations concernant l'origine des ASCA n'ont pas permis d'identifier un immunogène responsable de leur génération. L'hypothèse d'une origine auto-immune reste valide. Il serait intéressant de purifier spécifiquement les ASCA de sérums de patients atteints de la MC en quantité suffisante, afin d'aller observer par immunohistochimie si les ASCA ciblent des zones tissulaires et cellulaires spécifiques, sur des tissus collectés en zone saine et zone lésée de patients atteints de MC, ainsi que chez des individus sains. Les ASCA ainsi purifiés pourraient être utilisés dans des expériences de cytométrie en flux pour analyser les micromycètes exprimant spécifiquement l'épitope ASCA (collaboration avec l'équipe Inserm U543, APHP Hôpital Pitié-Salpêtrière). Nous caractériserons également le phénotype des lymphocytes B issus de patients ASCA positifs et ASCA séronégatifs.

Par ailleurs, les résultats obtenus récemment au sein de notre équipe ont mis en évidence un défaut de glycosylation des mucines intestinales chez les patients atteints de MC et des liens de plus en plus forts entre des processus de pauci-mannosylation et l'apparition de réaction immunitaire inadaptée (Robbe Masselot *et al.*, 2023). Nos perspectives viseront à étudier, d'une part, les relations entre les profils de glycosylation des mucines de patients atteints de la MC et la génération des ASCA, et, d'autre part, les variations du glycome pariétal des levures isolées des patients atteints de MC et leur relation avec la production des ASCA au niveau duodéal et systémique.

Références

- Ahluwalia, B., Moraes, L., Magnusson, M. K., & Ohman, L. (2018). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scand J Gastroenterol*, 53(4), 379-389. doi:10.1080/00365521.2018.1447597
- Alfredsson, J., & Wick, M. J. (2020). Mechanism of fibrosis and stricture formation in Crohn's disease. *Scand J Immunol*, e12990. doi:10.1111/sji.12990
- Amiot, A., Bouguen, G., Bonnaud, G., Bouhnik, Y., Hagege, H., Peyrin-Biroulet, L., *et al.* (2021). Clinical guidelines for the management of inflammatory bowel disease: Update of a French national consensus. *Dig Liver Dis*, 53(1), 35-43. doi:10.1016/j.dld.2020.10.018
- Annaix, V., Bouchara, J. P., Tronchin, G., Senet, J. M., & Robert, R. (1990). Structures involved in the binding of human fibrinogen to *Candida albicans* germ tubes. *FEMS Microbiol Immunol*, 2(3), 147-153. doi:10.1111/j.1574-6968.1990.tb03514.x
- Azramezani Kopi, T., Shahrokh, S., Mirzaei, S., Asadzadeh Aghdaei, H., & Amini Kadijani, A. (2019). The role of serum calprotectin as a novel biomarker in inflammatory bowel diseases: a review study. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 12(3), 183-189.
- Balderramo, D. C., Romagnoli, P. A., Granlund, A. V. B., & Catalan-Serra, I. (2023). Fecal fungal microbiota (mycobiome) study as a potential tool for precision medicine in inflammatory bowel disease. *Gut Liver*, 17(4), 505-515. doi:10.5009/gnl220537
- Barnich, N., Carvalho, F. A., Glasser, A. L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., *et al.* (2007). CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest*, 117(6), 1566-1574. doi:10.1172/JCI30504
- Barnich, N., & Darfeuille-Michaud, A. (2010). Abnormal CEACAM6 expression in Crohn disease patients favors gut colonization and inflammation by adherent-invasive *E. coli*. *Virulence*, 1(4), 281-282. doi:10.4161/viru.1.4.11510
- Best, W. R., Bectel, J. M., Singleton, J. W., & Kern, F., Jr. (1976). Development of a Crohn's disease activity index. National cooperative Crohn's disease study. *Gastroenterology*, 70(3), 439-444.
- Bonneau, J., Dumestre-Perard, C., Rinaudo-Gaujous, M., Genin, C., Sparrow, M., Roblin, X., *et al.* (2015). Systematic review: new serological markers (anti-glycan, anti-GP2, anti-GM-CSF Ab) in the prediction of IBD patient outcomes. *Autoimmun Rev*, 14(3), 231-245. doi:10.1016/j.autrev.2014.11.004

- Bouali, A., Robert, R., Tronchin, G., & Senet, J. M. (1986). Binding of human fibrinogen to *Candida albicans* in vitro: a preliminary study. *J Med Vet Mycol*, 24(4), 345-348. doi:10.1080/02681218680000511
- Boudeau, J., Glasser, A. L., Masseret, E., Joly, B., & Darfeuille-Michaud, A. (1999). Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun*, 67(9), 4499-4509.
- Burisch, J., Jess, T., Martinato, M., Lakatos, P. L., & EpiCom, E. (2013). The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis*, 7(4), 322-337. doi:10.1016/j.crohns.2013.01.010
- Carlsen, K., Malham, M., Hansen, L. F., Petersen, J. J. H., Paerregaard, A., Houen, G., *et al.* (2019). Serum calprotectin in adolescents with inflammatory bowel disease-A pilot investigation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 68(5), 669-675. doi:10.1097/MPG.0000000000002244
- Carlson, S. L., Mathew, L., Savage, M., Kok, K., Lindsay, J. O., Munro, C. A., *et al.* (2023). Mucosal immunity to gut fungi in health and inflammatory bowel disease. *J Fungi (Basel)*, 9(11). doi:10.3390/jof9111105
- Carvalho, F. A., Barnich, N., Sivignon, A., Darcha, C., Chan, C. H., Stanners, C. P., *et al.* (2009). Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med*, 206(10), 2179-2189. doi:10.1084/jem.20090741
- Chehoud, C., Albenberg, L. G., Judge, C., Hoffmann, C., Grunberg, S., Bittinger, K., *et al.* (2015). Fungal signature in the gut microbiota of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 21(8), 1948-1956. doi:10.1097/MIB.0000000000000454
- Chiaro, T. R., Soto, R., Zac Stephens, W., Kubinak, J. L., Petersen, C., Gogokhia, L., *et al.* (2017). A member of the gut mycobiota modulates host purine metabolism exacerbating colitis in mice. *Sci Transl Med*, 9(380). doi:10.1126/scitranslmed.aaf9044
- Chokr, D., Cornu, M., Neut, C., Bortolus, C., Charlet, R., Desreumaux, P., *et al.* (2021). Adherent invasive *Escherichia coli* (AIEC) strain LF82, but not *Candida albicans*, plays a profibrogenic role in the intestine. *Gut Pathog*, 13(1), 5. doi:10.1186/s13099-021-00401-z
- Choo, J. M., Leong, L. E., & Rogers, G. B. (2015). Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. *Sci Rep*, 5, 16350. doi:10.1038/srep16350

- Choung, R. S., Princen, F., Stockfisch, T. P., Torres, J., Maue, A. C., Porter, C. K., *et al.* (2016). Serologic microbial associated markers can predict Crohn's disease behaviour years before disease diagnosis. *Aliment Pharmacol Ther*, *43*(12), 1300-1310. doi:10.1111/apt.13641
- Choy, M. C., Visvanathan, K., & De Cruz, P. (2017). An overview of the innate and adaptive immune system in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, *23*(1), 2-13. doi:10.1097/MIB.0000000000000955
- Cimicka, J., Riegert, J., Kavkova, M., & Cerna, K. (2022). Intestinal mycobiome associated with diagnosis of inflammatory bowel disease based on tissue biopsies. *Med Mycol*, *60*(1). doi:10.1093/mmy/myab076
- Cinemre, H., Bilir, C., Gokosmanoglu, F., & Kadakal, F. (2007). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in acute myocardial infarction. *J Investig Med*, *55*(8), 444-449. doi:10.2310/6650.2007.00024
- Colombel, J. F., Narula, N., & Peyrin-Biroulet, L. (2017). Management strategies to improve outcomes of patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, *152*(2), 351-361 e355. doi:10.1053/j.gastro.2016.09.046
- Diaz, P. I., Hong, B. Y., Dupuy, A. K., & Strausbaugh, L. D. (2017). Mining the oral mycobiome: Methods, components, and meaning. *Virulence*, *8*(3), 313-323. doi:10.1080/21505594.2016.1252015
- Diederer, K., Hoekman, D. R., Leek, A., Wolters, V. M., Hummel, T. Z., de Meij, T. G., *et al.* (2017). Raised faecal calprotectin is associated with subsequent symptomatic relapse, in children and adolescents with inflammatory bowel disease in clinical remission. *Aliment Pharmacol Ther*, *45*(7), 951-960. doi:10.1111/apt.13950
- Dill-McFarland, K. A., Tang, Z. Z., Kemis, J. H., Kerby, R. L., Chen, G., Palloni, A., *et al.* (2019). Close social relationships correlate with human gut microbiota composition. *Sci Rep*, *9*(1), 703. doi:10.1038/s41598-018-37298-9
- Dumych, T., Bridot, C., Gouin, S. G., Lensink, M. F., Paryzhak, S., Szunerits, S., *et al.* (2018). A novel integrated way for deciphering the glycan code for the FimH lectin. *Molecules*, *23*(11). doi:10.3390/molecules23112794
- Dumych, T., Yamakawa, N., Sivignon, A., Garenaux, E., Robakiewicz, S., Coddeville, B., *et al.* (2018). Oligomannose-rich membranes of dying intestinal epithelial cells promote host colonization by adherent-invasive *E. coli*. *Front Microbiol*, *9*, 742. doi:10.3389/fmicb.2018.00742

- El Jurdi, N., Filali-Mouhim, A., Salem, I., Retuerto, M., Dambrosio, N. M., Baer, L., *et al.* (2019). Gastrointestinal microbiome and mycobiome changes during autologous transplantation for multiple myeloma: results of a prospective pilot study. *Biol Blood Marrow Transplant*, 25(8), 1511-1519. doi:10.1016/j.bbmt.2019.04.007
- El Mouzan, M., Wang, F., Al Mofarreh, M., Menon, R., Al Barrag, A., Korolev, K. S., *et al.* (2017). Fungal microbiota profile in newly diagnosed treatment-naive children with Crohn's disease. *J Crohns Colitis*, 11(5), 586-592. doi:10.1093/ecco-jcc/jjw197
- El Mouzan, M. I., Korolev, K. S., Al Mofarreh, M. A., Menon, R., Winter, H. S., Al Sarkhy, A. A., *et al.* (2018). Fungal dysbiosis predicts the diagnosis of pediatric Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 24(39), 4510-4516. doi:10.3748/wjg.v24.i39.4510
- Enache-Angoulvant, A., & Hennequin, C. (2005). Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. *Clin Infect Dis*, 41(11), 1559-1568. doi:10.1086/497832
- Frau, A., Ijaz, U. Z., Slater, R., Jonkers, D., Penders, J., Campbell, B. J., *et al.* (2021). Inter-kingdom relationships in Crohn's disease explored using a multi-omics approach. *Gut Microbes*, 13(1), 1930871. doi:10.1080/19490976.2021.1930871
- Fujimoto, T., Imaeda, H., Takahashi, K., Kasumi, E., Bamba, S., Fujiyama, Y., *et al.* (2013). Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 28(4), 613-619. doi:10.1111/jgh.12073
- Gangneux, J. P., Guegan, H., Vandemborgh, L. E., Buffet-Bataillon, S., Enaud, R., & Delhaes, L. (2019). A European ECMM-ESCMID survey on goals and practices for mycobiota characterisation using next-generation sequencing. *Mycoses*, 62(12), 1096-1099. doi:10.1111/myc.12999
- Ganji-Arjenaki, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2018). Probiotics are a good choice in remission of inflammatory bowel diseases: A meta analysis and systematic review. *J Cell Physiol*, 233(3), 2091-2103. doi:10.1002/jcp.25911
- Ghione, S., Sarter, H., Fumery, M., Armengol-Debeir, L., Savoye, G., Ley, D., *et al.* (2018). Dramatic increase in incidence of ulcerative colitis and Crohn's disease (1988-2011): A population-based study of French adolescents. *Am J Gastroenterol*, 113(2), 265-272. doi:10.1038/ajg.2017.228
- Giuffrida, P., Pinzani, M., Corazza, G. R., & Di Sabatino, A. (2016). Biomarkers of intestinal fibrosis - one step towards clinical trials for stricturing inflammatory bowel disease. *United European Gastroenterol J*, 4(4), 523-530. doi:10.1177/2050640616640160
- Gomollon, F., Dignass, A., Annese, V., Tilg, H., Van Assche, G., Lindsay, J. O., *et al.* (2017). 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's

- disease 2016: Part 1: Diagnosis and medical management. *J Crohns Colitis*, 11(1), 3-25. doi:10.1093/ecco-jcc/jjw168
- Hamad, I., Ranque, S., Azhar, E. I., Yasir, M., Jiman-Fatani, A. A., Tissot-Dupont, H., *et al.* (2017). Culturomics and amplicon-based metagenomic approaches for the study of fungal population in human gut microbiota. *Sci Rep*, 7(1), 16788. doi:10.1038/s41598-017-17132-4
- Harvey, R. F., & Bradshaw, J. M. (1980). A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet*, 1(8167), 514. doi:10.1016/s0140-6736(80)92767-1
- Hayashi, Y., & Nakase, H. (2022). The molecular mechanisms of intestinal inflammation and fibrosis in Crohn's disease. *Front Physiol*, 13, 845078. doi:10.3389/fphys.2022.845078
- Heelan, B. T., Allan, S., & Barnes, R. M. (1991). Identification of a 200-kDa glycoprotein antigen of *Saccharomyces cerevisiae*. *Immunol Lett*, 28(3), 181-185. doi:10.1016/0165-2478(91)90001-q
- Hirche, T. O., Stein, J., Hirche, H., Hausmann, J., Wagner, T. O., Behrens, F., *et al.* (2011). Increased levels of anti-glycan antibodies in patients with cystic fibrosis. *Eur J Med Res*, 16(9), 385-390. doi:10.1186/2047-783x-16-9-385
- Hoarau, G., Mukherjee, P. K., Gower-Rousseau, C., Hager, C., Chandra, J., Retuerto, M. A., *et al.* (2016). Bacteriome and mycobiome interactions underscore microbial dysbiosis in familial Crohn's disease. *mBio*, 7(5). doi:10.1128/mBio.01250-16
- Hoggard, M., Vesty, A., Wong, G., Montgomery, J. M., Fourie, C., Douglas, R. G., *et al.* (2018). Characterizing the human mycobiota: a comparison of small subunit rRNA, ITS1, ITS2, and large subunit rRNA genomic targets. *Front Microbiol*, 9, 2208. doi:10.3389/fmicb.2018.02208
- Humbert, L., Cornu, M., Proust-Lemoine, E., Bayry, J., Wemeau, J. L., Vantyghem, M. C., *et al.* (2018). Chronic mucocutaneous candidiasis in autoimmune polyendocrine syndrome type 1. *Front Immunol*, 9, 2570. doi:10.3389/fimmu.2018.02570
- Huseyin, C. E., Rubio, R. C., O'Sullivan, O., Cotter, P. D., & Scanlan, P. D. (2017). The fungal frontier: a comparative analysis of methods used in the study of the human gut mycobiome. *Front Microbiol*, 8, 1432. doi:10.3389/fmicb.2017.01432
- Iliev, I. D., & Cadwell, K. (2021). Effects of intestinal fungi and viruses on immune responses and inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 160(4), 1050-1066. doi:10.1053/j.gastro.2020.06.100

- Iliev, I. D., Funari, V. A., Taylor, K. D., Nguyen, Q., Reyes, C. N., Strom, S. P., *et al.* (2012). Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. *Science*, *336*(6086), 1314-1317. doi:10.1126/science.1221789
- Imai, T., Inoue, R., Kawada, Y., Morita, Y., Inatomi, O., Nishida, A., *et al.* (2019). Characterization of fungal dysbiosis in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*, *54*(2), 149-159. doi:10.1007/s00535-018-1530-7
- Ince, M. N., & Elliott, D. E. (2019). Effective use of the laboratory in the management of patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Clin North Am*, *48*(2), 237-258. doi:10.1016/j.gtc.2019.02.006
- Israeli, E., Grotto, I., Gilburd, B., Balicer, R. D., Goldin, E., Wiik, A., *et al.* (2005). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease. *Gut*, *54*(9), 1232-1236. doi:10.1136/gut.2004.060228
- Jawhara, S., & Poulain, D. (2007). *Saccharomyces boulardii* decreases inflammation and intestinal colonization by *Candida albicans* in a mouse model of chemically-induced colitis. *Med Mycol*, *45*(8), 691-700. doi:10.1080/13693780701523013
- Jawhara, S., Thuru, X., Standaert-Vitse, A., Jouault, T., Mordon, S., Sendid, B., *et al.* (2008). Colonization of mice by *Candida albicans* is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3. *J Infect Dis*, *197*(7), 972-980. doi:10.1086/528990
- Joossens, M., Van Steen, K., Branche, J., Sendid, B., Rutgeerts, P., Vasseur, F., *et al.* (2010). Familial aggregation and antimicrobial response dose-dependently affect the risk for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, *16*(1), 58-67. doi:10.1002/ibd.20985
- Kansal, S., Catto-Smith, A. G., Boniface, K., Thomas, S., Cameron, D. J., Oliver, M., *et al.* (2019a). The microbiome in paediatric Crohn's disease-A longitudinal, prospective, single-centre study. *J Crohns Colitis*, *13*(8), 1044-1054. doi:10.1093/ecco-jcc/jjz016
- Kansal, S., Catto-Smith, A. G., Boniface, K., Thomas, S., Cameron, D. J., Oliver, M., *et al.* (2019b). Variation of gut mucosal microbiome with anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody status in pediatric Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, *69*(6), 696-703. doi:10.1097/MPG.0000000000002461
- Kaplan, G. G., & Ng, S. C. (2017). Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, *152*(2), 313-321 e312. doi:10.1053/j.gastro.2016.10.020
- Kaul, A., Hutfless, S., Liu, L., Bayless, T. M., Marohn, M. R., & Li, X. (2012). Serum anti-glycan antibody biomarkers for inflammatory bowel disease diagnosis and progression:

- a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*, 18(10), 1872-1884. doi:10.1002/ibd.22862
- Kennedy, E. A., King, K. Y., & Baldrige, M. T. (2018). Mouse microbiota models: comparing germ-free mice and antibiotics treatment as tools for modifying gut bacteria. *Front Physiol*, 9, 1534. doi:10.3389/fphys.2018.01534
- Kim, M. J., Kim, E., Kang, B., Lee, Y., Kang, E. S., & Choe, Y. H. (2021). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody in pediatric Crohn's disease patients without mucosal healing is a useful marker of mucosal damage. *Gut Liver*, 15(5), 763-770. doi:10.5009/gnl20212
- Klaile, E., Muller, M. M., Schafer, M. R., Clauder, A. K., Feer, S., Heyl, K. A., *et al.* (2017). Binding of *Candida albicans* to human CEACAM1 and CEACAM6 modulates the inflammatory response of intestinal epithelial cells. *mBio*, 8(2). doi:10.1128/mBio.02142-16
- Krawczyk, A., Salamon, D., Kowalska-Duplaga, K., Bogiel, T., & Gosiewski, T. (2021). Association of fungi and archaea of the gut microbiota with Crohn's disease in pediatric patients-pilot study. *Pathogens*, 10(9). doi:10.3390/pathogens10091119
- Krawczyk, A., Salamon, D., Kowalska-Duplaga, K., Zapala, B., Ksiazek, T., Drazniuk-Warchol, M., *et al.* (2023). Changes in the gut mycobiome in pediatric patients in relation to the clinical activity of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 29(14), 2172-2187. doi:10.3748/wjg.v29.i14.2172
- Kreulen, I. A. M., de Jonge, W. J., van den Wijngaard, R. M., & van Thiel, I. A. M. (2023). *Candida* spp. in human intestinal health and disease: more than a gut feeling. *Mycopathologia*, 188(6), 845-862. doi:10.1007/s11046-023-00743-z
- Kvehaugen, A. S., Aasbrenn, M., & Farup, P. G. (2017). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) are associated with body fat mass and systemic inflammation, but not with dietary yeast consumption: a cross-sectional study. *BMC Obes*, 4, 28. doi:10.1186/s40608-017-0164-2
- Lamouse-Smith, E. S., Tzeng, A., & Starnbach, M. N. (2011). The intestinal flora is required to support antibody responses to systemic immunization in infant and germ free mice. *PLoS One*, 6(11), e27662. doi:10.1371/journal.pone.0027662
- Latella, G., Di Gregorio, J., Flati, V., Rieder, F., & Lawrance, I. C. (2015). Mechanisms of initiation and progression of intestinal fibrosis in IBD. *Scand J Gastroenterol*, 50(1), 53-65. doi:10.3109/00365521.2014.968863

- Lee, M. H., Hsu, T. L., Lin, J. J., Lin, Y. J., Kao, Y. Y., Chang, J. J., *et al.* (2020). Constructing a human complex type N-linked glycosylation pathway in *Kluyveromyces marxianus*. *PLoS One*, *15*(5), e0233492. doi:10.1371/journal.pone.0233492
- Lee, S. H., Kwon, J. E., & Cho, M. L. (2018). Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intest Res*, *16*(1), 26-42. doi:10.5217/ir.2018.16.1.26
- Lewis, J. D., Chen, E. Z., Baldassano, R. N., Otley, A. R., Griffiths, A. M., Lee, D., *et al.* (2015). Inflammation, antibiotics, and diet as environmental stressors of the gut microbiome in pediatric Crohn's disease. *Cell Host Microbe*, *18*(4), 489-500. doi:10.1016/j.chom.2015.09.008
- Li, Q., Wang, C., Tang, C., He, Q., Li, N., & Li, J. (2014). Dysbiosis of gut fungal microbiota is associated with mucosal inflammation in Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol*, *48*(6), 513-523. doi:10.1097/MCG.0000000000000035
- Lichtenstein, G. R., Loftus, E. V., Isaacs, K. L., Regueiro, M. D., Gerson, L. B., & Sands, B. E. (2018). ACG Clinical Guideline: Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol*, *113*(4), 481-517. doi:10.1038/ajg.2018.27
- Liguori, G., Lamas, B., Richard, M. L., Brandi, G., da Costa, G., Hoffmann, T. W., *et al.* (2016). Fungal dysbiosis in mucosa-associated microbiota of Crohn's disease patients. *J Crohns Colitis*, *10*(3), 296-305. doi:10.1093/ecco-jcc/jjv209
- Limon, J. J., Tang, J., Li, D., Wolf, A. J., Michelsen, K. S., Funari, V., *et al.* (2019). *Malassezia* is associated with Crohn's disease and exacerbates colitis in mouse models. *Cell Host Microbe*, *25*(3), 377-388 e376. doi:10.1016/j.chom.2019.01.007
- Ma, C., Jairath, V., Click, B., Hirota, S. A., Lu, C., Parker, C. E., *et al.* (2019). Targeting anti-fibrotic pathways in Crohn's disease - The final frontier? *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, *38-39*, 101603. doi:10.1016/j.bpg.2019.02.005
- Maaser, C., Sturm, A., Vavricka, S. R., Kucharzik, T., Fiorino, G., Annese, V., *et al.* (2019). ECCO-ESGAR Guideline for diagnostic assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. *J Crohns Colitis*, *13*(2), 144-164. doi:10.1093/ecco-jcc/jjy113
- Main, J., McKenzie, H., Yeaman, G. R., Kerr, M. A., Robson, D., Pennington, C. R., *et al.* (1988). Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *BMJ*, *297*(6656), 1105-1106. doi:10.1136/bmj.297.6656.1105
- McDonnell, T., Wincup, C., Buchholz, I., Pericleous, C., Giles, I., Ripoll, V., *et al.* (2020). The role of beta-2-glycoprotein I in health and disease associating structure with function: More than just APS. *Blood Rev*, *39*, 100610. doi:10.1016/j.blre.2019.100610

- McKenzie, H., Main, J., Pennington, C. R., & Parratt, D. (1990). Antibody to selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's and brewer's yeast) and *Candida albicans* in Crohn's disease. *Gut*, *31*(5), 536-538. doi:10.1136/gut.31.5.536
- Miyoshi, J., Sofia, M. A., & Pierre, J. F. (2018). The evidence for fungus in Crohn's disease pathogenesis. *Clin J Gastroenterol*, *11*(6), 449-456. doi:10.1007/s12328-018-0886-9
- Moller, F. T., Andersen, V., Wohlfahrt, J., & Jess, T. (2015). Familial risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study 1977-2011. *Am J Gastroenterol*, *110*(4), 564-571. doi:10.1038/ajg.2015.50
- Mori, A., Mitsuyama, K., Sakemi, R., Yoshioka, S., Fukunaga, S., Kuwaki, K., *et al.* (2021). Evaluation of serum calprotectin levels in patients with inflammatory bowel disease. *Kurume Med J*, *66*(4), 209-215. doi:10.2739/kurumemedj.MS664009
- Motooka, D., Fujimoto, K., Tanaka, R., Yaguchi, T., Gotoh, K., Maeda, Y., *et al.* (2017). Fungal ITS1 deep-sequencing strategies to reconstruct the composition of a 26-species community and evaluation of the gut mycobiota of healthy Japanese individuals. *Front Microbiol*, *8*, 238. doi:10.3389/fmicb.2017.00238
- Mukhopadhyaya, I., Hansen, R., Meharg, C., Thomson, J. M., Russell, R. K., Berry, S. H., *et al.* (2015). The fungal microbiota of de-novo paediatric inflammatory bowel disease. *Microbes Infect*, *17*(4), 304-310. doi:10.1016/j.micinf.2014.12.001
- Muller, S., Styner, M., Seibold-Schmid, B., Flogerzi, B., Mahler, M., Konrad, A., *et al.* (2005). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody titers are stable over time in Crohn's patients and are not inducible in murine models of colitis. *World J Gastroenterol*, *11*(44), 6988-6994. doi:10.3748/wjg.v11.i44.6988
- Munoz, P., Bouza, E., Cuenca-Estrella, M., Eiros, J. M., Perez, M. J., Sanchez-Somolinos, M., *et al.* (2005). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an emerging infectious disease. *Clin Infect Dis*, *40*(11), 1625-1634. doi:10.1086/429916
- Nearing, J. T., Douglas, G. M., Hayes, M. G., MacDonald, J., Desai, D. K., Allward, N., *et al.* (2022). Microbiome differential abundance methods produce different results across 38 datasets. *Nat Commun*, *13*(1), 342. doi:10.1038/s41467-022-28034-z
- Nelson, A., Stewart, C. J., Kennedy, N. A., Lodge, J. K., Tremelling, M., Consortium, U. I. G., *et al.* (2021). The Impact of NOD2 genetic variants on the gut mycobiota in Crohn's disease patients in remission and in individuals without gastrointestinal inflammation. *J Crohns Colitis*, *15*(5), 800-812. doi:10.1093/ecco-jcc/jjaa220
- Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., *et al.* (2018). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century:

- a systematic review of population-based studies. *Lancet*, 390(10114), 2769-2778. doi:10.1016/S0140-6736(17)32448-0
- Nowicki, C., Ray, L., Engen, P., Madigrano, A., Witt, T., Lad, T., *et al.* (2023). Comparison of gut microbiome composition in colonic biopsies, endoscopically-collected and at-home-collected stool samples. *Front Microbiol*, 14, 1148097. doi:10.3389/fmicb.2023.1148097
- O'Brien, C. L., Bringer, M. A., Holt, K. E., Gordon, D. M., Dubois, A. L., Barnich, N., *et al.* (2017). Comparative genomics of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Gut*, 66(8), 1382-1389. doi:10.1136/gutjnl-2015-311059
- Ott, S. J., Kuhbacher, T., Musfeldt, M., Rosenstiel, P., Hellmig, S., Rehman, A., *et al.* (2008). Fungi and inflammatory bowel diseases: Alterations of composition and diversity. *Scand J Gastroenterol*, 43(7), 831-841. doi:10.1080/00365520801935434
- Papp, M., Norman, G. L., Altorjay, I., & Lakatos, P. L. (2007). Utility of serological markers in inflammatory bowel diseases: gadget or magic? *World J Gastroenterol*, 13(14), 2028-2036. doi:10.3748/wjg.v13.i14.2028
- Park, J. H., Peyrin-Biroulet, L., Eisenhut, M., & Shin, J. I. (2017). IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules. *Autoimmun Rev*, 16(4), 416-426. doi:10.1016/j.autrev.2017.02.013
- Pigneur, B., Seksik, P., Viola, S., Viala, J., Beaugerie, L., Girardet, J. P., *et al.* (2010). Natural history of Crohn's disease: comparison between childhood- and adult-onset disease. *Inflamm Bowel Dis*, 16(6), 953-961. doi:10.1002/ibd.21152
- Poullis, A., Foster, R., Mendall, M. A., & Fagerhol, M. K. (2003). Emerging role of calprotectin in gastroenterology. *J Gastroenterol Hepatol*, 18(7), 756-762. doi:10.1046/j.1440-1746.2003.03014.x
- Prideaux, L., De Cruz, P., Ng, S. C., & Kamm, M. A. (2012). Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis*, 18(7), 1340-1355. doi:10.1002/ibd.21903
- Qiu, X., Zhao, X., Cui, X., Mao, X., Tang, N., Jiao, C., *et al.* (2020). Characterization of fungal and bacterial dysbiosis in young adult Chinese patients with Crohn's disease. *Therap Adv Gastroenterol*, 13, 1756284820971202. doi:10.1177/1756284820971202
- Quinton, J. F., Sendid, B., Reumaux, D., Duthilleul, P., Cortot, A., Grandbastien, B., *et al.* (1998). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut*, 42(6), 788-791.

- Rahmouni, O., Vignal, C., Titecat, M., Foligne, B., Pariente, B., Dubuquoy, L., *et al.* (2018). High carriage of adherent invasive *E. coli* in wildlife and healthy individuals. *Gut Pathog*, *10*, 23. doi:10.1186/s13099-018-0248-7
- Ramos, G. P., & Papadakis, K. A. (2019). Mechanisms of disease: inflammatory bowel diseases. *Mayo Clin Proc*, *94*(1), 155-165. doi:10.1016/j.mayocp.2018.09.013
- Rieder, F. (2013). The gut microbiome in intestinal fibrosis: environmental protector or provocateur? *Sci Transl Med*, *5*(190), 190ps110. doi:10.1126/scitranslmed.3004731
- Rieder, F., Fiocchi, C., & Rogler, G. (2017). Mechanisms, management, and treatment of fibrosis in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, *152*(2), 340-350 e346. doi:10.1053/j.gastro.2016.09.047
- Rinaldi, M., Perricone, R., Blank, M., Perricone, C., & Shoenfeld, Y. (2013). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* autoantibodies in autoimmune diseases: from bread baking to autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol*, *45*(2), 152-161. doi:10.1007/s12016-012-8344-9
- Robbe Masselot, C., Cordier, C., Marsac, B., Nachury, M., Leonard, R., & Sendid, B. (2023). Human fecal mucin glycosylation as a new biomarker in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*, *29*(1), 167-171. doi:10.1093/ibd/izac244
- Ruiz, M. A., Kaiser Junior, R. L., Piron-Ruiz, L., Pena-Arciniegas, T., Saran, P. S., & De Quadros, L. G. (2018). Hematopoietic stem cell transplantation for Crohn's disease: Gaps, doubts and perspectives. *World J Stem Cells*, *10*(10), 134-137. doi:10.4252/wjsc.v10.i10.134
- Saad, A. M., Czul, F., Sakuraba, A., Rubin, D. T., & Cohen, R. D. (2016). Age of diagnosis is associated with disease presentation and therapeutic complications in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, *22*(5), 1027-1031. doi:10.1097/MIB.0000000000000732
- Salipante, S. J., Kawashima, T., Rosenthal, C., Hoogestraat, D. R., Cummings, L. A., Sengupta, D. J., *et al.* (2014). Performance comparison of Illumina and ion torrent next-generation sequencing platforms for 16S rRNA-based bacterial community profiling. *Appl Environ Microbiol*, *80*(24), 7583-7591. doi:10.1128/AEM.02206-14
- Schaffer, T., Muller, S., Flogerzi, B., Seibold-Schmid, B., Schoepfer, A. M., & Seibold, F. (2007). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies (ASCA) of Crohn's patients crossreact with mannan from other yeast strains, and murine ASCA IgM can be experimentally induced with *Candida albicans*. *Inflamm Bowel Dis*, *13*(11), 1339-1346. doi:10.1002/ibd.20228

- Schierova, D., Roubalova, R., Kolar, M., Stehlikova, Z., Rob, F., Jackova, Z., *et al.* (2021). Fecal microbiome changes and specific anti-bacterial response in patients with IBD during anti-TNF therapy. *Cells*, *10*(11). doi:10.3390/cells10113188
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., *et al.* (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(16), 6241-6246. doi:10.1073/pnas.1117018109
- Scott, B. M., Gutierrez-Vazquez, C., Sanmarco, L. M., da Silva Pereira, J. A., Li, Z., Plasencia, A., *et al.* (2021). Self-tunable engineered yeast probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Nat Med*, *27*(7), 1212-1222. doi:10.1038/s41591-021-01390-x
- Sendid, B., Colombel, J. F., Jacquinot, P. M., Faille, C., Fruit, J., Cortot, A., *et al.* (1996). Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's disease. *Clin Diagn Lab Immunol*, *3*(2), 219-226. doi:10.1128/cdli.3.2.219-226.1996
- Sendid, B., Cornu, M., Cordier, C., Bouckaert, J., Colombel, J. F., & Poulain, D. (2023). From ASCA breakthrough in Crohn's disease and *Candida albicans* research to thirty years of investigations about their meaning in human health. *Autoimmun Rev*, *23*(2), 103486. doi:10.1016/j.autrev.2023.103486
- Sendid, B., Jawhara, S., Sarter, H., Maboudou, P., Thierny, C., Gower-Rousseau, C., *et al.* (2018). Uric acid levels are independent of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) in Crohn's disease: A reappraisal of the role of *S. cerevisiae* in this setting. *Virulence*, *9*(1), 1224-1229. doi:10.1080/21505594.2018.1496779
- Sendid, B., Quinton, J. F., Charrier, G., Goulet, O., Cortot, A., Grandbastien, B., *et al.* (1998). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies in familial Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, *93*(8), 1306-1310. doi:10.1111/j.1572-0241.1998.00415.x
- Siegel, C. A., Horton, H., Siegel, L. S., Thompson, K. D., Mackenzie, T., Stewart, S. K., *et al.* (2016). A validated web-based tool to display individualised Crohn's disease predicted outcomes based on clinical, serologic and genetic variables. *Aliment Pharmacol Ther*, *43*(2), 262-271. doi:10.1111/apt.13460
- Silverberg, M. S., Satsangi, J., Ahmad, T., Arnott, I. D., Bernstein, C. N., Brant, S. R., *et al.* (2005). Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*, *19 Suppl A*, 5A-36A. doi:10.1155/2005/269076

- Sinha, R., Abnet, C. C., White, O., Knight, R., & Huttenhower, C. (2015). The microbiome quality control project: baseline study design and future directions. *Genome Biol*, *16*, 276. doi:10.1186/s13059-015-0841-8
- Sivignon, A., de Vallee, A., Barnich, N., Denizot, J., Darcha, C., Pignede, G., *et al.* (2015). *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 prevents colitis induced by AIEC bacteria in the transgenic mouse model mimicking Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, *21*(2), 276-286. doi:10.1097/MIB.0000000000000280
- Sivignon, A., Yu, S. Y., Ballet, N., Vandekerckove, P., Barnich, N., & Guerardel, Y. (2021). Heteropolysaccharides from *S. cerevisiae* show anti-adhesive properties against *E. coli* associated with Crohn's disease. *Carbohydr Polym*, *271*, 118415. doi:10.1016/j.carbpol.2021.118415
- Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H. P., Jegou, S., Landman, C., *et al.* (2016). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*. doi:10.1136/gutjnl-2015-310746
- Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H. P., Jegou, S., Landman, C., *et al.* (2017). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*, *66*(6), 1039-1048. doi:10.1136/gutjnl-2015-310746
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L. G., Gratadoux, J. J., *et al.* (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(43), 16731-16736. doi:10.1073/pnas.0804812105
- Specia, S., Giusti, I., Rieder, F., & Latella, G. (2012). Cellular and molecular mechanisms of intestinal fibrosis. *World J Gastroenterol*, *18*(28), 3635-3661. doi:10.3748/wjg.v18.i28.3635
- Specia, S., Rousseaux, C., Dubuquoy, C., Rieder, F., Vetuschi, A., Sferra, R., *et al.* (2016). Novel PPARgamma Modulator GED-0507-34 Levo ameliorates inflammation-driven intestinal fibrosis. *Inflamm Bowel Dis*, *22*(2), 279-292. doi:10.1097/MIB.0000000000000618
- Spehlmann, M. E., Begun, A. Z., Burghardt, J., Lepage, P., Raedler, A., & Schreiber, S. (2008). Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis*, *14*(7), 968-976. doi:10.1002/ibd.20380
- Standaert-Vitse, A., Jouault, T., Vandewalle, P., Mille, C., Seddik, M., Sendid, B., *et al.* (2006). *Candida albicans* is an immunogen for anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody markers of Crohn's disease. *Gastroenterology*, *130*(6), 1764-1775. doi:10.1053/j.gastro.2006.02.009

- Standaert-Vitse, A., Sendid, B., Joossens, M., Francois, N., Vandewalle-El Khoury, P., Branche, J., *et al.* (2009). *Candida albicans* colonization and ASCA in familial Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, *104*(7), 1745-1753. doi:10.1038/ajg.2009.225
- Sturm, A., Maaser, C., Calabrese, E., Annese, V., Fiorino, G., Kucharzik, T., *et al.* (2019). ECCO-ESGAR Guideline for diagnostic assessment in IBD Part 2: IBD scores and general principles and technical aspects. *J Crohns Colitis*, *13*(3), 273-284. doi:10.1093/ecco-jcc/jjy114
- Suarez Ferrer, C., Abadia Barno, M., Martin Arranz, E., Jochems, A., Garcia Ramirez, L., Poza Cordon, J., *et al.* (2019). The use of serum calprotectin as a biomarker for inflammatory activity in inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig*, *111*(10), 744-749. doi:10.17235/reed.2019.5797/2018
- Tang, J., Iliev, I. D., Brown, J., Underhill, D. M., & Funari, V. A. (2015). Mycobiome: Approaches to analysis of intestinal fungi. *J Immunol Methods*, *421*, 112-121. doi:10.1016/j.jim.2015.04.004
- Thielemann, N., Herz, M., Kurzai, O., & Martin, R. (2022). Analyzing the human gut mycobiome - A short guide for beginners. *Comput Struct Biotechnol J*, *20*, 608-614. doi:10.1016/j.csbj.2022.01.008
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J. F., & Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *Lancet*, *389*(10080), 1741-1755. doi:10.1016/S0140-6736(16)31711-1
- Torres, J., Petralia, F., Sato, T., Wang, P., Telesco, S. E., Choung, R. S., *et al.* (2020). Serum biomarkers identify patients who will develop inflammatory bowel diseases up to 5 years before diagnosis. *Gastroenterology*, *159*(1), 96-104. doi:10.1053/j.gastro.2020.03.007
- Underhill, D. M., & Braun, J. (2022). Fungal microbiome in inflammatory bowel disease: a critical assessment. *J Clin Invest*, *132*(5). doi:10.1172/JCI155786
- van Schaik, F. D., Oldenburg, B., Hart, A. R., Siersema, P. D., Lindgren, S., Grip, O., *et al.* (2013). Serological markers predict inflammatory bowel disease years before the diagnosis. *Gut*, *62*(5), 683-688. doi:10.1136/gutjnl-2012-302717
- Vavricka, S. R., Brun, L., Ballabeni, P., Pittet, V., Prinz Vavricka, B. M., Zeitz, J., *et al.* (2011). Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss inflammatory bowel disease cohort. *Am J Gastroenterol*, *106*(1), 110-119. doi:10.1038/ajg.2010.343
- Ventin-Holmberg, R., Eberl, A., Saqib, S., Korpela, K., Virtanen, S., Sipponen, T., *et al.* (2021). Bacterial and fungal profiles as markers of infliximab drug response in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*, *15*(6), 1019-1031. doi:10.1093/ecco-jcc/jjaa252

- Vestergaard, M. V., Allin, K. H., Eriksen, C., Zakerska-Banaszak, O., Arasaradnam, R. P., Alam, M. T., *et al.* (2024). Gut microbiota signatures in inflammatory bowel disease. *United European Gastroenterol J*, 12(1), 22-33. doi:10.1002/ueg2.12485
- Waitzberg, D., Guarner, F., Hojsak, I., Ianiro, G., Polk, D. B., & Sokol, H. (2024). Can the Evidence-based use of probiotics (notably *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 and *Lactobacillus rhamnosus* GG) mitigate the clinical effects of antibiotic-associated dysbiosis? *Adv Ther*, 41(3), 901-914. doi:10.1007/s12325-024-02783-3
- Wang, Y., Gao, X., Zhang, X., Xiao, F., Hu, H., Li, X., *et al.* (2021). Microbial and metabolic features associated with outcome of infliximab therapy in pediatric Crohn's disease. *Gut Microbes*, 13(1), 1-18. doi:10.1080/19490976.2020.1865708
- Wang, Z. Z., Shi, K., & Peng, J. (2017). Serologic testing of a panel of five antibodies in inflammatory bowel diseases: Diagnostic value and correlation with disease phenotype. *Biomed Rep*, 6(4), 401-410. doi:10.3892/br.2017.860
- Wu, X., Xia, Y., He, F., Zhu, C., & Ren, W. (2021). Intestinal mycobiota in health and diseases: from a disrupted equilibrium to clinical opportunities. *Microbiome*, 9(1), 60. doi:10.1186/s40168-021-01024-x
- Xue, Z., Kable, M. E., & Marco, M. L. (2018). Impact of DNA Sequencing and analysis methods on 16s rna gene bacterial community analysis of dairy products. *mSphere*, 3(5). doi:10.1128/mSphere.00410-18
- Zeng, L., Feng, Z., Zhuo, M., Wen, Z., Zhu, C., Tang, C., *et al.* (2022). Fecal fungal microbiota alterations associated with clinical phenotypes in Crohn's disease in southwest China. *PeerJ*, 10, e14260. doi:10.7717/peerj.14260

