



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 10859

To cite this version :

Cloup, Emilie. *Etude de l'effet mutagène lors d'une colonisation néonatale par une souche de Escherichia coli produisant la colibactine*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2013, 151 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

ETUDE DE L'EFFET MUTAGÈNE LORS D'UNE COLONISATION NÉONATALE PAR UNE SOUCHE DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUISANT LA COLIBACTINE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

CLOUP Emilie

Née, le 10 juillet 1988 à LIBOURNE (33)

Directeur de thèse : M. Gabriel CUEVAS-RAMOS

JURY

PRESIDENT :
M. Eric OSWALD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUS

ASSESEURS :
M. Gabriel CUEVAS-RAMOS
M. Claude PETIT

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES INVITES :
M. Jean-Philippe NOUGAYREDE
Mme Isabelle RAYMOND-LETRON

Chargé de Recherche à l'IHAP INRA-ENVT
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

**PROFESSEURS CLASSE
EXCEPTIONNELLE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1°
CLASSE**

- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2°
CLASSE**

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT
AGRICOLE**

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

**MAITRES DE CONFERENCES HORS
CLASSE**

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PRIYENKO Nathalie**, *Alimentation*

**MAITRES DE CONFERENCES (classe
normale)**

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
CONTRACTUELS**

Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

Remerciements

A Monsieur le Professeur Eric Oswald,

Professeur de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Bactériologie,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Mes hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur Claude Petit,

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pharmacie et Toxicologie,

Pour son soutien, ses conseils et ses encouragements,

Qui nous a fait l'honneur de participer à ce jury de thèse,

Mes sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Gabriel Cuevas-Ramos,

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Chirurgie Equine,

Pour m'avoir permis de travailler sur ce projet, encadrée et guidée tout au long de ce travail,

Mes sincères remerciements.

Je remercie Monsieur Eric Oswald, Vétérinaire et Professeur à la faculté de médecine de Toulouse, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et confié ce travail de recherche. Merci pour l'attention portée à mon travail, ainsi que pour votre aide et vos précieux conseils.

Je remercie également Monsieur Jean-Philippe Nougayrède, Chargé de Recherche à l'INRA, pour sa sympathie, sa disponibilité, ses idées et ses conseils, ainsi que pour son aide précieuse de tous les jours.

Un grand merci à Monsieur Gabriel Cuevas-Ramos, Maître de Conférences à l'ENVT, pour son aide, son soutien et sa gentillesse. Merci de m'avoir invité à suivre les pistes de la colibactine.

Je remercie Madame Isabelle Raymond-Letron, Maître de Conférences à l'ENVT, de m'avoir ouvert les portes du service d'Anatomie-Pathologique. Merci de me communiquer votre expérience de ce domaine et de m'accorder un peu de votre temps très précieux.

J'aimerais adresser un remerciement particulier à Mademoiselle Sophie Tronnet, doctorante au CPTP, pour sa bonne humeur, son humour et son amitié.

Mes remerciements à tous les membres du bureau, Michèle, Claude W., Marie, Nadège, Monique, Maryse, Morgan, Alpha, Nori; et les autres membres de l'équipe : Patricia, Fred, Claude P., Damien, Maïwen, Delphine, Thomas, Ayaka et Christophe.

Merci à Isabelle et Céline, techniciennes du service d'Anatomie-Pathologique de l'ENVT, pour la qualité de leur travail et leurs explications. Merci pour votre accueil et vos mots de réconfort.

Merci à Dean et à mes parents pour leur soutien et leurs encouragements, pour avoir accepté mes nombreuses absences.

Merci à mes p'tits Swiss sans qui je ne pourrais « chercher ».

Table des matières

Table des matières	13
Table des illustrations	17
Index des figures	17
Index des tableaux	19
Tables des abréviations	21
Résumé	23
Abstract	25
Introduction	27
Partie 1. Synthèse bibliographique	31
Chapitre 1. Le développement de la barrière colique chez la souris	31
1.1. Les défenses de la barrière intestinale.....	33
1.2. Composition cellulaire de l'épithélium colique.....	36
1.2.1. Les cellules souches intestinales.....	37
1.2.2. Les entérocytes coliques.....	40
1.2.3. Les cellules caliciformes et le gel de mucus.....	42
1.2.4. Les cellules entéroendocrines.....	44
1.2.5. Les cellules M.....	47
1.2.6. Les cellules tuft.....	47
1.2.7. Les cellules Paneth-like.....	48
1.3. Développement de la barrière colique chez l'Homme et la souris.....	50
1.4. Mise en place de la flore intestinale chez le nouveau-né.....	52
Chapitre 2. <i>Escherichia coli</i>, un hôte naturel de l'homme et de l'animal	54
2.1. <i>Escherichia coli</i> , une bactérie ubiquitaire des flores intestinales humaines et animales...54	
2.2. Déroulement de la primo-colonisation du nouveau-né par <i>Escherichia coli</i>58	
2.3. Diversité de l'espèce <i>Escherichia coli</i> par acquisition d'éléments génétiques mobiles...60	
2.4. La colibactine, une génotoxine bactérienne.....63	

2.4.1.	L'îlot génomique <i>pks</i>	63
2.4.2.	Prévalence du portage digestif de l'îlot <i>pks</i> dans les bactéries des flores intestinales adultes et infantiles.....	66
2.4.3.	Effets génotoxiques de la colibactine <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	68
Chapitre 3. Causes, réponse et conséquences des cassures double brin de l'ADN eucaryote.....		71
3.1.	Causes de cassures double brin.....	71
3.2.	Déroulement de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN.....	73
3.3.	Les histones H2AX phosphorylées, un biomarqueur sensible des sites de cassure double brin.....	76
3.4.	Mécanismes de réparation des cassures double brin.....	77
3.4.1.	La recombinaison homologue.....	78
3.4.2.	La jonction des extrémités non homologues.....	81
3.4.3.	L'appariement par simples brins homologues.....	82
3.5.	Conséquences des cassures double brin.....	83
Chapitre 4. Principe de l'essai de mutagenèse sélectif sur le gène <i>cII</i>.....		84
4.1.	Généralités sur le phage lambda.....	85
4.2.	La lignée de fibroblastes embryonnaires Big Blue Rat2.....	90
4.3.	Chronologie de l'essai de mutagenèse sélectif au locus <i>cII</i>	91
Partie 2. Etude expérimentale.....		95
Chapitre 1. Matériel et méthodes.....		95
1.1.	Culture et traitements des cellules Big Blue.....	95
1.2.	Extraction de l'ADN génomique.....	96
1.3.	Réaction d'encapsidation <i>in vitro</i>	97
1.4.	Culture de la souche G1250 de <i>E. coli</i>	98
1.5.	Criblage et vérification des mutants <i>cII</i>	99

1.6. Titration du nombre de plages de lyse criblées	100
1.7. Amplification et séquençage des locus <i>cII</i> mutés	101
1.8. Analyses statistiques.....	103
1.9. Souches et cultures bactériennes.....	103
1.10. Modèle animal de colonisation orale.....	103
1.11. Evaluation de la concentration bactérienne.....	104
1.12. Observation à l'état frais.....	104
1.13. Préparation des échantillons tissulaires.....	104
1.14. Immunohistochimie.....	105
1.15. Immunofluorescence.....	105
1.16. Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence.....	106
Chapitre 2. Résultats	107
2.1. La colibactine augmente la fréquence de mutations géniques dans des cellules eucaryotes infectées.....	107
2.2. Des <i>Escherichia coli</i> sont en contact avec l'épithélium intestinal de la naissance au sevrage des souriceaux.....	113
2.3. La distribution des cassures double brin induites par la colibactine varie selon le stade de développement de la barrière intestinale.....	118
Partie 3. Conclusion, discussion et perspectives	123
Agrément scientifique	129
Références bibliographiques	131
Annexes	147
Lexique	153

Note : Les mots soulignés dans le texte sont définis dans le lexique.

Table des illustrations

Index des figures

Figure 1. Place anatomique du côlon dans le système digestif chez la souris.....	32
Figure 2. Structure architecturale du côlon en couches concentriques.....	33
Figure 3. Architecture générale d'une crypte intestinale.....	37
Figure 4. Modèle des cellules « +4 ».....	39
Figure 5. Modèle des cellules souches cylindriques basales (CBC).	40
Figure 6. Structure et fonctions d'un entérocyte.	41
Figure 7. Des mucines au mucus.....	43
Figure 8. Les mucines forment une double couche de mucus sur la paroi colique.	44
Figure 9. Cellules M observées en microscopie électronique	47
Figure 10. Détection par immunohistofluorescence des cellules « tuft » intestinales.....	48
Figure 11. Les cellules de Paneth.....	49
Figure 12. Développement postnatal du côlon chez la souris.	51
Figure 13. <i>E. coli</i> sur la paroi intestinale.....	54
Figure 15. . Représentation schématique des six modes d'infection des <i>E. coli</i> entéropathogènes.	57
Figure 16. Sites d'infection des <i>E.coli</i> pathogènes.....	58
Figure 17. Niveau de colonisation du tractus digestif humain par <i>E. coli</i> au cours de la vie d'un individu.....	59
Figure 18. Localisation des antigènes de surface recherchés lors du sérotypage d'une souche de <i>E. coli</i>	60
Figure 19. Diversité phylogénétique des souches de <i>E. coli</i> analysée par la méthode de MLST.	61
Figure 20. Figure 19. Plasticité du génome de <i>E.coli</i>	62
Figure 21. La diversité génétique des <i>E. coli</i> commensales ou pathogènes résulte de l'acquisition d'éléments génétiques mobiles.....	63
Figure 22. Représentation schématique de l'îlot génomique <i>pks</i>	64
Figure 23. Structure putative de la colibactine d'après l'analyse <i>in silico</i>	65
Figure 24. Modifications morphologiques des cellules épithéliales en culture suite à un contact avec des <i>E. coli pks+</i>	68
Figure 25. Des cellules Hela exposées à la colibactine s'arrêtent temporairement au point de contrôle G2/M.	69
Figure 26. L'exposition à une souche de <i>E. coli</i> produisant la colibactine augmente l'apparition de ponts anaphasiques.....	69
Figure 27. La colibactine est génotoxique <i>in vivo</i> dans un modèle d'anse ligaturée de côlon.	70
Figure 28. Les différentes sources de cassures double brin.	73

Figure 29. Organisation de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN.	74
Figure 30. Etapes de recrutement du complexe MRN et d'activation de la kinase clé ATM lors du déclenchement de la réponse au dommage à l'ADN.....	76
Figure 31. Phosphorylation des histones H2AX, réorganisation structurale de la chromatine et visualisation des IRIF.....	77
Figure 32. Déroulement des étapes initiales de la recombinaison homologue.....	78
Figure 33. Les étapes successives de la recombinaison homologue.	80
Figure 34. Les trois voies de réparation par recombinaison homologue et leurs produits.	81
Figure 35. Les mécanismes de réparation par jonctions des extrémités non homologues.	82
Figure 36. La réparation par appariement entre simples brins entraîne une perte de matériel génétique.	83
Figure 37. Les deux modes d'infection du phage lambda.....	85
Figure 38. Structure et génome du phage lambda.	86
Figure 39. Régulation du cycle lytique.....	87
Figure 40. Activation des promoteurs p_{RE} et p_L	89
Figure 41. Activation du promoteur p_{RM}	90
Figure 42. Principe de la méthode de sélection positive des mutants <i>cII</i>	93
Figure 43. Criblage des mutants <i>cII</i>	107
Figure 44. Titration du nombre total de plages de lyse.	108
Figure 45. Fluorescence des souches de <i>E. coli</i> exprimant le gène <i>gfp</i> chromosomique, ou plasmidique, <i>in vitro</i> après fixation.	113
Figure 46. Détection des <i>E. coli</i> exprimant le gène <i>gfp</i> plasmidique <i>in vivo</i> après fixation.....	114
Figure 47. Les colibacilles produisant la colibactine établissent des contacts avec les cellules de l'épithélium intestinal au cours de la période périnatale.	115
Figure 48. <i>E. coli</i> au sein du microbiote intestinal chez le souriceau sevré.	116
Figure 49. Les <i>E. coli</i> peuvent être au contact des colonocytes chez les animaux sevrés.....	117
Figure 50. Détection des foyers γ -H2AX sur la muqueuse du côlon d'un souriceau colonisé par une souche génotoxique de <i>E. coli</i>	119
Figure 51. Représentation de la muqueuse du côlon et de ses compartiments cellulaires.	119
Figure 52. Analyse histologique de coupes de côlons de souriceaux de 5, 8 et 21 jours exposés (groupe WT) ou non (groupe $\Delta clbA$) à la colibactine.....	121

Index des tableaux

Tableau 1. Les principaux sous-types de cellules entéroendocrines et leurs sécrétions.....	45
Tableau 2. Conditions d'amplification du gène <i>cII</i>	101
Tableau 3. Estimation des fréquences de mutant <i>cII</i> dans des fibroblastes Big Blue exposés différents traitements mutagènes, dont la colibactine.....	108
Tableau 4. La colibactine accroît la fréquence de mutant <i>cII</i> dans des fibroblastes Big Blue de manière comparable à un traitement à la bléomycine (10 µM, 4h) ou une irradiation de type γ (0,5 Gy).	110
Tableau 5. Caractérisation des mutations sélectionnées sur le gène <i>cII</i>	110
Tableau 6. Spectres de mutation obtenus dans chaque groupe.....	111
Tableau 7. Pourcentage de cellules γ -H2AX positives au niveau de la muqueuse et de la sous-muqueuse.....	120

Table des abréviations

AAF : fimbriae d'adhésion agrégative (« aggregative adherence fimbria »)

$\alpha\beta$ dhg : $\alpha\beta$ déshydrogénase

ACP : protéine porteuse d'acyle (« acyl carrier protein »)

APUD: prise et décarboxylation de précurseur d'amine (« amine precursor uptake and decarboxylation »)

AT: acyle transférase

ATM: muté dans le syndrome d'ataxie télangiectasie (« ataxia telangiectasia mutated »)

ATR: muté dans le syndrome d'ataxie télangiectasie et apparenté à Rad3 («Ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related»)

ATRIP: protéine interagissant avec la protéine ATR (« ATR-interacting protein »)

BER : réparation par excision des bases (« base excision repair »)

BFP: pilus formant des faisceaux («bundle-forming pilus »)

BIR: réplication induite par cassure (« break-induced replication »)

BRCA1: cancer du sein 1 (« breast cancer 1 »)

BRCT (domain): (domaine) C terminale de BRCA1 (« BRCA1 C Terminus »)

CDB : cassure double-brin

CFA : antigène de facteur de colonisation (« Colonization factor antigen »)

Δ clbA : souche mutante pour le gène *clbA* de *E. coli*

CSB : cassure simple-brin

DAEC : *E. coli* à adhésion diffuse

DAF: facteur d'accélération d'inactivation (« decay-accelerating factor »)

DDR : réponse aux dommages à l'ADN (« DNA damage response »)

DNA-PKcs : sous unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'ADN

DO: densité optique

DSBR: réparation des cassures double brin (« double-strand break repair »)

E. coli : *Escherichia coli*

EAEC : *E. coli* entéroaggrégative

EAST1 : entéroaggrégative *E. coli* ST1

ECOR : « *Escherichia coli* reference collection »

EGFR : récepteur à l'EGF (« Epidermal growth factor receptor »)

EHEC : *E. coli* entérohémorragique

EIEC : *E. coli* entéroinvasive

EPEC : *E. coli* entéropathogène

ER : énoyl-réductase

ETEC : *E. coli* entérotoxigénique

FISH: hybridation *in situ* en fluorescence

GALT: tissu lymphoïde associé au tube digestif (« Gut-associated lymphoid tissue »)

hcdh : hydroxyl-acyl-CoA déshydrogénase

Hop 2: «Hsp70-Hsp90 Organizing Protein 2 »

HR: recombinaison homologue

IEL: lymphocytes intraépithéliaux

IgA: immunoglobuline A

IL: interleukine

IRIF: foyers radio-induits (« irradiation-induced foci »)

KS: kétoacyl synthase

KR : kétoacyl réductase

LB : bouillon de lysogénie (« lysogeny broth »)

Lgr5 : récepteur couplé aux protéines G contenant une séquence répétée riche en leucine 5 (« Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 »)

LT : entérotoxine thermolabile

MDC1: médiateur du point de contrôle 1 (« mediator of DNA damage checkpoint protein 1 »)

Mdn1: « midasin homolog 1 »

MLEE: analyse des isoenzymes par électrophorèse (« Multi-locus enzyme electrophoresis »)

MLST : « Multi-Locus Sequence Typing »

MMR : mécanisme de réparation des mésappariements (« Mismatch repair »)

MNEC : *E. coli* à méningites néonatales

MOI : multiplicité d'infection

Mre11: protéine 11 de recombinaison méiotique (« Meiotic Recombination protein 11 »)

MRN: complexe MRE11-RAD50-NBS1

Nbs1: « Nijmegen Breakage Syndrome protein 1 »

NER : réparation par excision des nucléotides (« nucleotide excision repair »)

NHEJ : jonction des extrémités non homologues (« non-homologous end-joining »)

NGS : sérum normal de chèvre

NRP : peptide non ribosomique

NRPS : synthase de peptide non ribosomique

ORI : origine de réplication unique

Pb : paire de bases

PCP : peptide porteur de protéine (« peptidyl carrier protein »)

PFA : paraformaldéhyde

PIKKS: (« phosphatidylinositol-3 kinase-related kinases »)

PKS: polykétide synthase

PM : poids moléculaire

Pol : polymérase

ROS : espèces réactives de l'oxygène (« reactive oxygen species »)

RPA : Protéine de Réplication A (« replication protein A »)

SDSA : « synthesis-dependant strand-annealing »

Ser : sérine

ShET1 : entérotoxine de *Shigella* 1

SL : synthèse translésion

SM : saline magnésium

SMC1: « structural maintenance of chromosome protein 1 »

SSA : appariement entre simples brins

ST : entérotoxine thermostable

TdT : déoxynucléotidyl transférase

TE : thioestérase

UPEC : *E. coli* uropathogène

UV : ultra-violet

Wnt : « wingless »

WT : sauvage (« wild type »)

XLF: (« XRCC4-like factor »)

XRCC4: X-ray repair cross-complementing protein 4

53BP1: (« tumor suppressor p53-binding protein 1 »)

9-1-1 : complexe Rad9p-Hus1p-Rad1p

ETUDE DE L'EFFET MUTAGENE LORS D'UNE COLONISATION NEONATALE PAR UNE SOUCHE DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUISANT LA COLIBACTINE

Résumé : *Escherichia coli* (*E. coli*) est l'une des principales bactéries commensales primo-colonisatrices du tractus intestinal du nouveau-né. Au sein de cette espèce bactérienne ubiquitaire, certaines souches possèdent un îlot génomique *pks* regroupant les gènes permettant la synthèse d'une génotoxine, la colibactine. Cette toxine induit des cassures double brin de l'ADN *in vitro* dans des cellules eucaryotes en culture et *in vivo* dans les cellules intestinales. La période néonatale est une période critique au cours de laquelle l'épithélium intestinal est directement exposé à ces bactéries primo-colonisatrices. Afin d'examiner les conséquences de la colonisation néonatale par des *E. coli* commensales produisant la colibactine, les objectifs de cette étude ont été (1) de déterminer la fréquence de mutation dans un gène rapporteur mobilisable (*cII*), intégré dans le génome de cellules eucaryotes infectées par une souche de *E. coli* porteuse de l'îlot génomique *pks*; (2) de cartographier dans un modèle de colonisation néonatale les sites de contact bactéries/cellules ainsi que les cellules dont l'ADN a été endommagé. La génération de mutants *cII* m'a permis de montrer une augmentation significative de la fréquence de mutant chez les cellules infectées par les bactéries *pks+*, et de constituer une banque de gènes *cII* mutés dont le séquençage permet de caractériser la nature des mutations induites par la colibactine. Mon travail a également mis en évidence *in vivo* la distribution spatiale dynamique des dommages à l'ADN, des glandes intestinales vers l'épithélium de surface, en fonction du développement de la muqueuse intestinale. L'ensemble de ce travail pose les bases de l'étude de la mutagenèse résultant de l'acquisition néonatale d'une souche de *E. coli* produisant la colibactine.

MUTAGENIC EFFECT FOLLOWING NEONATAL COLONIZATION BY A COLIBACTIN-PRODUCING ESCHERICHIA COLI STRAIN.

Abstract: *Escherichia coli* (*E. coli*) is one of the first commensal bacterium colonizing the intestinal tract of newborns. Within this highly versatile and ubiquitous bacterial species, some strains carry a genomic island *pks* containing the genes involved in the biosynthesis of a genotoxin named colibactin. This toxin induces DNA double-stranded breaks both *in vitro* in cultivated eukaryotic cells and *in vivo* in rodent intestinal cells. The peripartum period is a critical period during which the intestinal epithelium could be directly exposed to these early colonizing bacteria. In order to examine the consequences of the neonatal colonization by a colibactin-producing *E. coli* strain, the objectives of this project were (1) to determine the mutation frequency in a reporter gene (*cII*), integrated into the genome of eukaryotic cells infected by a *pks*⁺ *E. coli* strain, and (2) to map the contact points between bacteria and the intestinal tissue, and the DNA-damaged cells in a model of neonatal colonization. Generation of mutant *cII* allowed us to show a significant increase of *cII*-mutant frequency in cells infected by *pks*⁺ bacteria, and to construct a *cII*-mutant gene library of which sequencing permit to characterize the nature of colibactin-induced mutations. Our experiments have also put in light *in vivo* dynamic spatial distribution of DNA damage, from intestinal crypts to surface epithelium, in relation to the developmental stage of the intestinal mucosa. This work establishes a basis for the study of mutagenesis resulting from neonatal acquisition of a colibactin-producing *E. coli* strain.

Introduction

Escherichia coli (*E. coli*) est une bactérie ubiquitaire des flores intestinales (microbiote) humaines et animales (Kaper et *al.*, 2004). Au cours des premiers jours de vie, cette bactérie colonise rapidement et massivement le tractus digestif du nouveau-né. Avec plus de 10^9 bactéries par gramme de fèces, *E. coli* domine le microbiote jusqu'à l'expansion des bactéries anaérobies strictes (> 8 jours) (Penders et *al.*, 2006; Tenaillon et *al.*, 2010). Par la suite, elle se maintient de façon durable dans le microbiote intestinal de l'adulte, et y demeure l'espèce aéro-anaérobie facultative majoritaire de la flore sous dominante (Nowrouzian et *al.*, 2003). La plupart des *E. coli* ne provoque pas de pathologie chez l'hôte et appartient à la flore commensale (Tenaillon et *al.*, 2010). Néanmoins, *E. coli* est une espèce bactérienne très polymorphe. La grande plasticité de son génome résulte de l'acquisition d'éléments génétiques mobiles (plasmides, îlots génomiques, phages, intégrons, ...) dont certains portent des facteurs de virulence.

En 2006, l'équipe a découvert l'existence de l'îlot génomique *pks* regroupant les gènes permettant la synthèse d'une génotoxine nommée colibactine (Nougayrède et *al.*, 2006). L'infection *in vitro* de cellules en culture avec des *E. coli pks+* induit rapidement (4 heures) des dommages à l'ADN eucaryote. En réponse à ce stress génotoxique, les cellules recrutent un réseau de signalisation complexe qui organise une réponse plurielle incluant un contrôle du cycle cellulaire aux points de contrôle, une régulation de la transcription et une stimulation des mécanismes de réparation de l'ADN.

L'ADN peut être endommagé de multiples façons, allant de la simple modification de base ou de nucléotide aux lésions hautement cytotoxiques telles que les réticulations interbrins et les cassures double brin (CDB). Dès la détection du dommage, les protéines de réparation s'assemblent rapidement en suivant un ordre précis et forment une plateforme locale dynamique. Dans le cas des CDB, la phosphorylation des histones H2AX sur la sérine 139 est une étape clé dans l'initiation de ce processus. Les histones H2AX phosphorylée, appelées histones γ -H2AX, représentent ainsi des marqueurs sensibles et robustes des sites de coupures double brin. Une cellule qui a accumulé une grande quantité de dommages sur son ADN peut entrer dans un état de mort cellulaire programmée (apoptose, sénescence, ...). Si des

mécanismes de réparation existent, ils ne sont pas infaillibles. Les CDB persistantes ou incorrectement réparées peuvent conduire à des mutations génétiques et à des aberrations chromosomiques (délétion, translocation, perte de chromosome, état de polysomie, ...).

Lors d'une infection à faible dose avec des *E. coli* produisant la colibactine, peu de cellules entrent en apoptose. Ces cellules témoignent d'une réponse aux dommages à l'ADN de courte durée. Toutefois, la persistance de foyers d'histones H2AX phosphorylées dans les cellules qui récapitulent la division, et plus tardivement des remaniements chromosomiques, indique l'émergence fréquente d'une instabilité génétique (accumulation d'anomalies génétiques) suite à l'exposition à de faibles concentrations de colibactine (Cuevas-Ramos et al., 2010). Les rayonnements ionisants et certains composés cytotoxiques sont connus pour causer des cassures double brin et des mutations, comme les rayons de type γ et la bléomycine. Contrairement à ces deux agents, le mode d'action et le type exact de dommage induit par la colibactine reste à déterminer.

In vivo, *E. coli* domine le microbiote intestinal lors de la période néonatale, moment où la barrière intestinale est en maturation et vulnérable aux agressions extérieures. Des travaux récents du laboratoire indiquent qu'au cours d'une fenêtre temporelle périnatale (de J0 à J28 chez les rongeurs, la naissance correspondant à J0), les *E. coli* primo-colonisatrices produisant la colibactine sont capables d'induire des dommages à l'ADN dans les cellules intestinales (Payros et al., soumis). Des aberrations chromosomiques s'observent ensuite dans les cellules intestinales chez les rats adultes, suggérant la mise en place d'une instabilité chromosomique et une perte d'homéostasie consécutives à l'acquisition néonatale d'une souche *pks+* de *E. coli*. Cette instabilité chromosomique pourrait favoriser l'accumulation de mutations génétiques à l'origine de l'initiation et/ou de la progression d'un processus néoplasique. L'importance quantitative et/ou qualitative du portage asymptomatique des souches produisant la colibactine suscite donc de nombreuses interrogations sur la pathogénicité potentielle de ces bactéries génotoxiques, notamment dans l'étiologie du cancer colorectal sporadique (Hope et al., 2005; Lax, 2005). En effet, les souches commensales de *E. coli pks+* sont ubiquitaires. L'analyse du microbiome (ADN du microbiote) intestinal d'individus en bonne santé a permis par exemple de détecter les gènes de l'îlot *pks* chez près de 40% d'entre eux (Kurokawa et al., 2007), tout particulièrement chez les enfants et les nourrissons. En

effet, une étude menée sur 197 nouveau-nés par une pédiatre du laboratoire a montré que 54,3% des nouveau-nés de 3 jours hébergeaient au moins une souche de *E. coli* dont, pour 29% (n=31) d'entre eux, une souche porteuse de l'îlot *pks* (Payros et al, soumis). De façon remarquable, toutes les souches de *E. coli* produisant la colibactine appartiennent au groupe phylogénétique B2, le plus fréquemment associé au cancer colorectal (Buc et al., 2013).

Compte tenu de l'impact potentiel d'une colonisation périnatale par des souches de *E. coli* produisant la colibactine, cette étude a eu pour ambition (1) d'analyser les effets mutagènes de la colibactine en termes de fréquence de mutation et de nature (spectre) des mutations produites; et (2) de cartographier les sites de contact bactéries/cellules et les cellules dont l'ADN a été endommagé dans un modèle de colonisation néonatale.

Pour la première partie de cette étude, j'ai utilisé des cellules eucaryotes transgéniques en culture permettant de quantifier et de décrire les mutations générées par un carcinogène sur un gène rapporteur. Ce système utilise des fibroblastes de rat dont les chromosomes ont intégré de multiples copies d'un élément génétique mobilisable. Ce vecteur navette est construit à partir du génome du bactériophage λ . Les mutations sont enregistrées sur le locus *cII*. La sélection des phages est réalisée en fonction du statut mutationnel de la protéine cII, qui est déterminante dans la commutation entre les cycles lytique et lysogénique. Parallèlement à l'évaluation des fréquences de mutants induites par la colibactine et d'autres agents mutagènes de référence (bléomycine, rayonnement γ), j'ai constitué une banque de phages mutés sur *cII*. L'analyse des séquences des locus *cII* mutés m'a permis de déterminer les types de mutations occasionnées par la colibactine et de les comparer à celles générées par les autres agents mutagènes testés dont les modes d'action sont mieux connus. Les résultats de cet essai de mutagenèse incitent à étudier le potentiel mutagène de la colibactine chez des rongeurs Big Blue transgéniques pour le système rapporteur.

Afin de localiser les cellules génétiquement à risque *in vivo*, j'ai visualisé les zones de contact entre les colibacilles et les cellules intestinales, chez de jeunes souriceaux de 5 à 21 jours, à l'aide d'un marquage en fluorescence par hybridation *in situ* spécifique des *E. coli*. En effet, les effets cytopathiques liés à la colibactine sont tributaires d'une interaction directe hôte-bactérie, du moins *in vitro*.

Dans ce même modèle murin de nouveau-nés colonisés par une souche génotoxique de *E. coli*, ou par un mutant isogénique ne produisant plus la colibactine, j'ai étudié la distribution des cellules intestinales présentant des cassures double brin (γ -H2AX positives) en fonction du stade de développement de la barrière intestinale. La quantification de ces lésions pour chaque compartiment de la muqueuse (épithélium de surface, épithélium glandulaire, lamina propria) souligne la complexité des relations entre les *E. coli pks+* et leur hôte au cours du premier mois de vie. Les cellules bordant la lumière des glandes de Lieberkühn, dont les cellules souches intestinales, semblent particulièrement à risques génétiques.

Partie 1. Synthèse bibliographique

Hébergeant environ 100 000 milliards de bactéries, notre tractus digestif est un véritable écosystème microbien. Cette population bactérienne intestinale (ou microbiote intestinal) s'acquiert à la naissance depuis l'environnement proche du nourrisson. La structure et la diversité microbiennes se stabilisent vers l'âge de 2-3 ans et déterminent les fonctions de cet organe à part entière. Dès sa mise en place, un réel dialogue s'établit entre les bactéries endosymbiotiques et leur hôte. Ces échanges contribuent à la fois au maintien de l'écologie intestinale et l'équilibre digestif de l'hôte.

Avant d'étudier la relation hôte-bactérie établie par les *E. coli* produisant la colibactine, ce chapitre présentera premièrement la mise en place de la barrière colique et de la flore intestinale lors de la période périnatale. Puis, nous parlerons des grandes généralités du genre bactérien *E. coli* et replaceront les bactéries produisant la colibactine au sein de ce groupe. Afin de mieux comprendre les conséquences induites par cette toxine, nous détaillerons les voies de signalisation déclenchées et les mécanismes de réparation activés suite à une CDB de l'ADN. Enfin, le principe de l'essai de mutagenèse utilisé sera exposé afin de faciliter la compréhension des résultats exposés.

Chapitre 1. Le développement de la barrière colique chez la souris

Lors de sa colonisation, *E. coli* s'établit dans le côlon, et plus précisément dans le gel de mucus (Chang et *al.*, 2004). Anatomiquement, le côlon - aussi appelé gros intestin – fait suite à l'intestin grêle et au caecum et se termine en avant du rectum (Figure 1)

Le tractus digestif est responsable de l'ingestion et de la digestion des aliments ; de l'absorption d'eau, d'ions et de nutriments ; et de l'élimination des substances non digérées. Situé entre le caecum et le rectum, le côlon (ou gros intestin) poursuit l'absorption d'eau, d'électrolytes et de vitamines qu'il tire des résidus alimentaires indigestibles et les transforme en matières vouées à l'élimination.

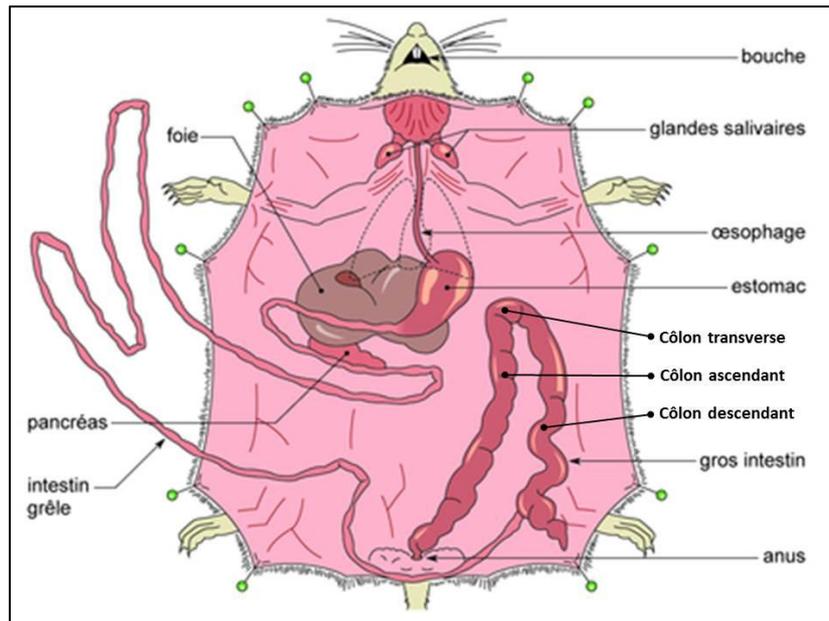


Figure 1. Place anatomique du côlon dans le système digestif chez la souris.

Le côlon, ou gros intestin, se situe entre le cæcum et le rectum. En fonction de sa position anatomique, on distingue trois portions (du côté proximal à distal) : le côlon ascendant, le côlon transverse et le côlon descendant.

Comme le reste du tractus digestif, le côlon est formé de cinq tuniques concentriques (Figure 2) que l'on nomme (du lumen vers la périphérie) :

- une **muqueuse** constituée d'un épithélium reposant sur un tissu conjonctif lâche appelé chorion ou lamina propria ;
- une **musculaire muqueuse** (ou muscularis mucosæ) très fine composée de fibres musculaires lisses ;
- une **sous-muqueuse** conjonctive qui contient des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques. On y trouve également le plexus nerveux de Meissner ;
- une **musculeuse** épaisse composée de deux couches de fibres musculaires lisses : une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe. Ces deux tuniques sont séparées par le plexus myentérique d'Auerbach ;
- une **séreuse** qui correspond à un épithélium simple recouvrant un tissu conjonctif. Précisément, cette séreuse correspond au feuillet viscéral de la séreuse péritonéale.

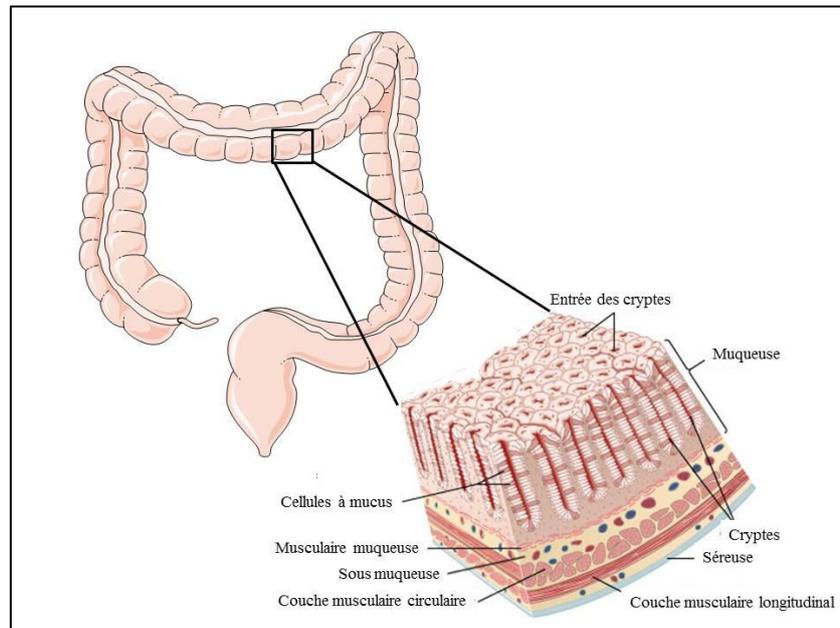


Figure 2. Structure architecturale du côlon en couches concentriques.

De l'intérieur vers l'extérieur, le côlon est composé de 5 tuniques : la muqueuse et la lamina propria) limitées par la musculaire muqueuse, la musculature et la séreuse.

Du côté luminal, les intestins sont tapissés par un gel de mucus qui constitue la niche écologique principale de *E. coli* dans cet écosystème. Par ailleurs, la plupart des interactions établies entre *E. coli* et son hôte se réalise à l'interface séparant le milieu extérieur (la lumière intestinale) du milieu intérieur (ensemble de l'organisme à l'exception des épithéliums de surface) matérialisé par l'épithélium intestinal.

L'épithélium intestinal est l'une des barrières de la paroi intestinale qui s'oppose aux agressions extérieures (Yu et *al.*, 2012). Avant de décrire davantage la structure histologique du côlon et de son épithélium, précisons quels sont les moyens de défense mis en place au niveau de la barrière intestinale.

1.1. Les défenses de la barrière intestinale

L'intestin a pour fonctions premières d'assurer la poursuite de la digestion, l'absorption et l'assimilation des nutriments. Néanmoins, la paroi intestinale remplit un rôle de barrière primordial en s'opposant aux agressions d'origine extérieure.

L'intestin est doué d'une motilité péristaltique qui brasse et propulse le chyme alimentaire et les bactéries. Ces mouvements freinent le développement des bactéries et empêchent leur adhérence à l'épithélium. Cet effet mécanique représente une première ligne de défense.

Essentielle à la digestion et l'absorption, la flore bactérienne est aussi une barrière biologique qui s'oppose à l'implantation de nouvelles bactéries potentiellement pathogènes (Ohland and MacNaughton, 2010). Suite à l'ingestion de bactéries inconnues de la flore, une compétition commence entre les nouvelles arrivantes et le microbiote intestinal résident. Chaque bactérie cherche à capter les nutriments indispensables à sa croissance et à échapper aux dangers représentés par les substances microbicides (d'origine bactérienne ou cellulaire) et les effecteurs de la réponse immunitaire. Les bactéries de la flore, premières arrivantes, occupent en masse la niche écologique de l'intestin et bénéficient de cet avantage.

Comme mentionné précédemment, l'épithélium constitue une barrière physique contre la plupart des agents infectieux. Les défenses mises en place par la barrière épithéliale sont triples. L'étanchéité entre les cellules épithéliales est permise par des jonctions serrées qui évitent la diffusion intercellulaire de molécules et de microorganismes (Ivanov, 2012). Les microorganismes, s'ils quittent le bol alimentaire, sont capturés dans un gel de mucus qui recouvre l'épithélium (Liévin-Le Moal and Servin, 2006). Le mucus participe à l'élimination de certains pathogènes : il contient des substances antimicrobiennes et des immunoglobulines A sécrétées et il favorise l'élimination du contenu luminal par péristaltisme. Les cellules de Paneth, situées au fond des cryptes de Lieberkühn, sécrètent de nombreuses substances antimicrobiennes (lysozyme, défensines, cryptines, ...). Parmi les cellules composant l'épithélium, on rencontre parfois des lymphocytes intraépithéliaux (IEL) (10 à 20 IEL pour 100 entérocytes) qui appartiennent à la quatrième ligne de défense : l'immunité mucoale intestinale (Montufar-Solis et al., 2007).

La muqueuse intestinale est associée à un tissu lymphoïde secondaire communément appelé GALT (« Gut-associated lymphoid tissue »). Du fait de la superficie considérable de l'intestin (de l'ordre de 300 m² chez l'homme), le GALT est l'organe lymphoïde le plus étendu,

regroupant près de 80% des cellules immunitaires. Il est divisé en différents sites dits effecteurs ou inducteurs selon leur rôle dans les réactions immunitaires.

Les sites inducteurs regroupent différentes structures : les follicules lymphoïdes isolés, les plaques de Peyer et les nœuds lymphatiques mésentériques. Ces tissus lymphoïdes sont déterminants dans la mise en place des réponses immunes du tube digestif qu'elles soient immunogènes ou tolérogènes.

Les sites effecteurs sont des infiltrats de cellules immunes plus ou moins denses. Dans la lamina propria, on retrouve des lymphocytes CD8⁺ et CD4⁺, des macrophages, des cellules dendritiques, des mastocytes, des plasmocytes à IgA et très peu de polynucléaires chez les individus sans pathologie intestinale. Le deuxième site effecteur est formé par les IEL.

La flore bactérienne participe activement au développement de l'immunité mucoale en éduquant les lymphocytes T naïfs, en induisant des facteurs proinflammatoires ou encore en favorisant une réponse tolérogène via la production d'interleukine (IL) 10 et la stimulation des lymphocytes T régulateurs (Castro-Sánchez and Martín-Villa, 2013).

A la naissance, la muqueuse intestinale est encore très immature et vulnérable. Les différentes lignes de défense se mettent progressivement en place au cours des premières semaines de vie. Le développement et la maturation de la barrière épithéliale sont des événements clés de la santé du nouveau-né. On distingue quatre lignées de cellules épithéliales dérivées des cellules souches, situées au fond des cryptes intestinales. Par division asymétrique, une cellule souche intestinale donne naissance à une cellule souche qui maintient le réservoir souche et à une cellule progénitrice qui migre le long de l'axe cryptique. Au cours de sa progression, le progéniteur se différencie soit en cellule épithéliale absorbative (entérocytes), soit en cellules sécrétoires (cellules caliciformes à mucus, cellules entéroendocrines, cellules de Paneth) (van der Flier and Clevers, 2009).

1.2. Composition cellulaire de l'épithélium colique

La muqueuse colique se présente comme épithélium unistratifié prismatique bordant la lumière intestinale et qui s'invagine dans la lamina propria. Cette architecture en cryptes est parfois interrompue par des formations lymphoïdes (Plaque de Peyer, follicules lymphoïdes). Bien que continu, on distingue deux épithéliums coliques selon leur localisation histologique :

- **L'épithélium de surface** est composé principalement de cellules absorbantes (ou colonocytes, ou entérocytes coliques) et de cellules caliciformes (ou cellules en gobelet). Ce tissu joue un rôle majeur dans la physiologie de l'organe. On y retrouve également quelques lymphocytes intraépithéliaux logés entre les colonocytes.

- **L'épithélium des cryptes** est plus hétérogène mais très structuré (Figure 3). Dans la portion supérieure des cryptes, côté luminal, on y retrouve quelques entérocytes et des cellules à mucus plus nombreuses, ainsi que des populations plus rares comme les cellules entéroendocrines et les cellules en houppes (ou « tuft »). Cette région luminale des cryptes, où les cellules ne peuvent plus se diviser et poursuivent leur différenciation, constitue une zone de maturation. Juste au-dessous, dans la zone basale, on observe une population niche de cellules transitoires à division rapide. Très prolifératives, chez la souris, ces cellules progénitrices réalisent 4 à 6 divisions lors d'un cycle de 12 heures, et produisent de 16 à 32 cellules épithéliales qui progressent vers la zone de maturation. A l'origine de l'ensemble des lignées intestinales, les cellules souches se situent à la base des cryptes. Elles s'intercalent entre des cellules sécrétoires qui jouent un rôle similaire aux cellules de Paneth de l'intestin grêle. Ces cellules « Paneth-like » sont essentielles au maintien de la niche des cellules souches qui compte environ une quinzaine de cellules par crypte. Une deuxième population souche a été décrite. Localisées en position « +4 » (la position « 0 » correspondant au fond de la crypte), ces cellules constitueraient une réserve de cellules souches intestinales.

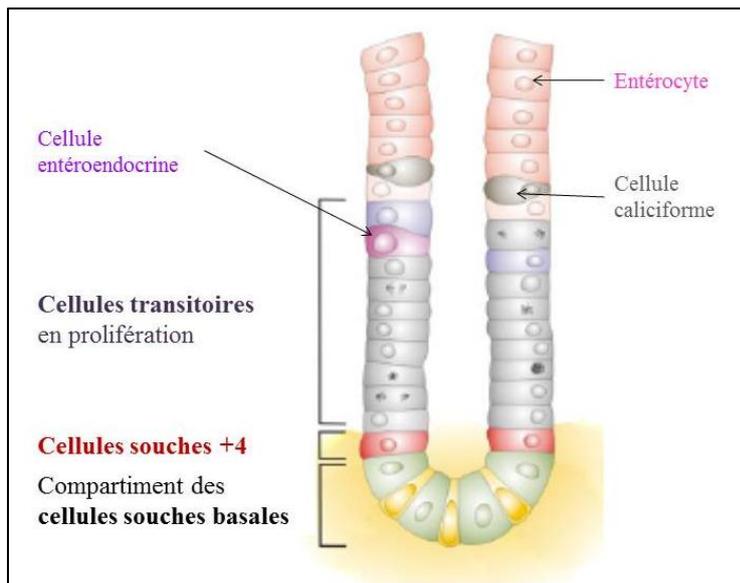


Figure 3. Architecture générale d'une crypte intestinale.

(D'après Barker et al., 2010). L'épithélium colique est un tissu très structuré qui résulte de l'évolution coordonnée de ses différentes lignées cellulaires au cours du temps et de l'espace.

1.2.1. Les cellules souches intestinales

L'épithélium colique se singularise par la rapidité de son renouvellement. Ce tissu, soumis à d'importantes contraintes mécaniques, chimiques et biologiques, nécessite d'être presque entièrement renouvelé tous les 1 à 5 jours chez les mammifères (3 jours chez la souris, 5 jours chez l'Homme) (Moore and Lemischka, 2006). Ce temps de renouvellement est déterminé par la durée de migration des cellules intestinales depuis le compartiment basal jusqu'à la surface luminale. Dans certaines conditions pathologiques, le renouvellement de l'épithélium intestinal peut être ralenti (ex : malnutrition) ou accélérée (ex : inflammation de la muqueuse).

Les cellules souches à l'origine de l'ensemble des lignées épithéliales intestinales se situent dans la région basale des cryptes. Deux populations souches ont été décrites d'après les différences de leurs profils d'expression moléculaire et le devenir de leurs cellules filles.

Les cellules souches cylindriques intercalées entre les cellules de Paneth (ou « columnar base cells » (CBC)) expriment fortement le récepteur Lgr5 (« Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 ») qui participe à la transduction du signal Wnt (« wingless »). Cette voie de signalisation, complétée des signaux issus de l'activation des récepteurs Notch et EGFR (« Epidermal Growth Factor Receptor »), est essentielle au maintien d'un caractère souche. Dans la zone basale, une quatrième famille de facteurs, les R-spondines, agit en synergie avec les facteurs Wnt en renforçant leur interaction avec le récepteur Frizzled. On

observe un gradient inverse le long de l'axe cryptique dont l'existence détermine le sens de migration des cellules filles et leur différenciation.

Dans la niche des cellules basales, quelques cellules conservent après plusieurs cycles de division des analogues de nucléotidiques, comme le bromodéoxyuridine (BrdU). Ces cellules retenant le BrdU pourraient indiquer une sous-population cellulaire déjà décrite, les cellules souches en position « +4 ». Plusieurs marqueurs plus ou moins spécifiques ont été proposés pour repérer ces cellules : Bmi1, Tert, HoxP, Lrig1, entre autres. Selon certains auteurs, les cellules « +4 » sont quiescentes et conservent un potentiel « souche » leur permettant de redonner des cellules Lgr5⁺ lors de lésions tissulaires dans le compartiment souche. Pour d'autres auteurs, ces cellules entrent en division toutes les 24 heures environ et ne seraient donc pas quiescentes. Le partage du génome pourrait être asymétrique : la cellule souche mère conservant le brin originel. De façon intéressante, une autre sous-population cellulaire exprimant à la fois le marqueur Lgr5⁺ et de nombreux marqueurs des cellules « +4 » a été identifiée. En conditions normales, ces cellules à division lente sont à l'origine des précurseurs des cellules de Paneth. Comme décrit précédemment, en cas de dommages tissulaires, elles sont également capables de produire de véritables cellules souches multipotentes.

Malgré le nombre croissant d'études, l'identité des cellules souches intestinales fait encore l'objet de nombreux débats. Deux modèles principaux ont été proposés : le modèle des cellules « +4 » proposé par Potten *et al.* ; et celui des cellules souches CBC décrit par Bjerkas *et al.*

D'après le modèle des cellules souches « +4 » (Figure 4), les cellules souches intestinales sont situées spécifiquement à la position « +4 » qui correspond aussi précisément à l'origine du point de migration des cellules transitoires et des cellules épithéliales en cours de différenciation. Ces cellules retenant le BrdU sont extrêmement sensibles aux rayonnements X et γ , deux caractéristiques typiques des cellules souches. De plus, l'expression de Bmi1, un gène connu pour être impliqué dans le maintien du caractère souche, est augmentée dans les cellules « +4 ».

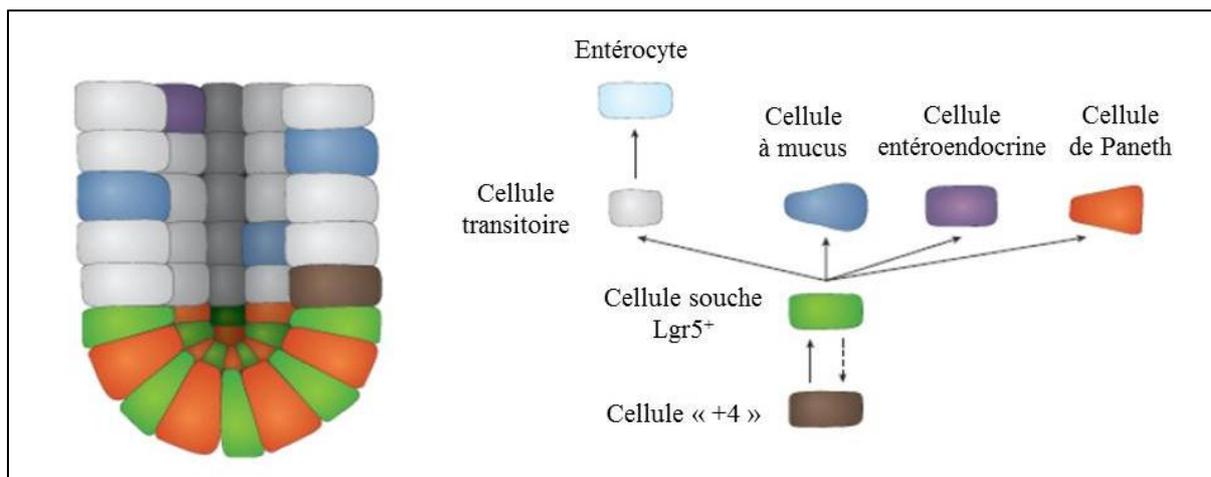


Figure 4. Modèle des cellules « +4 ».

(D'après Stange and Clevers, 2013). D'après l'organisation de l'épithélium intestinal proposée par Potten et *al*, les cellules souches CBC proviendraient de cellules « +4 », la position « 0 » correspondant à la base des cryptes. Les cellules souches CBC $Lgr5^+$ se divisent de façon asymétrique. Les cellules filles vont soit maintenir l'expression d'un programme souche, soit proliférer rapidement puis se différencier en entérocyte, en cellule à mucus, en cellule entéroendocrine ou en cellule de Paneth en fonction des signaux intégrés.

A l'inverse, le deuxième modèle (Figure 5) est centré sur les cellules souches CBC d'après une série d'études en microscopie électronique décrivant le comportement de ces cellules immatures intercalées entre les cellules de Paneth aux positions 1 à 4. Afin de confirmer l'identité de ces cellules comme cellules souches intestinales, des études de mutagenèse ont montré que 90% des cryptes qui contenaient deux sous-populations mutantes de cellules différenciées, renfermaient également deux sous-populations mutantes de cellules CBC. Ce travail indique que les cellules CBC seraient à l'origine de ces différentes lignées. D'autres études basées sur des stratégies de traçage de lignage cellulaire ont clairement défini les cellules CBC comme étant les véritables cellules souches intestinales ; et ont révélé les mécanismes par lesquels l'équilibre entre prolifération et différenciation était maintenu. Ensemble, ces études suggèrent que les cellules souches intestinales opèrent au sein d'un environnement dynamique et complexe ; et dans lequel la perte de cellules est compensée par la prolifération des cellules souches voisines.

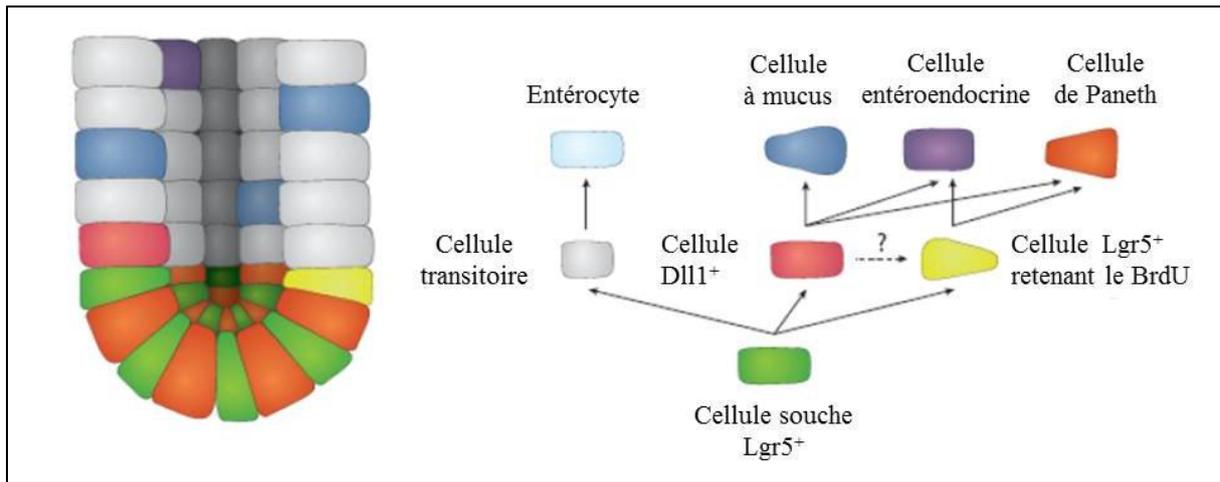


Figure 5. Modèle des cellules souches cylindriques basales (CBC).

(D'après Stange and Clevers, 2013). Dans ce second modèle, les cellules CBC sont considérées comme étant les « véritables » cellules souches intestinales. Elles peuvent à elles seules redonner tous les types cellulaires intestinaux.

1.2.2. Les entérocytes coliques

Représentant près de 80% des cellules épithéliales, les entérocytes sont les cellules épithéliales intestinales les plus nombreuses (de Santa Barbara et *al.*, 2003). Au niveau du côlon, les colonocytes (ou cellules épithéliales coliques, ou entérocytes coliques) sont des cellules différenciées solidaires les unes des autres par un système de jonctions formant un épithélium prismatique simple. Ces cellules épithéliales sont spécialisées dans le transport (ou absorption) sélectif des nutriments et des ions. Soumises à de nombreux stress, les entérocytes sont renouvelés environ tous les 3 jours chez la souris (de Santa Barbara et *al.*, 2003).

L'organisation structurelle de ce tissu polarise le sens du flux de la lumière vers le milieu intérieur. Les jonctions serrées, distribuées en ceinture, assurent l'étanchéité de l'épithélium et participent à la sélectivité du transport. Lorsque l'épithélium est intact, seules les molécules d'eau peuvent emprunter la voie paracellulaire en suivant un gradient de sodium (Na^+) (Figure 6). Les nutriments et autres molécules résultant de la digestion traversent l'épithélium par la voie transcellulaire. Ces substances sont internalisées au pôle apical par endocytose ou par des protéines de transport (porines, transporteurs, pompes), de manière passive (diffusion) ou active nécessitant un apport d'énergie. La membrane plasmatique apicale possède de

nombreuses microvillosités recouvertes d'un glycocalix formant une structure spécialisée, appelée bordure en brosse, qui augmentent la surface d'absorption. Les nutriments sont ensuite véhiculés jusqu'au pôle basal où ils sont délivrés dans le milieu intérieur avant de passer dans la circulation sanguine (Figure 6).

Les cellules épithéliales coliques expriment de nombreux facteurs à activité autocrine, paracrine ou endocrine sur de nombreux types cellulaires. La synthèse et la sécrétion de ces médiateurs sont modulées par des cytokines, des facteurs de croissance, des hormones et autres molécules de signalisation présentes dans le milieu extracellulaire (Figure 6). Cette régulation est un processus dynamique qui varie en fonction de l'âge de l'individu et du contexte physiopathologique.

Enfin, les entérocytes participent également à la mise en place de l'immunité mucoale. Ils présentent des antigènes exogènes et contribueraient à la tolérance orale (Snoeck et *al.*, 2005) (Figure 6).

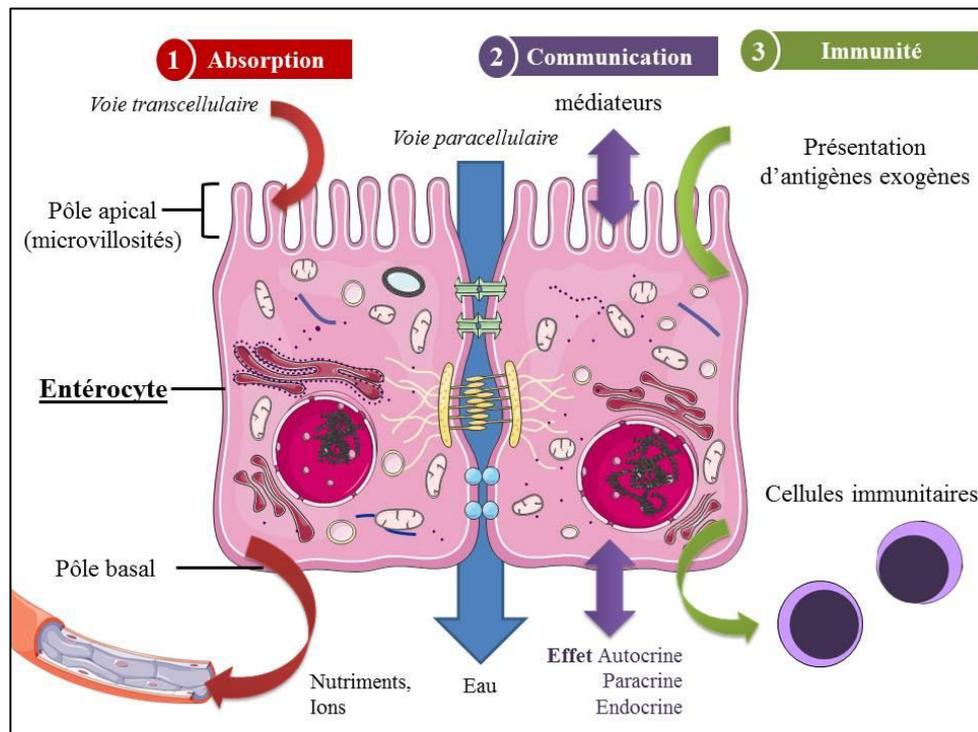


Figure 6. Structure et fonctions d'un entérocyte.

Les entérocytes sont des cellules épithéliales jointives et polarisées dont la principale fonction est l'absorption sélective d'eau, d'ions et de nutriments résultant de la digestion. Ces cellules sécrètent

également de nombreux médiateurs à activité autocrine, paracrine ou endocrine, dont l'expression est elle-même modulée par des facteurs présents dans le milieu extracellulaire. Enfin, les entérocytes sont capables de présenter des antigènes exogènes aux lymphocytes de la muqueuse intestinale. Ils participeraient ainsi à la mise en place de la tolérance orale des peptides issus de l'alimentation.

1.2.3. Les cellules caliciformes et le gel de mucus

Les mucocytes (ou cellules à mucus, ou cellules caliciformes, ou cellules à gobelet) sont des cellules épithéliales glandulaires qui sécrètent des mucines et les exportent vers le lumen par un processus de sécrétion mérocrine ou apocrine. Des projections villositaires de leur membrane plasmique apicale augmentent la surface de sécrétion. Les mucocytes sont à la fois des cellules sécrétoires et de stockage puisque la majeure partie du cytoplasme est occupée par des granules sécrétoires contenant les mucinogènes. Le noyau et les autres organites se concentrent au pôle basal. Comme les entérocytes, les cellules caliciformes sont renouvelées tous les 3 jours chez la souris (de Santa Barbara et *al.*, 2003).

Les mucines sont des polymères glycoprotéiques filamenteux de haut poids moléculaire (PM). Leur squelette polypeptidique porte des milliers (70-80% du PM) de polysides liés par des liaisons O-glycosidiques. Quatre oligosaccharides sont retrouvés en majorité dans les mucines : le N-acétylglucosamine, le N-acétylgalactosamine, le fucose et le galactose. Ces chaînes O-glycaniques sont souvent terminées par un acide sialique ou un sulfate déterminant la nature polyanionique des mucines à pH neutre. L'addition post-traductionnelle de chaînes glycosylées sur le squelette peptidique des mucines est réalisée par des glycosyl-transférases membranaires spécifiques dans l'appareil de Golgi.

Deux grandes familles de mucines sont distinguées : les mucines sécrétées dites « vraies » (Muc2, Muc5AC, Muc5B, Muc6, etc) et les mucines transmembranaires parfois encore appelées « mucin-like » (Muc1, Muc3, Muc4, Muc13, etc). Plusieurs gènes codant pour des mucines ont été identifiés à ce jour. Le gène *MUC2* code pour la protéine MUC2 qui est la mucine sécrétée la plus représentée dans le gel de mucus intestinal (McGuckin et *al.*, 2011).

Sécrétées dans la lumière intestinale, les mucines se dissolvent dans l'eau et établissent entre elles des ponts disulfures (Figure 7). Elles forment un gel visqueux, le mucus, qui tapit la surface de l'épithélium, la protège et la lubrifie.

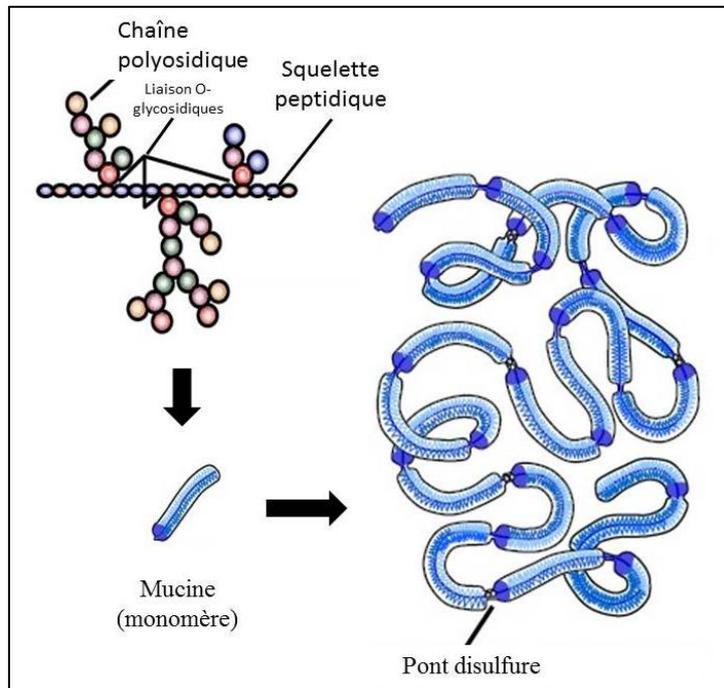


Figure 7. Des mucines au mucus.

Les mucines sont des glycoprotéines sécrétées par les cellules caliciformes à mucus, qui se lient entre elles via des ponts disulfures et s'organisent en un réseau tridimensionnel, la couche de mucus. Au niveau du côlon, la couche de mucus est hétérogène (Figure 8). Certains auteurs distinguent une couche externe plus lâche et facilement éliminée par les mouvements péristaltiques (Johansson et *al.*, 2008) ; d'une couche interne, dense, adhérente à l'épithélium et « stérile ». L'imperméabilité de cette couche est encore controversée à l'heure actuelle. Notamment lors d'une inflammation de la muqueuse, des bactéries peuvent y être observées (Johansson et *al.*, 2013).

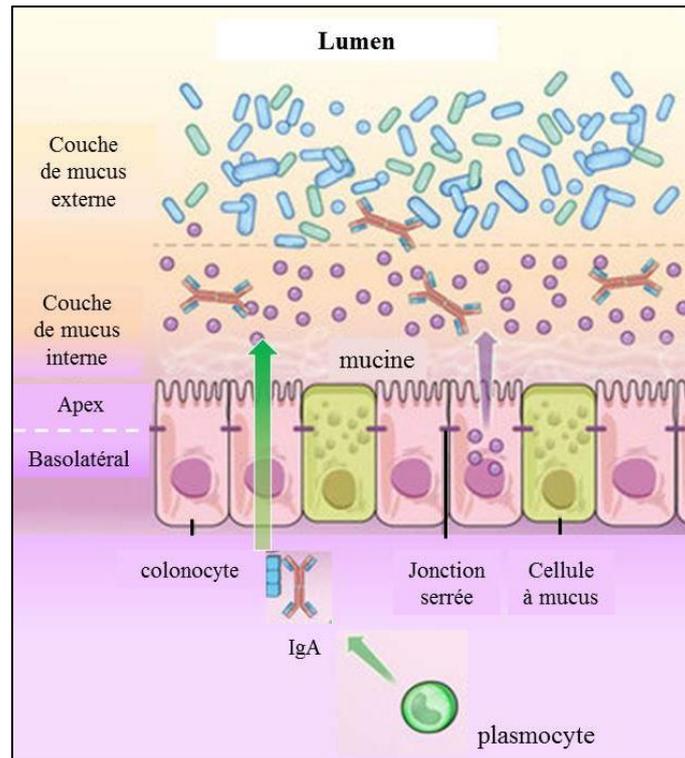


Figure 8. Les mucines forment une double couche de mucus sur la paroi colique.

(Maynard et *al.*, 2012). Les mucines sécrétées par les cellules à mucus polymérisent dans la lumière intestinale et forment un gel visqueux hyalin appelé mucus. Au niveau du côlon, on distingue une couche de mucus adhérente à l'épithélium et quasi-stérile ; d'une couche extérieure lâche et facilement éliminée avec les résidus alimentaires.

Par ailleurs, récemment, McDole et *al.* ont montré que les cellules à gobelet auraient un rôle dans la tolérance orale. Après avoir capturé des antigènes dans la lumière, elles les présenteraient préférentiellement aux cellules dendritiques CD103⁺ qui induisent la différenciation de lymphocytes T_{reg}. Par la suite, les lymphocytes T_{reg} inhibent les réponses immunitaires dirigées contre ces antigènes issus de produits dérivés de notre alimentation (McDole et *al.*, 2012).

1.2.4. Les cellules entéroendocrines

A ce jour, une trentaine d'hormones ont été identifiées parmi les sécrétions du tractus gastro-intestinal, si bien que l'intestin a été décrit comme l'organe le plus étendu du système endocrinien (Ann. Oncol., 12, 2003, S63).

Si les cellules entéroendocrines (ou cellules neuroendocrines, ou cellules APUD (« Amine Precursor Uptake and Decarboxylation »)) représentent moins de 1% des cellules épithéliales intestinales (Noah et *al.*, 2011), ce sont les plus nombreuses cellules endocrines de l'organisme. Plus de 16 sous-types de cellules entéroendocrines ont été identifiés dans l'intestin chez la souris. Comme les autres cellules sécrétoires (à l'exception des cellules de Paneth), ces cellules se localisent dans la moitié inférieure de l'épithélium bordant les cryptes, au-dessus de la zone transitionnelle des cellules progénitrices ; et espacées les unes des autres par au moins une cellule non endocrine.

Les cellules entérochromaffines sont des cellules entéroendocrines et neuroendocrines avec une similarité proche des cellules chromaffines de la glande médullosurrénale qui sécrètent la sérotonine. En réponse à des stimuli variés, elles produisent des hormones et des peptides. Trois types de communication peuvent être réalisés selon le mode de transport de ces messagers :

- La signalisation endocrine repose sur une molécule-signal (appelée hormone) sécrétée par une cellule endocrine et transportée dans la circulation sanguine pour agir sur une cible à distance.
- La voie paracrine fait intervenir une molécule-signal agissant localement pour réguler l'activité de cellules voisines de la cellule émettrice du signal.
- On parle de communication autocrine lorsque la cellule émettrice répond elle-même aux molécules-signaux qu'elle produit.

Les cellules entéroendocrines de l'intestin sont des chémorécepteurs initiant les actions digestives et les réponses protectrices en détectant des substances dangereuses. Les principales cellules endocrines retrouvées dans l'intestin sont indiquées dans le tableau 1, ainsi que leurs sécrétions et leurs fonctions premières dans la physiologie gastro-intestinale.

Tableau 1. Les principaux sous-types de cellules entéroendocrines et leurs sécrétions.

(D'après Moran-Ramos et *al.*, 2012). Abréviations : IG, intestin grêle ; prox., proximal ; dist., distal.

Type cellulaire	Peptide	Localisation digestive	Autres localisations	Propriétés
A ou X	Ghréline	Estomac	Cellules Epsilon du pancréas	Régule la sécrétion d'acide gastrique.
G	Gastrine	Antre de l'estomac, pylore	-	Stimule la prise alimentaire.
EC	Sérotonine		Système nerveux central	Régule la température corporelle, les comportements alimentaires, le cycle veille-sommeil, la douleur, l'anxiété, entre autres.
S	Sécrétine	IG prox.	-	Augmente la production de bicarbonate. Inhibe la sécrétion d'acide gastrique et la vidange gastrique.
CCK (I)	Cholécystokinine	IG prox.	-	Augmente la production de bile. Stimule la contraction de la vésicule biliaire et le relâchement du sphincter d'Oddi.
GIP (K)	Peptide inhibiteur gastrique	IG prox.	-	Augmente la sécrétion d'insuline et d'acide gastrique. Réduit l'activité des LPL dans le tissu adipeux.
Mo	Motiline	IG prox.	-	Favorise la motilité de l'estomac lorsque le pH est bas.
D	Somatostatine	Estomac, IG, pancréas	Hypothalamus	Hormone inhibitrice du largage d'autres hormones intestinales ou non.
L	Peptide glucagon-like	IG dist. et côlon	-	Augmente la sécrétion glucose-dépendante de l'insuline. Inhibe la sécrétion de glucagon, la vidange gastrique. Effet anorexigène central.
N	Neurotensine	IG dist.	Hypothalamus, amygdale et noyau accumbens	Dans l'intestin, stimule la contraction des muscles lisses.
EC ₁	Substance P		-	Favorise la transmission de l'influx nociceptif.

1.2.5. Les cellules M

Les cellules M (ou cellules micro-membraneuses, ou cellules à microplis) sont des cellules de l'épithélium intestinal recouvrant les plaques de Peyer (Figure 9). Ces cellules sont de véritables senseurs du contenu luminal essentiels à la mise en place de l'immunité mucoale.

Les cellules M sont entourées d'un environnement riche en cellules immunes. Dans leurs espaces basolatéraux, les cellules M forment par invagination des poches dans lesquelles on retrouve des lymphocytes T et B, des cellules dendritiques et des macrophages.

Elles présentent à leur apex des microvésicules et capturent de manière sélective des particules lumineales, généralement antigéniques. Contenus dans des vésicules, ces antigènes endoluminaux traversent le cytoplasme de la cellule M et sont libérés au pôle basal sans modification de leur nature. Les antigènes sont pris en charge par les cellules dendritiques pour être présentés aux cellules lymphocytaires (Hathaway and Kraehenbuhl, 2000).

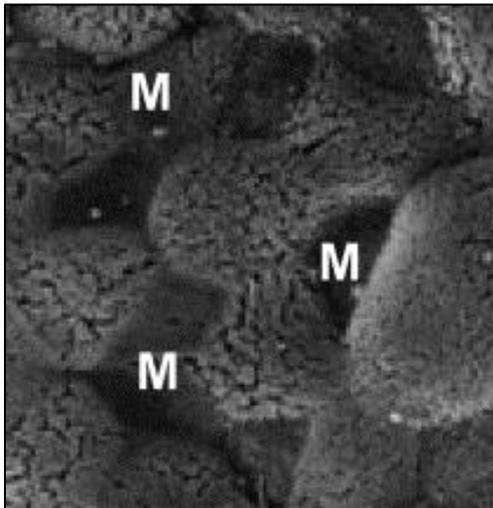


Figure 9. Cellules M observées en microscopie électronique

(D'après Kunisawa et *al.*, 2012). Les cellules M, dépourvues de bordure en brosse, forment des dépressions à la surface de l'épithélium intestinale lorsqu'elles sont observées en microscopie électronique

1.2.6. Les cellules « tuft »

D'après le programme génétique requis pour leur différenciation, les cellules « tuft » (ou cellules en houppes) représentent un 5^{ème} lignage de cellules épithéliales intestinales encore peu connu. Ces cellules rares doivent leur nom à leurs projections cytoplasmiques très développées qui forment des houppes (« tufts » en anglais) au pôle apical (Gerbe et *al.*, 2012).

Leur formation étant dépendante du facteur Atoh1, Gerbe et *al.* classent les cellules « tuft » parmi les cellules sécrétoires (Gerbe et *al.*, 2011). Ces cellules se singularisent par l'expression constitutive de marqueurs de l'inflammation, tels que les cyclooxygénases 1 et 2, et du facteur Dclk1 (Saqui-Salces et *al.*, 2011), considéré comme l'un des marqueurs d'une sous population souche de l'épithélium intestinal. Elles peuvent être visualisées grâce à un double marquage Cox1-Sox9 (Figure 10).

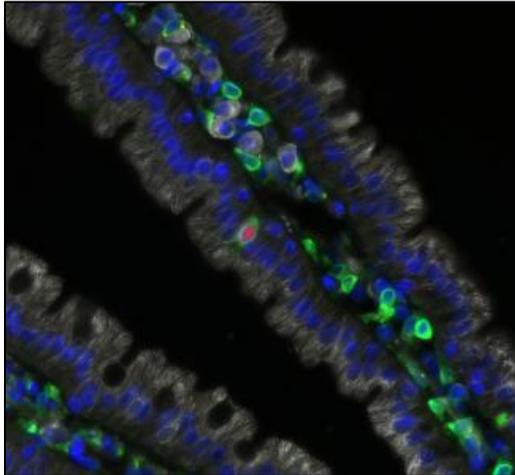


Figure 10. Détection par immunohistofluorescence des cellules « tuft » intestinales.

Source : François Gerbe. Les cellules « tuft » coexpriment la cyclooxygénase 1 (vert) et le facteur Sox9 (rouge). A l'aide d'un double marquage, ces cellules épithéliales rares peuvent être facilement visualisées en microscopie à fluorescence.

Ces cellules pourraient être des cellules sensibles du goût puisqu'elles expriment de nombreuses protéines impliquées dans la perception des saveurs (alpha-gustducin, Trpm5) et sécrètent des opioïdes suite à l'ingestion d'aliments (Höfer et *al.*, 1996; Kokrashvili et *al.*, 2009).

1.2.7. Les cellules « Paneth-like »

Les cellules de Paneth sont des cellules sécrétoires localisées à la base des cryptes de l'intestin grêle. Chez la souris, elles se repèrent très facilement grâce à leurs larges granules apicaux éosinophiles (Figure 11). Ces grains de zymogènes renferment des peptides antimicrobiens qui sont libérés vers le lumen.

En plus de leur localisation basale dans l'axe crypte-villosité, elles se singularisent des autres cellules sécrétoires par d'autres aspects. Contrairement aux autres cellules, les cellules de Paneth apparaissent après la naissance lors de l'émergence des cryptes. Une fois leur différenciation programmée, les cellules de Paneth migrent vers le fond des cryptes où elles

acheminent leur maturation et séjournent environ 42 jours. De plus, les cellules de Paneth expriment la β -caténine au niveau nucléaire, ce qui n'est jamais retrouvé dans les autres cellules sécrétoires de l'intestin. L'activation de la voie Wnt/ β -caténine a été associée à la spécialisation des cellules de Paneth, à leur différenciation et à leur maturation. Le signal Wnt régule positivement la transcription du facteur Sox9, un facteur critique pour la spécialisation et la différenciation des cellules de Paneth.

Les cellules de Paneth appartiennent à la niche des cellules souches intestinales. Intercalées entre les cellules souches $Lgr5^+$, elles expriment les ligands des voies Wnt, EGF et Notch. Ainsi, elles apportent les molécules-sigaux essentiels au maintien d'un programme souche et régulent la prolifération de ces cellules souches. On estime que chaque crypte contient une dizaine de cellules de Paneth (de Santa Barbara et *al.*, 2003).

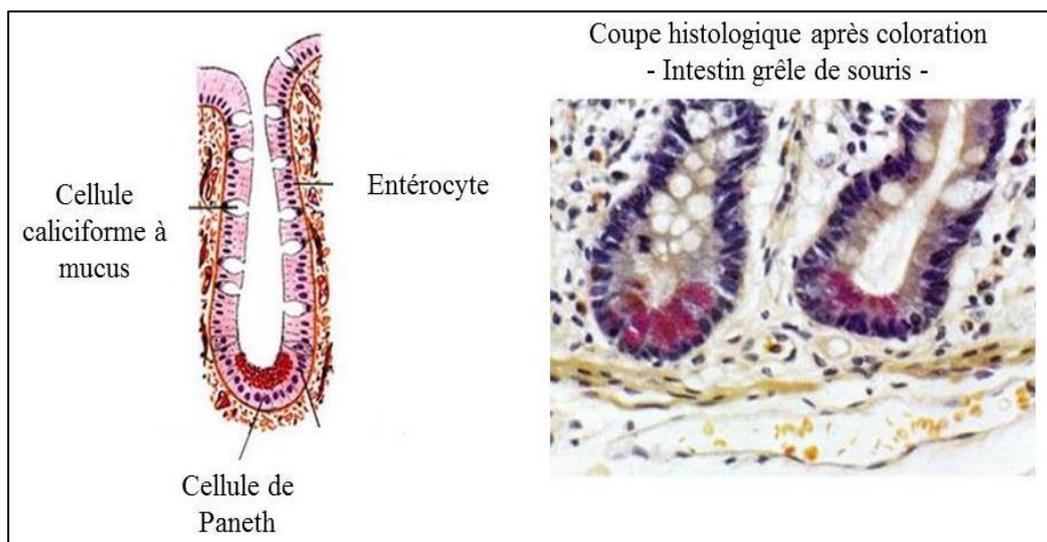


Figure 11. Les cellules de Paneth.

Source : Dr Serge Nataf, Université de Lyon/Hospices Civils de Lyon. Observation microscopique de cellules de Paneth après coloration à l'hémalun-éosine d'une coupe transversale d'intestin grêle.

Si l'on retrouve des cellules souches $Lgr5^+$ dans le côlon, on n'observe pas de cellules de Paneth. Néanmoins, plusieurs études suggèrent l'existence de cellules « Paneth-like » intercalées entre les cellules souches $Lgr5^+$. En effet, cette sous-population de cellules caliciformes exprime les ligands Dll1, Dll4 et EGF. Ces cellules « Paneth-like » se singularisent de leurs homologues intestinaux par l'expression du facteur c-kit et un faible signal Wnt.

1.3. Développement de la barrière colique chez l'Homme et la souris

A la naissance, l'intestin de l'Homme est structuralement et fonctionnellement plus mature que celui des autres mammifères (Drozdowski et *al.*, 2010). Chez l'homme, les cryptes intestinales du côlon se développent au cours de la dernière période de gestation. À la naissance, on retrouve les principales lignées cellulaires localisées dans les cryptes (i.e. : cellules souches, cellules caliciformes, cellules entéroendocrines). Peu après, le nombre de cryptes intestinales est multiplié par 100, simultanément à l'augmentation de la population de cellules intestinales de l'épithélium des cryptes. Cette activité proliférative se traduit par un épaissement de la paroi colique et un élargissement du côlon. Lors de la gestation, des villosités se forment sur toute la muqueuse intestinale (Walthall et *al.*, 2005). A l'inverse de l'intestin grêle, ces villosités disparaissent avant la naissance au niveau du côlon (Thomson and Keelan, 1986). Ainsi, les villosités sont remplacées par des « tables intercryptes ».

En comparaison, la muqueuse intestinale des rongeurs (rat, souris) est immature à la naissance. Elle acquiert sa maturité fonctionnelle et structurelle au moment du sevrage (22-26^{ème} jour post-natal chez le rat, 20-22^{ème} jour chez la souris) (Colony et *al.*, 1989). Néanmoins, dès les deux derniers jours de gestation, on observe un élargissement du lumen et des cryptes, ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules épithéliales.

Au cours des deux premières semaines de vie, des villosités se développent au niveau du côlon proximal. Ces projections de la muqueuse sont similaires à celles retrouvées dans l'intestin grêle mais transitoires (Pácha, 2000). La portion distale du côlon reste plane avec des glandes peu profondes. A partir du 10^{ème} jour post-natal, les villosités coliques s'atrophient et ne sont plus observés à la 3^{ème} semaine. La présence transitoire de structures villositaires augmenterait temporairement les capacités de transport et d'absorption de la muqueuse (Pácha, 2000) pour répondre aux besoins requis au cours de la période périnatale. En effet, le côlon des très jeunes nouveau-nés est impliqué dans le transport indépendant du sodium, des carbohydrates et des acides aminés, dans l'absorption de l'eau et des ions, ainsi que dans les équilibres osmotique et hydroélectrique. Ses propriétés sont transitoires et disparaissent rapidement suite à la maturation de l'organe. Il a été postulé que le côlon est impliqué dans ces fonctions au cours du développement post-natal afin de compenser la faible capacité d'absorption observée dans l'intestin grêle des animaux non sevrés.

Les cryptes intestinales apparaissent lors de la première semaine de vie chez la souris (Hirano and Kataoka, 1986). Leur profondeur et leur nombre augmentent dès la deuxième semaine et jusqu'au sevrage, de façon modérée (Renz et *al.*, 2012) (Figure 12). Les cellules intestinales, peu différenciées à la naissance, prolifèrent activement et s'orientent vers les différents lignages cellulaires retrouvés chez l'adulte. Ainsi, le côlon des animaux sevrés est très proche morphologiquement de celui des adultes. Après le sevrage, le nombre de cryptes augmente de façon considérable par scission des cryptes initiales. Le nombre de cryptes estimé chez l'adulte est d'environ 420 000 (contre 4 500 cryptes peu après la naissance) avec environ 635 cellules par crypte (au lieu de 240 chez le jeune souriceau) (Walthall et *al.*, 2005).

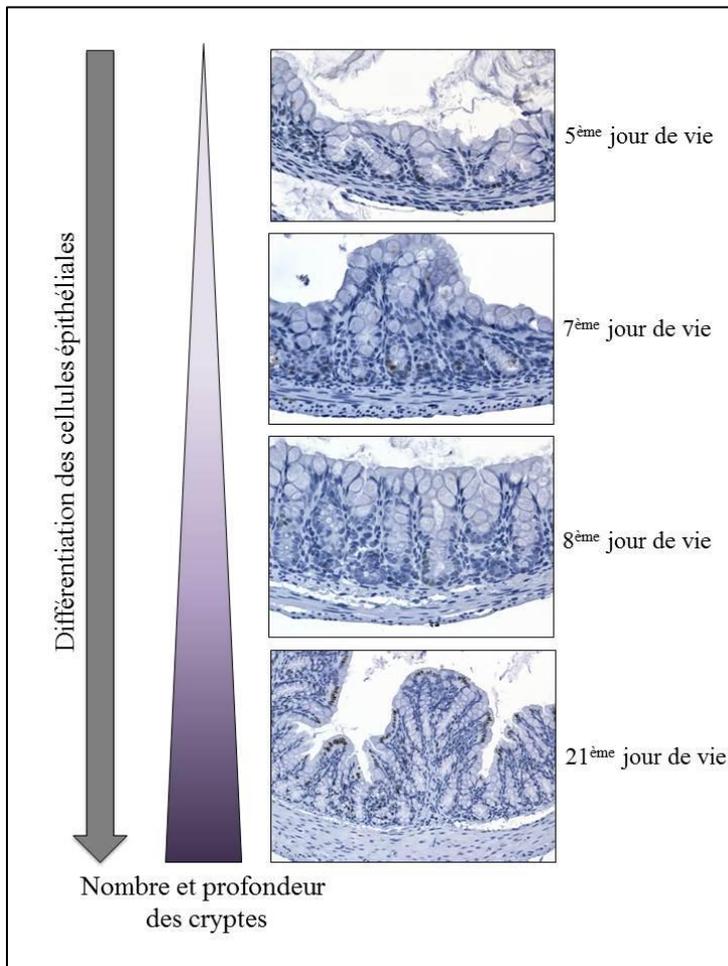


Figure 12. Développement postnatal du côlon chez la souris.

Photos réalisées par Isabelle Raymond-Letron (x400, x200).

Bien qu'il existe des différences temporelles entre les espèces animales, le développement de la muqueuse colique reste très similaire. Toutes les étapes ontogéniques observées chez l'Homme sont retrouvées chez la souris.

1.4. Mise en place de la flore intestinale chez le nouveau-né

La plus grande communauté microbienne du microbiote humain se situe dans le tractus digestif et plus précisément au niveau du gros intestin. En effet, le côlon renfermerait approximativement 10^{14} bactéries et plus de 100 fois le nombre de gènes contenus dans un génome humain (Ley et *al.*, 2006; Qin et *al.*, 2010). De par son poids quantitatif et qualitatif, le microbiote joue un rôle essentiel sur la santé de son hôte.

L'environnement intra-utérin, ainsi que le fœtus, sont considérés comme stériles depuis plus d'un siècle (Tissier, 1900). Pourtant, des bactéries ont été retrouvées dans du liquide amniotique prélevé chez des jeunes femmes avant terme dont les membranes fœtales étaient intactes (Bearfield et *al.*, 2002; DiGiulio et *al.*, 2008; Jiménez et *al.*, 2008; Mackie et *al.*, 1999). Dans un modèle murin, Jiménez et *al.* ont identifié dans le fluide amniotique des souches marquées de *E. faecium* préalablement données aux mères en gestation par voie orale (Jiménez et *al.*, 2008). La présence de micro-organismes (bactéries ou fungi) dans le liquide amniotique a pu être mise en évidence par qPCR ou culture chez 15% des femmes enceintes (DiGiulio et *al.*, 2008). Ces bactéries pourraient provenir de la translocation placentaire de bactéries intestinales circulantes. En effet, les espèces *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* et *Propionibacterium* ont été isolées du sang de cordon ombilical corroborant l'hypothèse d'une translocation (Jiménez et *al.*, 2005). Une autre étude a retrouvé de l'ADN bactérien provenant des espèces *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* dans le placenta d'enfants nés par voie naturelle ou par césarienne ; mais aucune bactérie viable n'a pu être cultivée (Satokari et *al.*, 2009). D'après certains auteurs, il serait nécessaire de patienter quelques jours après la naissance avant de pouvoir détecter des bactéries dans le méconium, un délai suffisant pour que des bactéries du microbiote maternel (cutané, vaginal et fécal) aient pu être transférées à l'enfant, suggérant une colonisation très précoce plutôt que prénatale. Au contraire, Jiménez et *al.* ont isolé des bactéries de méconiums de moins de 2 heures (avant toute prise alimentaire). Les principales espèces retrouvées sont *Staphylococcus epidermicus*, *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli* (Jiménez et *al.*, 2008).

Ces données apportent plus de questions que de réponses. Nous ne savons toujours pas si la présence intra-utérine de micro-organismes est systématique ou bien exceptionnelle, si ces

bactéries sont viables et capables de coloniser l'intestin fœtal, et quelle influence peuvent-elles avoir sur le développement ultérieur du microbiote intestinal de l'enfant.

Le microbiote intestinal des jeunes enfants est très différent de celui des adultes et présente une grande variabilité interindividuelle. Des similitudes apparaissent autour de l'âge d'1 an et converge vers un microbiote plus communément partagé et plus proche de celui de l'adulte (Palmer et *al.*, 2007). On estime que la composition de la flore intestinale se stabilise autour de l'âge de 2-3 ans.

Bien qu'il soit difficile de définir un microbiote humain « type », des tendances générales peuvent être déduites de plusieurs études (Dave et *al.*, 2012). Classiquement, les premières bactéries colonisatrices du tractus digestif sont des anaérobies facultatives telles que *E. coli* et les autres *Enterobacteriaceae* (Jiménez et *al.*, 2008). Suite à la consommation de l'oxygène initialement présent, les conditions anaérobies favorisent le développement des espèces strictement anaérobies comme *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*, et parfois *Ruminococcus*.

Le genre *Bifidobacterium* appartient à la flore intestinale dominante du jeune enfant (Turroni et *al.*, 2012). Six espèces de *Bifidobacterium* ont été identifiées dans les selles de 15 enfants en bas âge : *Bifidobacterium breve* et *Bifidobacterium longum* sont les plus espèces les plus fréquemment isolées, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium pseudocaneulatum*, *Bifidobacterium bifidum* et *Bifidobacterium dentium* (Aires et *al.*, 2011; Turroni et *al.*, 2012).

Différents facteurs peuvent modifier la composition de la flore lors de son établissement. Un facteur intrinsèque critique est la durée de gestation. La comparaison du microbiote fécal d'enfants nés à terme à celui de ceux nés avant terme révèle des différences significatives. Les *Enterobacteriaceae* et autres bactéries potentiellement pathogènes comme *Clostridium difficile* ou *Klebsiella pneumoniae* ont été retrouvés en plus grands nombres chez les nourrissons prématurés. Chez les nouveau-nés nés à terme, le microbiote est plus complexe. On y trouve davantage de genres communs comme *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*. Parmi les facteurs extrinsèques, la mère est celui dont l'influence sur le développement du microbiote intestinal de l'enfant est la plus forte. A un mois d'âge, le microbiote intestinal du nourrisson est semblable à celui de sa mère à la fois sur les plans

fonctionnel et phylogénétique. Cependant, à 11 mois, on observe une différence phylogénétique alors que génétiquement les microbiotes maternel et infantile restent très proches (Vaishampayan et *al.*, 2010). Selon le mode de délivrance, les bactéries primo-colonisatrices ne seront pas les mêmes. Lors d'un accouchement par voie basse, le nouveau-né est exposé aux flores vaginale (*Lactobacillus*, *Prevotella*, *Sneathia*), périnéale et fécale. Il présente généralement une meilleure colonisation par les *Bifidobacterium*. Au contraire, chez les enfants nés par césarienne, les *Bifidobacterium* sont moins nombreux. Les bactéries primo-colonisantes de ces nourrissons, appartiennent à la flore cutanée (*Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*) de la mère et/ou de leur environnement proche. L'allaitement des enfants participe doublement à la mise en place de la flore intestinale du jeune. Le lait peut contenir plusieurs espèces de bactéries notamment : des staphylococcus, des streptococcus, et dans une moindre mesure des lactobacilles et des bifidobactéries. D'autre part, le lait est une source d'oligosaccharides qui sont des prébiotiques.

Chapitre 2. *Escherichia coli*, un hôte naturel de l'homme et de l'animal

2.1. *Escherichia coli*, une bactérie ubiquitaire des flores intestinales humaines et animales

Chez tout individu sain, les tissus profonds de l'organisme sont exempts de micro-organismes. Au contraire, les épithéliums et les muqueuses de surface (peau, tractus digestif, vagin, ...), sont en contact permanent avec l'environnement et sont recouverts d'un microbiote – anciennement appelé flore microbienne. Selon la localisation anatomique, on distingue 4 microbiotes : cutané, respiratoire, génital et intestinal.

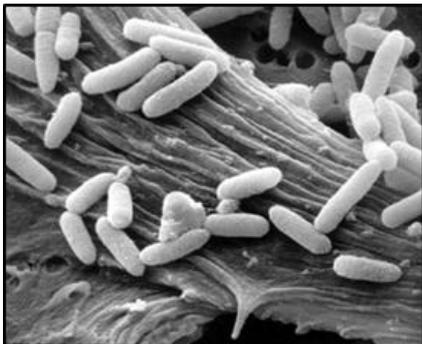


Figure 13. *E. coli* sur la paroi intestinale.

Source : Albert Amgar.

Ces microflores commensales résidentes sont constituées en majorité de bactéries. Quantitativement, la flore digestive – et plus précisément la flore colique - est la plus abondante avec de l'ordre de 10^{12} bactéries par gramme de fèces. Au sein de cette flore, l'espèce aérobie-anérobie facultative la plus représentée est *Escherichia coli*, une bactérie ubiquitaire dans les flores intestinales de mammifères (Figure 13).

E. coli, ou colibacille, est une entérobactérie Gram négative découverte en 1885 par Théodor Escherich (1857-1911). Ce pédiatre autrichien, considéré comme le premier spécialiste des maladies infectieuses de l'enfant, montra que certaines souches de « *Bacterium coli* » étaient responsables de diarrhées et gastroentérites. En 1919, cette espèce fut rebaptisée *Escherichia coli* en l'honneur de son découvreur (Shulman et al., 2007).

Etudiée depuis le XIXème siècle, *E. coli* est sans doute la bactérie la mieux connue. La souche *E. coli* K12 de laboratoire est un organisme modèle qui a permis de décrypter de nombreux processus biologiques essentiels des procaryotes. Ces recherches ont donné lieu à de nombreuses applications dans le domaine de la génétique, par exemple en développement le clonage moléculaire de gènes.

E. coli n'est pas seulement un outil de laboratoire. Généralement, une association symbiotique s'établit entre cette bactérie commune de la flore et son hôte. Au côté des autres bactéries de la flore intestinale, *E. coli* participe à la dégradation et à la digestion de certains aliments, à la synthèse de la vitamine K (Dairi, 2012) et freinent le développement des levures et autres bactéries transitoires potentiellement pathogène (effet barrière). Si la plupart des *E. coli* sont bénéfiques pour leur hôte, certaines souches peuvent devenir virulentes lorsque les défenses immunitaires sont diminuées, ou par acquisition de facteurs de virulence. Ces souches de *E. coli* dites pathogènes, assez rares (~5% des *E. coli*), peuvent provoquer des infections plus ou moins graves. En raison de cette versatilité, *E. coli* est bon modèle pour étudier le continuum entre commensalisme et pathogénicité (Leimbach et al., 2013).

Selon le site où se réalise l'infection, on classifie ces *E. coli* pathogènes en pathovars (Kaper et al., 2004) (Figures 14 et 15) :

Infections intestinales

- *E. coli* entéropathogènes (EPEC).

Les EPEC adhèrent aux entérocytes de l'intestin grêle, puis détruisent l'architecture normale des microvillosités créant des lésions caractéristiques d'attachement-effacement. Les modifications du cytosquelette s'accompagnent d'une réaction inflammatoire et de diarrhée.

- *E. coli* entérohémorragiques (EHEC).

Les EHEC produisent une toxine clé de la physiopathologie de l'infection, la Shigatoxine (Stx), dont l'absorption systémique est à l'origine de complications sévères. Les EHEC induisent également des lésions d'attachement-effacement dans le côlon.

- *E. coli* entéroinvasives (EIEC).

Les EIEC entrent dans les colonocytes par phagocytose en détournant activement le cytosquelette (Navarro-Garcia et al., 2013), puis lysent le phagosome. Les colibacilles peuvent se mouvoir librement dans le cytoplasme via le réseau de microfilaments d'actine et se diriger vers les cellules voisines.

- *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC).

Les ETEC adhèrent aux entérocytes de l'intestin grêle et provoquent une diarrhée aqueuse en sécrétant deux types d'entérotoxines de nature protéique, l'une est thermosensible (LT) et l'autre est thermostable (ST).

- *E. coli* entéroaggrégatives (EAEC).

Les EAEC peuvent adhérer sur toute portion de l'épithélium intestinale, protégées dans un épais biofilm, et élaborent des entérotoxines et des cytotoxines.

- *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC).

Les DAEC induisent des projections cellulaires digitiformes qui s'enroulent autour des bactéries, créant une zone d'interaction étendue.

Infections extraintestinales

- *E. coli* uropathogènes (UPEC).
- *E. coli* à méningites néonatales (MNEC).

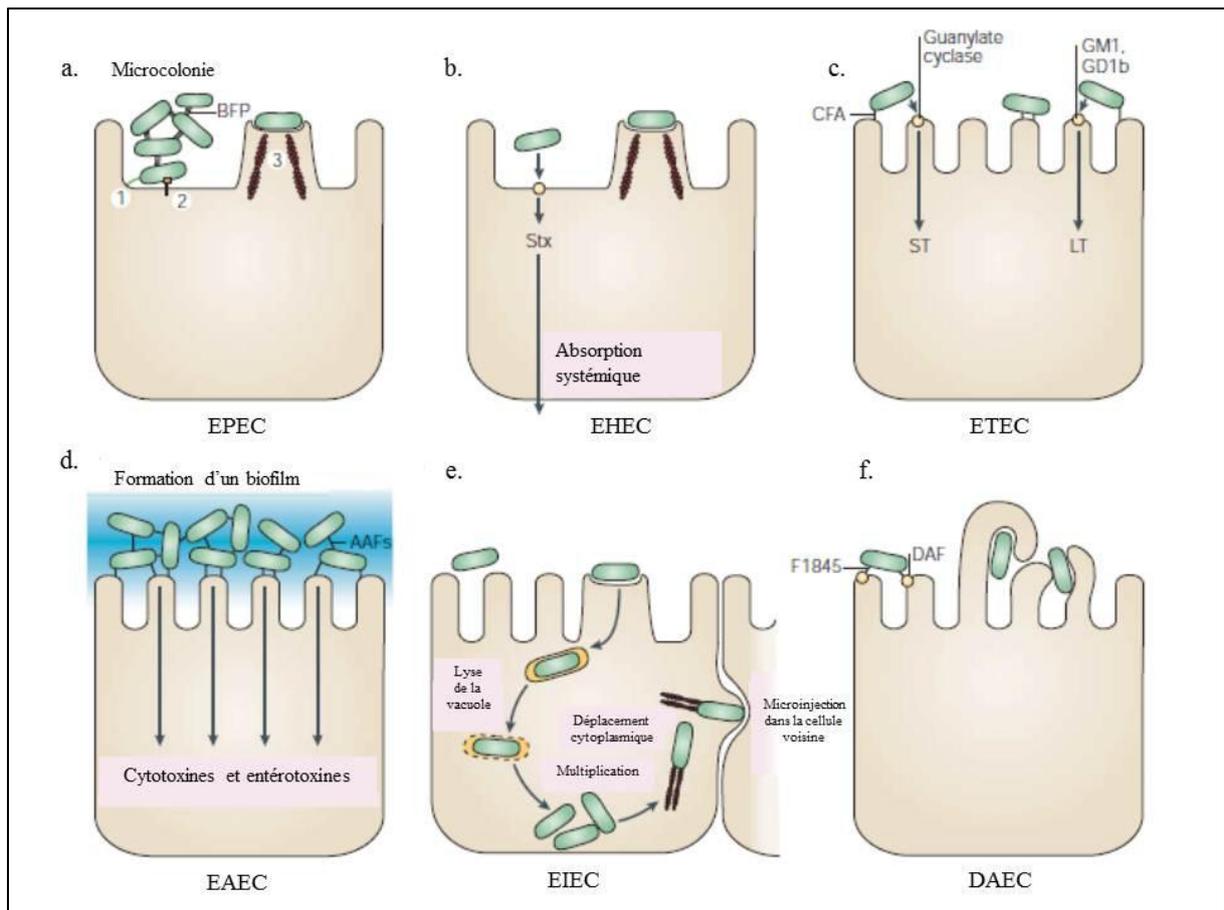


Figure 14. . Représentation schématique des six modes d'infection des *E. coli* entéropathogènes.

(D'après Kaper et al., 2004). Les *E. coli* entéropathogènes sont actuellement classées en six pathovars sur la base des modes d'interaction avec les cellules épithéliales intestinales et des signes cliniques associés à l'infection. Les figures caractéristiques sont ici représentées pour chaque pathovar en interaction avec sa cible cellulaire type, l'entérocyte. (a) *E. coli* entéropathogènes (EPEC) ; (b) *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) ; (c) *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC) ; (d) *E. coli* entéroaggrégatives (EAEC) ; (e) *E. coli* entéroinvasives (EIEC) ; (f) *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC). AAF, aggregative adherence fimbria; BFP, pilus formant des faisceaux ; CFA, antigène du facteur de colonisation ; DAF, facteur d'accélération d'inactivation ; LT, entérotoxine thermolabile; ShET1, entérotoxine Shigella 1; ST, entérotoxine thermostable.

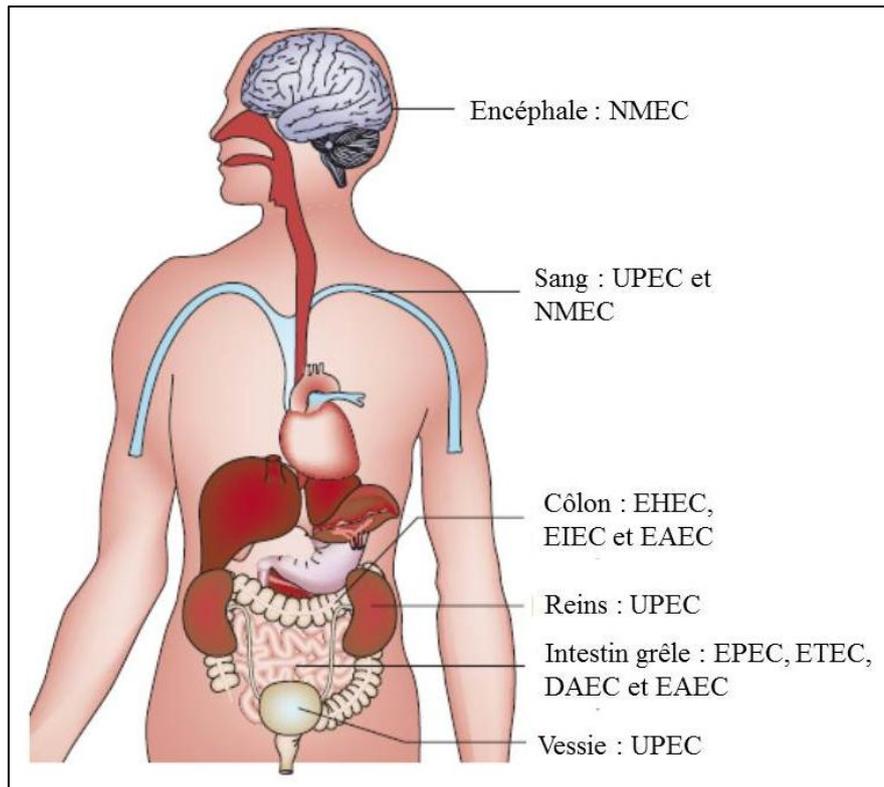


Figure 15. Sites d'infection des *E.coli* pathogènes.

(D'après Croxen and Finlay, 2010). Certaines souches de *E. coli* peuvent être pathogènes et provoquer des infections intestinales ou extra-intestinales. En fonction du site de colonisation, les *E. coli* sont classées en différents pathovars : NMEC = *E. coli* méningitiques néonatales. UPEC = *E. coli* uropathogènes. EHEC = *E. coli* entérohémorragiques. EPEC = *E. coli* entéro-pathogènes. DAEC = *E. coli* à adhésion diffuse. EIEC = *E. coli* entéro-invasives. ETEC = *E. coli* entérotoxigéniques. EAEC = *E. coli* entéroaggrégatives.

2.2. Déroulement de la primo-colonisation du nouveau-né par des *Escherichia coli*

Lors de la gestation, le fœtus se développe dans un milieu quasi-stérile (DiGiulio et *al.*, 2008; Jiménez et *al.*, 2008). La mise en place de la flore intestinale au cours des premières heures et des premiers jours suivants la naissance est détaillée dans la partie 1.1.3.

A la naissance, la lumière intestinale est un environnement aérobie. Les bactéries aérobie-anaérobie facultative - notamment les espèces *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* - bénéficient de conditions très favorables à leur croissance et à leur expansion. Vers le 10^{ème} jour de vie, la concentration en dioxygène du compartiment intestinal

a nettement diminué et les espèces anaérobies commencent à s'établir (*Lactobacillus*, *Firmicutes*, *Clostridia*).

E. coli colonise donc massivement le tractus digestif des enfants. Elle fait partie de la flore dominante infantile. Le portage diminue à l'âge adulte. *E. coli* appartient alors à la flore sous-dominante. Néanmoins, elle reste la bactérie aérobie-anaérobie facultative la plus représentée (Nowrouzian et al., 2006) (Figure 16).

De façon intéressante, on observe chez les individus âgés une augmentation de la charge de *E. coli*.

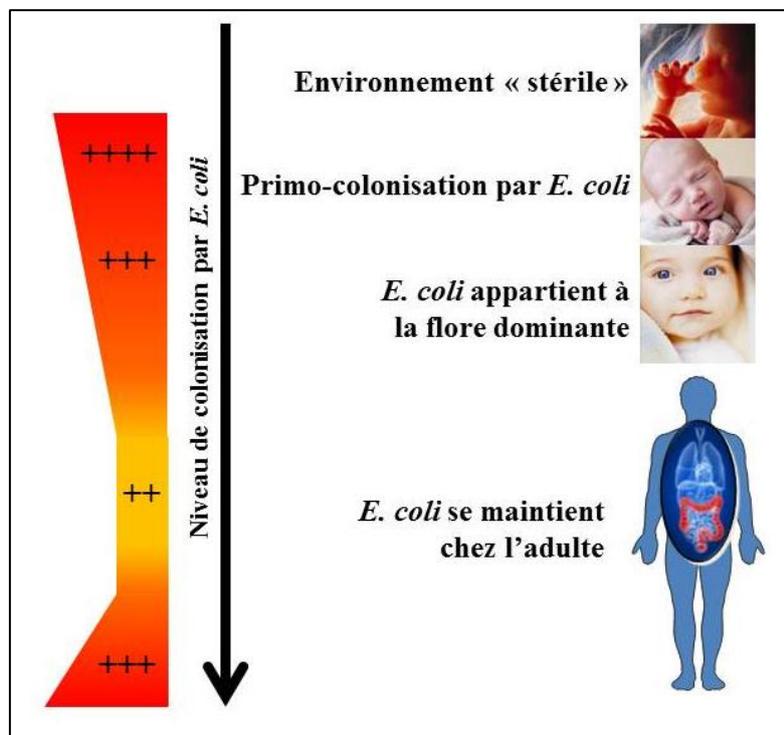


Figure 16. Niveau de colonisation du tractus digestif humain par *E. coli* au cours de la vie d'un individu.

Au cours des premières heures de vie, le tractus digestif, presque stérile à la naissance, est rapidement colonisé par des bactéries de l'environnement proche du nouveau-né. *E. coli* est l'une de ces bactéries primo-colonisatrices. Son expansion est massive, si bien que *E. coli* appartient à la flore dominante infantile. A l'âge adulte, ses propriétés anaérobies facultatives lui permettent de s'établir dans la flore sous-dominante. Cependant, *E. coli* reste l'espèce anaérobie-aérobie facultative la plus représentée dans le microbiote intestinal.

2.3. Diversité de l'espèce *E. coli* par acquisition d'éléments génétiques mobiles

E. coli est une bactérienne très versatile et polymorphe. Actuellement, plus de 1000 souches différentes ont pu être attribuées à cette espèce bactérienne. Classiquement, l'identification et la caractérisation des souches sont réalisées par sérotypage. Cette méthode, mise en place pour la première fois en 1976 par Orskov et *al.*, est basée sur la combinaison et la distribution non aléatoire d'antigènes spécifiques de l'espèce *E. coli* : les antigènes O, H et K (Orskov et *al.*, 1976) (Figure 16). La grande diversité de ces combinaisons d'antigènes rencontrées a permis de décrire des sérotypes (ou sérovars) (Orskov and Orskov, 1992).

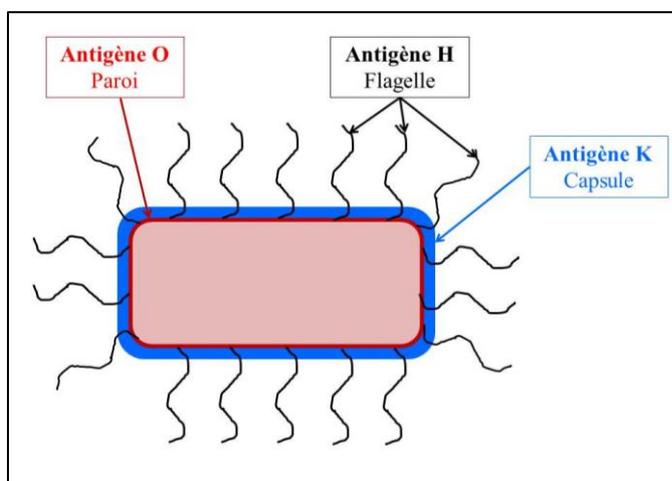


Figure 17. Localisation des antigènes de surface recherchés lors du sérotypage d'une souche de *E. coli*.

La paroi, les flagelles et la capsule (ou enveloppe) de *E. coli* sont des éléments antigéniques dont la variabilité peut facilement être analysée par des techniques immunologiques.

L'antigène somatique O est une entité structurale entrant dans la composition du lipopolysaccharide. Cet antigène très variable (plus de 150 variants) définit le séro groupe.

L'antigène H est un polymère de flagelline, la protéine structurale majeure des flagelles. Puisqu'il existe plus de 56 types de flagelline, l'antigène H est aussi très variable.

La capsule des bactéries est antigénique. On compte 80 antigènes capsulaires K chez *E. coli*, classés en fonction de leurs propriétés. Les antigènes K_L, les plus fréquemment rencontrés, sont thermolabiles ; tandis que les antigènes K_A sont rares mais thermostables. Les derniers, les antigènes K_B sont toujours observés dans les souches EPEC des gastro-entérites de l'enfant.

Le sérotypage des antigènes O, H et K reste la première technique la plus répandue pour identifier une souche de *E. coli* aussi bien dans le cadre d'une étude épidémiologique que lors d'une démarche diagnostique.

Suite à la classification établie par Orskov et *al.* par sérotypage, de nouvelles techniques ont permis d'étudier la variabilité génétique de *E. coli*. En 1984, Ochman et Selander mettent en évidence des différences alléliques en analysant les produits de ces variants par électrophorèse. Cette méthode, appelée « *Multi-Locus Enzyme Electrophoresis* » (MLEE), s'appuie sur la spécificité de la mobilité électrophorétique (Ochman and Selander, 1984). Les avancées rapides en biologie moléculaire ont permis de faire évoluer cette méthode vers le « *Multi-Locus Sequence Typing* » (MLST) qui consiste à séquencer plusieurs séquences nucléotidiques issues de gènes de ménage.

En appliquant cette méthode sur la collection de souches de *E. coli* de référence (ECOR, « *Escherichia coli* reference collection »), six groupes phylogénétiques majeurs (A, B1, B2, C, E, et D), ont été décrits sur la base de six gènes essentiels (*trpA*, *trpB*, *pabB*, *icd*, et *polB*) (Figure 18).

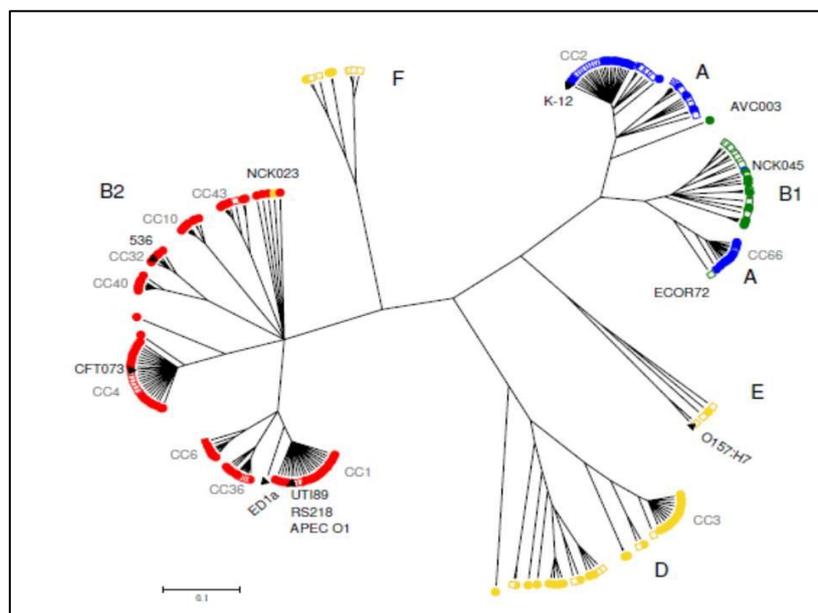


Figure 18. Diversité phylogénétique des souches de *E. coli* analysée par la méthode de MLST.

(D'après Jauregui et *al.*, 2008). Cette analyse phylogénétique a été menée sur 161 isolats de *E. coli* issus de patients bactériémiques (cercles fermés), 67 souches de la collection de référence ECOR (carrés ouverts) et 7 souches de *E. coli* de référence (triangles fermés). Le séquençage de ces souches a

été réalisé sur 8 gènes (4 095 nucléotides). Les souches ont été regroupées dans chacun des groupes phylogénétiques majeurs dont le code couleur est le suivant : rouge, B2; vert, B1; jaune, D; bleu, A.

L'analyse de ces gènes d'entretien donne une image restreinte de la diversité de l'espèce de *E. coli* (Figure 19). En effet, l'ensemble des gènes partagés par toutes les souches de *E. coli* – ou « core génome » (1 976 gènes) – ne représente que 11% des gènes identifiés chez ces bactéries – ou « pangénome » (17 838 gènes) (Touchon et *al.*, 2009). Possédant en moyenne 4 721 gènes, une souche de *E. coli* ne peut représenter à elle seule toutes les caractéristiques de l'espèce.

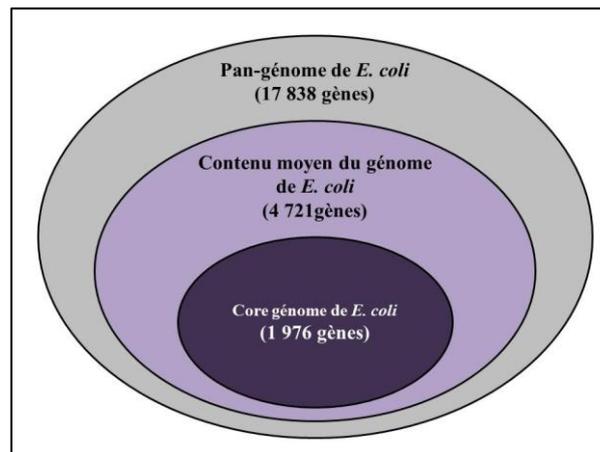


Figure 19. Plasticité du génome de *E. coli*.

(D'après Hendrickson, 2009). Le pan-génome (en gris clair) représente la totalité des gènes connus dans l'espèce de *E. coli* (Touchon et *al.*, 2009). Dans cet ensemble, le core génome (en violet foncé) correspond au sous ensemble de gènes communs à toutes les souches de *E. coli*. Chaque souche contient en moyenne 4 721 gènes (en violet clair) comprenant le core génome et des gènes du répertoire flexible du pangénome.

La plasticité du génome de *E. coli* résulte de l'acquisition d'éléments génétiques mobiles (Dobrindt et *al.*, 2010). Parmi ces éléments, on trouve (Figure 20) :

- Des plasmides, des molécules d'ADN circulaires capables de répllication autonome.
- Des phages, des virus infectant les bactéries et dont le génome peut s'insérer dans le chromosome bactérien sous forme d'un prophage.
- Des transposons, des séquences d'ADN capables de s'exciser, de se déplacer et de s'insérer au niveau d'un autre site sur le même brin d'ADN ou sur un autre brin.
- Des îlots génomiques, régions chromosomiques regroupant plusieurs gènes acquis par transfert horizontal. Plusieurs caractéristiques témoignent de leur mobilité et

permettent d'identifier ces régions : un pourcentage en G+C différent du reste du génome, une insertion à l'extrémité 3' de gène codant un ARN de transfert, des gènes impliqués dans la conjugaison.

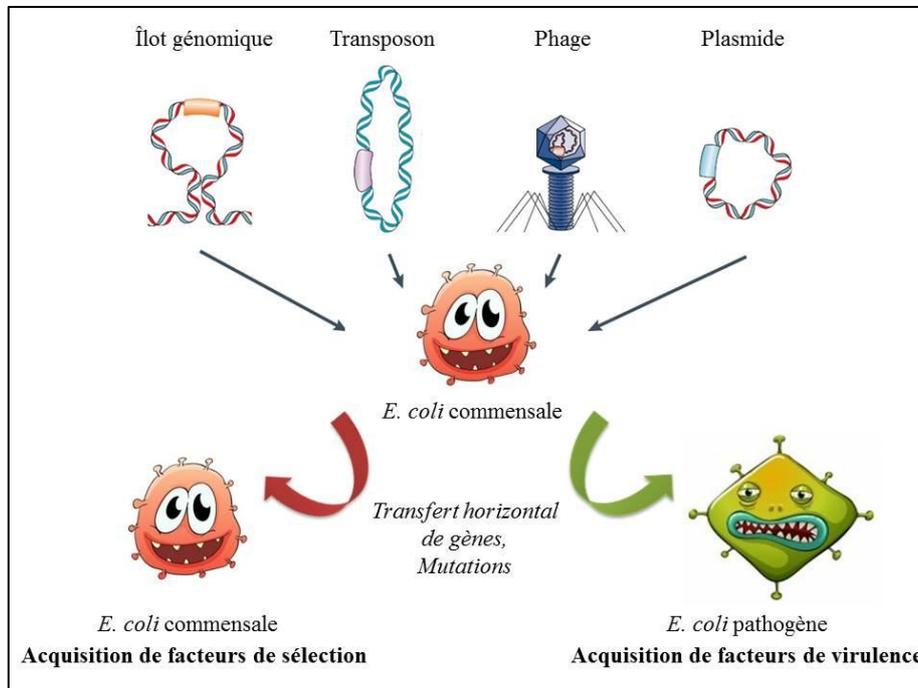


Figure 20. La diversité génétique des *E. coli* commensales ou pathogènes résulte de l'acquisition d'éléments génétiques mobiles.

(D'après Kaper et *al.*, 2004). Les îlots génomiques, les transposons, les virus bactériens (phages) et les plasmides sont essentiels à l'adaptation bactérienne. Ces éléments génétiques mobiles ou transposables sont des segments d'ADN mobiles pouvant être transférer horizontalement d'un génome bactérien à un autre appartenant à une bactérie voisine. L'information génétique transférée peut coder pour des gènes apportant un avantage sélectif et/ou un potentiel de pathogénicité.

2.4. La colibactine, une génotoxine bactérienne

2.4.1. L'îlot génomique *pks*, support génétique de la colibactine

En 2006, Nougayrède et *al* ont découvert un îlot génomique de 54 kb appelé *pks* (pour polykétide synthase) (Nougayrède et *al.*, 2006). Cet îlot regroupe en effet un ensemble de gènes qui codent pour une machinerie enzymatique complexe responsable de la synthèse d'un composé toxique de type polykétide/peptide non ribosomique, nommée la colibactine.

En réalisant une modélisation *in silico*, 23 gènes putatifs ont été identifiés (Figure 21). Nous savons aujourd'hui que 16 d'entre eux sont essentiels à l'obtention d'un effet colibactine ; en particulier :

- Les gènes codant pour des polykétides synthases (PKS) : *clbC*, *clbI*, et *clbO*.
- Les gènes codant pour des synthèses de peptides non ribosomiques (NRPS) : *clbH*, *clbJ* et *clbN*.
- Les gènes codant pour des synthèses de polykétides-peptides non ribosomiques (PKS-NRPS) : *clbB* et *clbK*.
- *clbA* code pour une phosphopantéthéinyl transférase nécessaire à l'activation des mégasynthèses (PKS, NRPS, PKS-NRPS) et donc à l'initiation de la synthèse de la colibactine.
- ClbD serait une hydroxyl-acyl-CoA déshydrogénase (hcdh)
- ClbE serait une protéine porteuse d'acyle (acp)
- ClbF serait une $\alpha\beta$ déshydrogénase ($\alpha\beta$ dhg)
- ClbG serait une acyle transférase (at)
- ClbQ serait une thioestérase (te) (Kim et *al.*, 2002)
- ClbL serait une amidase, mais son rôle n'est pas encore connu.
- *clbP* code pour une peptidase périplasmique associée à la membrane cytoplasmique bactérienne. Cette enzyme participerait à la maturation du composé dans le compartiment périplasmique (Dubois et *al.*, 2011).

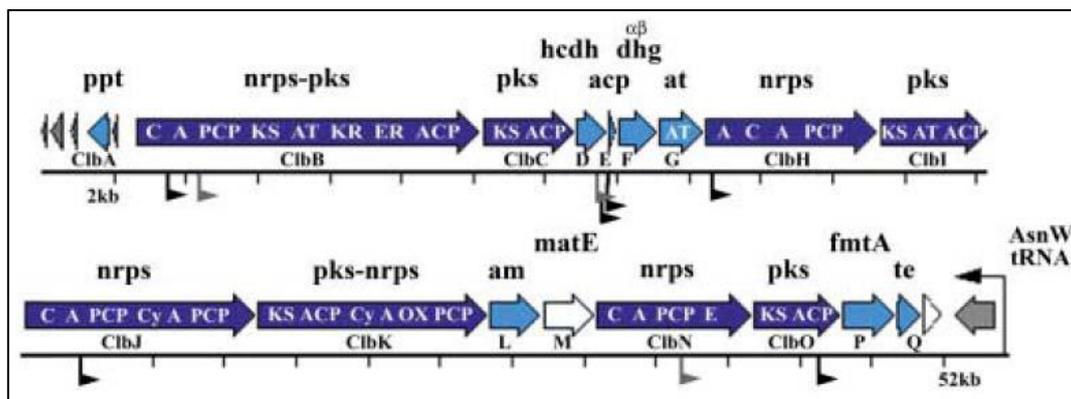


Figure 21. Représentation schématique de l'îlot génomique *pks*.

(Nougayrède et *al.*, 2006). L'îlot *pks* regroupe 23 gènes (larges flèches) dont 16 sont requis pour observer une toxicité sur les cellules eucaryotes (en bleu foncé et clair). Les 7 gènes accessoires sont en blanc. Les gènes codant pour des intégrases et des transposases sont en gris.

Les sept gènes non essentiels à la toxicité des souches *pks+* sont dits accessoires.

- ClbR possédant un motif de liaison à l'ADN hélice-tour-hélice et pouvant intervenir dans la régulation de cet îlot génomique.
- une pompe à efflux, nommée ClbM, de 170 acides aminés (ORF2)
- une intégrase P4
- trois transposases probablement impliquées dans l'histoire mobile de l'îlot.

Les NRPS et PKS sont des synthèses de très grandes tailles (mégasynthèses) composées de plusieurs sous domaines pouvant être regroupés en trois catégories selon leur activité enzymatique :

- les domaines de thiolation (T, thiolation ; ACP, Acyl carrier protein ; PCP, peptide carrier protein) crée une liaison thioester entre l'acide aminé à ajouter et la mégasynthase.
- Les domaines d'acyl-transférase (AT) des PKS et d'adénylation (A) des NRPS sélectionnent les acides aminés à incorporer en les fixant par liaison thioester au domaine de thiolation.
- Les domaines de condensation (KS, Kétoacyl synthase sur les PKS ; C, Condensation sur les NRPS) créent une liaison peptidique entre deux monomères et condensent le monomère ajouté sur la chaîne en élongation.

D'autres domaines ont été décrits sur les NRPS et PKS de l'îlot *pks* : deux domaines de cyclisation (Cy) (ClbJ, ClbK), un domaine énoyl-réductase (ER) (ClbB), un domaine kétoacyl-réductase (KR) (ClbB) et un domaine d'oxydation (OX) (ClbK).

A l'image d'une chaîne de fabrication d'automobiles, ces mégasynthèses coopèrent dans l'élaboration d'un composé de type polykétide-peptide non ribosomique. D'après l'organisation prédite de l'îlot *pks*, la colibactine aurait une structure proche de celle présentée sur la figure 22.

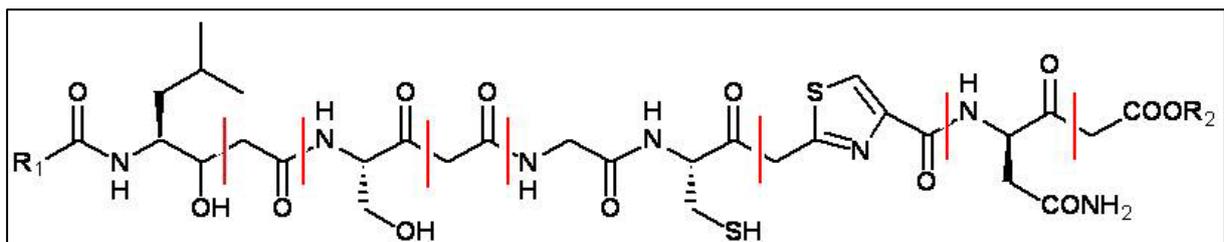


Figure 22. Structure putative de la colibactine d'après l'analyse *in silico*.

2.4.2. Prévalence du portage digestif de l'îlot *pks* dans les bactéries des flores intestinales adultes et infantiles

L'îlot génomique *pks*, comme beaucoup de facteurs de virulence et d'adaptation, appartient au patrimoine génétique flexible de *E. coli*.

La première recherche épidémiologique du portage de l'îlot *pks* a été réalisée sur la collection ECOR contenant 72 souches commensales et pathogènes. Cette étude a montré que l'îlot *pks* est retrouvé quasi-exclusivement dans des colibacilles du phylogroupe B2 qui regroupe des souches ExPEC et commensales. A l'inverse, l'îlot *pks* n'a pas été retrouvé dans des pathotypes intestinaux (Herzer et al., 1990; Ochman and Selander, 1984). Il est intéressant de noter que la proportion dans la flore commensale des souches de *E. coli* du groupe phylogénétique B2 est en augmentation constante depuis ces 30 dernières années en Europe, au Japon et aux Etats-Unis. Ce groupe phylogénétique est maintenant prévalent dans nos régions tempérées (Escobar-Páramo et al., 2004). Ces souches de *E. coli* du groupe B2 sont d'excellents colonisateurs, qui peuvent persister plus durablement dans le côlon que d'autres souches de *E. coli* (Nowrouzian et al., 2005).

En 2008, Johnson et al. ont étudié la prévalence de l'îlot *pks* dans une collection de *E. coli* prélevées chez des vétérans américains hospitalisés. Sur les 131 souches étudiées, 62 sont des isolats sanguins issus de patients malades et 69 sont des isolats fécaux de patients sains. Les marqueurs de l'îlot *pks*, *clbB* et *clbN*, ont été détectés dans 58 de ces isolats. De plus, retrouvés dans plus de la moitié des isolats sanguins (58%) et peu d'isolats fécaux (32%), la présence de ces marqueurs est significativement associée à une bactériémie ($P = 0,003$) (Johnson et al., 2008). Cette étude montre également que l'îlot *pks* serait présent de façon majoritaire dans des bactéries du groupe phylogénétique B2 qui portent d'autres facteurs de virulence.

Peu après, ces résultats ont été confirmés et complétés par une étude de Putze et al. menée sur 1565 isolats d'*Enterobacteriaceae*. Dans les souches de *E. coli*, on retrouve sans surprise l'îlot dans des ExPEC (n=205, 37,1%) et des *E. coli* commensales (n=142, 19,7%) du groupe phylogénétique B2. Cependant, pour la première fois, cette étude a montré que l'îlot *pks* pouvait être retrouvé avec plus de 98% d'identité de séquence nucléotidique dans d'autres

Entérobactéries, notamment *Klebsiella pneumoniae* (3,5%, n=141), *Enterobacter aerogenes* (27,3%, n=11) et *Citrobacter koseri* (n=1) ((Putze et al., 2009).

En 2010, l'étude épidémiologique menée par Dubois et al. suggère que l'îlot *pks* serait associé à une meilleure colonisation et non à un potentiel de pathogénicité. En effet, si l'îlot *pks* est quasi-exclusivement retrouvé dans les souches du groupe phylogénétique B2, les prévalences de l'îlot *pks*, au sein des souches issues de patients souffrant d'infections urinaires à UPEC (n=146) ou commensales (n=51), ne sont pas significativement différentes (Dubois et al., 2010).

D'après une étude réalisée sur une cohorte de 130 enfants suédois (âgés de 0 à 18 mois), l'îlot *pks* contribuerait à la persistance sur le long terme dans le côlon (Nowrouzian and Oswald, 2012).

Plus récemment, une étude a montré que les *E. coli* appartenant au groupe phylogénétique B2 colonisent plus fréquemment les tumeurs colorectales que les diverticuloses bénignes. De plus, les gènes codant pour des cyclomodulines, en particulier l'îlot *pks*, *cnf1* et *cdt*, sont très représentées dans les cancers colorectaux (Buc et al., 2013).

En ce qui concerne la transmission des souches de *E. coli pks+*, une analyse du métagénome intestinal de 13 individus en bonne santé dont 5 enfants en bas âge (moins de 2 ans) a détecté l'îlot *pks* chez 38,46% des personnes testées (n=5/13) et 60% (n=3/5) des enfants. Ces travaux mettent également en évidence une transmission éventuelle de souches *pks+* de la mère à ses jeunes enfants (Kurokawa et al., 2007).

Dernièrement, une pédiatre du laboratoire a conduit une étude épidémiologique plus étendue afin de préciser la prévalence des souches de *E. coli pks+* dans les flores intestinales de nourrissons. Parmi les 197 nouveau-nés de 3 jours dépistés, 54,3% (n=108) étaient porteurs d'au moins une souche de *E. coli* ; et pour 29% (n=31) de ces enfants, au moins l'une de ces souches de *E. coli* portait l'îlot *pks* (Payros et al, soumis).

Il apparaît donc que les *E. coli* qui produisent la colibactine sont fortement prévalentes dans les flores intestinales humaines, et ont la capacité de coloniser l'Homme dès la naissance puis de se maintenir durablement dans le côlon.

2.4.3. Effets génotoxiques de la colibactine *in vitro* et *in vivo*

La colibactine est une cyclomoduline inhibitrice. En effet, suite à une infection *in vitro* par une souche de *E. coli pks+*, des cellules Hela cyclantes s'arrêtent en phase G2/M. Ces cellules exposées à la colibactine présentent de la mégalyocytose (Figure 23). Cette modification phénotypique des cellules en culture témoigne de la sénescence induite par l'endommagement de l'ADN.

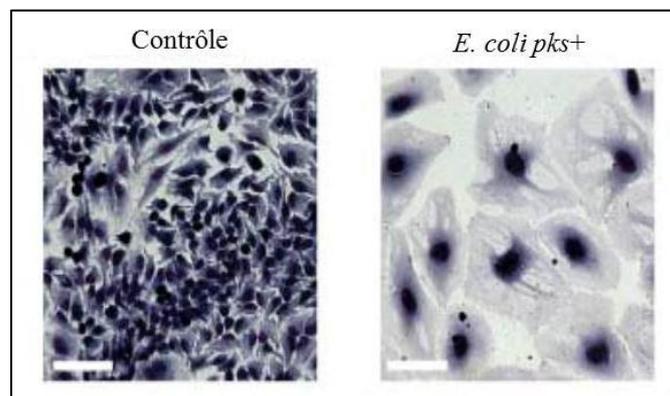


Figure 23. Modifications morphologiques des cellules épithéliales en culture suite à un contact avec des *E. coli pks+*.

(Nougayrède et al., 2006). Des *E. coli* produisant la colibactine sont ajoutées directement dans le milieu de culture des cellules HeLa (cellules humaines dérivées d'un cancer du col utérin). Suite à une coculture de 4 heures, les cellules sont lavées afin d'éliminer les bactéries. La culture cellulaire est poursuivie pendant 72 heures dans un milieu additionné de gentamicine avant de colorer les cellules en Giemsa. Barre d'échelle de 100 μ m.

La colibactine est une génotoxine qui induit des CDB de l'ADN. Ces lésions de l'ADN sont considérées comme étant les plus toxiques pour la cellule (Jackson, 2002). Une erreur lors de la réparation de ces coupes peut résulter en la perte de chromosomes, un échange de brins de chromatides, la mort cellulaire ou encore de la cancérogenèse (Hoeijmakers, 2001). Afin de comprendre le processus tumoral, il est nécessaire de développer les mécanismes de détection et de réparation des dommages à l'ADN.

Les lésions de l'ADN sont détectées par un système de surveillance cellulaire qui active la réponse aux dommages à l'ADN (DDR, « DNA damage response »). Dans un premier temps, cette réponse arrête la progression du cycle cellulaire au point de contrôle situé entre la phase G2 et la phase M (Figure 24).

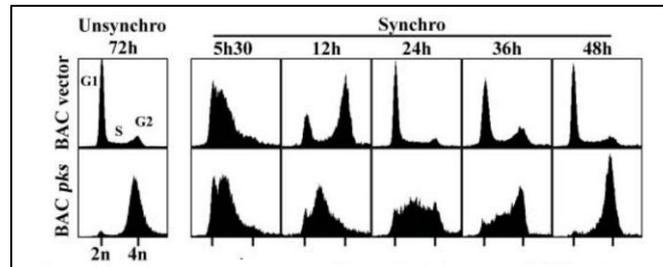


Figure 24. Des cellules Hela exposées à la colibactine s'arrêtent temporairement au point de contrôle G2/M.

(Nougayrède et *al.*, 2006). Dans cette étude, les cellules sont synchronisées au point de contrôle G1/S (Synchro) ou bien non synchronisées (Unsynchro). Les cellules sont cocultivées pendant 4 heures avec la souche de *E. coli* DH10B hébergeant soit un vecteur portant l'îlot pks (BAC *pks*) soit le vecteur seul (BAC vector). La progression du cycle cellulaire a été suivie par cytométrie en flux aux temps indiqués après infection.

Des mécanismes de réparation de l'ADN sont mis en œuvre. Néanmoins, la faillite de la réparation des dommages peut mener à la fusion de deux chromosomes qui crée un pont chromatidien lors de l'anaphase (appelé pont anaphasique) (Jackson, 2002) (Figure 25).

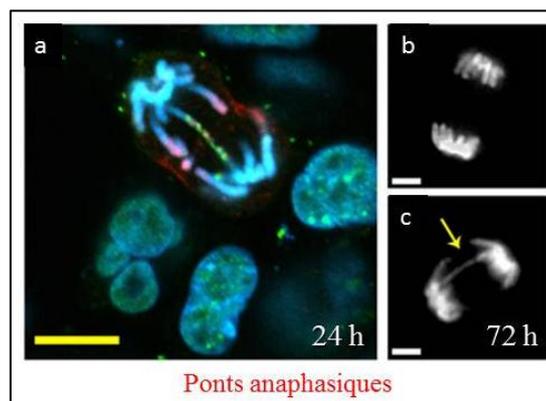


Figure 25. L'exposition à une souche de *E. coli* produisant la colibactine augmente l'apparition de ponts anaphasiques.

(Cuevas-Ramos et *al.*, 2010). Vingt-quatre heures après une exposition à une souche de *E. coli* produisant la colibactine, on observe une augmentation du nombre de figures de mitose anormales comme des ponts anaphasique longs (image a.). Après 72 heures, des cellules continuent à se diviser

certaines d'entre elles présentent des figures mitotiques modifiées (image c.). En comparaison, sur l'image b. une cellule non infectée réalise une anaphase normale.

Les sites de CDB peuvent être visualisés sur la chromatine par un immunomarquage des histones γ -H2AX, des protéines de structure de la chromatine phosphorylées sur la sérine 139 (Rogakou et al., 1998). Cette phosphorylation est réalisée sur les 2 brins, de part et d'autre du site de CDB, sur plusieurs milliers de nucléosomes à partir du site de cassure (Rogakou et al., 1999). Le marquage dirigé contre les γ -H2AX est une méthode sensible de détection des CDB qui a permis de mettre en évidence l'effet génotoxique de la colibactine à la fois *in vitro* sur des cellules en culture et *in vivo* sur des coupes de côlons (Cuevas-Ramos et al., 2010) (Figure 26).

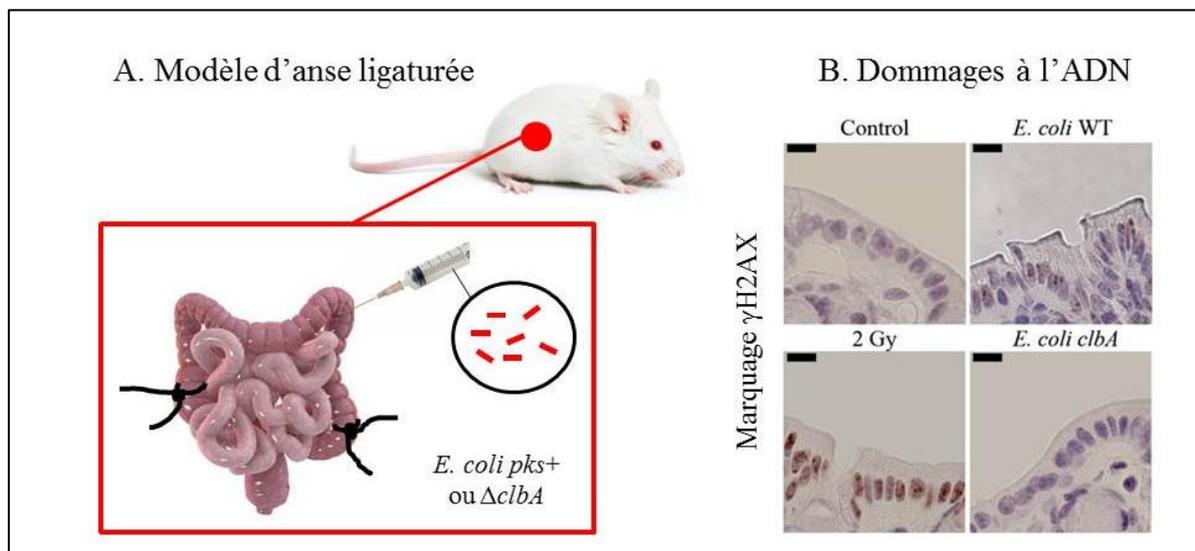


Figure 26. La colibactine est génotoxique *in vivo* dans un modèle d'anse ligaturée de côlon. (D'après Cuevas-Ramos et al., 2010). (A) Dans un modèle murin, un inoculum d'une souche de *E. coli* produisant la colibactine (*pks+*) ou bien mutée pour le gène *clbA* ($\Delta clbA$) a été injecté directement dans la lumière intestinale d'anses de côlons ligaturés en amont de la partie proximal et en aval de la partie distale. Six heures après, les anses ligaturées sont prélevées et préparées afin de réaliser des coupes histologiques. (B) Les γ -H2AX ont été révélées sur ces échantillons par immunohistochimie. On observe de la positivité dans les noyaux des entérocytes irradiés ou exposés à la souche de sauvage de *E. coli pks+*. A l'inverse, les entérocytes non infectés ou mis en contact avec la souche mutante $\Delta clbA$ sont peu à pas marqués.

Pour confirmer et compléter ces résultats, un second modèle murin a été mis au point en donnant oralement la souche de *E. coli* produisant ou non la colibactine à des souris adultes

préalablement traitées par antibiothérapie (streptomycine, bacitracine et néomycine pendant 5 jours). De façon similaire, des foyers γ -H2AX ont pu être observés dans les cellules épithéliales coliques.

Chapitre 3. Causes, réponse et conséquences des cassures double brin de l'ADN eucaryote

3.1. Causes de cassures double brin

Les CDB sont connues pour être des lésions délétères de l'ADN. Néanmoins, elles peuvent parfois faire partie intégrante de mécanismes cellulaires spécialisés à l'origine de variabilité génétique. Citons pour exemple :

- La recombinaison homologue ayant lieu lors de la méiose (Keeney and Neale, 2006) ;
- La recombinaison des segments V(D)J (ou recombinaison somatique) permettant la diversité des immunoglobulines au niveau des chaînes légères (Maizels, 2005) ;
- La commutation de classe (ou commutation isotypique) induisant un réarrangement dans les gènes codant pour les chaînes lourdes (Maizels, 2005) ;
- L'hypermutation somatique à la base de la maturation d'affinité des immunoglobulines (Maizels, 2005).

D'autres mécanismes endogènes peuvent aboutir à des CDB accidentelles. L'origine endogène principale des CDB est la réplication de l'ADN (Vilenchik and Knudson, 2003). On compte approximativement 50 CDB par cellule en phase S. Lors de la progression de la fourche de réplication, différents scénarios peuvent aboutir à la création de CDB :

- Lors de l'arrivée de la fourche de réplication au niveau d'une cassure simple brin (CSB), la fourche peut s'effondrer. Cet effondrement laisse s'échapper une extrémité double brin libre.
- La structure superenroulée de la double hélice d'ADN peut bloquer la fourche. La molécule d'ADN est relâchée par clivage d'un de ses brins par une topoisomérase. De façon transitoire, la fourche présente une extrémité double brin libre qui doit impérativement être réparée pour relancer la synthèse du brin d'ADN.

Dans un contexte de stress oxydatif, l'oxydation du désoxyribose par un radical hydroxyle entraîne une rupture du squelette ribose-phosphate du brin d'ADN, autrement dit une CSB. L'action très localisée des ROS augmente la probabilité d'apparition de 2 CSB en vis-à-vis qui forment alors une CDB (Kryston et *al.*, 2011).

Les causes exogènes sont plus nombreuses. Elles sont généralement classées en fonction de leur nature : physique, chimique ou biologique. Par sources physiques, on entend communément les radiations électromagnétiques, ionisantes, telles que les rayons UV, les rayons X et les rayons γ (Little, 1993). Ces rayonnements énergétiques heurtent les constituants cellulaires et peuvent les endommager. Lorsqu'il s'agit d'une molécule d'eau, la réaction de radiolyse résultante produit des ROS.

Le rayonnement ionisant peut provoquer directement différents types de dommages à l'ADN comme des modifications de bases, des altérations des groupes ribose-phosphate et des clivages simple ou double brin. Au contraire, l'effet des rayonnements ultraviolets (UV) est toujours indirect. Les UV ciblent des constituants cellulaires photosensibles, comme les bases aromatiques de l'ADN et des chromophores. Les principales lésions retrouvées sont des dimères de pyrimidines et des photoproduits. Les distorsions créées sur la double hélice peuvent bloquer la transcription et la réplication du matériel génétique. De la même manière, des agents alkylants (exemples : le cyclophosphamide, le chlorambucil, le melfalan) peuvent induire des pontages interbrins et/ou intrabrins en établissant des liaisons covalentes avec la molécule d'ADN (Hotta and Ueoka, 2005). Certains antibiotiques cytotoxiques utilisés comme anti-tumoraux peuvent également induire des CDB en inhibant l'activité de la topoisomérase II (exemples : la doxorubicine, l'étoposide, le mitoxantrone) (Pommier, 2013), ou en produisant des ROS (exemple : la bléomycine) (Kappus et *al.*, 1990). Ces génotoxines peuvent être strictement synthétiques ou bien d'origine naturelle comme les toxines de distension (CDTs, « cytolethal distending toxins ») qui sont capables de créer des CDB de l'ADN grâce à leur activité DNase (Fedor et *al.*, 2013).

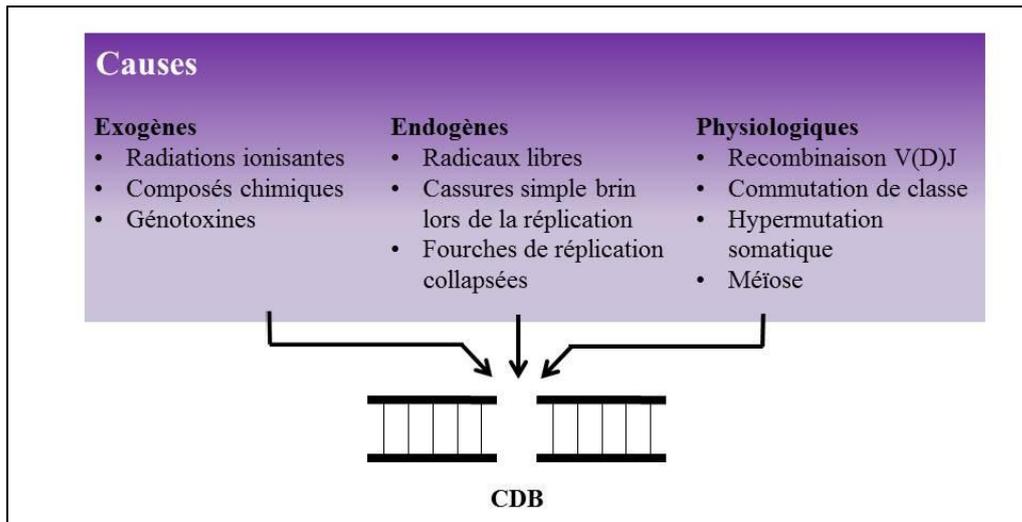


Figure 27. Les différentes sources de cassures double brin.

(D'après van Gent et *al.*, 2001). Les CDB sont d'origine endogène ou exogène. Lors de processus cellulaires, les CDB peuvent faire partie intégrante du mécanisme moléculaire ou au contraire résulter d'un dysfonctionnement. Parmi les causes exogènes, on distingue les causes physiques, chimiques et biologiques. Quelle que soit la cause de la CDB, ce type de lésion nécessite une réparation rapide.

3.2. Déroulement de la réponse cellulaire aux cassures double brin

Quels que soient l'origine et le type de dommage fait à l'ADN, la cellule doit impérativement réparer la lésion pour rétablir l'intégrité de son génome. Si la cellule ne parvient pas à corriger les dommages produits sur ses molécules d'ADN, son entrée en apoptose ou en sénescence peuvent lui permettre de bloquer la propagation d'éventuelles mutations délétères. Cette réponse fait intervenir plusieurs voies de signalisation et de très nombreux composants moléculaires. Bien que très complexe, la DDR se déroule selon la même cascade de signalisation organisée autour de quatre groupes de facteurs : les senseurs, les médiateurs, les transducteurs et les effecteurs.

Les senseurs détectent un dommage sur l'ADN. Ce sont les premiers intervenants dans la voie de signalisation. Ils se lient aux médiateurs, des composants sans activité catalytique mais qui favorisent les interactions entre protéines. Les médiateurs permettent de recruter les transducteurs. Une fois activés, les transducteurs transmettent le signal à différentes protéines effectrices qui déterminent l'orientation de la réponse vers l'arrêt du cycle cellulaire, la correction de la lésion et/ ou l'apoptose (Figure 28).

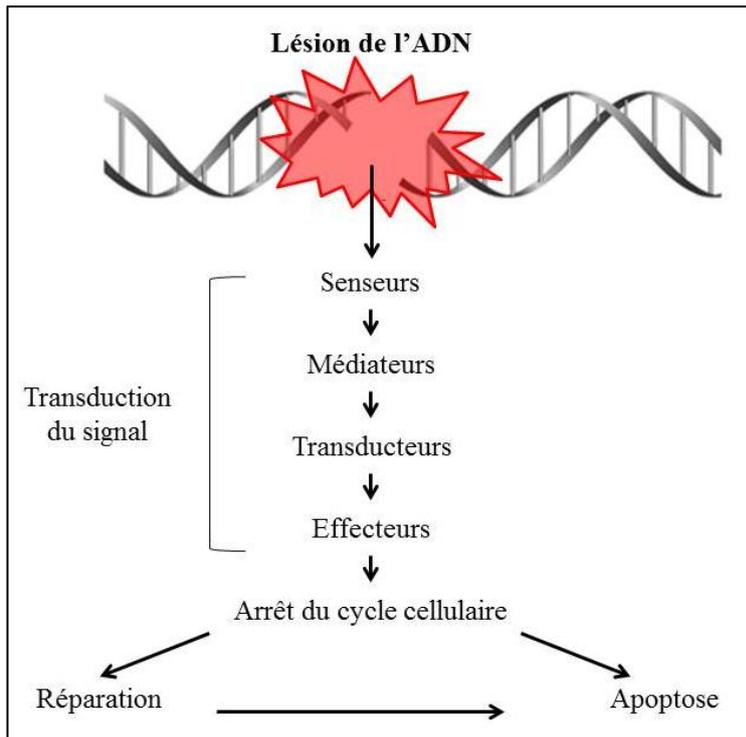


Figure 28. Organisation de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN.

Les lésions de l'ADN sont reconnues par des senseurs. La transmission du signal aux transducteurs nécessite des médiateurs. Enfin, les transducteurs activent des effecteurs qui déterminent la réponse cellulaire. On observe une activation des mécanismes de réparation de l'ADN. Lors de dommages importants, la cellule peut entrer en apoptose ou en sénescence.

Chez les mammifères, plusieurs voies de réparation ont été décrites selon le type de dommages.

- La voie de **réparation par excision des bases** (BER) corrige principalement des lésions qui ne modifient pas la structure enroulée de l'ADN (Robertson et *al.*, 2009). Elle répare également les sites abasiques.
- La **réparation par excision des nucléotides** (NER) élimine une séquence de 24 à 32 bases encadrant une base endommagée ou une autre lésion risquant de perturber la machinerie de réplication de l'ADN (Costa et *al.*, 2003).
- Le **mécanisme de réparation des mésappariements** (MMR) reconnaît et corrige des bases appariées mais non complémentaires d'après le code génétique (Kunkel and Erie, 2005).
- La **jonction des extrémités non homologues** (NHEJ) répare des CDB de l'ADN (Lieber, 2010).
- La **recombinaison homologue** (HR) répare des CDB et des pontages interbrins. Elle rétablit des fourches de réplication bloquées (Li and Heyer, 2008)
- La **synthèse translésion** (SL) permet à la réplication de l'ADN de dépasser une base encombrante ou manquante (Prakash et *al.*, 2005)
- L'**appariement entre simples brins** (SSA) utilise des séquences homologues à proximité du site de CDB (Cramer et *al.*, 2008).

Bien que trois mécanismes de réparation soient décrits en réponse aux CDB, les premières étapes sont communes aux trois. De manière quasi-instantanée, une CDB déclenche trois événements clés qui conditionnent par la suite le déroulement de la réparation. Chronologiquement, on observe (1) une modification de la chromatine au site de clivage, (2) le recrutement du complexe MRN et (3) la résection des extrémités endommagées.

(1) Modification de la structure chromatinienne

Suite à une CDB, en quelques secondes, la chromatine est ouverte au niveau du site de la lésion (Price and D'Andrea, 2013). De façon concomitante, les senseurs reconnaissent la lésion et se fixent sur l'ADN. L'ouverture de la double hélice, ainsi que la stabilisation des liaisons à l'ADN, sont des processus coûteux en énergie et donc dépendant fortement de l'approvisionnement en ATP. L'exposition des brins d'ADN facilite le recrutement des protéines de réparation. De même, le déplacement des nucléosomes vers cette région chromatinienne décondensée découvre les histones. La modification du code des histones par méthylation, sumoylation, acétylation ou phosphorylation joue un rôle important dans la signalétique du recrutement des acteurs de la réparation. La phosphorylation des histones H2AX est à ce jour la modification la plus documentée à ce jour. Elle génère un signal qui permet le recrutement des facteurs de réparation et les concentre au site de CDB (Scully and Xie, 2013).

(2) Recrutement du complexe MRN

Le complexe MRN est formé par les protéines Mre11 (Meiotic Recombination protein 11), Rad50 et Nbs1 (Nijmegen Breakage Syndrome protein 1). MRN est recruté sur le site lésionnel par l'intermédiaire du médiateur Nbs1 (Figure 29). Cette protéine interagit avec MDC1, elle-même liée aux histones γ -H2AX par son domaine BRCT. La sous-unité Mre11 présente une activité nucléase. Le complexe MRN active des PIKKS : ATM, ATR ou des DNA-PKcs (Lamarche et al., 2010). La protéine ATM est la principale kinase engagée lors de la réponse aux CDB (Berkovich et al., 2007). Présente sous la forme d'un dimère inactif, ATM se monomérisse sous l'action du complexe MRN et s'active par autophosphorylation sur la sérine 1981 (Figure 29). ATM est une kinase qui phosphoryle de nombreuses protéines impliquées dans la voie de réparation : p53, BRCA1, Nbs1, SMC1 (Structural Maintenance of Chromosome protein 1), Rad17, 53BP1, entre autres (Figure 29).

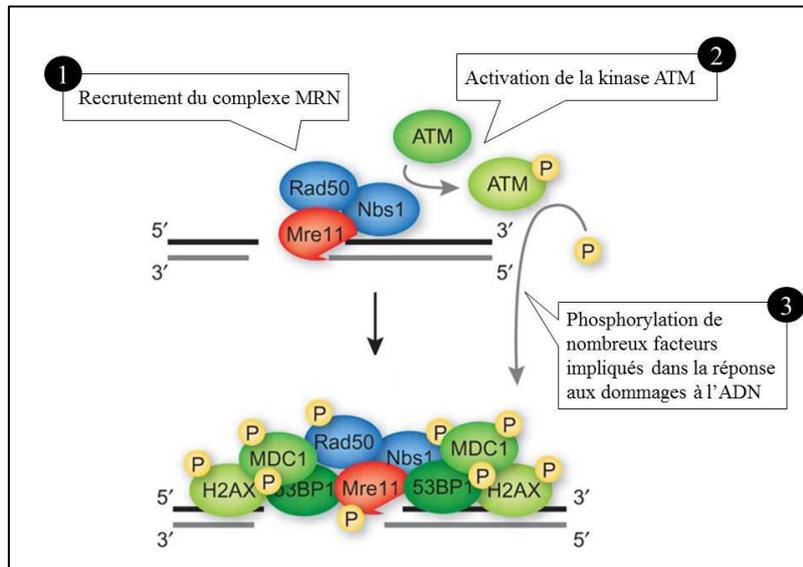


Figure 29. Etapes de recrutement du complexe MRN et d'activation de la kinase clé ATM lors du déclenchement de la réponse au dommage à l'ADN.

(D'après Zha et *al.*, 2009).

(3) La résection des extrémités double brin

Quelle que soit la voie de réparation mise en jeu, les machineries enzymatiques interviennent sur des extrémités simple brin 3'-OH sortantes. Selon le type de lésion, différentes modifications structurales doivent être réalisées sur les brins clivés. La protéine RPA (Replication protein A) se fixe sur les extrémités libres générées. Indiquant une séquence endommagée, RPA recrute ATR/ATRIP, Rad17 et le complexe 9-1-1 (Rad9p-Hus1p-Rad1p) (Binz et *al.*, 2004).

3.3. Les histones H2AX phosphorylées, un biomarqueur des sites de cassures double brin

La phosphorylation des histones H2AX est une conséquence immédiate des CDB. Chez les mammifères, les histones H2AX sont phosphorylées sur la Ser139 (γ -H2AX) de l'extrémité C-terminale par plusieurs kinases de la famille PIKKs (ATM, ATR et DNAPKs).

Les histones γ -H2AX interagissent avec MDC1 et le complexe MRN qui active ATM. Ainsi, par effet domino, les histones H2AX sont phosphorylées sur plusieurs mégabases de part et d'autre de la zone de clivage (Rogakou et *al.*, 1999). Chaque CDB est associé à un foyer d'histones γ -H2AX visualisable par immunomarquage (Figure 30).

Les γ -H2AX ne sont pas indispensables à la reconnaissance des CDB (Celeste et *al.*, 2003). Cependant, elles participent au maintien et à l'accumulation d'autres facteurs, notamment 53BP1, BRCA1 et Nbs1. Ces facteurs, tout comme les γ -H2AX, réunis en forte densité forment des foyers nucléaires ou IRIF (irradiation induced foci) (Hlatky, 2012)

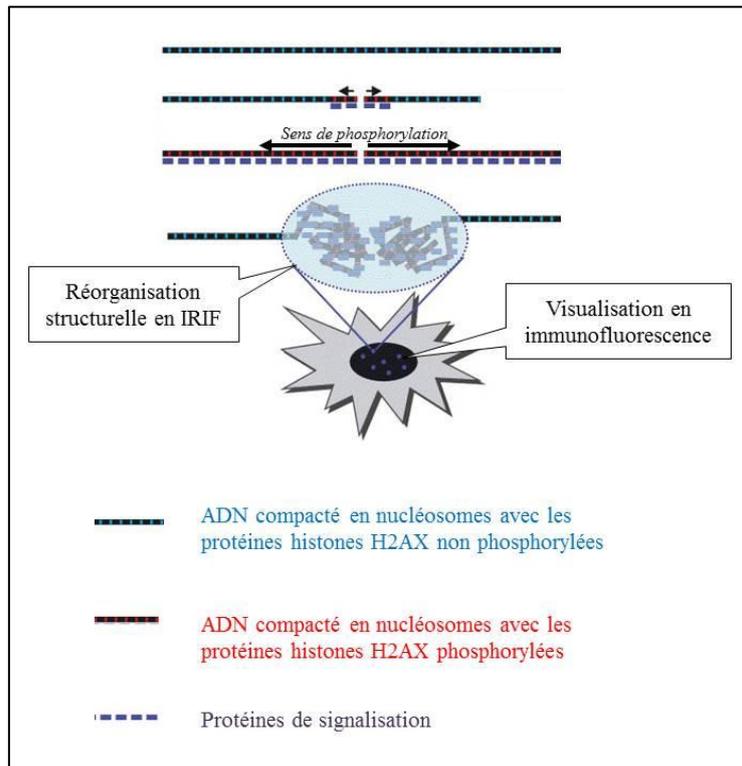


Figure 30. Phosphorylation des histones H2AX, réorganisation structurelle de la chromatine et visualisation des IRIF.

(D'après Fernandez-Capetillo et *al.*, 2004).

La colocalisation des γ -H2AX, la quasi-simultanéité de leur formation avec la rupture des brins et la simplicité de détection de ce signal en font un bon marqueur des sites de CDB.

3.4. Mécanismes de réparation des cassures double brin

Trois mécanismes de réparation des CDB sont connus à ce jour : la jonction des extrémités non homologues (NHEJ), la recombinaison homologe (HR) et l'appariement de séquences simple brin homologues (SSA). L'activation préférentielle de l'une de ces voies est fortement corrélée à la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule au moment de la lésion

(Branzei and Foiani, 2008). La HR est plus souvent rencontrée au cours des phases S et G2 ; tandis que la NHEJ, plus active en phase G1 et à la transition G1-S, peut être déclenchée à tout moment.

3.4.1. La recombinaison homologue

Le système de recombinaison homologue met en jeu un appariement de séquences homologues et un échange de brins entre la molécule d'ADN cassée et la seconde molécule intacte. La recombinaison homologue peut être décomposée en trois phases successives (Sung and Klein, 2006) : (1) la phase présynaptique ; (2) la phase synaptique et (3) la phase postsynaptique.

(1) La phase présynaptique

Pour être réparées, les extrémités générées par la cassure sont raccourcies en 5' à l'aide de nucléases et du complexe MRN. Cette résection génère de longues extrémités simples brins 3' terminales reconnues par la recombinase Rad51. Les monomères de Rad51 se polymérisent autour du simple brin et assemblent une structure nucléoprotéique organisée nommée filament présynaptique (Figure 31).

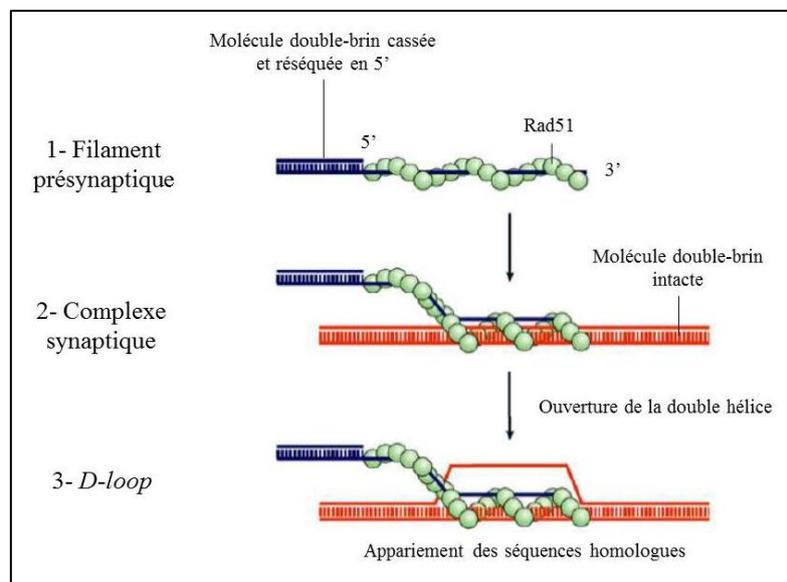


Figure 31. Déroulement des étapes initiales de la recombinaison homologue

(D'après Sung and Klein, 2006). Après maturation de l'extrémité endommagée, des monomères Rad51 s'associent sur la portion monobrin pour former un filament nucléoprotéique hautement organisé. Ce filament présynaptique se lie à une molécule d'ADN sur laquelle il se déplace à la

recherche de son substrat homologue. A partir de ce complexe synaptique, et aidé par d'autres protéines de réparation, le simple brin s'intercale dans la double hélice et s'apparie à son brin complémentaire.

(2) La phase synaptique

Aidé par le complexe Hop2-Mdn1, le filament présynaptique capture une molécule d'ADN double brin. La recombinaise Rad 51 polymérisée associe l'extrémité simple brin à l'ADN double brin. Le complexe formé par le filament nucléoprotéique, l'ADN simple brin du brin endommagé et la molécule double brin envahie est appelé complexe synaptique (Fig 32.). Le brin de l'ADN endommagé se déplace à la recherche de son substrat homologue d'ADN double brin. La recherche d'homologie serait un évènement aléatoire guidé par la complémentarité des bases. Dès lors, la molécule d'ADN s'ouvre et le filament nucléoprotéique s'apparie à son brin complémentaire. L'appariement entre les séquences complémentaires crée une structure caractéristique est appelée D-loop (displacement loop) (Figure 32) et déclenche la synthèse d'ADN. L'ADN polymérase utilise d'une part le brin envahissant comme amorce ; d'autre part le brin complémentaire comme substrat. La synthèse s'arrête lors de l'engagement de la 2^{ème} extrémité du brin cassé (5'). A cette étape, les brins en cours de synthèse s'entrecroisent et forment une double jonction de Holliday.

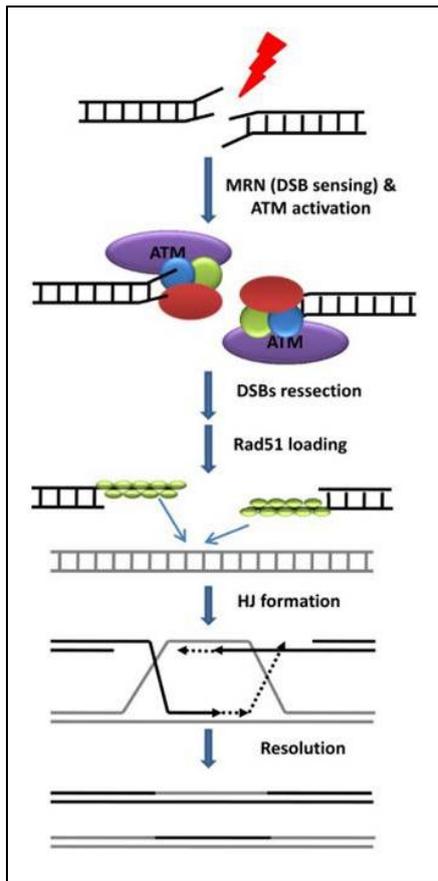


Figure 32. Les étapes successives de la recombinaison homologue.

(D'après Joaquin and Fernandez-Capetillo, 2012). La lésion de l'ADN est reconnue par le complexe MRN qui active la kinase ATM, une protéine clé de la réponse aux CDB. Les extrémités de la cassure sont maturées, faisant apparaître des simples brins sur lesquels polymérise Rad51. Le filament nucléoprotéique guidé par les protéines de la réparation s'associe à une molécule d'ADN double brin, l'envahit et s'apparie à son substrat homologue afin de réaliser une synthèse fidèle. L'entrecroisement des brins crée des jonctions de Holliday dont la résolution peut être exécutée par plusieurs systèmes.

(3) La résolution des intermédiaires de recombinaison.

Afin d'obtenir deux molécules d'ADN double brin, cette structure intermédiaire de recombinaison doit être coupée au niveau de chaque jonction. Cette étape de résolution peut être réalisée selon plusieurs mécanismes conduisant chacun à des produits différents avec ou sans enjambement. Ainsi, en phase postsynaptique, la résolution peut se décliner selon 3 modes de réparation soit par appariement des brins dépendant de la synthèse d'ADN (SDSA, « synthesis-dependant strand-annealing »), soit par répllication induite par la cassure (BIR, « break-induced replication ») ou par la voie classique de recombinaison (DSBR, « double-strand break repair ») (Li and Heyer, 2008) (Figure 33).

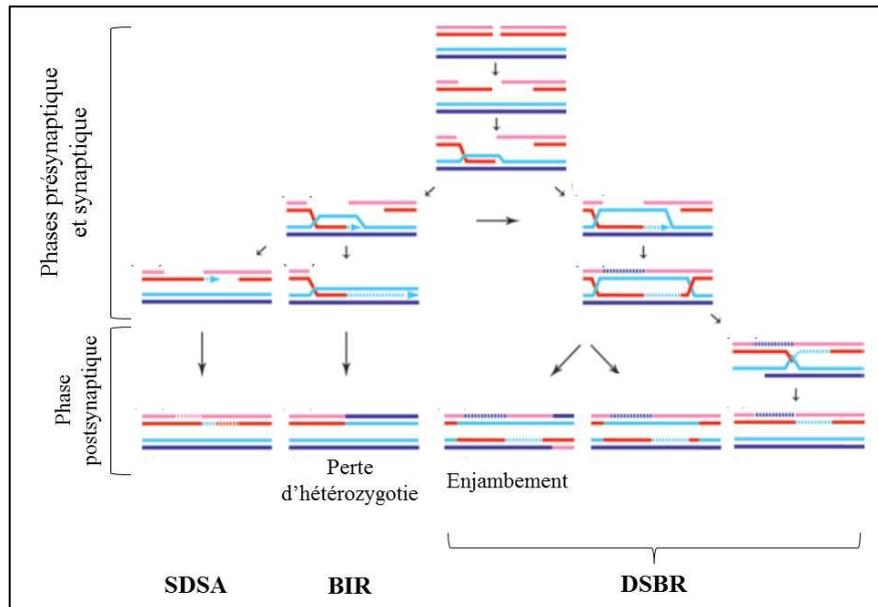


Figure 33. Les trois voies de réparation par recombinaison homologue et leurs produits.

(D'après Li and Heyer, 2008). Les premières étapes de la recombinaison homologue font apparaître des jonctions de Holliday. Simple ou double, ces entrecroisements de brins peuvent être résolus selon l'une de ces voies : l'appariement des brins dépendant de la synthèse d'ADN (SDSA), la voie de réplication induite par la cassure (BIR) ou bien par la voie classique de réparation des CDB (DSBR). Chaque mécanisme donne un produit de recombinaison différent et à des modifications de l'information génétique plus ou moins étendue. La BIR entraîne une perte d'hétérozygotie. La DSBR peut créer un échange de brin par un enjambement.

3.4.2. La jonction des extrémités non homologues

Contrairement aux mécanismes de HR, le système de réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) ne repose pas sur un contrôle d'homologie (Lieber, 2010). En conséquence, la synthèse d'ADN introduit des mutations et la religation des brins peut finaliser un échange de brins hétérologues.

Cette voie répare en majorité les cassures à bouts francs, peu remaniées ensuite par le complexe MRN. Doté d'une forte affinité pour les extrémités, l'hétérodimère Ku70/Ku80 (ou Ku) enserre l'ADN cassé en formant deux anneaux de part et d'autre du clivage (Figure 34). Ku recrute la kinase ADN-dépendante DNA-PKcs et forme à eux deux un complexe enzymatique nommé DNA-PK. Au contact de l'ADN, DNA-PKcs s'autophosphoryle et phosphoryle d'autres facteurs de la réparation, notamment les protéines RPA et Artémis.

Localement, elle provoque l'ouverture de la double hélice qui devient accessible aux autres protéines de réparation essentielles à la NHEJ : XRCC4, ADN-ligase IV et XLF. DNA-PKcs se lie au complexe ligase IV-XRCC4 qui assure la ligation des brins (Figure 34). Juste avant cette étape finale, les extrémités sont modifiées afin d'ajouter des séquences de microhomologies et faciliter l'appariement des brins.

Les séquences des produits intermédiaires peuvent aussi être modifiées par l'action de 3 polymérases : la déoxynucléotidyl transférase (TdT), Pol μ et Pol λ . La TdT a pour fonction de synthétiser de l'ADN en l'absence de brin complémentaire. Néanmoins, elle introduit de la variabilité génétique.

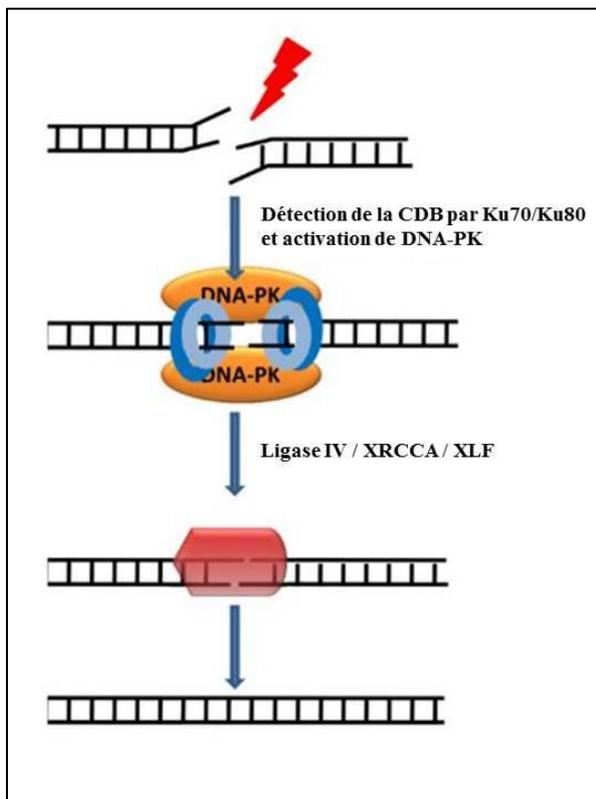


Figure 34. Les mécanismes de réparation par jonctions des extrémités non homologues.

(D'après Joaquin and Fernandez-Capetillo, 2012). L'hétérodimère Ku (Ku70/Ku80) se fixe sur les extrémités cassées en formant deux anneaux. Ku recrute la sous-unité catalytique du complexe DNA-PK, DNA-PKcs qui entraîne l'ouverture de la double hélice et son accès aux autres protéines de réparation. La ligation des brins est assurée par le complexe ligase IV-XRCC4. Le produit obtenu est modifié par l'action de la TdT et de deux polymérases de la famille X (pol μ et pol λ).

3.4.3. L'appariement par simples brins homologues

La jonction des simples brins homologues (SSA, « single strand annealing ») est le dernier mécanisme de réparation des CDB découvert. Elle se réalise dans un contexte bien particulier. De manière indépendante à Rad51, deux séquences appartenant à des brins opposés s'apparient et remplacent la CDB en 2 CSB. Les extrémités non homologues sont éliminées (Stark et al., 2004) (Figure 35).

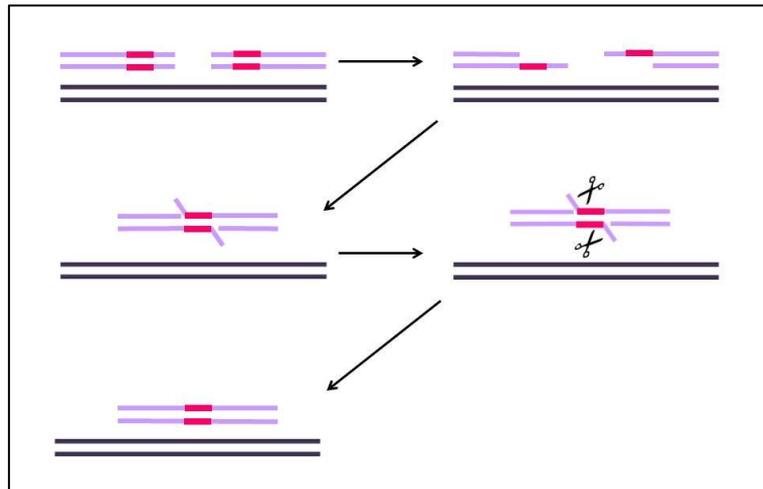


Figure 35. La réparation par appariement entre simples brins entraîne une perte de matériel génétique.

Lorsque deux séquences complémentaires (en rose) se trouvent à proximité du site de cassure, elles peuvent être appariées après résection des extrémités 5' terminales. La protéine Rad52 participe à cet appariement. Les brins non appariés sont éliminés par une endonucléase.

3.5. Conséquences des cassures double brin

Les CDB sont considérées comme les lésions de l'ADN les plus délétères pour la cellule. Une seule CDB peut être létale pour la cellule. Malgré le large panel de mécanismes de réparation, le matériel génétique conserve les marques de ces cassures sous forme de mutations et/ou de remaniements chromosomiques. Ces modifications de l'information génétique, y compris les plus minimes, sont susceptibles de favoriser l'émergence d'une instabilité génomique, l'un des traits distinctifs des cellules transformées (Aguilera and Gómez-González, 2008).

Nous avons vu que les causes à l'origine de CDB sont multiples, ainsi que leurs mécanismes d'action. La réparation de ces cassures privilégie certaines voies en fonction de nombreux paramètres cellulaires, principalement la phase du cycle cellulaire. Cette combinaison d'évènements génère parfois une signature mutationnelle sur le génome qui témoigne de l'action de la source responsable de la CDB.

L'étude des mutations consécutives à des CDB peut donc apporter des informations sur les mécanismes responsables de la rupture de l'ADN. La signature d'un agent mutagène

s'analyse en termes de type de mutation (substitution de bases, délétion, insertion) et de localisation sur le génome (spécificité de séquences).

Cette méthode peut être appliquée à la bléomycine, un composé produit par *Streptomyces verticillus* de la famille des NRP. Depuis sa découverte en 1965, le mode d'action de la bléomycine a été très étudié *in vitro* mais le mécanisme exact de la scission des brins d'ADN reste encore hypothétique. La bléomycine est active sous une forme chélatée à l'ion ferrique (ion fer(III), ou Fe^{3+}). Ce complexe réagit avec l'oxygène et produit des ROS (Hecht, 2000). La réactivité de ces molécules induit différents types de lésions sur l'ADN, principalement des CDB et l'oxydation des guanines en 8-oxoguanines (Ohno et al., 2006). Ces lésions résultent en de courtes délétions et des transversions de type GC → TA (Shibutani et al., 1991). De plus, d'après certaines publications, les délétions induites par la bléomycine se localiseraient majoritairement au niveau de sites spécifiques : en 3' des séquences 5'-GT-3' (ou en 5' des séquences 5'-AC-3') et pour les délétions A:T aux sites 5'-GTC-3' (ou 5'CAG-3') (Guttenplan et al., 2004).

Chapitre 4. Principe de l'essai de mutagenèse sélectif sur le gène *cII*

Parmi les essais de mutagenèse développés pour étudier les spectres de mutations figurent la méthode sélective sur le gène *cII* (Lambert et al., 2005).

Le système de détection des mutations au locus *cII* est une méthode permettant de quantifier et de caractériser les mutations générées sur un gène rapporteur. Cette technique peut être appliquée *in vitro* sur des lignées cellulaires – ou *in vivo* sur des rongeurs, tous deux génétiquement modifiés par intégration d'un vecteur phagique dans leur génome.

Le principe de ce test repose sur la biologie du cycle bactériophage lambda dont l'orientation est dépendante du produit du locus *cII*. Des notions élémentaires sur la biologie du bactériophage tempéré lambda (λ) sont rappelées au début de ce chapitre afin d'aider à la compréhension de cette technique. Bien que décrites dans la section *Matériel et méthodes*, les étapes successives de l'essai sont ici reprises sous un angle plus didactique.

4.1. Généralités sur le phage lambda

Le bactériophage λ est un virus procaryote dont l'hôte est la bactérie *E. coli*. Il s'agit d'un phage tempéré puisqu'il dispose de deux options de reproduction en fonction des conditions *in vitro*: il peut se multiplier de façon lytique ou bien persister dans le génome de la cellule hôte sous la forme de prophage (Węgrzyn et al., 2012) (Figure 36). Lors du cycle lytique, l'ADN phagique est répliqué de nombreuses fois dans la bactérie. Sa traduction par la machinerie enzymatique donne lieu à la synthèse massive de protéines virales et à l'assemblage des virions. La cellule hôte, victime de ce parasitage, finit par se lyser libérant des milliers de virions dans le milieu. Au contraire, lors de la phase lysogène, la croissance de la bactérie est normale. Le génome du phage intégré dans le chromosome bactérien se transmet à la descendance à chaque division.

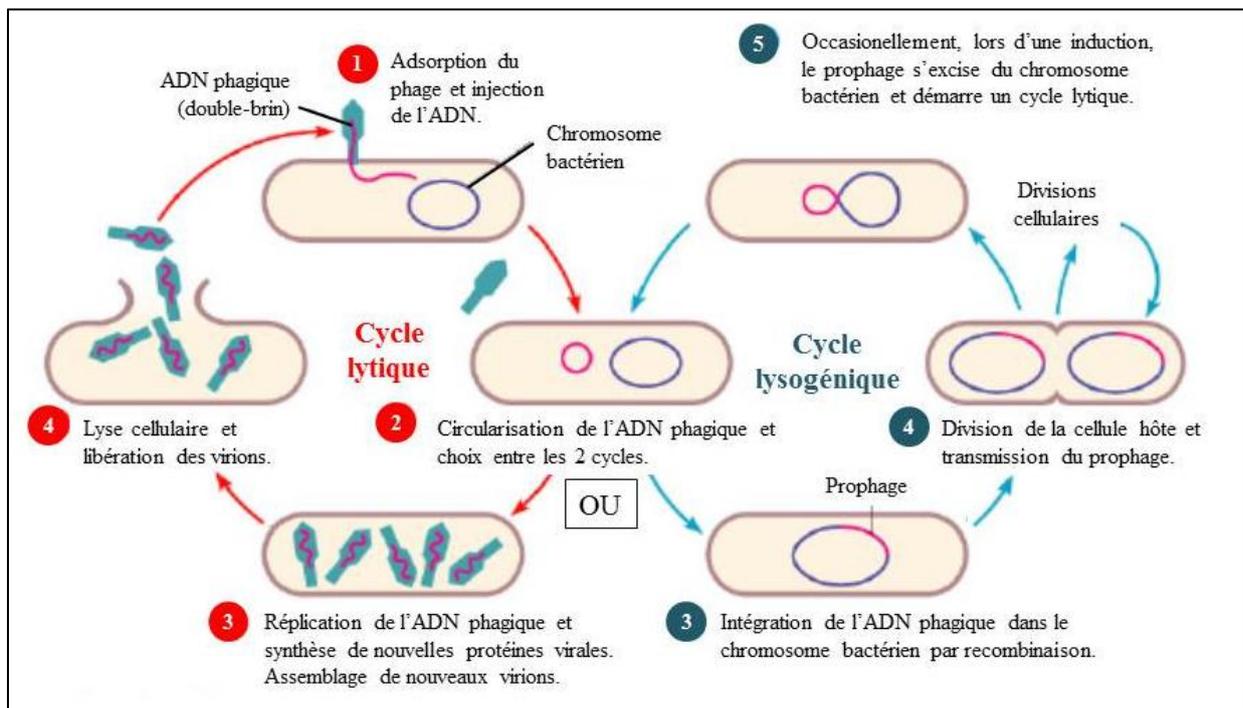


Figure 36. Les deux modes d'infection du phage lambda.

Le bactériophage λ est un phage tempéré qui peut se multiplier soit selon un cycle lytique, soit en s'intégrant sous forme de prophage dans le génome de la bactérie infectée.

Comme les virus eucaryotes non enveloppés, le phage λ possède une enveloppe protéique externe, appelée capsid ou tête, qui protège le matériel génétique (Figure 37). Le phage λ contient une molécule d'ADN double brin linéaire de 48 502 paires de bases (pb) terminée par des séquences *cos* aux extrémités cohésives (simples brins complémentaires de 12 pb) (Figure

37). La tête du phage est prolongée par une queue et une fibrille nécessaire à l'ancrage du virus sur la cellule hôte.

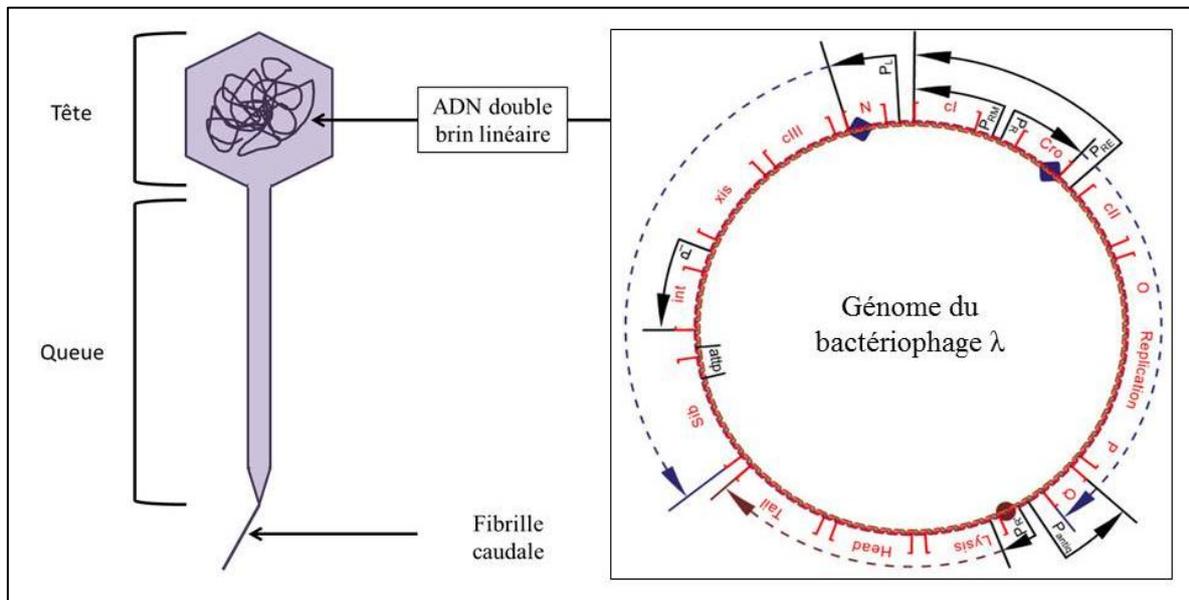


Figure 37. Structure et génome du phage lambda.

Le bactériophage λ est un virus bactérien à ADN double brin linéaire. Son matériel génétique est protégé dans une capsidie icosaédrique qui forme la tête. Cette capsidie protéique est prolongée par une structure tubulaire (ou queue) impliquée dans l'encapsidation et l'injection de l'ADN phagique. La queue se termine par une fibrille qui participe à l'ancrage du virus bactérien sur la cellule hôte.

Le virus bactérien se lie au récepteur LamB, une porine appartenant à l'opéron maltose, de la membrane externe de *E. coli* (Chatterjee and Rothenberg, 2012). L'expression de ce récepteur est induite par le maltose et inhibée par le glucose. Pour qu'une bactérie soit sensible à l'infection, elle doit être cultivée dans un milieu contenant du maltose. La fixation du phage, probablement due à des interactions électrostatiques, est facilitée par la présence d'ions Mg^{2+} dans le milieu. Puis, l'ADN linéaire du phage est injecté dans le cytoplasme de la bactérie à travers la membrane. L'ADN se circularise aux sites *cos* à l'aide d'une ligase de *E. coli* (Campbell, 2007). Rapidement, la machinerie cellulaire est détournée au profit du virus. La transcription est initiée sur 2 promoteurs, p_L et p_R , dont les transcrits codent pour les protéines N et Cro respectivement.

N est un antiterminateur qui s'associe à l'ARN polymérase et lui impose de continuer la transcription au-delà des séquences de terminaison. En conséquence, les gènes O, P et Q, très importants pour le déroulement du cycle lytique sont transcrits. D'autre part, Cro se fixe sur

les opérateurs OR1, OR2 et préférentiellement sur OR3 ; et inhibe la transcription de *cl* (répresseur λ), un facteur clé pour l'entrée en phase lysogène (Oppenheim *et al.*, 2005) (Figure 38).

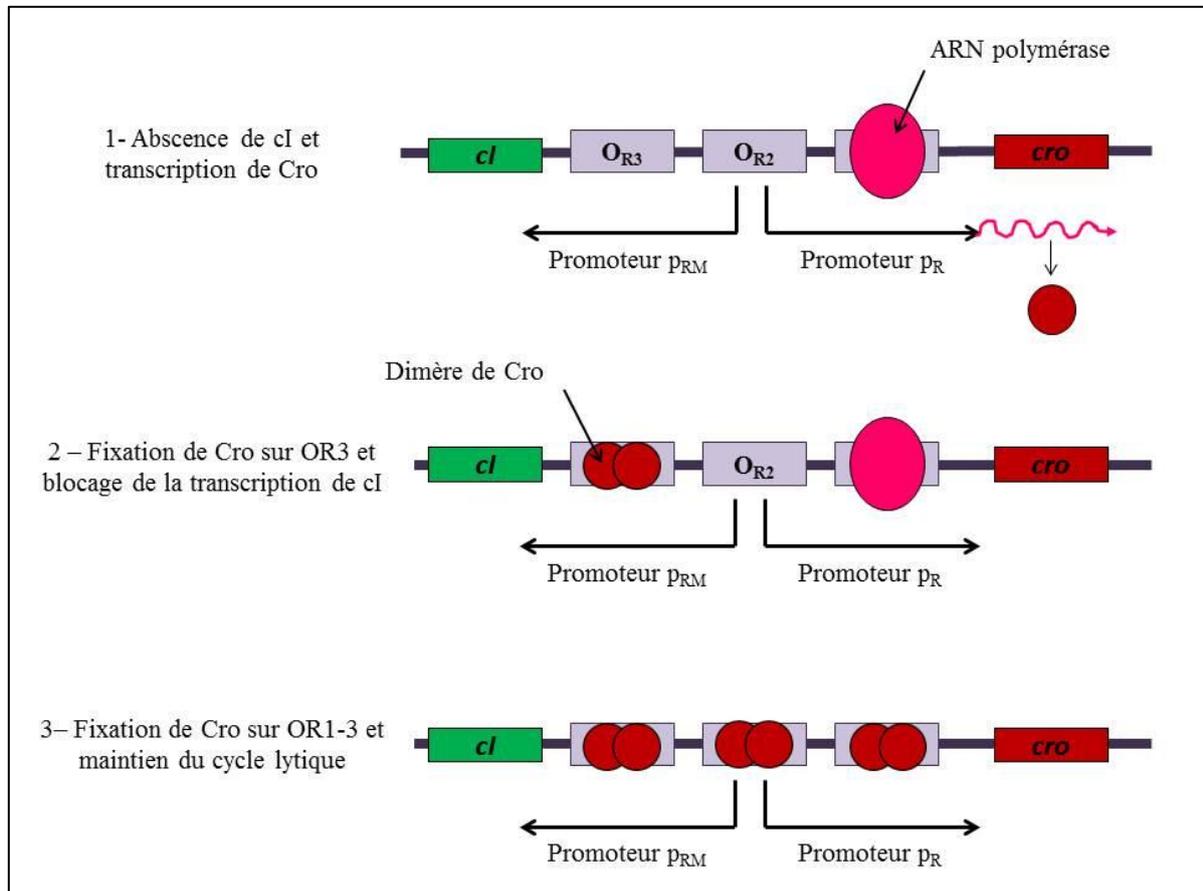


Figure 38. Régulation du cycle lytique.

La transcription de la protéine Cro est initiée au promoteur p_R . La fixation de Cro sur l'opérateur O_{R3} bloque la transcription du répresseur *cI* et engage la cellule dans un cycle lytique. Puis, la fixation de Cro sur les trois opérateurs (O_{R1-3}) maintient l'expression de Cro et des autres gènes transcrits lors du cycle lytique.

Lors de la phase précoce, la transcription des gènes O et P déclenche la réplication de l'ADN phagique. La protéine P interagit avec O pour permettre sa fixation sur une origine de réplication unique (ORI). L'ADN est répliqué de manière bidirectionnelle, puis, plus tardivement, en cercle roulant afin de générer un concatémère (Taylor and Wegrzyn, 1995; Wegrzyn and Wegrzyn, 2006).

Dès lors que la protéine contrôle Q ait atteint un taux suffisant, Q se fixe sur le promoteur p_R et régule positivement la transcription de gènes tardifs, ceux codant les protéines de structure (Friedman and Court, 1995).

L'assemblage est un processus hautement organisé. La capsid de la tête est construite en premier, séparément de la queue. Un génome est encapsidé à partir d'un concatémère d'ADN à l'aide des séquences *cos* (séquences d'initiation et de terminaison de l'encapsulation) (Tavares et al., 2012).

L'endolysine (R) et la holine (S) provoquent, à de fortes concentrations, la lyse de la cellule hôte. La holine est requise pour permettre le passage membranaire de l'endolysine qui dégrade la couche de peptidoglycane. La lyse libère les nouveaux virions dans le milieu (Wang et al., 2003).

Certains phages, dits virulents, n'ont d'autre choix que de réaliser un cycle lytique. A l'inverse, les phages tempérés comme le bactériophage λ peuvent lorsque les conditions sont défavorables à la reproduction du virus (forte densité de virus, milieu pauvre en nutriments, bactéries en phase stationnaire) induire une lysogénie (Kihara et al., 1997). La protéine Int intègre la séquence d'ADN virale dans le chromosome bactérien par recombinaison des sites *attP* (viral) et *attB* (bactérien) (Campbell, 2007).

Lors de la transcription primaire, les facteurs cII et cIII mettent en place la répression du cycle lytique en démarrant la synthèse de cI. La protéine cII exerce son activité en contrôlant 3 promoteurs : p_I qui transcrit *int*, p_{RE} qui transcrit cI et p_{AQ} qui produit un ARN antisens inhibant le produit du gène Q (Figure 39). CIII se lie aux protéases FtsH codées par le gène *htflB* et protège ainsi cII de leur dégradation (Figure 39) (Kobiler et al., 2007).

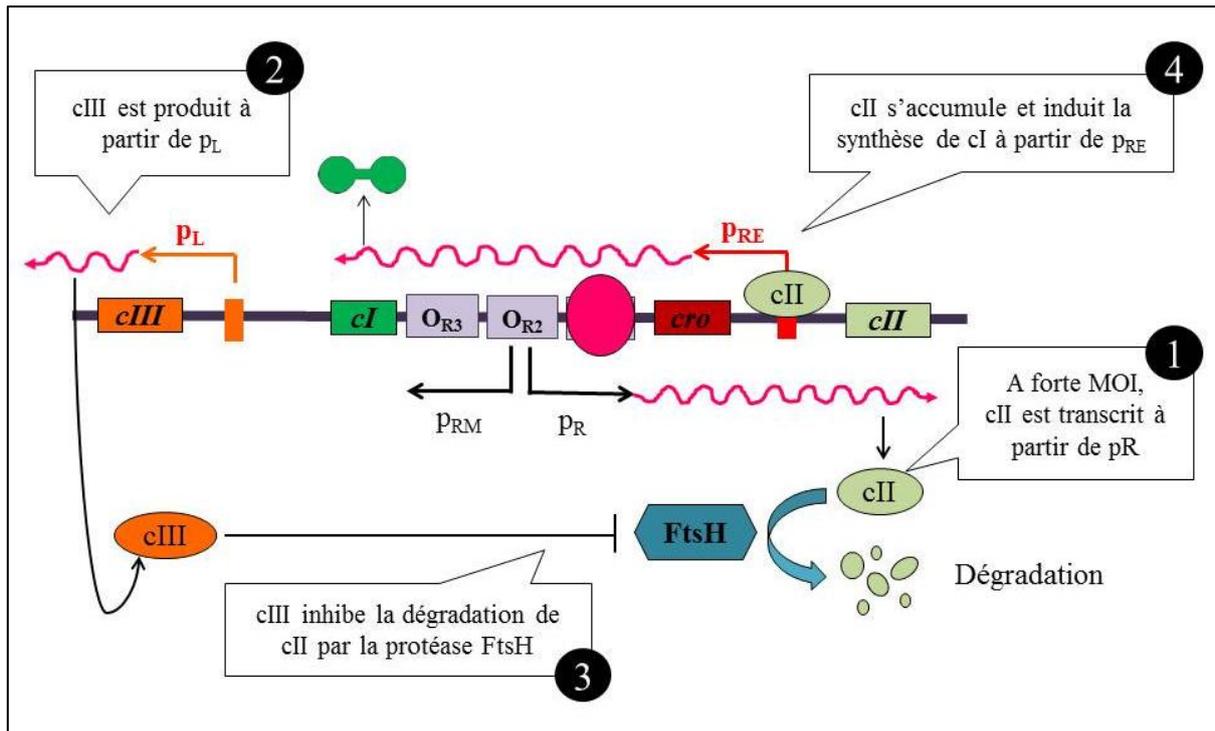


Figure 39. Activation des promoteurs p_{RE} et p_L .

Le facteur *cII* est essentiel lors de l'entrée en lysogénie. A forte MOI, *cII* est transcrit à partir de p_R et se fixe sur le promoteur p_{RE} . Le répresseur *cI* est produit à partir du transcrit de p_{RE} . De façon concomitante, *cIII* est synthétisée et inhibe la protéase cytoplasmique *FtsH* spécifique de *cII*.

Le répresseur λ (*cI*) bloque l'expression des gènes nécessaires au déroulement du cycle lytique en se fixant sur les 3 opérateurs O_{R1-3} . *cI* bloque la synthèse de *Cro* et autorégule sa propre transcription (Figure 40).

La bactérie lysogène se divise normalement et réplique l'ADN prophagique intégré dans son propre génome. Par ailleurs, suite à un stress ou un changement des conditions de croissance, le cycle lytique peut être activé. Nous avons vu que le choix entre les 2 modes d'infection dépend de la balance entre les facteurs *cI* (pro-lysogène) et *Cro* (pro-lytique). La réponse SOS active la protéine RecA (Recombination protein A) qui provoque l'auto-clivage de *cI* (Galkin et al., 2009). La dégradation de *cI* libère les opérateurs et permet la transcription de *cro*. *Cro* réprime la synthèse de *cI* en se fixant sur O_{R3} . Certains variants de *cI* sont sensibles à une élévation de température comme le variant *cI857* utilisé par la technologie Big Blue.

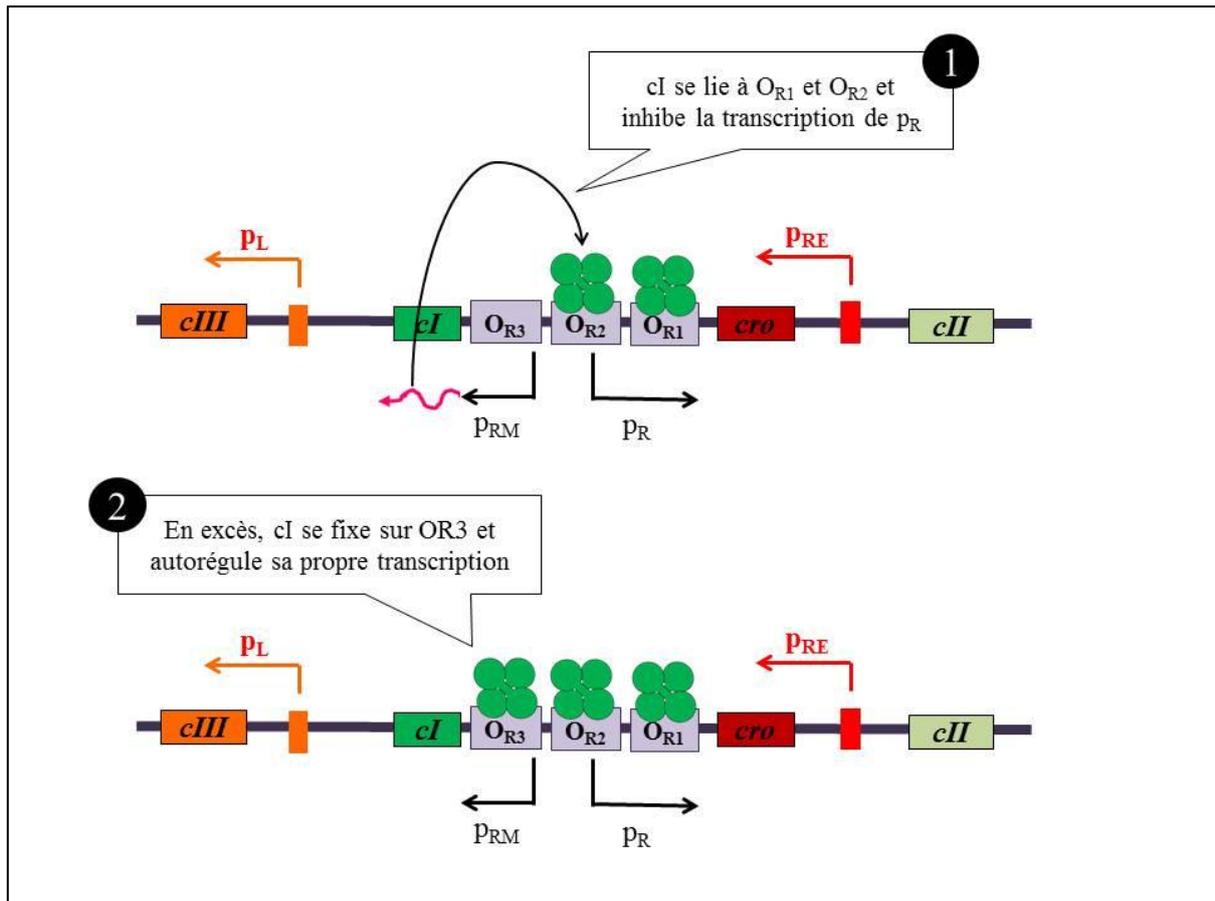


Figure 40. Activation du promoteur p_{RM} .

Le facteur cI , ou répresseur λ , se fixe sur les opérateurs O_{R1} et O_{R2} et inhibe l'expression de cro . En excès, cI se fixe sur O_{R3} et régule sa propre transcription.

4.2. La lignée de fibroblastes embryonnaires Big Blue Rat2

L'essai de mutagenèse Big Blue fait appel à une lignée cellulaire transgénique de fibroblastes de rat nommée Big Blue Rat2. Ces cellules ont intégré dans leurs chromosomes plusieurs copies du vecteur navette λ LYZ (45,5 kb) (Erexson et al., 1998).

Le vecteur λ LYZ est à la base du système de détection des mutations et de sa sélectivité sur les locus lac et cII . La séquence de ce vecteur est dérivée de l'opéron lactose et du génome du coliphage λ . Extraits avec l'ADN génomique des cellules, les vecteurs peuvent être encapsidés *in vitro* sous forme de bactériophages viables. Après infection de leur hôte (*E. coli*), les phages mutés sur le locus $lacI$ ne produisent plus la β -galactosidase et forment des colonies incolores aisément reconnaissables parmi les colonies bleues issues des phages sauvages. La détection des mutants cII , par sélection positive, se réalise dans des conditions

favorables à la lysogénie : utilisation de la souche de *E. coli* G1250 (*hflb*-), à 24°C (Nohmi et al., 2000).

Les cellules Big Blue Rat2 ont été développées avant les rats transgéniques Fisher 344 Big Blue par transfection de la lignée Rat2 avec le vecteur λ LYZ (Erexson et al., 1998). La lignée Rat2 dérivent d'une lignée de fibroblastes de rat porteuse de la mutation *tk*^{-/-} (thymidine kinase) et résistante à la 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU) (lignée Rat1 ou F2408) (Topp, 1981). Entre 50 et 70 copies du vecteur navette λ LYZ sont retrouvées dans le génome des cellules Big Blue au niveau de deux sites d'intégration différents (Wyborski et al., 1995). Ces cellules sont également résistantes à la généticine (G418) suite à une co-transfection avec le plasmide pSV2NEO.

Alors que les cellules des animaux Big Blue sont quasi-diploïdes (2N = 42 chromosomes chez le rat) avec en moyenne 44 chromosomes par cellule (Topp, 1981), les cellules Big Blue Rat2 sont hyperploïdes contenant en moyenne 75 chromosomes par cellule (Erexson et al., 1998). Cette ploïdie est d'autant plus variable qu'en métaphase le nombre de chromosomes peut varier de 36 à 130. Cette instabilité chromosomique s'exprime par la formation spontanée de nombreux micronoyaux et d'aberrations chromosomiques. La fréquence excessive d'apparition d'anomalies chromosomiques rend cette lignée inapte à l'évaluation des dommages chromosomiques. L'instabilité génétique mise en évidence dans la lignée Big Blue Rat2 n'interfère pas avec les résultats des études de mutagenèse (Erexson et al., 1998). La lignée Big Blue Rat2 reste un modèle largement utilisé dans ce domaine.

4.3. Chronologie de l'essai de mutagenèse sélectif au locus *cII*

La lignée cellulaire Big Blue Rat2 permet de détecter à la fois les mutations présentes sur le locus *lacI* et sur le locus *cII*. Plus sélective, nous avons choisi d'appliquer la méthode de sélection sur *cII*. Le déroulement de cet essai est détaillé ci-dessous.

La première étape consiste à exposer les cellules Big Blue à l'effet mutagène testé (Figure 41). Il peut s'agir indifféremment d'une irradiation, d'un traitement par un composé chimique, d'une infection par un agent pathogène ou de tout autre stress. Le génome dans son ensemble est soumis à l'action mutagène y compris les vecteurs λ LYZ. Ces vecteurs sont utilisés

comme indicateurs de la fréquence de mutation induite dans le génome. La mesure est exprimée en fréquence de mutant au locus *cII*.

Les cellules sont remises en culture pendant plusieurs jours, un à 28 jours classiquement, en fonction des observations souhaitées. L'ADN génomique est extrait d'un lot de $2,0 \times 10^7$ cellules (Figure 41). Cet ADN contenant les vecteurs λ LYZ (et les locus *cII* potentiellement mutés) est utilisé pour réaliser une série d'expériences sur un mois environ. Au-delà d'un mois, la dégradation du support génétique peut augmenter la fréquence de mutant observée.

A partir de l'ADN génomique extrait, un échantillon (10 μ L) est introduit dans un milieu réactionnel reproduisant l'encapsidation des phages. Cette réaction *in vitro* permet de produire des particules virales viables renfermant un génome dérivé du vecteur λ LYZ (Figure 41). Les phages sont conservés dans une solution tampon SM, riche en ions Mg^{2+} nécessaires à l'ancrage sur la membrane externe de la bactérie.

Le statut mutationnel sur *cII* de ces nouveaux virions procaryotes est révélé par infection de la souche G1250 *hflb*- de *E. coli* (Figure 41). L'inactivation du gène *hflb* inhibe la dégradation du facteur *cII* et donc favorise l'entrée en lysogénie. La souche G1250 est cultivée dans un milieu contenant du maltose afin d'augmenter l'expression de son transporteur, la protéine LamB, qui est aussi le récepteur membranaire permettant l'infection par le phage lambda.

Après une demi-heure de contact à température ambiante, les bactéries infectées sont coulées sur une gélose LB dans un gel d'agarose mou (LB Top Agarose à 0,07% d'agarose). Dans la demi-heure suivante, les boîtes sont placées à 24°C (40-48 heures) pour détecter les phages mutés sur *cII* ; ou bien à 37°C (12 heures) pour titrer le nombre de plages de lyse criblées. Le facteur cI857, répresseur du cycle lytique, est thermosensible. Ainsi, tous les phages - mutants ou non mutants - entrent en cycle lytique à 37°C. La mutation sur *cII* est confirmée en reproduisant les étapes d'infection et d'incubation à 24°C. La lecture des boîtes incubées selon ces deux conditions permet d'estimer la fréquence de mutant *cII* (Figure 41).

Les phages peuvent être conservés par congélation afin de séquencer les mutations générées aux locus *cII*. L'ensemble de ces séquences détermine le spectre des mutations caractéristiques d'une source mutagène sur une séquence donnée.

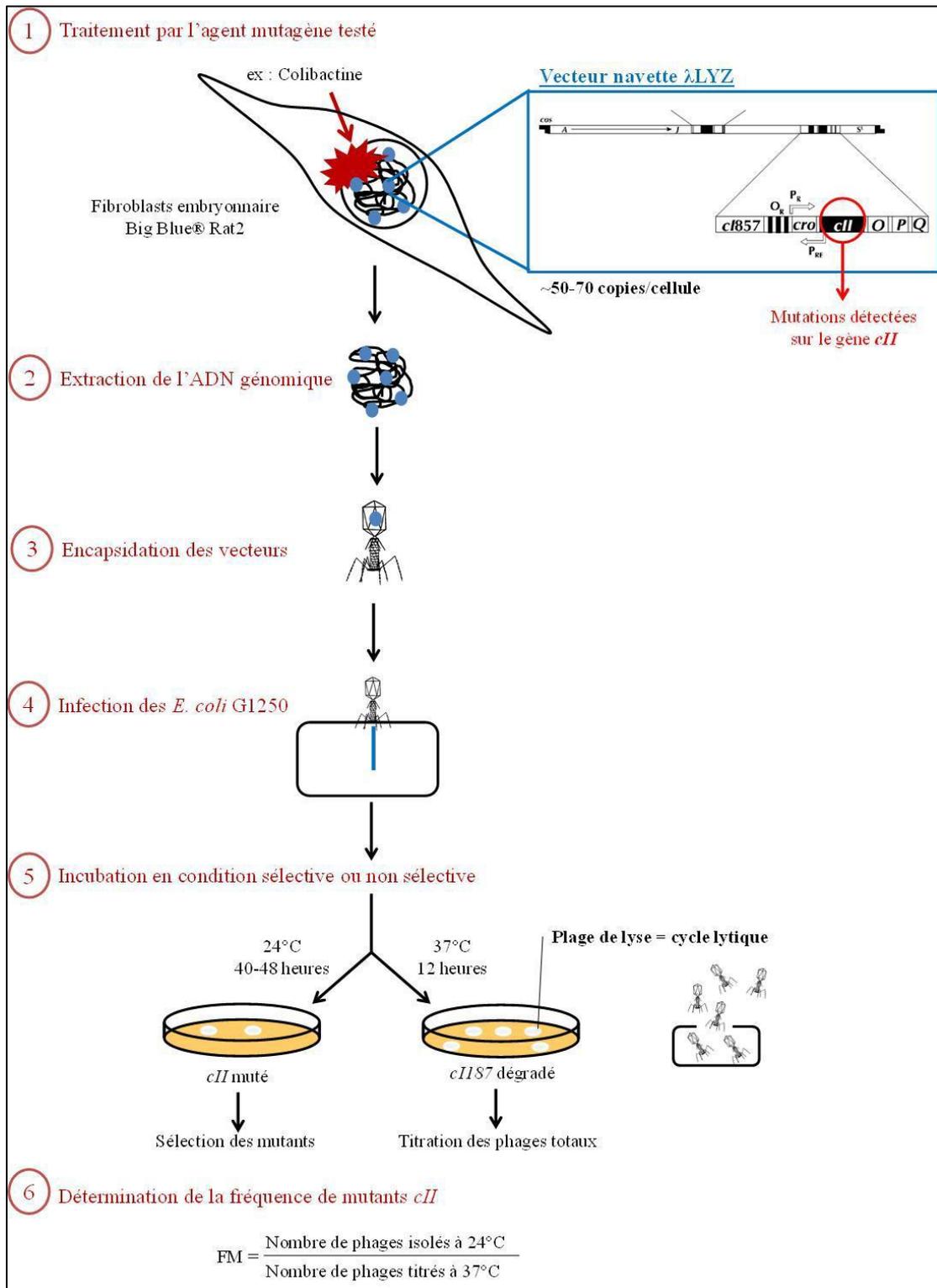


Figure 41. Principe de la méthode de sélection positive des mutants *cII*.

Les cellules transgéniques Big Blue enregistrent les effets mutagènes sur le gène rapporteur *cII* du bactériophage λ . Après isolement et conditionnement des vecteurs navettes, les nombres de phages et de mutants sont estimés par comptage des plages de lyse et déterminent la fréquence de mutant *cII*.

Partie 2. Etude expérimentale

Chapitre 1. Matériel et méthodes

1.1. Culture et traitements des cellules Big Blue

La lignée de fibroblastes embryonnaires Rat2 (Stratagene, La Jolla, CA) est cultivée à 37°C et 5% CO₂ dans un milieu complet (DMEM avec Hepes, Invitrogen) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF), 1% d'acides aminés non essentiels (Invitrogen) et de la gentamicine (50 µg/mL).

Trois agents mutagènes ont été testés : une irradiation aux rayons γ de 0.5 Gy, un traitement à la bléomycine (10 µM, 4 heures) et une infection par la souche DH10B pBAC pks de *E. coli* (MOI 60, pendant 4 heures) (Figure 1 ①).

La souche *E. coli* de laboratoire DH10B, contenant un chromosome bactérien artificiel (BAC) portant l'îlot pks (BAC pks), a été utilisée pour infecter les cellules Big Blue Rat2. Une préculture est réalisée dans un bouillon LB pendant une nuit à 37°C sous agitation. Le jour de l'infection, la culture bactérienne est diluée au 1/20ème en milieu DMEM avec Hepes et incubée 2 heures supplémentaires à 37°C sous agitation.

Pour chaque traitement réalisé, deux flasques T175 sontensemencées avec 250×10^4 cellules la veille du traitement. Lors des traitements à la bléomycine et des infections (MOI 60), après 4 heures d'exposition, les cellules sont lavées quatre à cinq fois en PBS puis placées dans un milieu DMEM avec Hepes additionné de gentamicine à 50 µg/mL et 200 µg/ml respectivement. Les fibroblastes sont collectés par trypsination après 1 jour, 3 jours ou bien 21 jours de culture. Suite à un second rinçage, les cellules sont remises en suspension dans le milieu de congélation (90% SVF/10% DMSO) à la concentration de 10^7 cellules par mL. Des aliquots de 1mL sont congelés à -80°C puis dans l'azote liquide.

1.2. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique de haut poids moléculaire est extrait de 10^7 fibroblastes Big Blue à l'aide du kit Qiagen « Blood and cell culture DNA » (Figure 1 (2)).

Décongélation – rinçage des cellules

Les ampoules de cellules sont décongelées rapidement dans un bain marie à 37°C. La suspension cellulaire est transférée dans un tube de 1,5 mL puis centrifugée à $300 \times g$ 5 minutes à 20°C. Après avoir ôté le surnageant, le culot cellulaire est remis en suspension dans 1 mL de PBS et transféré dans un tube Falcon de 15 mL.

Lyse des cellules

Au préalable, le tampon de lyse (C1, Qiagen) et de l'eau bidistillée (50 mL) sont placés dans un bac de glace pour abaisser leur température à 0°C. Sur glace, 2 mL de tampon de lyse et 6 mL d'eau bidistillée sont ajoutés dans le tube contenant les cellules à lyser. Le tube est agité 10 fois par retournement puis laissé au repos 10 minutes à 0°C. Le lysat cellulaire est centrifugé à $1\ 300 \times g$ pendant 15 minutes à 4°C afin de collecter les noyaux dans le culot. Le surnageant doit être jeté avec précaution. Pour optimiser cette étape, une deuxième lyse est réalisée. Sur glace, 1 mL de tampon de lyse C1 et 3 mL d'eau bidistillée sont ajoutés sur le premier culot. L'agitation est réalisée par 5 secondes de vortex suivi d'une seconde centrifugation à $1\ 300 \times g$ pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est jeté avec précaution.

Digestion protéique

Le culot nucléaire est remis en suspension dans 1 mL de tampon de digestion (G2, Qiagen) à la pipette, puis complété par 4 mL de tampon G2 supplémentaires. La solution est agitée au vortex 30 secondes à vitesse maximale. La digestion est poursuivie par l'ajout de 95 µl de solution de protéinase K (Qiagen). Après une agitation de 1 à 2 secondes, le tube est placé dans un bain marie à 50°C pendant 1 heure. La solution est agitée toutes les 10 à 15 minutes pendant 5 secondes à vitesse maximale.

Purification de l'ADN

Cette étape permet de séparer l'ADN des autres constituants cellulaires. Au préalable, une cartouche de purification (Genomic-tip 100), placée au-dessus d'un tube Falcon de 50 mL, est

rincée avec 4 mL de solution tampon (QBT, Qiagen). Le digestat est agité 10 secondes à vitesse maximale avant d'être versé sur la cartouche. Le lysat contenant l'ADN entre par gravité dans la cartouche, alors que la solution tombe goutte-à-goutte dans le tube Falcon. Deux lavages successifs sont réalisés avec 7,5 mL de solution tampon (QC, Qiagen).

L'ADN est ensuite collecté par élution. Pour augmenter le rendement de l'extraction, l'éluant (QF, Qiagen) est chauffé au bain marie à 50°C au préalable. La cartouche est transférée au-dessus d'un tube Falcon de 15 mL avant d'y verser 5 mL d'éluant. L'ADN génomique, jusqu'ici adsorbé dans la cartouche – contenant de la silice dont la surface est chargée positivement – se retrouve en solution.

Précipitation de l'ADN

Après élution, l'ADN génomique est précipité en ajoutant 3,5 mL d'isopropanol (*i.e* : 0,7 x volume). Le tube est agité 10 fois par retournement. L'ADN initialement transparent (dissout) précipite et apparaît sous la forme d'une pelote de couleur blanc nacré. Ainsi visible, l'ADN est pêché à l'aide d'une pipette en verre (un matériau chargé positivement) et transféré immédiatement dans un microtube de 200 µL de tampon d'élution.

Mesure de la quantité et de la qualité de l'ADN génomique

Par une mesure de l'absorbance à 260 nm (absorbance maximale des acides nucléiques), la quantité d'ADN est déterminée et sa concentration calculée en appliquant un facteur de corrélation (ADN double-brin : 1 Abs = 50 ng/µl). La pureté de l'extraction est évaluée en mesurant l'absorbance à la longueur d'onde de 280 nm (absorbance maximale des protéines). Le rapport A_{260}/A_{280} doit être compris entre 1,8 et 1,2. Un rapport inférieur à 1,8 témoigne d'une purification insuffisante (beaucoup de protéines). Inversement, un rapport supérieur à 2 indique une contamination par des ARN.

1.3. Réaction d'encapsulation *in vitro*

A partir d'un échantillon d'ADN génomique (10 µL), une réaction d'encapsulation (Transpack Packaging extract, Agilent) est réalisée *in vitro* pour obtenir des particules de phages viables (Figure 1 ③).

Par échantillon d'ADN, un tube rouge contenant 10 µL d'extrait d'encapsulation est prélevé à -80°C et est placé immédiatement dans de la carboglace.

Avant utilisation, les tubes rouges sont centrifugés 1 à 2 secondes pour collecter le contenu au fond du tube. Chaque tube est décongelé rapidement, au trois quart environ, **juste avant utilisation**. A l'aide d'une pipette et d'un cône à large ouverture, 10 µl d'ADN génomique sont transférés dans un tube rouge. L'ADN est mélangé à l'extrait d'encapsulation en pipetant le mélange 3 fois. Le tube est placé dans un bain marie à **30°C** pendant 1 heure 30 minutes. Cette opération est répétée à l'identique pour chacun des échantillons d'ADN génomique. Si nécessaire, les tubes sont centrifugés 1 à 2 secondes pour faire tomber le mélange réactionnel au fond avant de les placer au bain marie.

Pour maximaliser la réaction, 12 µL d'extrait d'encapsulation sont ajoutés dans chaque tube. Pour cela, un tube bleu contenant 60 µL d'extrait d'encapsulation est prélevé à -80°C et placé immédiatement sur carboglace. Avant utilisation, le tube est complètement et rapidement décongelé entre les doigts. Immédiatement, l'extrait est versé dans chaque tube et incorporé au mélange réactionnel par 4 pipetages. Chaque réaction est replacée à 30°C pour 1 heure 30 minutes de chauffage supplémentaires.

La solution de phages obtenue est diluée dans 1 mL de tampon SM (Saline magnesium, cf Annexe 1), agitée à vitesse maximale pendant 10 secondes et mise sur glace. Ces phages virulents sont utilisés dans les deux heures pour infecter la souche G1250 de *E. coli*.

1.4. Culture de la souche G1250 de *E. coli*

La titration des phages et la sélection des mutants sont obtenues par infection des *E. coli* G1250. Cette souche est délétée pour le gène *hfl* dont le produit est Ftsh, une protéase cytoplasmique qui dégrade le facteur cII. La lysogénie est favorisée lors d'une infection de la souche G1250. L'emploi de cette souche augmente la sélectivité de la recherche de mutants *cII* à 24°C.

La souche G1250 de *E. coli* a été cultivée dans un bouillon LB 2% maltose–10mM MgSO₄ à 30°C pendant 24 heures. Le magnésium participe à l'adsorption des phages ; tandis que le

maltose augmente l'expression de la porine lamB ou maltoporine, un transporteur du maltose. Cette protéine de la membrane externe des *E. coli* sert de récepteur au bactériophage λ .

Après centrifugation, les bactéries sont remises en suspension dans une solution de MgSO₄ à 10 mM. La concentration finale est ajustée à une DO à 600 nm de 0.5.

1.5. Criblage et vérification des mutants *cII*

Le gène *cII* est impliqué dans la commutation entre le cycle lytique et la lysogénie du phage λ . La protéine cII active la transcription du gène *cII87*, qui code une forme thermosensible du répresseur λ . Dans ce système de détection, les phages mutés sur *cII* sont sélectionnés à 24°C (40-48 heures en condition sélective) (Figure 1 (5)).

La titration (cf *Titration du nombre de plages de lyse criblées*) et la sélection des phages ont été réalisées selon les instructions fournies par le manuel λ Select-*cII* Mutation Detection System for Big Blue Rodents en remplaçant le milieu TB1 par le milieu LB (Zimmer et al., 1998).

Pour chaque solution d'ADN encapsidé, 10 tubes avec des bouchons à pression sont annotés ainsi que 10 boîtes de Pétri contenant une gélose LB.

Dans chaque tube, 200 μ L de culture bactérienne (*E. coli* G1250 à DO 0,5) est mis en présence de 100 μ L de solution de phages. Les tubes sont incubés 30 minutes minimum à température ambiante.

Les bactéries infectées sont déposées sur milieu LB. Pour cela, 2,5 mL de LB Top agar (milieu LB à 0,07% agar), en surfusion à 50°C, sont versés dans chaque tube puis rapidement coulés sur une gélose LB agar. Après durcissement de la gélose de couverture, les boîtes sont placées à 24°C dans les 30 minutes suivant le coulage. Les paramètres de température et d'hygrométrie sont des points critiques pour la réussite de ce test. La variation de température ne doit pas excéder 0,5°C. L'hygrométrie de l'incubateur doit être contrôlée afin de ne pas dessécher la gélose.

La lecture des boîtes est réalisée entre 40 à 48 heures d'incubation. Chaque plage de lyse traduit la réplification d'un phage putatif muté au locus *cII*.

Pour vérifier le phénotype mutant, chaque plage de lyse à 24°C est prélevée à l'aide d'un cône à embout large et incubée dans 500 µL de solution tampon SM pendant 2 heures à température ambiante. Les tubes sont agités 10 secondes pour forcer la diffusion des phages de l'agar vers la solution. Une goutte de 10 µL de chaque suspension de phages est déposée sur LB Top agar coulé avec 200 µL de culture G1250 (DO 600 = 0,5) sur un milieu LB agar. Les boîtes sont incubées 40-48 heures à 24°C avant d'examiner de nouveau les plages de lyse.

Les phages mutants vérifiés sont prélevés à la pipette et conservés dans un tampon SM. Après 2 heures d'incubation à température ambiante, 250 µL de solution de phages à 7% DMSO est conservées à -80°C.

1.6. Titration du nombre de plages de lyse criblées

Le nombre de phages extraits de l'ADN génomique des cellules Big Blue a été chiffré en comptant les plages de lyse formées sur un tapis de *E. coli* G1250 à 37°C (12 heures en condition non sélective) (Figure 1 (5)). A cette température, le répresseur λ est dégradé ; par conséquent la bactérie sort de lysogénie.

Pour chaque solution d'ADN encapsidé, une dilution au 1/100^{ème} de 1 mL est réalisée en triplicat (dilutions A, B et C contenant chacune 990 µL de tampon SM et 10 µL de solution de phages).

Deux titrations sont réalisées pour chaque dilution. Au préalable, 2 tubes et 2 boîtes de Pétri contenant une gélose LB sont annotés « Titre 20 » et « Titre 100 » suivi de l'indication A, B ou C correspondant à la dilution. Ainsi, pour chaque dilution, 20 µL et 100 µL de la solution diluée de phages sont versés dans les tubes « Titre 20 » et « Titre 100 » respectivement.

Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, 2,5 mL de LB Top agar sont ajoutés dans chaque tube et immédiatement coulés sur gélose LB agar. Les boîtes sont incubées 12 heures à 37°C avant lecture, c'est-à-dire comptage des plages de lyse.

Ce dénombrement permet d'estimer le nombre total de phages criblés sur les dix boîtes de sélection incubées à 24°C. Une formule de calcul permet d'évaluer ce nombre :

$$\text{Nombre total de plages criblées} = \frac{\text{Nombre moyen de plages à Titre 20}}{\text{Nombre de } \mu\text{L de dilution à Titre 20}} \times \text{dilution} \times 100\mu\text{L/boîte} \times 10 \text{ boîtes}$$

Voici un exemple de calcul à Titre 20. Le nombre moyen de plages de lyse par boîte dans la série « Titre 20 » est de 108. Dans ce groupe, 20 μL d'une solution diluée au 1/100^{ème} sont déposés sur chaque gélose. Ainsi, le nombre total de plages criblées N se calcule de la façon suivante :

$$N = \frac{108 \text{ plages de lyse}}{20\mu\text{L de dilution}} \times 100 \times 100 \times 10$$

1.7. Amplification et séquençage des locus *cII* mutés

Pour chaque phage conservé, une plage de lyse isolée à 37°C sur Top Agarose 0,07% est prélevée à l'emporte-pièce avec un cône large, et plongée dans 25 μL d'eau nanofiltrée. L'échantillon est porté à ébullition pendant 5 minutes, puis centrifugé 3 minutes à vitesse maximale.

Chaque réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est réalisée à partir de 10 μL de surnageant auxquels sont ajoutés 33,4 μL d'eau nanofiltrée, 5 μL de tampon Thermopol 10X, 0,4 μL dNTPs à 25 mM, 0,2 μL Taq polymérase (New England Lab) et 0,5 μL de chaque amorce (sens et antisens) à 50 μM . Les concentrations finales sont indiquées dans le tableau 2. Le volume total de chaque réaction est de 50 μL .

Tableau 2. Conditions d'amplification du gène *cII*.

	Concentration	Concentration finale	Volume pour une réaction
Tampon Thermopol	10X	1X	5 μL
Amorce S	50 μM	0,5 μM	0,5 μL
Amorce AS	50 μM	0,5 μM	0,5 μL
dNTPs	25 mM	200 μM	0,4 μL
Taq polymérase		1,25 unités	0,2 μL
Eau nanofiltrée			33,4 μL
ADN matrice			10 μL

Pour le gène *cII*, les amorces utilisées sont :

- Amorce sens (S) : 5'-TGATGGAAGCGTTTATGCGGAA-3' ;
- Amorce anti-sens (AS) : 5'-CCTCTGCCGAAGTTGAGTAT-3'.

L'amplification est réalisée selon le protocole suivant :

- une étape préalable de dénaturation à 95°C pendant 4 minutes ;
- 35 cycles comprenant une phase de dénaturation (95°C, 1 minute), une phase d'hybridation (55°C, 1 minute) et une phase d'élongation (68°C, 1 minute) ;
- une étape de terminaison de l'élongation des chaînes d'ADN (68°, 5 minutes).

La taille des amplicons est vérifiée par migration sur gel d'agarose à 2 % (p/v). La migration s'effectue à 75 V pendant 40 minutes dans du tampon TAE 1X. Après électrophorèse, les bandes sont révélées par excitation UV après rinçage à l'eau d'un bain dans une solution de GelRed de 10 minutes.

Les produits de PCR sont purifiés à l'aide du kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) avant d'être séquencés. Le couple d'amorces utilisées pour le séquençage est le suivant :

- Amorce sens (S) : 5'-CCACACCTATGGTGTATG-3' ;
- Amorce anti-sens (AS) : 5'-CCTCTGCCGAAGTTGAGTAT-3'.

Les séquences obtenues ont été analysées avec le logiciel ClustalX en alignant les séquences avec le locus *cII* dont la séquence est la suivante (Genbank® database, #J02459) :

```
3'-ATGGTTCGTGCAAACAAACGCAACGAGGCTCTACGAATCGAGAGTGCGTTGCT  
TAACAAAATCGCAATGCTTGGAAGTGAAGACAGCGGAAGCTGTGGGCGTTGA  
TAAGTCGCAGATCAGCAGGTGGAAGAGGGACTGGATTCCAAAGTTCTCAATGCT  
GCTTGCTGTTCTTGAATGGGGGGTCGTTGACGACGACATGGCTCGATTGGCGCGA  
CAAGTTGCTGCGATTCTCACCAATAAAAAACGCCCGGCGGCAACCGAGCGTTCTG  
AACAAATCCAGATGGAGTTCTGA-5'.
```

Le premier nucléotide de cette séquence correspond à la position 1. La position des sites de mutation est calculée à partir de cette position.

1.8. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des fréquences de mutants *cII* ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism5. Toutes les valeurs des fréquences de mutant sont exprimées comme la moyenne \pm erreur standard (SD) de 3 expériences successives. La significativité statistique a été déterminée par une analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivi d'un post-test de Dunnett qui compare les différents traitements à l'échantillon d'ADN contrôle.

1.9. Souches et cultures bactériennes

La souche SP15 sauvage de *E. coli* porteuse de l'îlot *pks* (WT, « Wild Type ») a été utilisée pour les expériences *in vivo*. Un mutant isogénique $\Delta clbA$, ne produisant plus la colibactine, a été construit en remplaçant le gène *clbA* par une cassette de résistance à la kanamycine. Ces souches portent l'allèle *rpsLK42R* ce qui leur confère une résistance à la streptomycine, ainsi qu'une cassette chromosomique contenant une simple copie du gène *gfp* sous contrôle d'un promoteur constitutif (Hautefort et al., 2003). Afin de renforcer la fluorescence des bactéries, les souches WT et $\Delta clbA$ ont été transformées avec le plasmide à haut nombre de copies pFPV25.1 contenant le gène *gfp* sous contrôle du promoteur constitutif *rpsM* (Valdivia and Falkow, 1996).

Avant l'administration orale aux animaux, chaque souche est mise en culture dans un bouillon LB additionné des antibiotiques appropriés pendant 6 heures à 37°C sous agitation. Les cultures bactériennes sont diluées au 1/20^{ème} en milieu DMEM avec Hepes additionnés d'antibiotiques et incubées 2 heures supplémentaires à 37°C sous agitation. Les bactéries, en phase de croissance exponentielle, sont mises en suspension dans du PBS (10^{10} bactéries/mL).

1.10. Modèle animal de colonisation orale

Toutes les expérimentations animales ont été réalisées en accord avec la législation en vigueur sur les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire. Les souris femelles Swiss au 17^{ème} jour de gestation ont été fournies par Janvier (St Berthevin, France). Dès leur arrivée, les animaux ont été placés séparément dans une animalerie agréée avec un accès libre à la nourriture (régime RM3) et à l'eau. Jusqu'à la fin de l'expérience, l'eau de boisson est

additionnée de streptomycine (5 g/L) pour prévenir la dominance de souches autochtones dans le microbiote intestinal des souriceaux. Le jour de la naissance correspond à la date J0. Les portées ont été séparées en 2 groupes : un groupe dans lequel les souriceaux ont reçu oralement la souche *E. coli* WT pFPV25.1 tandis que le deuxième lot a été inoculé avec la souche de *E. coli* $\Delta clbA$ pFPV25.1. Un inoculum d'environ 10^9 colibacilles (WT ou $\Delta clbA$) a été administré à J5, J8 ou J21 à 3 à 4 souriceaux par groupe. Les jeunes animaux sont séparés de leurs mères et placés dans un environnement calme maintenu à 30°C. Ils sont hydratés régulièrement avec de l'eau sucrée (49,5 g/L) jusqu'à l'heure du sacrifice (6 heures post-infection). Les caecums et les côlons sont prélevés individuellement en vue de leurs analyses bactériologiques et histologiques.

1.11. Evaluation de la concentration bactérienne

Les échantillons collectés (caecums, fèces) sur les souriceaux et leurs mères ont été dilués dans du PBS (100 mg de tissu ou de fèces dans 1mL de PBS), puis des dilutions en série au $1/10^{\text{ème}}$ sont déposées en duplicat sur des géloses de MacConkey complémentées avec les antibiotiques appropriés. Après incubation à 37°C une nuit, la charge bactérienne (en CFU/g de tissu ou de fèces) est déterminée à partir de la plus petite dilution dénombrable.

1.12. Observation à l'état frais

Une préparation à l'état frais de bactéries GFP⁺ est observée et imagée, avec ou sans PFA 4% (10 μ L), en microscopie à fluorescence. Le même paramétrage a été conservé pour chaque lame (microscope Olympus BX41 et caméra CCD Leica, temps exposition 150 ms, gain 2,0).

1.13. Préparation des échantillons tissulaires

A chaque temps étudié, 2 à 3 animaux de chaque groupe ont été sacrifiés. Les côlons ont été prélevés et préparés selon l'un des deux protocoles suivants : (1) une fixation dans un bain de formol à 10% tamponné à la neutralité, suivi d'une déshydratation et d'une inclusion en paraffine réalisées selon les procédures histologiques classiques ; (2) une fixation en PFA 4% /sucrose 10% suivie d'une déshydratation dans un tampon phosphate à 20% sucrose (2 heures) puis 30% sucrose (2 heures) et d'une congélation sur carboglace dans l'OCT. Les

blocs de tissus - en paraffine ou congelés - ont été coupés en sections de 5 μm et 8 μm d'épaisseur respectivement et étalées sur des lames de verre (SuperFrost® Plus Slides).

1.14. Immunohistochimie

Les lames sont déparaffinées dans 3 bains successifs de toluène et réhydratées dans 2 bains d'acétone et 1 bain d'eau courante (5 minutes par bain). Un démasquage des sites antigéniques est réalisé par la chaleur pendant 6 minutes à l'étuve (37°C) dans une solution de trypsine à 0,1%, puis pendant 30 minutes au bain marie (94-96°C) dans une solution de tampon citrate (10 mM de citrate de sodium, pH 6). Afin de réduire le bruit de fond, l'activité peroxydase endogène est inhibée dans une solution de blocage (S2023 DAKO) pendant 5 minutes. Les sites de liaison non spécifiques sont saturés par un sérum normal de chèvre (NGS, X0907 DAKO) dilué à 2,5% pendant 20 minutes. L'anticorps primaire (Phospho-histone H2AX Rabbit mAb, #9718, Cell Signaling) dilué au 1/400^{ème} dans une solution de PBS-0,1% Tween-2,5% NGS est appliqué pendant une heure. Après rinçage avec la solution tamponnée Envision-flex (K8000 DAKO), une solution d'immunoglobulines de chèvre anti-lapin conjuguées à la peroxydase de raifort (K4061 DAKO) est déposée sur les lames pendant 30 minutes. Suite à un second rinçage dans le tampon Envision-flex, la révélation est réalisée par ajout d'une solution de substrat chromogène (K3468 DAKO) pendant 10 minutes. Les préparations ont ensuite été contre-colorées après application d'une solution d'hématoxyline de Harris pendant 30 secondes. Après déshydratation par passages successifs (15-20 secondes) dans des bains d'éthanol à 95% puis absolu suivi de 2 bains de toluène, les préparations ont été montées à l'aide du milieu de montage Coverquick (Labonord). Pour chaque échantillon, un contrôle négatif est réalisé sans application de l'anticorps primaire. Plus de 5 champs (x 400) ont été observés pour estimer les pourcentages de cellules γ -H2AX positives. Pour chaque compartiment cellulaire (épithélium de surface, épithélium des cryptes, lamina propria), plus de 200 cellules ont été comptées.

1.15. Immunofluorescence

L'actine F a été colorée avec de la phalloïdine couplée à la rhodamine (Invitrogen) diluée au 1/200^{ème} dans du PBS / 0,1% Tween / 2% NGS et appliquée sur les lames pendant une nuit à +4°C. Les lames sont rincées dans 2 bains successifs de PBS avant de marquer l'ADN au TO-

PRO 3 (dilution 1/1000^{ème}, 5 minutes). Les lames sont montées à l'aide du milieu de montage Vectamount.

1.16. Hybridation *in situ* en fluorescence

Les lames sont déparaffinées comme décrit ci-dessus, puis immergées dans une solution de tampon citrate portée à ébullition au four à micro-ondes. Après refroidissement, les parois bactériennes sont perméabilisées sous l'action d'une solution de lysozyme (2 mg/ml) pendant 30 minutes à 37°C (Cimino et *al.*, 2006). On réalise ensuite une hybridation *in situ* avec les sondes oligonucléotidiques EC1531 et EU338 (Møller et *al.*, 2003) ciblant les ARNr 23S de *E. coli* et des eubactéries respectivement comme décrit précédemment (Poulsen et *al.*, 1994). Les lames ont été montées avec le milieu de montage Vectashield avec DAPI.

Les images ont été prises avec un microscope Eclipse E400 (Nikon), un microscope BX41 (Olympus) à fluorescence, ou un ApoTome 2 (Zeiss).

Chapitre 2. Résultats

2.1. La colibactine augmente la fréquence de mutations géniques dans des cellules eucaryotes infectées

Afin d'évaluer l'action mutagène de la colibactine, j'ai réalisé un essai de mutagenèse *in vitro* sur des fibroblastes embryonnaires Big Blue Rat2. Cet essai permet de quantifier la fréquence de mutation sur le gène rapporteur *cII*. Pour cela, l'ADN génomique des cellules Big Blue est isolé, purifié et encapsidé *in vitro* sous forme de particules virales bactériennes viables. Additionnés à une culture de *E. coli* G1250, seuls les phages mutés au locus *cII* forment des plages de lyse dans des conditions favorisant la lysogénie (Figure 42). Dix boîtes de criblage sont réalisées pour un essai.

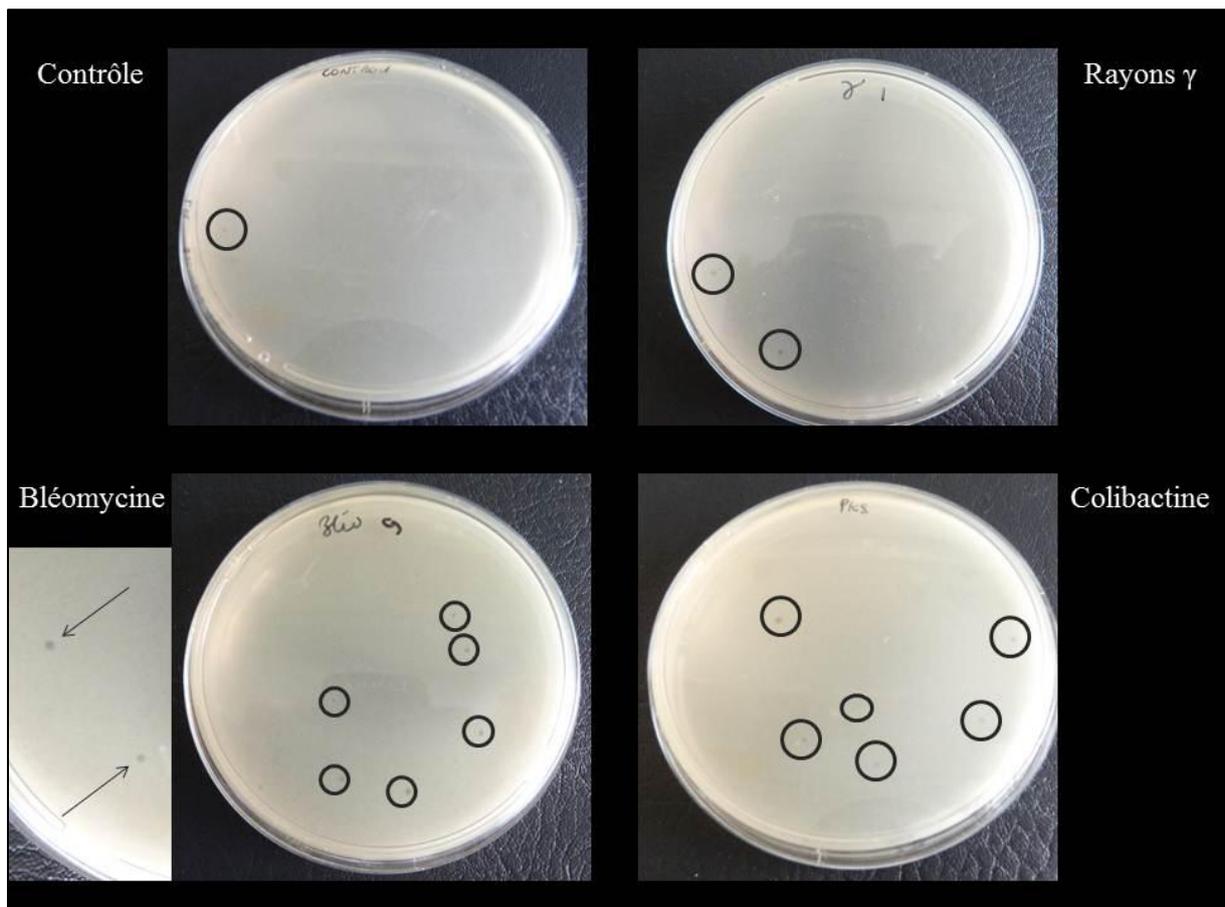


Figure 42. Criblage des mutants *cII*.

Exemples de boîtes de criblage sur lesquelles chaque plage de lyse (flèche noire) reflète l'entrée en lyse d'un phage muté au locus *cII*.

Le nombre de phages observés sur les boîtes de criblage est estimé par comptage des plages de lyse obtenues à 37°C (Figure 43).

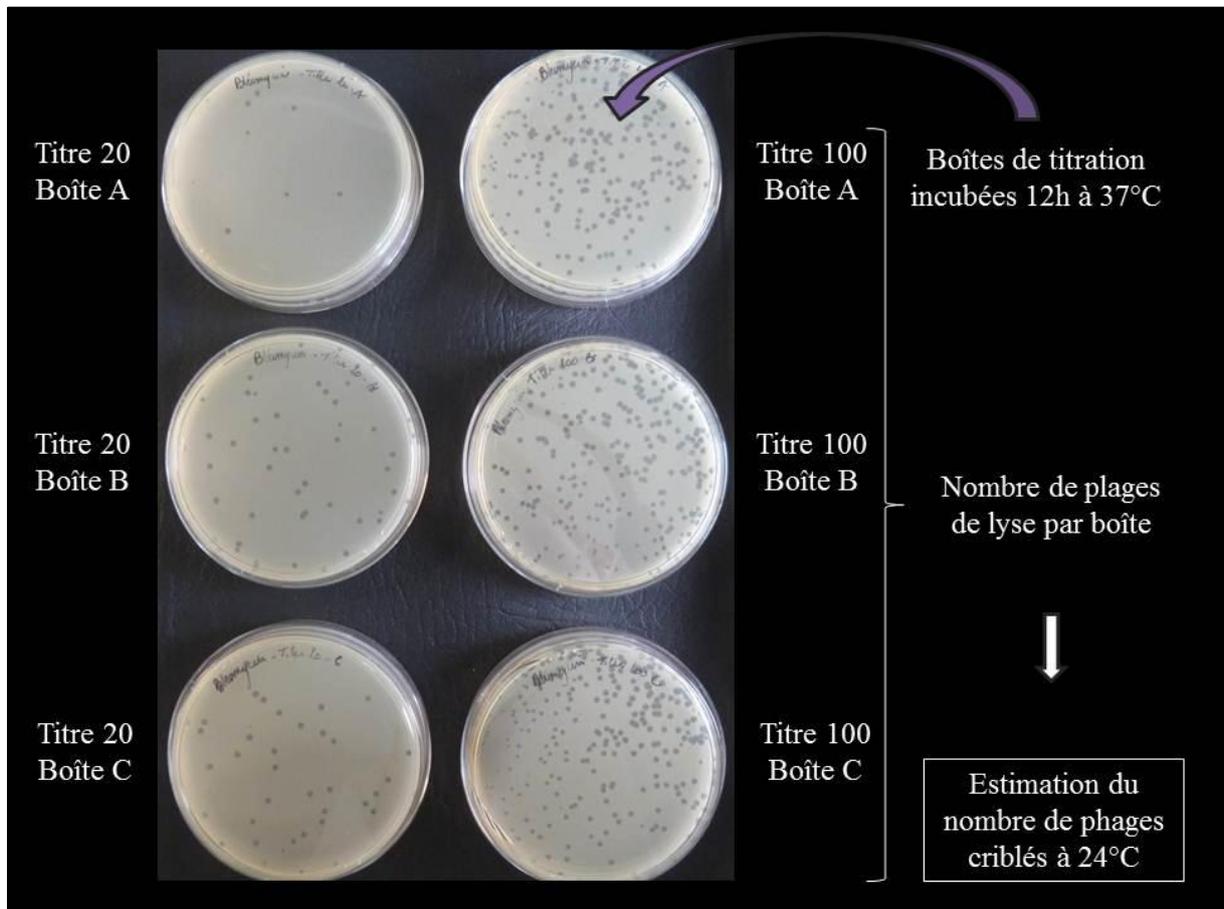


Figure 43. Titration du nombre total de plages de lyse.

Afin de déterminer la fréquence de mutant *cII*, on réalise une estimation du nombre total de phages viables déposés sur chaque boîte de criblage. On réalise une titration sur 6 boîtes de Pétri incubées à 37°C (3 boîtes « Titre 20 » et 3 boîtes « Titre 100 »).

Pour chaque lot de cellules, l'essai a été répété 3 fois afin de cribler plus de 300 000 phages. L'ensemble des données obtenues sont synthétisées dans le tableau 2.

Tableau 3. Estimation des fréquences de mutant *cII* dans des fibroblastes Big Blue exposés différents traitements mutagènes, dont la colibactine.

Des cellules Big Blue ont été soumises à différents traitements mutagènes : une irradiation aux rayons γ (0,5 Gy), un traitement à la bléomycine (10 μ M) et une infection par des *E. coli* produisant la colibactine (MOI 60). Un lot de cellules non traitées a été utilisé comme contrôle négatif. Les mutants

cII sont détectés à l'aide de la technologie Big Blue. Les fréquences de mutants *cII* ont été estimées pour 3 séries d'expériences.

Traitement	Expérience	Nombre de mutants <i>cII</i>	Nombre estimé de plages de lyse total (x 10 ³)	Fréquence moyenne de mutants <i>cII</i>
Contrôle	N°1	20	392	5,0
	N°2	11	291	4,0
	N°3	11	630	1,8
γ irradiation	N°1	18	282	6,5
	N°2	12	126	9,5
	N°3	11	132	8,5
Bléomycine	N°1	21	257	8,0
	N°2	21	203	10,5
	N°3	17	215	8,0
<i>E. coli pks+</i>	N°1	7	68	10,5
	N°2	23	288	8,0
	N°3	21	173	12,0

Pour commencer, lors d'une première série d'expériences, j'ai évalué la fréquence de mutations par copie *cII* dans des cellules Big Blue infectées par la souche DH10B pBAC*pks* produisant la colibactine. La fréquence moyenne de mutants (10,2 +/- 2,0 x10⁻⁵ mutations par copie *cII*) est significativement augmentée sous l'action de la colibactine (MOI 60) par rapport au taux de mutant observé dans des cellules non infectées (contrôle) (Tableau 3).

Dans une deuxième série d'expériences, j'ai comparé le potentiel mutagène de la colibactine à celui de la bléomycine (10 μ M pendant 4 heures) et de rayons de type γ (une dose de 0,5 Gy). L'analyse statistique des données révèle une augmentation significative de la fréquence de mutant suite à ces traitements (Tableau 4). De manière intéressante, la fréquence de mutant *cII* provoqués par la colibactine est du même ordre de grandeur que celles obtenues avec la bléomycine et l'irradiation γ . Les phages mutants ont été conservés afin de séquencer les différentes mutations générées au locus *cII*.

Tableau 4. La colibactine accroît la fréquence de mutant *cII* dans des fibroblastes Big Blue de manière comparable à un traitement à la bléomycine (10 µM, 4h) ou une irradiation de type γ (0,5 Gy).

Les fréquences de mutant *cII* (FM x 10⁻⁵ mutations par copie de *cII*) ont été déterminées avec le test de mutation sélectif sur le locus *cII*. Les fréquences moyennes ont été obtenues suite à 3 expériences indépendantes et ont été analysées par un test ANOVA suivi d'un post-test de Dunnett (*p < 0,05, ** p < 0,01 vs. contrôle).

Contrôle		γ irradiation		Bléomycine		<i>E. coli pks+</i>	
FM moy.	SD	FM moy.	SD	FM moy.	SD	FM moy.	SD
3,6	1,7	8,2*	1,5	8,8*	1,4	10,2**	2,0

Suite à cet essai de mutagenèse, j'ai constitué une banque composée de plus de 40 mutants pour chaque traitement. Par amplification et séquençage de ces mutants, nous pouvons déterminer la nature des mutations induites au locus *cII* en fonction de chaque traitement.

Une mutation peut être caractérisée par

- son type : transition, transversion, délétion, insertion
- la nature des nucléotides ciblés
- sa position sur le gène muté

Pour l'heure, je dispose de 16 séquences mutées par groupe. Les mutations retrouvées sont listées dans le tableau 5.

Tableau 5. Caractérisation des mutations sélectionnées sur le gène *cII*.

Dans chaque groupe, 16 mutants ont été amplifiés et séquencés. Pour chaque séquence obtenue, le type, la nature et le site de mutation (le premier nucléotide du gène *cII* correspondant à la position 1) ont été recherchés.

N°	Contrôle			γ Irradiation			Bléomycine			<i>E. coli pks+</i>		
	Type	Nature	Site	Type	Nature	Site	Type	Nature	Site	Type	Nature	Site
1	Transition	A→G	1	Délétion	A	246	Transversion	G→C	117	Délétion	A	246
2	Transition	G→A	64	Transition	G→A	28	Transition	C→T	214	Transversion	A→C	148
3	Délétion	A	246	Transition	C→T	86	Délétion	A	246	Délétion	A	246
4	Transversion	C→A	160	Délétion	G	184	Transition	C→T	70	Transversion	G→C	169
5	Transition	G→A	64	Délétion	G	184	Transversion	G→T	184	Délétion	G	185
6	Transition	A→G	1	Transversion	T→G	173	Transition	A→G	1	Délétion	A	246
7	Transversion	T→A	127	Transition	G→A	25	Transversion	G→C	117	Transversion	A→T	241
8	Transition	G→A	3	Transition	T→C	164	Délétion	A	246	Délétion	A	246

9	Délétion	A	246	Transition	C→T	65	Transition	A→G	130	Délétion	A	246
10	Délétion	A	246	Transversion	A→C	219	Transversion	T→G	173	Transversion	G→T	25
11	Délétion	A	246	Transversion	T→A	112	Délétion	A	246	Transversion	A→T	59
12	Transition	C→A	274	Insertion	GCT	241	Transversion	G→T	100	Transition	G→A	180
13	Délétion	A	246	Transversion	T→G	50	Transition	C→T	19	Transition	A→G	85
14	Transversion	G→T	100	Transition	C→T	29	Transversion	G→C	73	Transversion	G→T	25
15	Transversion	G→C	211	Insertion	G	185	Délétion	G	184	Transversion	C→A	217
16	Transition	A→G	14	Transition	C→T	29	Transition	C→T	70	Transversion	T→G	185

Afin de caractériser le spectre de mutations obtenu pour chaque groupe, j'ai comptabilisé le nombre de mutations par type et par nature (Tableau 6).

Tableau 6. Spectres de mutation obtenus dans chaque groupe.

Les séquences décrites dans le tableau 5 ont été comptabilisées par type de mutation. Le tableau ci-dessous indique le nombre et le pourcentage de mutants pour chaque type de mutation.

Type de mutation		Contrôle		γIrradiation		Bléomycine		<i>E. coli pks+</i>	
		Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%
Transition	A→G	3	18,75	0	0	2	12,5	1	6,25
	G→A	3	18,75	2	12,5	0	0	1	6,25
	C→T	0	0	4	25	4	25	0	0
	T→C	0	0	1	6,25	0	0	0	0
	Total	6	37,5	7	43,75	6	37,5	2	12,5
Transversion	A→C	0	0	1	6,25	0	0	1	6,25
	C→A	2	12,5	0	0	0	0	1	6,25
	A→T	0	0	0	0	0	0	2	12,5
	T→A	1	6,25	1	6,25	0	0	0	0
	G→C	1	6,25	0	0	3	18,75	1	6,25
	C→G	0	0	0	0	0	0	0	0
	G→T	1	6,25	0	0	2	12,5	2	12,5
	T→G	0	0	2	12,5	1	6,25	1	6,25
Total	5	31,25	4	25	6	37,5	8	50	
Délétion	A	5	31,25	1	6,25	3	18,75	5	31,25
	G	0	0	2	12,5	1	6,25	1	6,25
	C	0	0	0	0	0	0	0	0
	T	0	0	0	0	0	0	0	0
	Courtes séquences	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	5	31,25	3	18,75	4	25	6	37,5
Insertion	A	0	0	0	0	0	0	0	0
	G	0	0	1	6,25	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0	0	0
	T	0	0	0	0	0	0	0	0
	Courtes séquences	0	0	1	6,25	0	0	0	0
	Total	0	0	2	12,5	0	0	0	0

Dans le groupe contrôle, nous retrouvons 37,5% de transitions entre les bases puriques A et G ; 31,25% de transversions (dont la transversion G→C souvent consécutive à une déamination spontanée) ; et 31,5% de délétion de l'adénosine en position 246. Ce site correspond à la dernière base A d'une courte séquence polyadénylée.

Suite à une exposition de 0,5 Gy, on observe 43,75% de transitions (en particulier la transition C→T (25%)) ; 25% de transversions ; 18,75% de délétions sur l'adénine (de façon similaire au contrôle) ou la guanine ; et 12,5% d'insertion, notamment une séquence courte 3'-GTC-5'.

On obtient suite à un traitement à la bléomycine 37,5% de transitions (dont la transition C→T dans les mêmes proportions que le groupe γ irradiation) ; 37,5% de transversions essentiellement G→C et G→T pouvant résulter de la formation de 8-oxoguanine (Kino and Sugiyama, 2000) ; et 25% de délétions sur l'adénine (de façon similaire au contrôle) ou la guanine.

Dans les cellules infectées par un *E. coli* produisant la colibactine, on observe 12,5% de transitions entre les bases puriques (de façon similaire au contrôle) ; 50% de transversions de nature très diverse ; 37,5% de délétions principalement sur l'adénosine en position 246 (de façon similaire au contrôle).

Ces données nous donnent une première tendance des spectres de mutation générés dans les différents groupes. Il est intéressant de noter la fréquence élevée de transversions dans les cellules infectées par des *E. coli pks+*.

In vitro, l'étape d'infection par une souche *pks+* est une condition *sine qua non* à l'obtention du phénotype cellulaire caractéristique de l'effet colibactine (positivité γ -H2AX, mutagenèse). Mon deuxième objectif a donc été de rechercher dans un modèle de colonisation périnatale quelles cellules intestinales peuvent être en contact avec les colibacilles, c'est-à-dire les cellules à risques génétiques.

2.2. Des *Escherichia coli* sont en contact avec l'épithélium intestinal de la naissance au sevrage des souriceaux.

A la naissance, l'intestin du nouveau-né ne remplit pas encore toutes ses fonctions de barrière. Dans ce contexte, la colonisation rapide et massive des *E. coli* pourrait augmenter la fréquence des contacts hôte-bactérie à cette interface naturelle. Lorsque ces bactéries portent l'îlot *pks*, ces interactions peuvent donner lieu à la production de colibactine et à l'endommagement de l'ADN des cellules intestinales.

Pour étudier la localisation des *E. coli* par rapport à la barrière intestinale, j'ai inoculé par voie orale les souches de *E. coli* WT ou $\Delta clbA$ portant le gène *gfp* chromosomique à des souriceaux de 5, 8 et 21 jours. En microscopie, j'ai recherché les bactéries fluorescentes sur des coupes histologiques de côlons issus de ces animaux. Ma première approche a été d'observer directement les bactéries fluorescentes sur des coupes de tissus congelés.

L'intensité du signal lumineux étant fortement diminuée suite à la fixation des échantillons, les souches de *E. coli* WT et $\Delta clbA$ ont été transformées avec le plasmide à multiple copies pFPV25.1 portant le gène *gfp* (Figure 44).

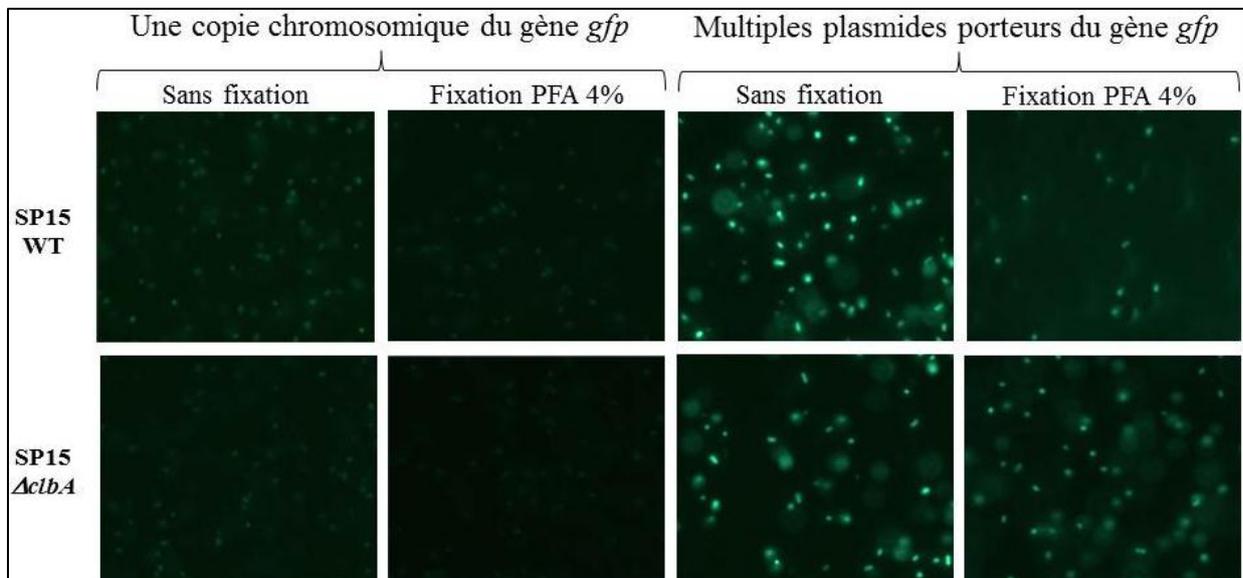


Figure 44. Fluorescence des souches de *E. coli* exprimant le gène *gfp* chromosomique, ou plasmidique, *in vitro* après fixation.

Observations microscopiques des *E. coli* SP15 WT et $\Delta clbA$ porteurs du gène *gfp* chromosomique, ou transformées avec le plasmide multi-copies pFPV25.1 portant le gène *gfp*, avant et après fixation au

paraformaldéhyde (PFA) 4%. Les images ont été obtenues selon le même paramétrage (temps exposition 150 ms, gain 2,0, objectif x 100).

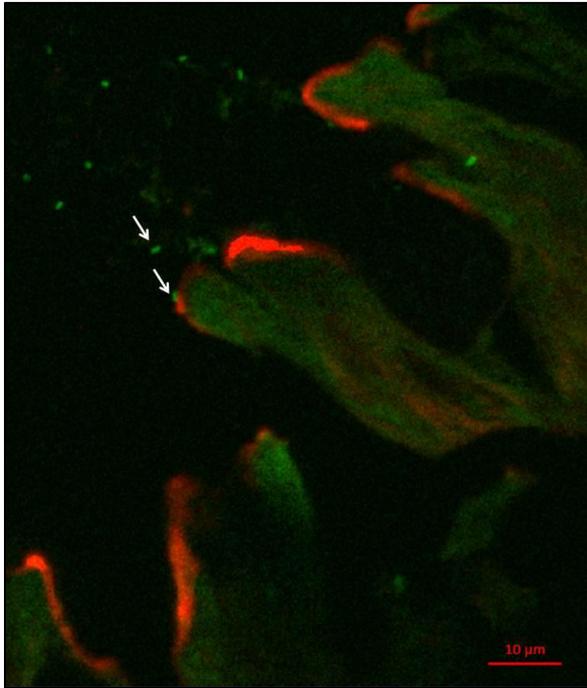


Figure 45. Détection des *E. coli* exprimant le gène *gfp* plasmidique *in vivo* après fixation.

Observation d'une coupe de côlon congelé d'un souriceau de 4 jours gavé avec une souche génotoxique de *E. coli* transformée avec le plasmide pFPV25.1 contenant le gène *gfp*. Un marquage de l'actine F (Rhodamine, rouge) permet de visualiser la bordure épithéliale. Les colibacilles (flèches blanches) sont visualisés directement en fluorescence (GFP, vert).

La surexpression de la GFP m'a permis de détecter directement les bactéries en fluorescence sur des sections de côlons congelés (Figure 45). Néanmoins, la petite taille des côlons de souriceaux et la labilité des couches de mucus rendent ces observations difficiles et peu reproductibles aux temps courts (de J0 à J8). L'inclusion en paraffine s'est avérée être la méthode de choix pour préserver au mieux l'intégrité du contenu luminal, les couches de mucus ainsi que la morphologie des tissus. Toutefois, la préparation des échantillons détériore la GFP. Pour remédier à cette contrainte, la microflore bactérienne a été révélée en fluorescence par hybridation moléculaire *in situ* de l'ARNr 23S (Eubactéries, EU338-FITC ; *E. coli*, EC1531-Cy3). Ce double marquage différencie les *E. coli* au sein du microbiote intestinal.

Chez les animaux non sevrés (< 21 jours), on peut constater que des contacts entre les bactéries et les cellules se produisent dès le 5^{ème} jour de vie (Figure 46 A). De plus, on observe, de façon ponctuelle, des bactéries à l'entrée des cryptes de Lieberkühn (Figure 46 A). Il est intéressant de noter que la grande majorité des *E. coli* que nous détectons par cette méthode est localisée dans la couche de mucus, comme décrit précédemment (Chang et al.,

2004) (Figure 46 A). Par ailleurs, les *E. coli* occupent la même niche écologique, qu'elles produisent ou non la colibactine (Figure 46 B et C).

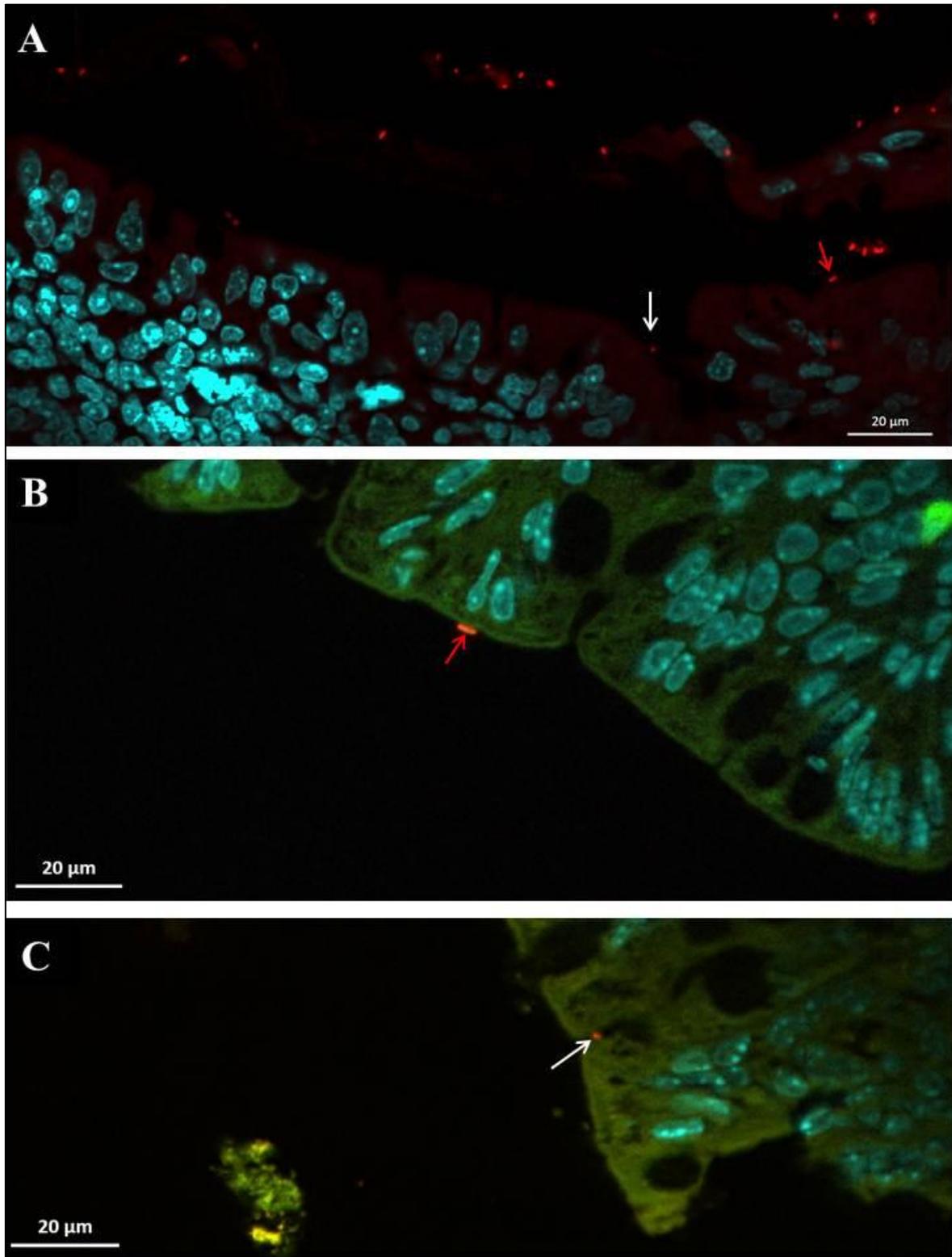


Figure 46. Les colibacilles produisant la colibactine établissent des contacts avec les cellules de l'épithélium intestinal au cours de la période périnatale.

Coupes histologiques de côlons de souriceaux gavés avec la souche *E. coli* SP15 WT pFPV25.1 (A et B) ou *E. coli* SP15 $\Delta clbA$ pFPV25.1 (C). Les eubactéries et les *E. coli* sont marquées respectivement en vert et en rouge, par hybridation *in situ* (EU338-FITC, EC1531-Cy3, respectivement). Le choix des fluorochromes a été dicté par le niveau d'autofluorescence du tissu, plus élevé en vert (comparez le panel A imagé sans le canal GFP et le panel B imagé dans tous les canaux). Quelques colibacilles adhèrent aux entérocytes apicaux (flèches rouges) aux 5^{ème} (A), 8^{ème} (B) et 15^{ème} jours (C). Certaines bactéries sont localisées à l'entrée des glandes intestinales (flèches blanches). L'ADN a été marqué au DAPI (bleu).

De la naissance au sevrage, la barrière intestinale et la flore microbienne se développent et se complexifient. Grâce la technique d'hybridation *in situ*, il est possible de localiser spécifiquement les *E. coli* (rouge) au sein du microbiote intestinal (vert) (Figure 47).

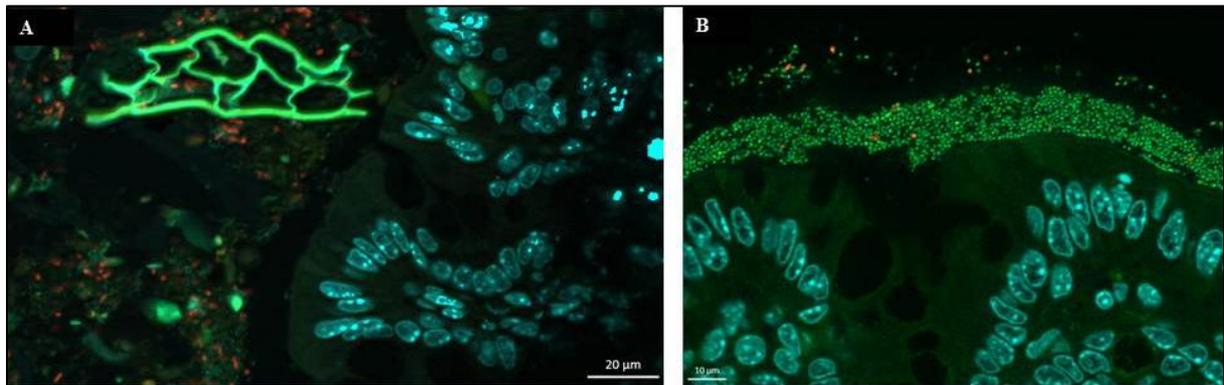


Figure 47. *E. coli* au sein du microbiote intestinal chez le souriceau sevré.

Coupes histologiques de côlons de souriceaux gavés avec la souche *E. coli* SP15 WT pFPV25.1 (A) et *E. coli* SP15 $\Delta clbA$ pFPV25.1 (B). Les eubactéries et les *E. coli* sont marquées respectivement en vert et en rouge, par hybridation *in situ* (EU338-FITC, EC1531-Cy3, respectivement).

De façon intéressante, des contacts peuvent encore être observés chez les animaux sevrés (Figure 48). Néanmoins, ces contacts semblent être moins nombreux compte tenu de l'augmentation du nombre de cellules épithéliales de surface.

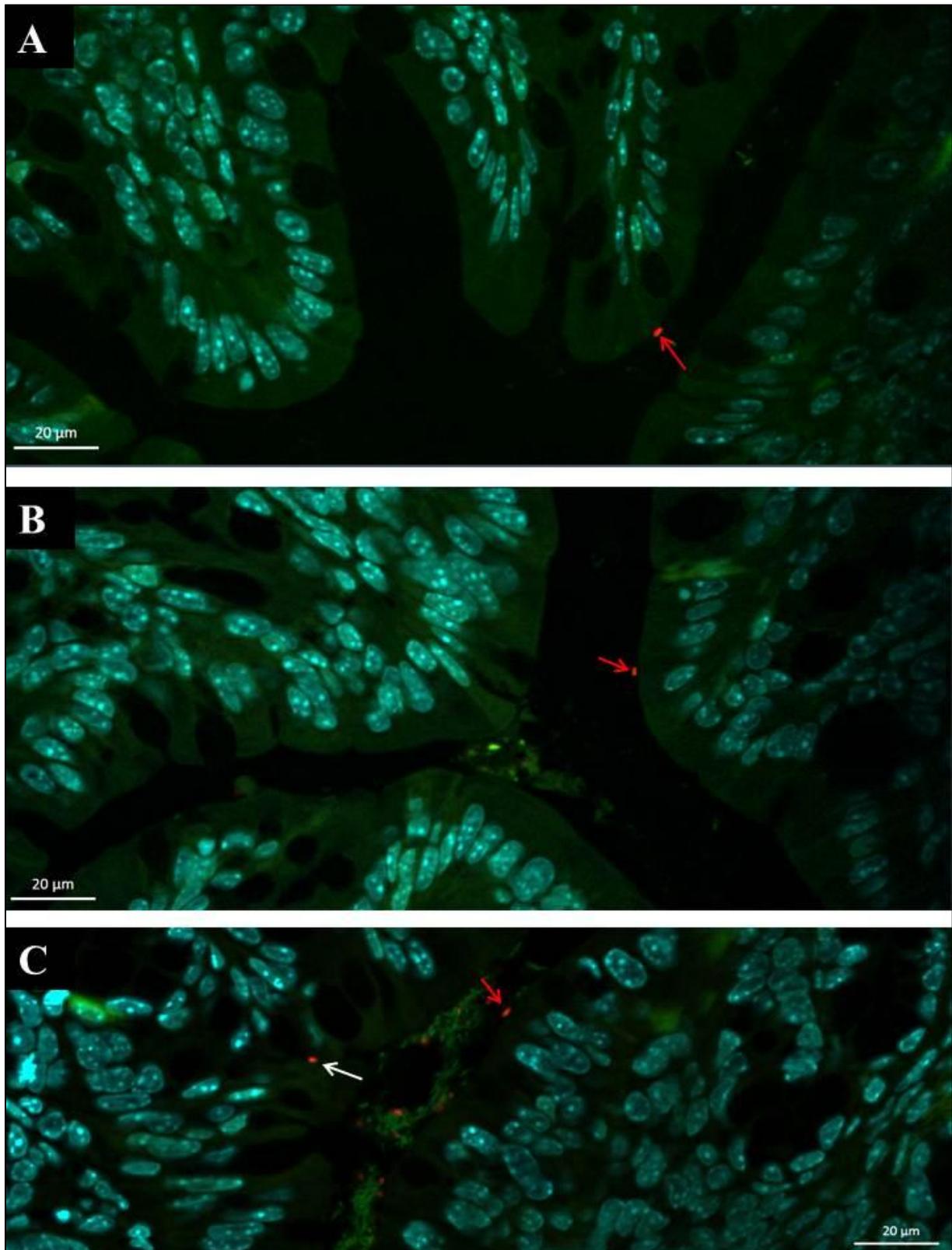


Figure 48. Les *E. coli* peuvent être au contact des colonocytes chez les animaux sevrés.

Coupes histologiques de côlons de souriceaux gavés avec la souche *E. coli* SP15 WT pFPV25.1 (A et C) ou *E. coli* SP15 $\Delta clbA$ pFPV25.1 (B). Les eubactéries et les *E. coli* sont marquées respectivement en vert et en rouge, par hybridation *in situ* (EU338-FITC, EC1531-Cy3, respectivement).

Jusqu'au sevrage, les glandes de Lieberkühn sont peu profondes, bordées de cellules peu différenciées et mitotiquement très actives. En raison des propriétés mutagènes de la colibactine, je me suis intéressée à la distribution spatiale des dommages à l'ADN provoqués par la colibactine lors d'une colonisation périnatale.

2.3. La distribution des cassures double brin induites par la colibactine varie selon le stade de développement de la barrière intestinale.

De la naissance au sevrage des souriceaux, la muqueuse intestinale fait l'objet de profonds remaniements morphologiques et fonctionnels. Parallèlement, la flore microbienne se développe et se diversifie (Figure 47). Afin d'étudier l'influence de la maturité de cette barrière sur la génotoxicité associée à primocolonisation par des souches *pks+* de *E. coli*, j'ai administré oralement une souche de *E. coli* génotoxique *pks+* (WT ou $\Delta clbA$ ne produisant plus la colibactine), à des souriceaux de 5, 8 ou 21 jours.

Les animaux ont été sacrifiés 6 heures après ingestion de l'inoculum bactérien. La présence de nos souches d'intérêt, de l'ordre de 10^6 CFU/g à 5 jours et de 10^8 CFU/g à 8 et 21 jours, a été vérifiée par un examen bactériologique du contenu caecal.

L'effet génotoxique induit par la colibactine sur la muqueuse colique a été analysé par immunohistochimie anti- γ -H2AX (Figure 49). Révélant spécifiquement les sites de CDB de l'ADN (Bekker-Jensen and Mailand, 2010), cette méthode permet de quantifier le nombre de cellules dont l'ADN a été endommagé et de préciser leur localisation dans la muqueuse (Tableau 4).

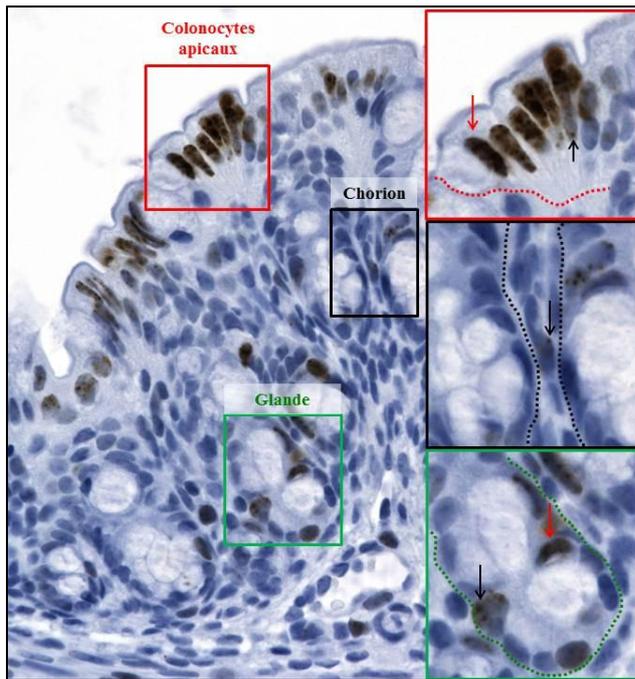


Figure 49. Détection des foyers γ -H2AX sur la muqueuse du côlon d'un souriceau colonisé par une souche génotoxique de *E. coli*.

La coloration des histones H2AX phosphorylées révèle les sites de CDB des cellules de la muqueuse du côlon. On note deux types de marquage nucléaire : un marquage pan-nucléaire correspondant à de multiples dommages (flèches rouges) et un marquage ponctuel en foyers (flèches noires) correspondant à des dommages moins nombreux.

Pour évaluer le nombre de cellules à γ -H2AX positives, j'ai dénombré les cellules marquées et non marquées au sein des différents compartiments cellulaires (Figure 50).

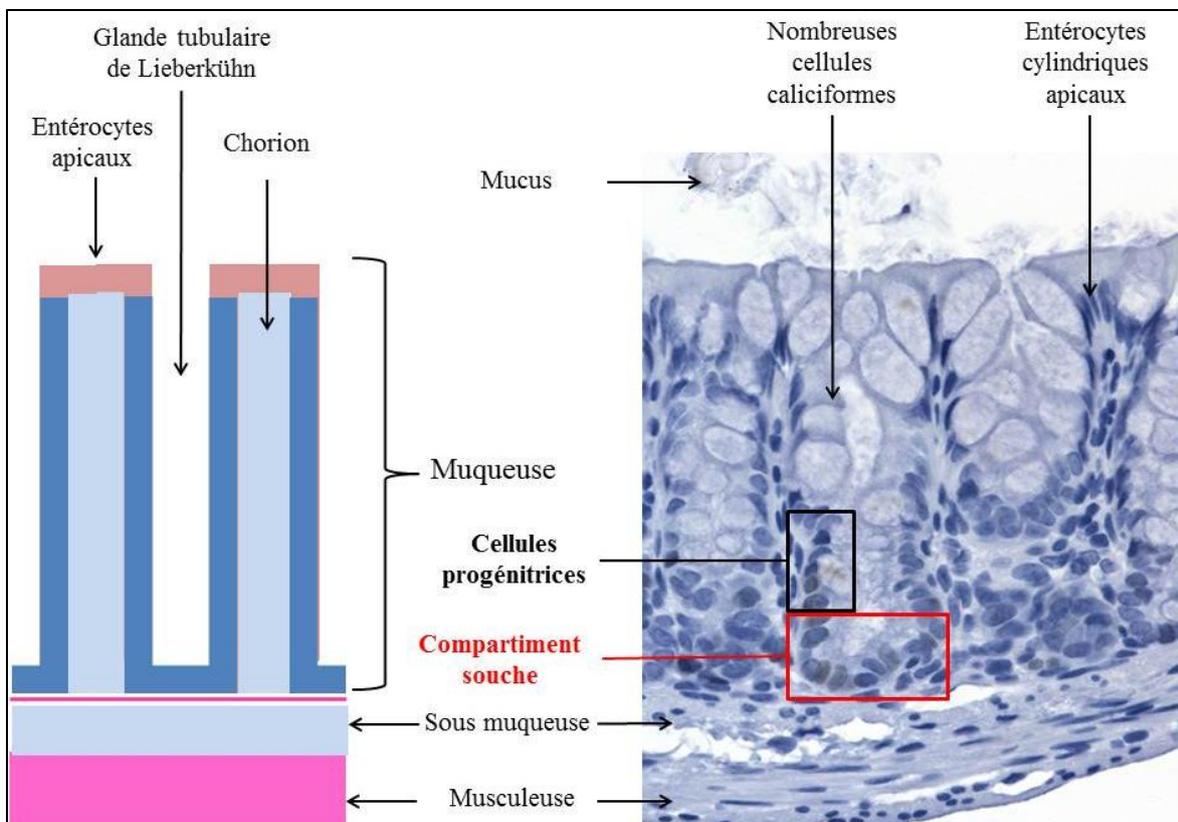


Figure 50. Représentation de la muqueuse du côlon et de ses compartiments cellulaires.

La muqueuse intestinale est composée d'un épithélium et d'un chorion (ou lamina propria). Dans le côlon, on distingue l'épithélium glandulaire, qui forme par invagination les glandes intestinales, de l'épithélium de surface, formé principalement de colonocytes. Les cellules souches intestinales se localisent au fond de ces glandes.

Tableau 7. Pourcentage de cellules γ -H2AX positives au niveau de la muqueuse et de la sous-muqueuse.

Par groupe, au moins 8 champs ont été observés (x 400) pour comptabiliser plus de 200 cellules.

% de cellules γ H2AX positives	Epithelium de surface		Epithélium glandulaire		Lamina propria	
	WT	$\Delta clbA$	WT	$\Delta clbA$	WT	$\Delta clbA$
5^{ème} jour	0,4	0,9	13,7	3,9	2,7	1,9
8^{ème} jour	43,1	0,0	24,5	9,8	16,9	1,0
21^{ème} jour	39,2	0,8	0,9	0,6	0,9	0,0

Qualitativement, le marquage anti- γ H2AX observé chez les individus du groupe WT est plus intense (pan-nucléaire, nombreux foci) que celui présenté par les animaux du groupe $\Delta clbA$ (Figure 51).

A 5 jours, alors que la couche de mucus est en formation, les foyers γ -H2AX s'observent essentiellement au niveau de l'épithélium glandulaire tapissant les cryptes de Lieberkühn et sont plus fréquents chez les souriceaux du groupe WT (Tableau 4, Figure 51, Annexe 2). Ces glandes tubulaires sont bordées par quelques entérocytes, un grand nombre de cellules caliciformes et des cellules entéro-endocrines clairsemées. Les cryptes abritent une population minoritaire de cellules souches qui donnent naissance à des cellules progénitrices cyclantes (Figure 50). Puis, à 8 jours, la génotoxicité induite par la colibactine se localise principalement dans les cellules épithéliales de surface, et dans des proportions moindres dans l'épithélium glandulaire et la lamina propria (Tableau 4, Figure 51, Annexe 2). D'une manière remarquable, chez les animaux sevrés (21 jours), les couches profondes de la muqueuse sont exemptes de dommages à l'ADN. Le marquage γ -H2AX se limite à l'épithélium de surface et, comme à 8 jours, affecte environ 40% des cellules (Tableau 4, Figure 51, Annexe 2).

En regard de l'accessibilité accrue de l'épithélium intestinal aux *E. coli*, ces observations mettent en évidence des dommages à l'ADN des cellules intestinales lors la période néonatale. Plus exposées lorsque les cryptes sont peu profondes, les cellules souches pourraient ne pas être épargnées par cette toxicité.

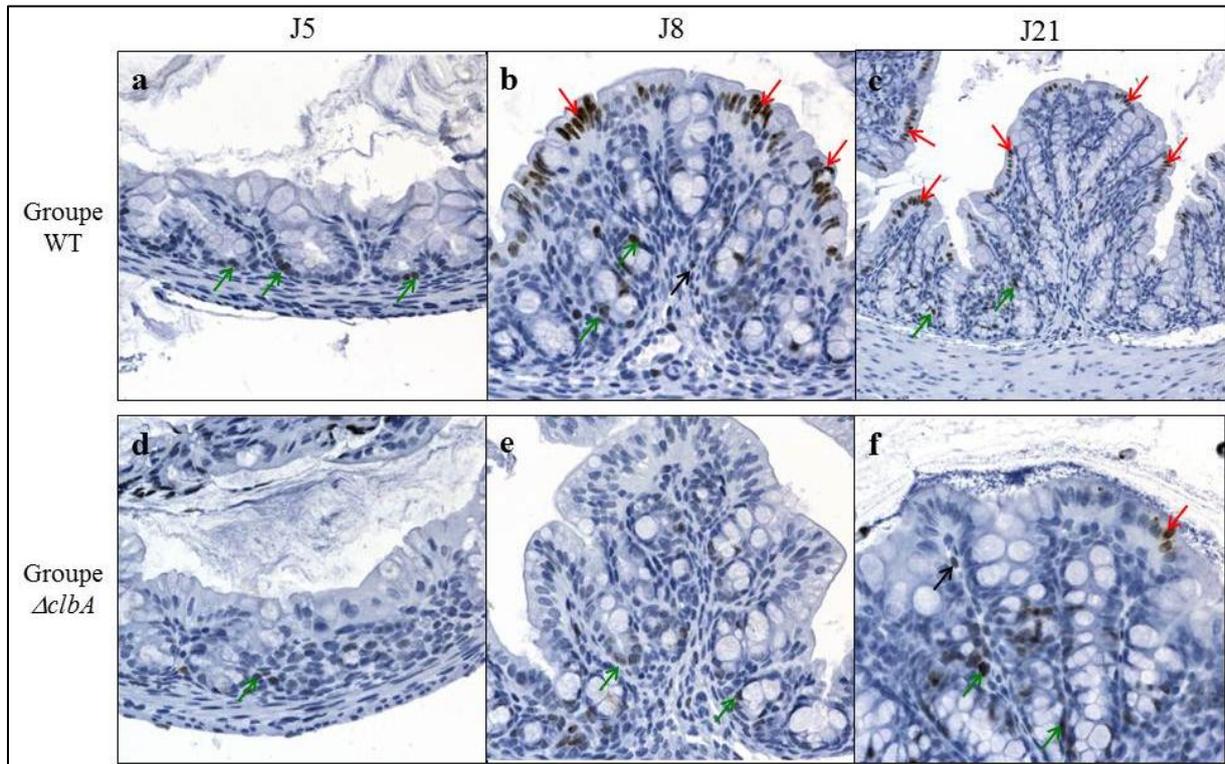


Figure 51. Analyse histologique de coupes de côlons de souris de 5, 8 et 21 jours exposés (groupe WT) ou non (groupe $\Delta clbA$) à la colibactine.

Les animaux ont été inoculés oralement par une souche génotoxique sauvage de *E. coli* (WT) ou mutée ($\Delta clbA$) ne produisant plus la colibactine. Les côlons ont été collectés 6 heures après exposition. Le marquage immunohistochimique anti- γ -H2AX révèle les sites de CDB de l'ADN dans les colonocytes apicaux (flèches rouges), les cellules glandulaires (flèches vertes) et les cellules stromales (flèches noires). Photos réalisées par le Dr Isabelle Raymond-Letron (x 400, excepté pour le cliché (c) x 200). D'autres clichés sont visibles dans l'annexe 2.

Partie 3. Conclusion, discussion et perspectives

Chaque année, environ 2 millions de nouveaux cas de cancers sont reliés à une cause infectieuse (16,1% en 2008) (de Martel et *al.*, 2012). Parmi les agents infectieux cancérogènes, *Helicobacter pylori* a été la première bactérie impliquée dans la cancérogenèse. Inspirées de cette découverte pionnière, plusieurs équipes ont recherché la trace de bactéries dans des biopsies tumorales. Ainsi, d'autres espèces bactériennes ont été associées à des cancers, en particulier le cancer colorectal dont l'importance est grandissante dans nos pays occidentaux (2^{ème} cause de mortalité par cancer en France, 4^{ème} dans le monde). En 2012, l'équipe de Matthew Meyerson a analysé la composition du microbiote intestinal d'individus souffrant de tumeurs coliques. Ils ont ainsi mis en évidence des altérations de la composition des bactéries de la flore, notamment une nette augmentation du genre *Fusobacterium* (Kostic et *al.*, 2012). Parmi les bactéries de ce genre, *Fusobacterium nucleatum*, une bactérie rare dans le côlon, intrigue beaucoup les chercheurs. A peine un an plus tard, Kostic et *al.* ont montré dans le modèle murin *Apc*^{min/+} prédisposé au cancer colorectal que la présence de *F. nucleatum* dans le microbiote intestinal augmente le nombre de tumeurs et induit une réponse inflammatoire similaire à celle observée chez les patients (Kostic et *al.*, 2013). La bactérie serait ainsi capable de promouvoir le développement tumoral de cellules intestinales génétiquement prédisposées. Par ailleurs, ces résultats laissent à penser que la bactérie pourrait favoriser la carcinogenèse colique en participant à la mise en place d'un environnement inflammatoire chronique.

Ainsi, deux mécanismes ont été proposés pour expliciter le lien de causalité entre infections bactériennes et cancer : (1) l'induction d'une inflammation chronique et/ou (2) la production de métabolites carcinogènes bactériens (O'Keefe et *al.*, 2009; Ou et *al.*, 2013; Parsonnet, 1995). La colibactine pourrait appartenir à cette famille de carcinogènes. En effet, ce composé peut induire des dommages à l'ADN *in vitro* et *in vivo*, résultant en des mutations géniques. L'élévation de la fréquence de mutant *cII* chez les cellules Big Blue infectées par des souches *pks+* de *E. coli* confirme la magnitude de l'effet mutagène observé par Cuevas et *al.* (Cuevas-Ramos et *al.*, 2010). Par ailleurs, la sélectivité de cette méthode sur le locus *cII* autorise une analyse supplémentaire. La banque de gènes *cII* mutés permet maintenant de caractériser et de comparer les mutations générées par la colibactine, la bléomycine et des rayons γ . Des mutations de même nature et/ou spécifiques d'une même séquence nucléotidique

suggéreraient des lésions à l'ADN, voire des mécanismes similaires. Par exemple, la bléomycine engendre deux types de mutations caractéristiques.

Des transversions, en particulier GC→TA, peuvent apparaître suite à l'oxydation d'une base guanine en 7,8-dihydro-8-oxo-guanine (appelée oxo-guanine) dont la conformation favorise un mésappariement avec la déoxyadénosine (Kino and Sugiyama, 2000), provoquant une transversion GC→TA lors de la réplication suivante. Des délétions au niveau de courtes séquences répétées (Dar and Jorgensen, 1995) peuvent résulter des CDB issus de réactions radicalaires. De plus, la bléomycine semble avoir une sélectivité pour les sites –GC et –GT (Hecht, 2000) et la séquence 5'-GTAC-3' (Chen et al., 2008). Dans cette étude, nous retrouvons ces types de mutations dans le groupe traité par la bléomycine.

Le lot de cellules non infectées témoigne des mutations spontanées. On observe que les transitions sont plus fréquentes, notamment AT→GA et GC→AT. La délétion d'une déoxyadénosine en position 246 est présente dans 30% des cas. Cette délétion est également retrouvée dans les autres groupes. Il pourrait d'agir d'un point chaud de mutation. Il est également possible que cette mutation était présente dans le lot de cellules initial dont sont issus les 4 groupes. Si les cellules irradiées présentent un spectre de mutations varié, le lot de cellules infectées par une souche de *E. coli* produisant la colibactine montre une nette prédominance de transversions. A la manière de la bléomycine, ce composé pourrait modifier l'état d'oxydation des nucléobases et provoquer des mésappariements.

Quelque soit leur nature, ces mutations peuvent conduire à une instabilité génétique. De plus en plus d'études suggèrent une association possible entre la présence de *E. coli* génotoxiques produisant la colibactine et le cancer colorectal (Arthur et al., 2012; Buc et al., 2013; Schwabe and Wang, 2012). Les *E. coli* du groupe phylogénétique B2, auquel appartiennent les *E. coli pks+*, sont en augmentation dans les flores intestinales des populations des pays développés (Nowrouzian and Oswald, 2012; Nowrouzian et al., 2005). De plus, une étude menée sur 197 nouveau-nés par une pédiatre du laboratoire a montré que 54,3% des nouveau-nés de 3 jours hébergeaient au moins une souche de *E. coli* dont, pour 29% (n=31) d'entre eux, une souche porteuse de l'îlot *pks* (Payros et al., soumis). L'équipe d'Eric Oswald étudie donc actuellement les conséquences d'une colonisation précoce et durable du tractus digestif par des souches commensales de *E. coli pks+* dans un modèle animal mimant la transmission

naturelle du microbiote maternel aux nouveau-nés. Dernièrement, une étude réalisée au laboratoire a mis en évidence chez le rat l'existence d'une fenêtre temporelle (de J0 à J15) pendant laquelle les souches commensales de *E. coli pks+* provoqueraient des dommages à l'ADN des cellules épithéliales intestinales (Payros et *al.*, soumis). A ces temps très précoces, alors que la barrière intestinale est immature, *E. coli* représente l'une des espèces dominantes de la flore intestinale de l'enfant (Penders et *al.*, 2006). Dans ce contexte développemental particulier, j'ai examiné la localisation des bactéries en regard des épithéliums de surface et glandulaire. En raison du biais introduit par la préparation des échantillons, la lecture des lames donne une information qualitative, difficilement quantifiable. Quel que soit l'âge des animaux, les *E. coli* se localisent préférentiellement dans le gel de mucus tapissant la paroi et qui correspond à leur niche écologique principale. Toutefois, des contacts bactéries/cellules s'observent à la surface de l'épithélium et à l'entrée des glandes intestinales, dont la « stérilité » est de plus en plus controversée (Johansson et *al.*, 2008; Pédrón et *al.*, 2012). Ces observations sont à mettre en regard avec le pré-requis, *in vitro*, d'une interaction directe entre les *E. coli pks+* et les cellules pour observer les effets de la colibactine.

Au 5^{ème} jour, les foyers γ -H2AX se localisent principalement au niveau des cryptes de Lieberkühn. Ces dommages concernent potentiellement tous les types cellulaires, dont le compartiment des cellules souches. Des co-marquages pourraient permettre d'identifier les types cellulaires (exemples : cellules souches intestinales Lgr5⁺ ou Bmi1⁺ (marquage très difficile), cellules de Paneth CD24⁺), présentant de l'ADN endommagé (γ -H2AX⁺). Pour parer à la difficulté du marquage des cellules souches, il serait également intéressant de reproduire ces expériences sur des souris Lgr5-YFP dont les cellules souches Lgr5⁺ expriment une protéine fluorescente jaune (YFP, « yellow fluorescent protein »). A l'inverse, chez les animaux sevrés, le marquage était restreint à l'épithélium de surface. Pour comprendre cette différence, il est essentiel de tenir compte de l'évolution de la composition cellulaire de ce tissu. Dès le 5^{ème} jour, les très nombreuses cellules caliciformes commencent à produire le mucus qui après transformation protéolytique donnera une couche dense et protectrice. Au cours du remaniement de la muqueuse du côlon, les cellules à mucus se relocalisent et se positionnent à la bordure apicale des glandes intestinales. Les colonocytes (cellules absorbatives) représentent le type cellulaire majoritaire de l'épithélium de surface qui forme des tables intercalées entre les glandes intestinales. La production de facteurs anti-microbiens contribue aussi probablement à la protection des cryptes. Le profil intermédiaire rencontré à 8

jours, avec une positivité glandulaire et superficielle, suggère une continuité entre les tableaux lésionnels observés aux 5^{ème} et 21^{ème} jours. A cet âge, les cellules du chorion présentent également des dommages à l'ADN, suggérant un effet indirect de la colibactine. Sous réserve d'une diffusion de la toxine dans le tissu, ceci suggère un effet de proximité impliquant les cellules infectées et leurs cellules voisines.

L'ensemble de ces résultats nous amène à poser différentes hypothèses quant à la dynamique des interactions entre les bactéries *pks+* et les cellules intestinales dans la genèse de cellules génétiquement endommagées *in vivo*. Nos observations suggèrent que les bactéries au contact de l'épithélium sont minoritaires au regard de la population de cellules γ H2AX positives. Ces dommages pourraient résulter d'un effet génotoxique étendu aux cellules non infectées, et/ou de contacts multiples et brefs (type « touch-and-go »). Cette seconde hypothèse serait en accord avec les résultats montrés *in vitro*. Néanmoins, nous ne connaissons pas à l'heure actuelle comment l'expression de la colibactine est régulée *in vivo*, c'est-à-dire dans l'écosystème du côlon.

Le modèle de colonisation forcée utilisé dans ce travail possède des limites. L'usage de la streptomycine chez les mères, bien que nécessaire pour notre expérimentation, ralentit l'acquisition et la diversification d'une flore intestinale et par là même, la mise en place d'une immunité mucosale efficiente. De plus, la manipulation des animaux lors du gavage génère un stress qui, via l'axe cerveau-intestin, affecte directement l'homéostasie de la barrière intestinale. Suite à une situation anxiogène, la perméabilité de l'épithélium intestinal est accrue, les défenses immunitaires diminuées. Afin de tenir compte de ces remarques et dans l'intention de compléter cette étude, nous avons reproduit chez la souris une colonisation périnatale plus « physiologique ». A leur arrivée, les mères seront placées dans un environnement contaminé par la souche bactérienne d'intérêt (aspersion d'un bouillon de culture sur la litière et dans le nid de l'animal). Cette méthode devrait permettre de réduire le stress et le cannibalisme inhérent à la lignée C57/Bl6. Les petits seront naturellement colonisés à la naissance au contact du microbiote maternel et de l'environnement souillé. Ce second modèle nous permettra de suivre la distribution des cellules dont l'ADN a été endommagé suite à une colonisation très précoce (avant J5). La comparaison de ce tableau lésionnel à celui du modèle précédent devrait permettre de discriminer les lésions induites par un effet génotoxique antérieur à l'administration orale des bactéries. Par la suite, l'étude de la

mutagenèse *in vivo* pourra être réalisée en reproduisant ce modèle chez des souris transgéniques Big Blue. Enfin, nous pourrions étudier l'effet de la colibactine sur les cellules souches intestinales au travers d'un nouveau modèle innovant reproduisant *in vitro* un organe miniature, les organoïdes. Ces structures histologiques développées *in vitro* à partir de cellules souches primaires isolées permettent en effet de suivre le développement et la différenciation de l'épithélium intestinal sur les plans structurel et fonctionnel. La construction d'organoïdes à partir de cellules souches préalablement exposées à la colibactine pourrait nous permettre de mettre en évidence une empreinte à la fois génétique et fonctionnelle consécutive à son effet génotoxique.

En conclusion, mon travail apporte de nouveaux éléments pour la compréhension des mécanismes d'action de bactéries commensales génotoxiques sur l'épithélium intestinal. Cette thèse a permis de développer les techniques *in vitro* et *in vivo* qui permettront de poursuivre l'étude de la mutagenèse induite par la colibactine *in vitro* et *in vivo*.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

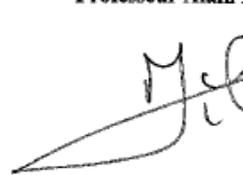
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, **CUEVAS-RAMOS Gabriel**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **CLOUP Emilie** intitulée « *Etude de l'effet mutagène lors d'une colonisation néonatale par une souche de Escherichia coli produisant la colibactine.* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 13 novembre 2013
Docteur Gabriel CUEVAS-RAMOS
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Eric OSWALD

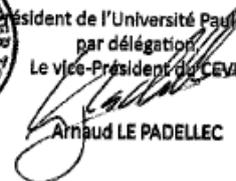


Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT



Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation
Le vice-Président du CEVU

Arnaud LE PADELLEC



Mlle CLOUP Emilie
a été admis(e) sur concours en : 2008
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 21/06/2012
a validé son année d'approfondissement le : 17/10/2013
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Références bibliographiques

Aguilera, A., and Gómez-González, B. (2008). Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat. Rev. Genet.* 9, 204–217.

Aires, J., Thouverez, M., Allano, S., and Butel, M.J. (2011). Longitudinal analysis and genotyping of infant dominant bifidobacterial populations. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 536–541.

Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.-J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., et al. (2012). Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 338, 120–123.

Barker, N., Bartfeld, S., and Clevers, H. (2010). Tissue-Resident Adult Stem Cell Populations of Rapidly Self-Renewing Organs. *Cell Stem Cell* 7, 656–670.

Bearfield, C., Davenport, E.S., Sivapathasundaram, V., and Allaker, R.P. (2002). Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 109, 527–533.

Bekker-Jensen, S., and Mailand, N. (2010). Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA Repair* 9, 1219–1228.

Berkovich, E., Monnat, R.J., Jr, and Kastan, M.B. (2007). Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair. *Nat. Cell Biol.* 9, 683–690.

Binz, S.K., Sheehan, A.M., and Wold, M.S. (2004). Replication protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA Repair* 3, 1015–1024.

Branzei, D., and Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 297–308.

Buc, E., Dubois, D., Sauvanet, P., Raisch, J., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., Pezet, D., and Bonnet, R. (2013). High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. *PloS One* 8, e56964.

Campbell, A. (2007). Phage integration and chromosome structure. A personal history. *Annu. Rev. Genet.* *41*, 1–11.

Castro-Sánchez, P., and Martín-Villa, J.M. (2013). Gut immune system and oral tolerance. *Br. J. Nutr.* *109 Suppl 2*, S3–11.

Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M., and Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat. Cell Biol.* *5*, 675–679.

Chang, D.-E., Smalley, D.J., Tucker, D.L., Leatham, M.P., Norris, W.E., Stevenson, S.J., Anderson, A.B., Grissom, J.E., Laux, D.C., Cohen, P.S., et al. (2004). Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 7427–7432.

Chatterjee, S., and Rothenberg, E. (2012). Interaction of bacteriophage λ with its *E. coli* receptor, LamB. *Viruses* *4*, 3162–3178.

Chen, J., Ghorai, M.K., Kenney, G., and Stubbe, J. (2008). Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. *Nucleic Acids Res.* *36*, 3781–3790.

Colony, P.C., Kois, J.M., and Peiffer, L.P. (1989). Structural and enzymatic changes during colonic maturation in the fetal and suckling rat. *Gastroenterology* *97*, 338–347.

Costa, R.M.A., Chiganças, V., Galhardo, R. da S., Carvalho, H., and Menck, C.F.M. (2003). The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* *85*, 1083–1099.

Cramer, K., Nieborowska-Skorska, M., Koptyra, M., Slupianek, A., Penserga, E.T.P., Eaves, C.J., Aulitzky, W., and Skorski, T. (2008). BCR/ABL and other kinases from chronic myeloproliferative disorders stimulate single-strand annealing, an unfaithful DNA double-strand break repair. *Cancer Res.* *68*, 6884–6888.

Croxen, M.A., and Finlay, B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 26–38.

Cuevas-Ramos, G., Petit, C.R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2010). *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 11537–11542.

Dairi, T. (2012). Chapter Six - Menaquinone Biosyntheses in Microorganisms. In *Methods in Enzymology*, David A. Hopwood, ed. (Academic Press), pp. 107–122.

Dar, M.E., and Jorgensen, T.J. (1995). Deletions at short direct repeats and base substitutions are characteristic mutations for bleomycin-induced double- and single-strand breaks, respectively, in a human shuttle vector system. *Nucleic Acids Res.* *23*, 3224–3230.

Dave, M., Higgins, P.D., Middha, S., and Rioux, K.P. (2012). The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* *160*, 246–257.

DiGiulio, D.B., Romero, R., Amogan, H.P., Kusanovic, J.P., Bik, E.M., Gotsch, F., Kim, C.J., Erez, O., Edwin, S., and Relman, D.A. (2008). Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PloS One* *3*, e3056.

Dobrindt, U., Chowdary, M.G., Krumbholz, G., and Hacker, J. (2010). Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* *199*, 145–154.

Drozdowski, L.A., Clandinin, T., and Thomson, A.B.R. (2010). Ontogeny, growth and development of the small intestine: Understanding pediatric gastroenterology. *World J. Gastroenterol. WJG* *16*, 787–799.

Dubois, D., Delmas, J., Cady, A., Robin, F., Sivignon, A., Oswald, E., and Bonnet, R. (2010). Cyclomodulins in Urosepsis Strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* *48*, 2122–2129.

Dubois, D., Baron, O., Cougnoux, A., Delmas, J., Pradel, N., Boury, M., Bouchon, B., Bringer, M.-A., Nougayrède, J.-P., Oswald, E., et al. (2011). ClbP is a prototype of a peptidase subgroup involved in biosynthesis of nonribosomal peptides. *J. Biol. Chem.* *286*, 35562–35570.

Erexson, G.L., Cunningham, M.L., and Tindall, K.R. (1998). Cytogenetic characterization of the transgenic Big Blue Rat2 and Big Blue mouse embryonic fibroblast cell lines. *Mutagenesis* *13*, 649–653.

- Escobar-Páramo, P., Grenet, K., Le Menac'h, A., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Rahimy, M.C., Andremont, A., et al. (2004). Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 5698–5700.
- Fedor, Y., Vignard, J., Nicolau-Travers, M.-L., Boutet-Robinet, E., Watrin, C., Salles, B., and Mirey, G. (2013). From single-strand breaks to double-strand breaks during S-phase: a new mode of action of the *Escherichia coli* Cytotoxic Distending Toxin. *Cell. Microbiol.* *15*, 1–15.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., and Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair* *3*, 959–967.
- Van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* *71*, 241–260.
- Friedman, D.I., and Court, D.L. (1995). Transcription antitermination: the lambda paradigm updated. *Mol. Microbiol.* *18*, 191–200.
- Galkin, V.E., Yu, X., Bielnicki, J., Ndjonka, D., Bell, C.E., and Egelman, E.H. (2009). Cleavage of bacteriophage lambda cI repressor involves the RecA C-terminal domain. *J. Mol. Biol.* *385*, 779–787.
- Van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H.J., and Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet.* *2*, 196–206.
- Gerbe, F., van Es, J.H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., Romagnolo, B., Shroyer, N.F., Bourgaux, J.-F., Pignodel, C., et al. (2011). Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.* *192*, 767–780.
- Gerbe, F., Legraverend, C., and Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *69*, 2907–2917.
- Guttenplan, J.B., Khmelnsky, M., Haesevoets, R., and Kosinska, W. (2004). Mutational spectrum of bleomycin in lacZ mouse kidney: a possible model for mutational spectrum of reactive oxygen species. *Mutat. Res.* *554*, 185–192.

Hathaway, L.J., and Kraehenbuhl, J.P. (2000). The role of M cells in mucosal immunity. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57, 323–332.

Hautefort, I., Proença, M.J., and Hinton, J.C.D. (2003). Single-copy green fluorescent protein gene fusions allow accurate measurement of *Salmonella* gene expression in vitro and during infection of mammalian cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7480–7491.

Hecht, S.M. (2000). Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action. *J. Nat. Prod.* 63, 158–168.

Hendrickson, H. (2009). Order and disorder during *Escherichia coli* divergence. *PLoS Genet.* 5, e1000335.

Herzer, P.J., Inouye, S., Inouye, M., and Whittam, T.S. (1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172, 6175–6181.

Hirano, S., and Kataoka, K. (1986). Histogenesis of the mouse jejunal mucosa, with special reference to proliferative cells and absorptive cells. *Arch. Histol. Jpn. Nihon Soshikigaku Kiroku* 49, 333–348.

Hlatky, L. (2012). Double-strand break motions shift radiation risk notions? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 351–352.

Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366–374.

Höfer, D., Püschel, B., and Drenckhahn, D. (1996). Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6631–6634.

Hope, M.E., Hold, G.L., Kain, R., and El-Omar, E.M. (2005). Sporadic colorectal cancer--role of the commensal microbiota. *FEMS Microbiol. Lett.* 244, 1–7.

Hotta, K., and Ueoka, H. (2005). New cytotoxic agents: a review of the literature. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 55, 45–65.

Ivanov, A.I. (2012). Structure and regulation of intestinal epithelial tight junctions: current concepts and unanswered questions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 763, 132–148.

Jackson, S.P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23, 687–696.

Jaureguy, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbonnelle, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., et al. (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 9, 560.

Jiménez, E., Fernández, L., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Nuño-Palop, C., Narbad, A., Olivares, M., Xaus, J., and Rodríguez, J.M. (2005). Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr. Microbiol.* 51, 270–274.

Jiménez, E., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L., and Rodríguez, J.M. (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* 159, 187–193.

Joaquin, A., and Fernandez-Capetillo, O. (2012). Signalling DNA Damage. In *Protein Phosphorylation in Human Health*, C. Huang, ed. (InTech),.

Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15064–15069.

Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., Holmén-Larsson, J., Jabbar, K.S., Xia, L., Xu, H., Ghishan, F.K., Carvalho, F.A., Gewirtz, A.T., Sjövall, H., et al. (2013). Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut*.

Johnson, J.R., Johnston, B., Kuskowski, M.A., Nougayrede, J.-P., and Oswald, E. (2008). Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3906–3911.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140.

Kappus, H., Bothe, D., and Mahmutoglu, I. (1990). The role of reactive oxygen species in the antitumor activity of bleomycin. *Free Radic. Res. Commun.* 11, 261–266.

Keeney, S., and Neale, M.J. (2006). Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 523–525.

Kihara, A., Akiyama, Y., and Ito, K. (1997). Host regulation of lysogenic decision in bacteriophage λ : Transmembrane modulation of FtsH (HflB), the cII degrading protease, by HflKC (HflA). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 5544–5549.

Kim, B.S., Cropp, T.A., Beck, B.J., Sherman, D.H., and Reynolds, K.A. (2002). Biochemical evidence for an editing role of thioesterase II in the biosynthesis of the polyketide pikromycin. *J. Biol. Chem.* 277, 48028–48034.

Kino, K., and Sugiyama, H. (2000). GC \rightarrow CG transversion mutation might be caused by 8-oxoguanine oxidation product. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 139–140.

Kobiler, O., Rokney, A., and Oppenheim, A.B. (2007). Phage Lambda CIII: A Protease Inhibitor Regulating the Lysis-Lysogeny Decision. *PLoS ONE* 2, e363.

Kokrashvili, Z., Rodriguez, D., Yevshayeva, V., Zhou, H., Margolskee, R.F., and Mosinger, B. (2009). Release of endogenous opioids from duodenal enteroendocrine cells requires Trpm5. *Gastroenterology* 137, 598–606, 606.e1–2.

Kostic, A.D., Gevers, D., Pedamallu, C.S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A.M., Ojesina, A.I., Jung, J., Bass, A.J., Taberner, J., et al. (2012). Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* 22, 292–298.

Kostic, A.D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J.N., Gallini, C.A., Michaud, M., Clancy, T.E., Chung, D.C., Lochhead, P., Hold, G.L., et al. (2013). *Fusobacterium nucleatum* Potentiates Intestinal Tumorigenesis and Modulates the Tumor-Immune Microenvironment. *Cell Host Microbe* 14, 207–215.

Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., and Georgakilas, A.G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat. Res.* 711, 193–201.

Kunisawa, J., Kurashima, Y., and Kiyono, H. (2012). Gut-associated lymphoid tissues for the development of oral vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 523–530.

Kunkel, T.A., and Erie, D.A. (2005). DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 681–710.

- Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., Takami, H., Morita, H., Sharma, V.K., Srivastava, T.P., et al. (2007). Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Reports Genes Genomes* 14, 169–181.
- Lamarche, B.J., Orazio, N.I., and Weitzman, M.D. (2010). The MRN complex in Double-Strand Break Repair and Telomere Maintenance. *FEBS Lett.* 584, 3682–3695.
- Lambert, I.B., Singer, T.M., Boucher, S.E., and Douglas, G.R. (2005). Detailed review of transgenic rodent mutation assays. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 590, 1–280.
- Lax, A.J. (2005). Opinion: Bacterial toxins and cancer--a case to answer? *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 343–349.
- Leimbach, A., Hacker, J., and Dobrindt, U. (2013). E. coli as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 358, 3–32.
- Ley, R.E., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124, 837–848.
- Li, X., and Heyer, W.-D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* 18, 99–113.
- Lieber, M.R. (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 181–211.
- Liévin-Le Moal, V., and Servin, A.L. (2006). The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 315–337.
- Little, J.B. (1993). Cellular, molecular, and carcinogenic effects of radiation. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 7, 337–352.
- Mackie, R.I., Sghir, A., and Gaskins, H.R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 1035S–1045S.
- Maizels, N. (2005). Immunoglobulin gene diversification. *Annu. Rev. Genet.* 39, 23–46.

- De Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., and Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* *13*, 607–615.
- Maynard, C.L., Elson, C.O., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* *489*, 231–241.
- McDole, J.R., Wheeler, L.W., McDonald, K.G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K.A., Newberry, R.D., and Miller, M.J. (2012). Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature* *483*, 345–349.
- McGuckin, M.A., Lindén, S.K., Sutton, P., and Florin, T.H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 265–278.
- Montufar-Solis, D., Garza, T., and Klein, J.R. (2007). T-cell activation in the intestinal mucosa. *Immunol. Rev.* *215*, 189–201.
- Moore, K.A., and Lemischka, I.R. (2006). Stem cells and their niches. *Science* *311*, 1880–1885.
- Moran-Ramos, S., Tovar, A.R., and Torres, N. (2012). Diet: Friend or Foe of Enteroendocrine Cells--How It Interacts with Enteroendocrine Cells. *Adv. Nutr. Int. Rev. J.* *3*, 8–20.
- Navarro-Garcia, F., Serapio-Palacios, A., Ugalde-Silva, P., Tapia-Pastrana, G., and Chavez-Dueñas, L. (2013). Actin cytoskeleton manipulation by effector proteins secreted by diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. *BioMed Res. Int.* *2013*, 374395.
- Noah, T.K., Donahue, B., and Shroyer, N.F. (2011). Intestinal development and differentiation. *Exp. Cell Res.* *317*, 2702–2710.
- Nohmi, T., Suzuki, T., and Masumura, K. (2000). Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assays. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *455*, 191–215.
- Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., and Oswald, E. (2006). *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* *313*, 848–851.

- Nowrouzian, F.L., and Oswald, E. (2012). *Escherichia coli* strains with the capacity for long-term persistence in the bowel microbiota carry the potentially genotoxic pks island. *Microb. Pathog.* *53*, 180–182.
- Nowrouzian, F., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I.-L., Aberg, N., Wold, A.E., and Adlerberth, I. (2003). *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatr. Res.* *54*, 8–14.
- Nowrouzian, F.L., Wold, A.E., and Adlerberth, I. (2005). *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *J. Infect. Dis.* *191*, 1078–1083.
- Nowrouzian, F.L., Adlerberth, I., and Wold, A.E. (2006). Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* *8*, 834–840.
- O'Keefe, S.J.D., Ou, J., Aufreiter, S., O'Connor, D., Sharma, S., Sepulveda, J., Fukuwatari, T., Shibata, K., and Mawhinney, T. (2009). Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. *J. Nutr.* *139*, 2044–2048.
- Ochman, H., and Selander, R.K. (1984). Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol.* *157*, 690–693.
- Ohland, C.L., and MacNaughton, W.K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *298*, G807–G819.
- Ohno, M., Miura, T., Furuichi, M., Tominaga, Y., Tsuchimoto, D., Sakumi, K., and Nakabeppu, Y. (2006). A genome-wide distribution of 8-oxoguanine correlates with the preferred regions for recombination and single nucleotide polymorphism in the human genome. *Genome Res.* *16*, 567–575.
- Oppenheim, A.B., Kobiler, O., Stavans, J., Court, D.L., and Adhya, S. (2005). Switches in bacteriophage lambda development. *Annu. Rev. Genet.* *39*, 409–429.
- Orskov, F., and Orskov, I. (1992). *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can. J. Microbiol.* *38*, 699–704.

- Orskov, F., Orskov, I., Evans, D.J., Jr, Sack, R.B., Sack, D.A., and Wadström, T. (1976). Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhoea in adults and children. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* *162*, 73–80.
- Ou, J., Carbonero, F., Zoetendal, E.G., DeLany, J.P., Wang, M., Newton, K., Gaskins, H.R., and O’Keefe, S.J.D. (2013). Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. *Am. J. Clin. Nutr.* *98*, 111–120.
- Pácha, J. (2000). Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol. Rev.* *80*, 1633–1667.
- Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A., and Brown, P.O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* *5*, e177.
- Parsonnet, J. (1995). Bacterial infection as a cause of cancer. *Environ. Health Perspect.* *103 Suppl 8*, 263–268.
- Pédron, T., Mulet, C., Dauga, C., Frangeul, L., Chervaux, C., Grompone, G., and Sansonetti, P.J. (2012). A crypt-specific core microbiota resides in the mouse colon. *MBio* *3*.
- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F.F., Snijders, B., Kummeling, I., van den Brandt, P.A., and Stobberingh, E.E. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* *118*, 511–521.
- Pommier, Y. (2013). Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem. Biol.* *8*, 82–95.
- Prakash, S., Johnson, R.E., and Prakash, L. (2005). Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* *74*, 317–353.
- Price, B.D., and D’Andrea, A.D. (2013). Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell* *152*, 1344–1354.
- Putze, J., Hennequin, C., Nougayrède, J.-P., Zhang, W., Homburg, S., Karch, H., Bringer, M.-A., Fayolle, C., Carniel, E., Rabsch, W., et al. (2009). Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family Enterobacteriaceae. *Infect. Immun.* *77*, 4696–4703.

- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65.
- Renz, H., Brandtzaeg, P., and Hornef, M. (2012). The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 9–23.
- Robertson, A.B., Klungland, A., Rognes, T., and Leiros, I. (2009). DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 981–993.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858–5868.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* 146, 905–916.
- De Santa Barbara, P., van den Brink, G.R., and Roberts, D.J. (2003). Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 60, 1322–1332.
- Saqui-Salces, M., Keeley, T.M., Grosse, A.S., Qiao, X.T., El-Zaatari, M., Gumucio, D.L., Samuelson, L.C., and Merchant, J.L. (2011). Gastric tuft cells express DCLK1 and are expanded in hyperplasia. *Histochem. Cell Biol.* 136, 191–204.
- Satokari, R., Grönroos, T., Laitinen, K., Salminen, S., and Isolauri, E. (2009). Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 8–12.
- Schwabe, R.F., and Wang, T.C. (2012). Cancer. Bacteria deliver a genotoxic hit. *Science* 338, 52–53.
- Scully, R., and Xie, A. (2013). Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat. Res.*
- Shibutani, S., Takeshita, M., and Grollman, A.P. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349, 431–434.

- Shulman, S.T., Friedmann, H.C., and Sims, R.H. (2007). Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *45*, 1025–1029.
- Snoeck, V., Goddeeris, B., and Cox, E. (2005). The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect.* *7*, 997–1004.
- Stange, D.E., and Clevers, H. (2013). The Yin and Yang of Intestinal (Cancer) Stem Cells and their Progenitors. *Stem Cells Dayt. Ohio*.
- Stark, J.M., Pierce, A.J., Oh, J., Pastink, A., and Jasin, M. (2004). Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 9305–9316.
- Sung, P., and Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 739–750.
- Tavares, P., Zinn-Justin, S., and Orlova, E.V. (2012). Genome gating in tailed bacteriophage capsids. *Adv. Exp. Med. Biol.* *726*, 585–600.
- Taylor, K., and Wegrzyn, G. (1995). Replication of coliphage lambda DNA. *FEMS Microbiol. Rev.* *17*, 109–119.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., and Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 207–217.
- Thomson, A.B., and Keelan, M. (1986). The development of the small intestine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *64*, 13–29.
- Topp, W.C. (1981). Normal rat cell lines deficient in nuclear thymidine kinase. *Virology* *113*, 408–411.
- Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., et al. (2009). Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet.* *5*, e1000344.

- Turroni, F., Peano, C., Pass, D.A., Foroni, E., Severgnini, M., Claesson, M.J., Kerr, C., Hourihane, J., Murray, D., Fuligni, F., et al. (2012). Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PloS One* 7, e36957.
- Vaishampayan, P.A., Kuehl, J.V., Froula, J.L., Morgan, J.L., Ochman, H., and Francino, M.P. (2010). Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. *Genome Biol. Evol.* 2, 53–66.
- Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996). Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol. Microbiol.* 22, 367–378.
- Vilenchik, M.M., and Knudson, A.G. (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12871–12876.
- Walthall, K., Cappon, G.D., Hurtt, M.E., and Zoetis, T. (2005). Postnatal development of the gastrointestinal system: a species comparison. *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 74, 132–156.
- Wang, I.-N., Deaton, J., and Young, R. (2003). Sizing the holin lesion with an endolysin-beta-galactosidase fusion. *J. Bacteriol.* 185, 779–787.
- Węgrzyn, G., and Węgrzyn, A. (2006). [Bacteriophage lambda DNA replication--new discoveries made using an old experimental model]. *Postepy Biochem.* 52, 42–48.
- Węgrzyn, G., Licznarska, K., and Węgrzyn, A. (2012). Phage λ --new insights into regulatory circuits. *Adv. Virus Res.* 82, 155–178.
- Wyborski, D.L., Malkhosyan, S., Moores, J., Perucho, M., and Short, J.M. (1995). Development of a rat cell line containing stably integrated copies of a lambda/lacI shuttle vector. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 334, 161–165.
- Yu, L.C.-H., Wang, J.-T., Wei, S.-C., and Ni, Y.-H. (2012). Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 3, 27–43.

Zha, S., Boboila, C., and Alt, F.W. (2009). Mre11: roles in DNA repair beyond homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 798–800.

Annexes

1. Solutions utilisées lors de l'essai de mutagenèse

Tampon SM (pour 1 L)

- 5,8 g de NaCl
- 2,0g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 50,0 mL de Tris-HCl (1M, pH 7.5)
- 5,0 mL de gélatine 2% (w/v)

Ajuster le pH à 7,5.

Ajouter de l'eau déminéralisée jusqu'au volume final de 1 litre.

Stériliser par autoclavage 30 minutes.

Conserver à température ambiante pendant 1 an.

Solution de Maltose (20% w/v) et MgSO_4 (1M) (pour 100mL)

- 20,0 g de maltose
- 24,6 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (sulfate de magnésium)

Ajouter de l'eau déminéralisée jusqu'au volume final de 100 mL.

Stériliser sous filtration.

Conserver à 4°C jusqu'à 6 mois.

MgSO_4 (10 mM) (pour 1 L)

- 2,46 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Ajouter de l'eau déminéralisée jusqu'au volume final de 1 litre.

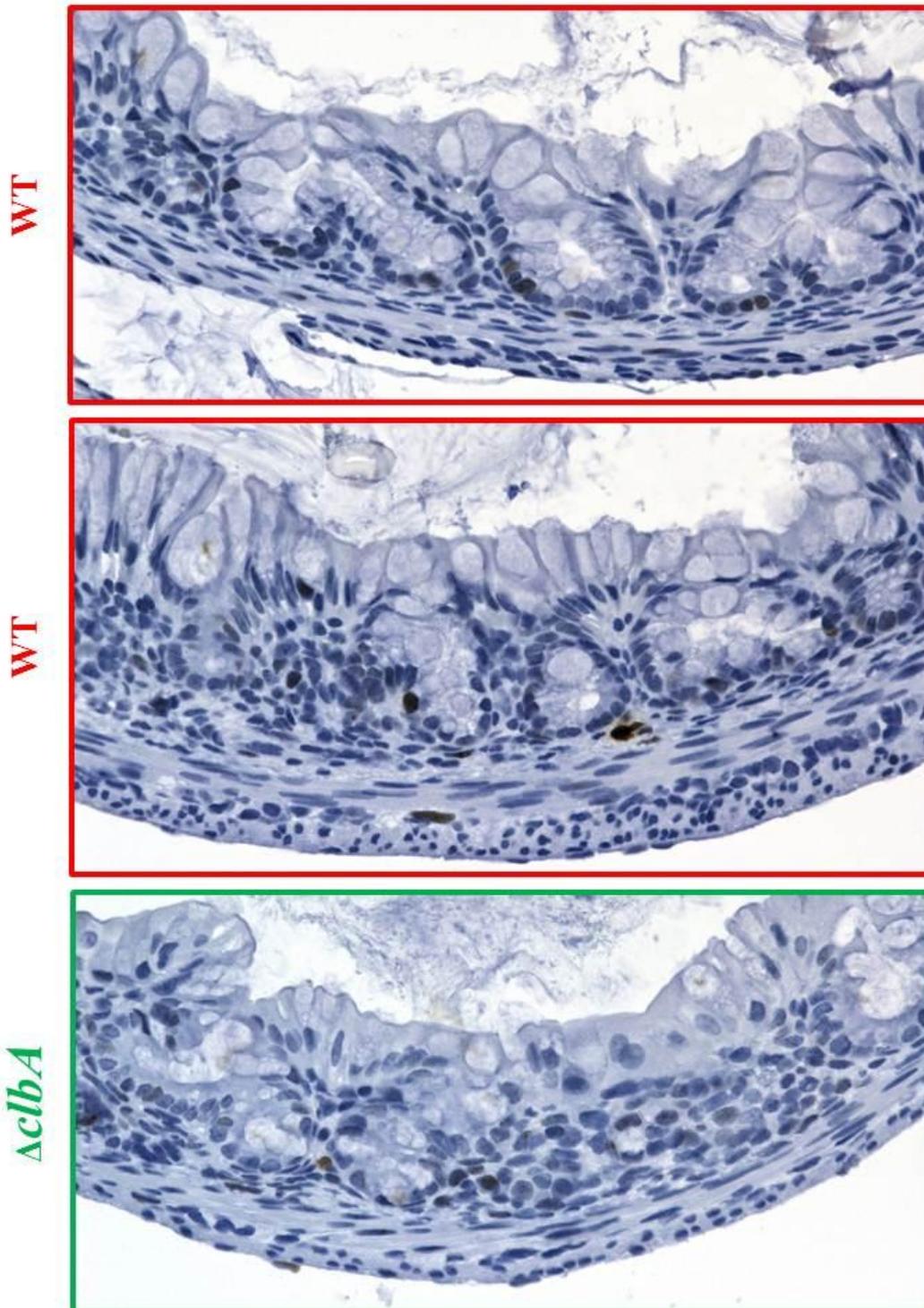
Stériliser par autoclavage 30 minutes.

Conserver à température ambiante pendant 1 an.

2. Coupes histologiques de côlon avec marquage anti- γ H2AX

Animaux gavés avec la souche la souche *E. coli* SP15 WT pFPV25.1 (cadre rouge) ou *E. coli* SP15 $\Delta clbA$ pFPV25.1 (cadre vert).

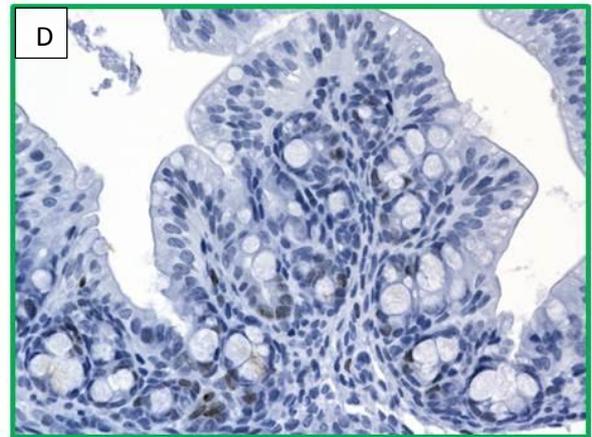
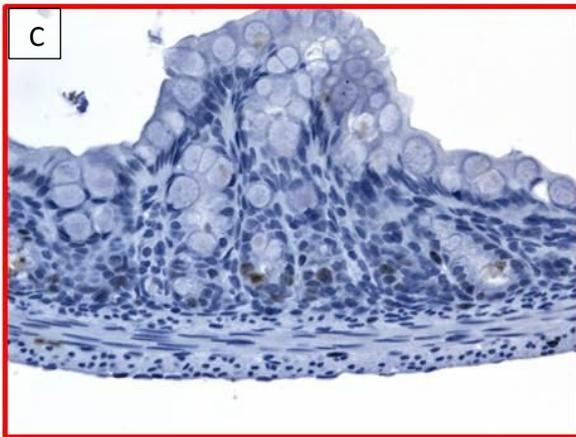
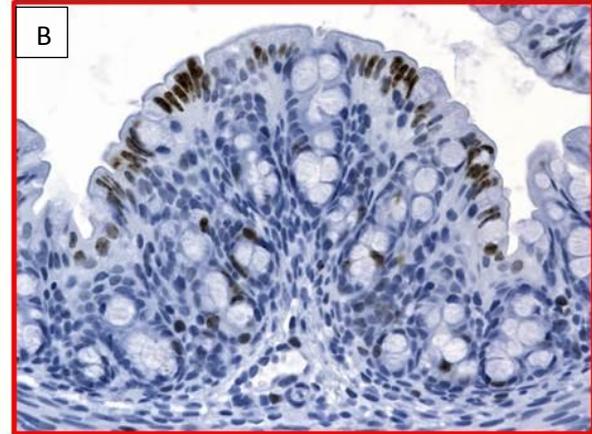
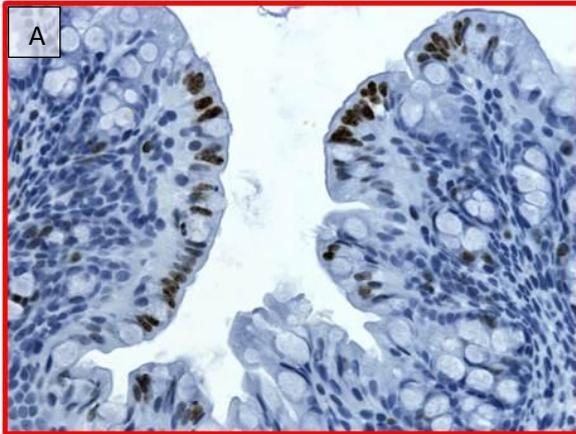
Souriceaux de 5 jours (x 400)



Souriceaux de 8 jours (x 200)

(A, B, C) Groupe WT

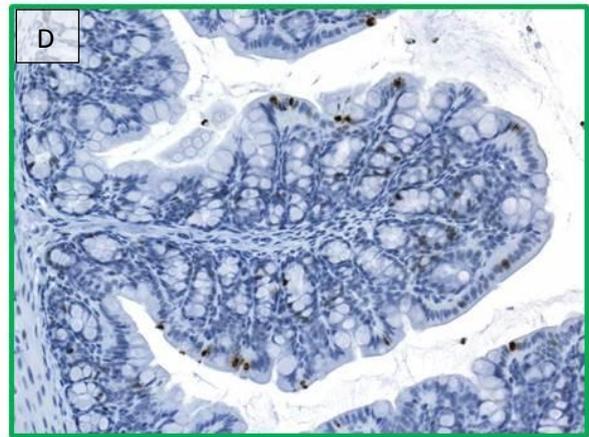
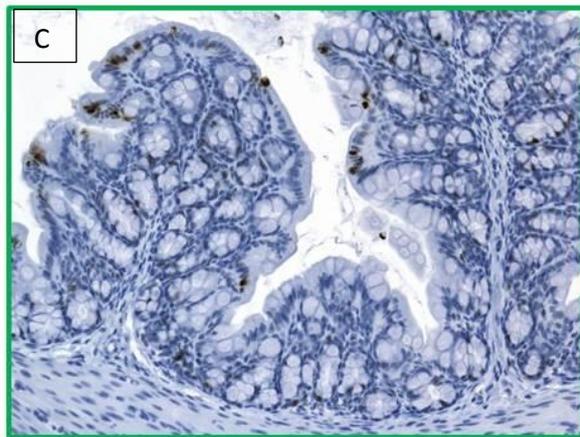
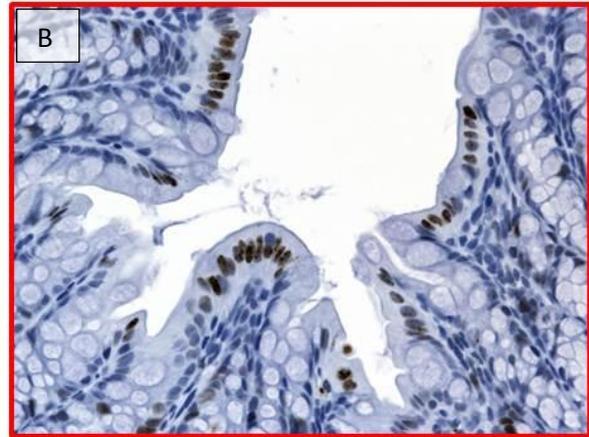
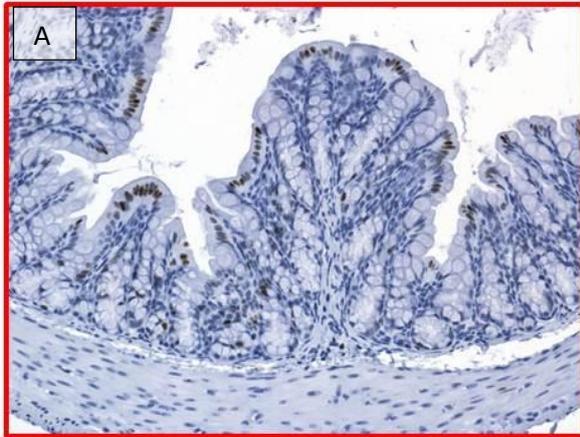
(D) Groupe $\Delta clbA$



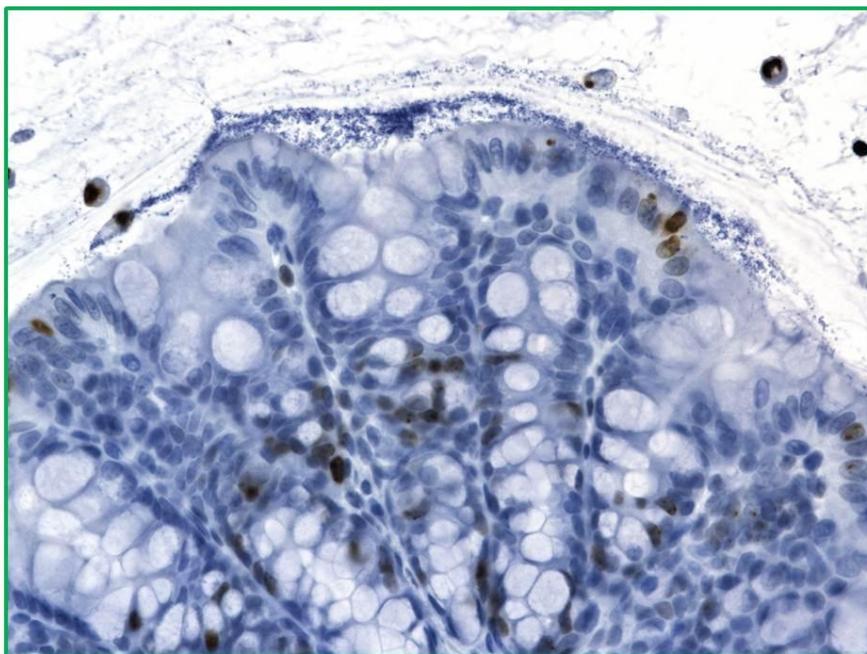
Souriceaux de 21 jours (x 200, x 400 en haut à droite)

(A, B) Groupe WT

(C, D) Groupe $\Delta clbA$



Souriceaux de 21 jours (x 400) Groupe $\Delta clbA$



3. Communication Poster

Poster présenté lors du symposium « Intestinal stem cells: new concepts and methods » (21 Novembre 2013, Toulouse).

Primo-colonizing genotoxic *Escherichia coli* : a threat to intestinal stem cells ?

Emilie Cloup^{a,b}, Delphine Payros^{a,c,d,e,f}, Gabriel Cuevas-Ramos^{a,b,c,d,e}, Frédéric Taieb^{a,c,d,e}, Thomas Seche^{a,c,d,e}, Patricia Martin^{a,c,d,e}, Isabelle Raymond-Letron^b, Claude Petit^{a,b,c,d,e}, Maiwenn Olier^{a,c,d,e,f}, Eric Oswald^{a,c,d,e,g}, Jean-Philippe Nougayrède^{a,c,d,e}

- ^a Inserm, UMR1043, Toulouse, France.
- ^b Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse France.
- ^c INRA, USC 1360, Toulouse, France.
- ^d CNRS, UMR5282, Toulouse, France.
- ^e Université de Toulouse, UPS, Toulouse, France.
- ^f Neuro-gastroentérologie & Nutrition, UMR Toxalim INRA/ENVT 1331, Toulouse, France.
- ^g CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de bactériologie-Hygiène, Toulouse, France.



Abstract : *Escherichia coli* (*E. coli*) is one of the first commensal bacterium that colonizes the intestinal tract of newborns and persists in adults as a long-term colonizer. Among this species, some strains of *E. coli* produce a genotoxin named colibactin. This bacterial toxin induces DNA double-strand breaks, chromosomal instability and genetic mutations in mammalian cells. Therefore, we have examined the consequences of the neonatal colonization by these genotoxic *E. coli*. Following oral inoculation, we observed *E. coli* bacteria mainly in their niche, the colic mucus gel layer, and some bacteria interacting with upper epithelial cells. Although direct interaction is required for genotoxic effect *in vitro*, we found γ H2AX⁺ cells in the basal crypt region, especially at day 8. Although DNA damage cannot be seen any more at adulthood, abnormal mitosis figures persisted and the renewal of the epithelium was enhanced. Thus, the perinatal period is a critical period when the intestinal epithelium is directly exposed to genotoxic primo-colonizer bacteria that could leave a persistent footprint in intestinal stem cells.

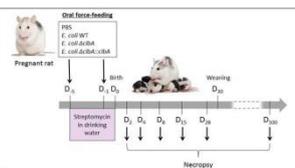
Colibactin-producing *Escherichia coli* strains can damage DNA in intestinal epithelial cells of unweaned newborn mice

At birth, commensal *E. coli* colonize rapidly the neonatal gut. Among this pleiomorphic species, we observe in industrialized countries a newly dominant phylogenetic group, and especially in infants, the B2 group. These B2 *E. coli* frequently produce a genotoxin named colibactin. This toxin can trigger DNA double-stranded breaks and chromosomal instability in mammalian cells.

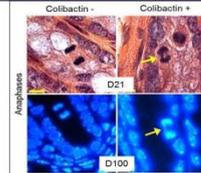
Here, we demonstrated an increased reporter *cll* gene mutant frequency in infected Big Blue fibroblasts.

Control		Gamma-irradiation		Bleomycin		<i>pkS+ E. coli</i>	
Mean MF	SD	Mean MF	SD	Mean MF	SD	Mean MF	SD
3,6	1,7	8,2*	1,5	8,8*	1,4	10,2**	2,0

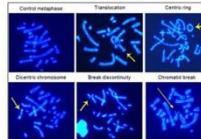
Reporter *cll* gene-mutant frequencies (MF x 10³ mutations per *cll* locus) were determined in Big Blue fibroblasts infected with genotoxic *E. coli*, using the λ Select-*cll* Mutation Detection System for Big Blue Rodents. Mean frequencies were obtained after 3 independent experiments and were analyzed by a one-way ANOVA followed with a Dunnett's post-test (*p < 0,05, ** p < 0,01 vs. control).



A rat model mimicking the natural transmission of *E. coli* from mothers to newborns.



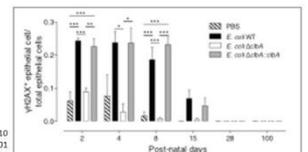
Colibactin exposition can induce anaphase bridges in intestinal epithelial cells



Chromosome aberrations in metaphasic cells 24h after infection with *pkS+ E. coli*. The chromosomes were labeled with DAPI after metaphase spreading.

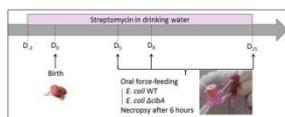
Quantification of γ H2AX-positive epithelial cells. Groups of 5-10 rats were analyzed. Mean \pm SEM are shown. * P<0.05, ** P<0.01 and *** P<0.001

Besides, in a rat model mimicking the natural transmission of *E. coli* from mothers to newborns, we showed that these genotoxic bacteria alters the intestinal epithelium both during the neonatal period, by activating the DNA-damage response (γ H2AX), and into adulthood, with signs of genotoxic damage including anaphase bridges, crypt fission, and increased intestinal proliferation and cellular renewal.

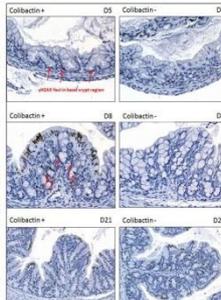
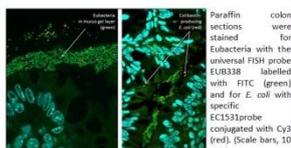


Neonatal colonization with *pkS+ E. coli* damage basal crypt region

We examined the consequences of the neonatal colonization by these genotoxic *E. coli*. A colibactin-producing *E. coli* strain, or its non-toxic isogenic mutant, was administered by oral route to newborn mice. Gut tissues were collected 6 hours after exposure to localize bacteria by FISH and DNA-damaged γ H2AX⁺ intestinal cells by IHC. Some *E. coli* can quit their niche, the colic mucus gel layer, and then interact with epithelial cells from both the surface epithelium and the upper crypt region.



Neonatal colonization in a mouse model by forced-feeding at 5, 8 and 21 days after birth.



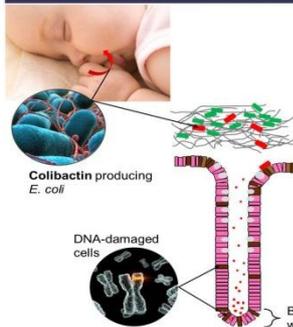
Although direct interaction is required for genotoxic effect *in vitro*, we can find γ H2AX⁺ cells in the basal crypt region, especially before weaning.

Percentage of γ H2AX⁺ cells in surface epithelium, glandular epithelium and lamina propria. For each group, 8 microscopic fields were observed (x 400) at least in order to count more than 200 cells.

% γ H2AX positives cells	Surface epithelium		Crypt epithelium		Lamina propria	
	WT	Δ clbA	WT	Δ clbA	WT	Δ clbA
Day 5	0,4	0,9	13,7	3,9	2,7	1,9
Day 8	43,1	0,0	24,5	9,8	16,9	1,0
Day 21	39,2	0,8	0,9	0,6	0,9	0,0

Paraffin colon sections were stained for γ H2AX (brown, red arrows) and counterstained with hematoxylin.

Conclusions and perspectives



The perinatal period is a critical time window during which the intestinal epithelium is directly exposed to genotoxic primo-colonizer bacteria. The primo-colonization by colibactin-producing strains might result in a persistent footprint in intestinal stem cells. Before weaning, we observed many γ H2AX⁺ cells in the basal crypt compartment. In consequence, both the genome and cellular homeostasis can be compromised.

- Use a physiological model mimicking the natural colonization of the gut of newborn mice from the maternal microbiota.
- Identify the cells harboring DNA-damage (by immunostaining (IHC, IHF, FISH))
- Characterize the spectrum of mutations induced by colibactin (mode of action?)
- Localize and quantify the activation of programmed cell death (apoptosis) with TUNNEL and Caspase stainings.
- Examine long-term effect on epithelium homeostasis : gut organoids cultured from transient infected ISCs.

Lexique

Antigène : substance reconnue comme étrangère par le système immunitaire et responsable d'une réponse immunitaire.

Association symbiotique

: ensemble des relations à bénéfices réciproques entre deux organismes.

Clonage moléculaire : opération de génie génétique permettant d'isoler une séquence d'ADN et de la produire en très grand nombre de copies. Elle consiste à transférer cette séquence dans le génome d'un

Cyclomoduline : facteur bactérien qui perturbe le déroulement normal du cycle cellulaire, soit en l'arrêtant (cyclomodulines inhibitrices), soit en le stimulant (cyclomodulines stimulatrices).

Espèces réactives de l'oxygène (ou ROS) : famille d'espèces chimiques oxygénées regroupant les radicaux libres oxygénés (espèces chimiques possédant un électron libre) et les dérivés non radicalaires (espèces chimiques ne possédant pas d'électron célibataire-non apparié).

Facteur de virulence : éléments bactériens qui contribuent à la survie de la bactérie, à sa capacité d'infection, à l'expression des symptômes de la maladie.

Flagelline : unité protéique du filament flagellaire.

Flore : ensemble des micro-organismes présents dans un lieu donné.

Gène de ménage : ou gène constitutif, pour un organisme procaryote, il s'agit d'un gène dont le produit est essentiel à la vie de la cellule et donc toujours exprimé.

Génotoxine : toxine provoquant des dommages à l'ADN.

Glycocalix : manteau membranaire constitué de glucides fixés à la surface de la membrane cellulaire.

Îlot génomique : région chromosomique regroupant plusieurs gènes acquis par transfert horizontal.

Instabilité génomique : augmentation de la probabilité d'apparition de mutations et d'anomalies chromosomiques.

Microbiote : ensemble des micro-organismes présent dans un environnement donnée. Par exemple, le microbiote intestinal correspond à la flore intestinale (bactéries, virus, protozoaires, levures).

Micro-organisme : organisme vivant invisible à l'œil nu, et dont l'observation ne peut se faire que sous microscopie (bactéries, archées, levures, champignons, protistes unicellulaires, amibes, parasites, virus).

Lipopolysaccharide : composant de la paroi des bactéries à Gram négatif formé d'un lipide et d'un polysaccharide.

Métagénome : contenu génétique d'un échantillon issu d'un environnement complexe.

Microvillosité : fines expansions membranaires en doigts de gant qui augmentent la surface apicale et donc la capacité de transport membranaire à ce pôle.

Pathotype : ensemble de micro-organismes à l'origine d'une même pathologie.

Phage : virus infectant les bactéries

Plasmide : molécule d'ADN circulaire répliquée de manière autonome de celui du chromosome bactérien.

Polykétide : métabolite secondaire dérivé de l'acétyl Coenzyme A ; et dont la structure et l'activité biologique sont très diverses.

Prophage : matériel génétique d'un virus intégré au génome de l'hôte.

Sérotypage : méthode immunologique permettant de mettre en évidence des antigènes structuraux présents à la surface d'une cellule ou d'un micro-organisme.

Sérotype : ensemble de propriétés antigéniques présenté par une cellule ou un micro-organisme.

Souche : population bactérienne issue d'une même cellule.

Stress oxydatif : oxydation des constituants cellulaires (protéines, lipides, acides nucléiques) par un excès d'espèces réactives de l'oxygène.

Transposon : séquence d'ADN capable de s'exciser, de se déplacer et de s'insérer au niveau d'un autre site sur le même brin d'ADN ou sur un autre brin de manière autonome.

Transversion : substitution d'une base purique (A ou G) par une base pyrimidique (C ou T) et vice versa.

