



Université
de Toulouse

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Discipline: *Microbiologie*

Présentée et soutenue par

Sandra MALAVAUD

Le 29 mars 2017

***Escherichia coli* et canneberge :**
évaluation de l'activité *in vitro* et chez l'animal

JURY

M le Pr Xavier GAME, Président
Mme le Pr. Hélène MARCHANDIN, Rapporteur,
M le Pr. Hervé BAUMERT, Rapporteur,
Mme le Pr. Christine ROQUES-CESCHIN, Directeur de Thèse,
M le Pr. Bernard MALAVAUD, co-directeur,
M le Pr. Franck BRUYERE, membre invité

Ecole doctorale : SEVAB
Unité de recherche : LCG – UER 5503
Directeur(s) de Thèse : Christine ROQUES-CESCHIN ; Bernard MALAVAUD

Auteur : Sandra Peckre Figueira Ferraz MALAVAUD

Titre : *Escherichia coli* et canneberge : évaluation de l'activité *in vitro* et chez l'animal

Directeurs de thèse : Christine ROQUES-CESCHIN, Bernard MALAVAUD

Soutenue à Toulouse, le mars 2017

Résumé :

V. macrocarpon (canneberge) est traditionnellement associé à la prévention des IU, les mécanismes restant mal élucidés. L'effet d'une préparation commerciale de canneberge sur l'adhésion d'*E.coli* UTI89 aux cellules urothéliales T24, a montré l'importance de pré-incuber les bactéries avec le composé pour obtenir une inhibition dose-dépendante et réversible de l'adhésion. L'étude du transcriptome (*E.coli* Gene expression microarray, AgilentTechnologies) montre un effet puissant portant sur de nombreux gènes liés aux adhésines (sauf les fimbriae P), au chémotactisme et au flagelle. L'étude en microscopie électronique confirme un effet sur la taille et les structures de surface (adhésines, flagelles), l'étude de la mobilité en microscopie à champ large montre de moindres capacités de déplacement (distances, linéarité).

Chez la souris C57BL/6, la pré-incubation n'a pas d'effet significatif sur la colonisation des vessies, ni sur l'adhésion *ex vivo* aux cellules T24, des bactéries récupérées dans les vessies.

Un modèle intégratif d'étude de *V.macrocarpon*, basé sur des tests simples *in vitro* (adhésion, swarming, microscopie à champ large) est défini.

Mots clés : *E.coli*, canneberge, adhésion, mobilité, chémotactisme, flagelle, transcriptome

Discipline : Microbiologie

Thèse préparée dans le Laboratoire de Génie Chimique, Faculté de Pharmacie, UMR 5503, Toulouse III.

Escherichia coli et canneberge : évaluation de l'activité *in vitro* et chez l'animal

1	Introduction	11
2	Etat de l'art	13
2.1	Qui est <i>Escherichia coli</i> ?	13
2.2	Rôle d' <i>E.coli</i> dans les infections urinaires	15
2.2.1	Epidémiologie	15
2.2.2	Physiopathologie de l'Infection Urinaire	17
2.2.2.1	Infection urinaire aiguë	17
2.2.2.2	Les infections urinaires chroniques et récurrentes	34
2.2.2.3	Pathologies urinaires non infectieuses et persistance des bactéries	37
2.2.3	Traitements antibiotiques des infections urinaires basses	38
2.2.3.1	Traitement antibiotique probabiliste des cystites aiguës simples	38
2.2.3.2	Traitement antibiotique des cystites récidivantes	39
2.3	Les traitements actuels non antibiotiques, préventifs et curatifs, de l'IU	39
2.3.1	Approche compétitive	40
2.3.2	Approche inhibition de l'adhésion	40
2.3.2.1	Vaccins	40
2.3.2.2	Immunothérapie active	40
2.3.2.3	Antagonistes FimH dérivés du biarylmannose	41
2.3.2.4	Autres molécules ciblant l'adhésion bactérienne	41
2.3.2.5	Des probiotiques galactooligosaccharides	42
2.3.2.6	Les dérivés de la canneberge	42
2.4	Modèles d'étude de l'activité de la canneberge	45
2.4.1	Modèles <i>in vitro</i>	45
2.4.2	Modèles <i>in vivo</i>	50
2.5	Place de la canneberge dans la prise en charge des infections urinaires basses	53
3	Matériel et méthodes	57
3.1	Matériel	57
3.1.1	La collection de souches d' <i>E.coli</i>	57
3.1.2	Les lignées cellulaires utilisées <i>in vitro</i>	60
3.1.3	Les animaux utilisés <i>in vivo</i>	61
3.1.4	Les produits utilisés pour la mise au point du modèle	61
3.1.4.1	Extraits de canneberge	61
3.1.4.1	Principaux milieux, réactifs et appareils utilisés pour les différents essais <i>in vitro</i>	62
3.2	Méthodes	63

3.2.1	In vitro	63
3.2.1.1	Hémagglutination.....	63
3.2.1.2	Cytotoxicité	64
3.2.1.3	Croissance bactérienne.....	65
3.2.1.4	Adhésion aux cellules vésicales.....	65
3.2.1.5	Etude des ARNm chez UTI89 (puce Affymetrix, Agilent)	67
3.2.1.6	Mobilité bactérienne sur gélose.....	69
3.2.1.7	Mobilité bactérienne par microscopie électronique à champ large.	70
3.2.1.8	Structure bactérienne par microscopie électronique par transmission (MET)	72
3.2.2	Expériences in vivo.....	72
3.2.2.1	Inoculation de différentes souches d' <i>E.coli</i> en l'absence de pré-incubation avec C102...73	
3.2.2.2	Effet sur l'adhésion à l'urothélium de souris inoculées avec <i>E.coli</i> UTI89, pré-incubée ou non avec C102.....	75
3.3	Analyse des données	76
4	Résultats	77
4.1	Essais <i>in vitro</i>	77
4.1.1	Hémagglutination.....	78
4.1.2	Essais de cytotoxicité.....	78
4.1.2.1	Cytotoxicité directe des bactéries sur les cellules T24 (test au bleu Trypan).....	78
4.1.2.2	Cytotoxicité des surnageants bactériens par test XTT	79
4.1.2.3	Cytotoxicité des différents composés (extraits de canneberge) (test XTT)	80
4.1.2.4	Cytotoxicité du composé C102 à 1 et 0,1% (test au bleu Trypan)	82
4.1.3	Croissance bactérienne en présence de C102 à 1 et 0,1%	82
4.1.4	Etude de l'adhésion et de l'inhibition d'adhésion par le composé C102.....	83
4.1.4.1	Capacité d'adhésion de neuf souches différentes d' <i>E.coli</i> aux cellules urothéliales humaines T24 après un temps de contact de 2 heures	83
4.1.4.2	Inhibition de l'adhésion d' <i>E.coli</i> UTI89 aux cellules humaines T24 par C102, selon différentes modalités d'exposition	86
4.1.4.3	Etude <i>in vitro</i> sur les cellules de rein de souris NUC-1.....	88
4.1.4.4	Application du modèle <i>in vitro</i> à l'évaluation de candidats médicaments.....	89
4.1.5	Etude des ARNm par séquençage.....	96
4.1.5.1	Modifications induites par C102 sur la transcription des gènes impliqués dans les fimbriae 98	
4.1.5.2	Modifications induites par C102 sur la transcription des gènes impliqués dans la chaîne moléculaire du chémotactisme.	99
4.1.5.3	Modifications induites par C102 sur la transcription des gènes impliqués dans la construction et la mobilité des flagelles.....	102
4.1.6	Etude fonctionnelle de la mobilité bactérienne.....	105
4.1.7	Microscopie à champs large.....	109

4.1.8	Microscopie électronique à transmission	112
4.2	Expériences <i>in vivo</i> chez la souris	115
4.2.1	Définition des conditions expérimentales : Inoculation de différentes souches d'E.coli en l'absence de pré-incubation avec C102.....	115
4.2.1.1	Cinétiques de l'excrétion urinaire et persistance tissulaire	115
4.2.1.2	Histologie	117
4.2.1.3	Impact de la taille de l'inoculum d'UTI89 sur l'adhésion vésicale à T4 heures	119
4.2.2	Effet de la pré-incubation avec C102 de la bactérie inoculée chez la souris	120
4.2.2.1	Effet sur la colonisation à J3	120
4.2.2.2	Contrôle de l'adhésion de la souche d'UTI89 obtenue <i>ex vivo</i>	123
4.2.2.3	Effet sur l'adhésion à la muqueuse vésicale à T 4 heures après inoculation	124
5	Discussion	129
5.1	Des modèles d'études	129
5.1.1	Les essais en clinique humaine.....	130
5.1.2	Des essais sur modèle animal.	130
5.1.3	Moyens d'étude de l'adhésion bactérienne sur lignées de cellules eucaryotes.....	136
5.1.3.1	Approche analytique.....	138
5.1.3.2	Approche intégrative	139
5.2	La complexité des voies intervenant dans l'effet de la canneberge sur l'adhésion microbienne	146
5.2.1	Complexité de la composition et des mécanismes d'action de la canneberge.....	146
5.2.2	Effet post -transcriptionnel des composés du jus de canneberge.....	147
5.2.2.1	Affymetrix, pili et canneberge.....	148
5.2.2.2	Affymetrix, chimotaxie, flagelle et canneberge.	152
5.2.3	Visualisation des effets	160
5.2.3.1	Effets de la canneberge en microscopie électronique.....	160
5.2.3.2	Effets de la canneberge sur la mobilité en gélose molle	162
5.2.3.3	Effets de la canneberge sur la mobilité en microscopie à champ large.....	163
6	Conclusion et perspectives.....	165
7	Bibliographie.....	168

Abréviations

ABU asymptomatic bacteriuria

ADN acide désoxyribonucléique

AFSSA agence française de sécurité des aliments

AIEC *E.coli* adhérents-invasifs

ARN acide ribonucléique

ATCC american type culture collection

ATP adénosine triphosphate

BGN bacille à Gram négatif

BMR bactérie multi-résistante

CBI colonies ou communautés bactériennes intra-cellulaires

CIP collection de l'Institut Pasteur

CNF cytotoxic necrotising factor

CO₂ dioxyde de carbone

CUP chaperone usher pathways

DAEC *E.coli* adhérent de façon diffuse

DMEM Dulbecco's minimal essential medium

DO densité optique

DS déviation standard

EAEC *E.coli* entéroaggrégatif

EHEC *E.coli* entérohémorragique

EIEC *E.coli* entéroinvasives

EPEC *E.coli* entéropathogène

EPPI eau pour préparations injectables

ETEC *E.coli* entérotoxigène

ExPEC *E.coli* pathogènes extra-intestinaux

FQ fluoroquinolones

HA hémagglutination

HlyA alpha hémolysine

IHA inhibition de l'hémagglutination

IL interleukines

IU infection urinaire

KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LB Luria-Bertani (milieu de)
LPS lipopolysaccharide
MCP pethyl-acceptingchemotaxis protein
MET microscopie électronique à transmission
ml millilitre
NaCl chlorure de sodium
NIH National Institute of Health
Nm nanometer
Omp outer membrane protein
PAC proanthocyanidines
PBS phosphate buffered saline
PN pyélonéphrites
PVC polivinyl chlorure
PVPI povidone iodée
RIQ réservoirs intracellulaires quiescents
RT qPCR real time quantitative polymerase chain reaction
UFC unité formant colonie
UPEC uropathogenic *E.coli*
UPK uroplakines
UTI urinary tract infection
SVF serum de veau fœtal
TLR toll like receptor
TMP-STX triméthoprim-sulfaméthoxazole
TS trypcase soja (milieu)
VAT vacuolating autotransporter toxin

Tableaux et figures	page
<u>Tableaux</u>	
Tableau 1. Facteurs de virulence exprimés par les UPEC les plus étudiés	21
Tableau 2. Etudes <i>in vitro</i> confirmant l'effet anti-adhésion des « canneberges »	45
Tableau 3. Facteurs de virulence présents chez 5 souches ExPEC	49
Tableau 4. Souches d' <i>E.coli</i> initialement testées pour leurs propriétés hémagglutinantes	58
Tableau 5. Comparaison des pourcentages d'adhésion et d'inhibition de l'adhésion par C102 (1%) sur 3 souches d' <i>E.coli</i> sur cellules eucaryotes (NUC-1 et T24).	89
Tableau 6. Tableau récapitulatif des différents essais préliminaires d'adhésion, et d'inhibition de l'adhésion <i>in vitro</i>	92
Tableau 7 : nombre de gènes affectés par l'exposition au composé C102 à 1% pendant les 10 subcultures	98
Tableau 8. Protocole et principaux résultats de l'essai ARNm par puce Affymetrix	98
Tableau 9. Variations du transcriptome d'UTI89 (fimbriae) selon l'exposition à C102 1%.	99
Tableau 10. Variations du transcriptome d'UTI89 (chémotaxie) selon l'exposition à C102 1%.	101
Tableau 11: Variations du transcriptome d'UTI89 (flagelle) selon l'exposition à C102 1%	103
Tableau 12. Mobilité en microscopie champ large	110
Tableau 13. Dénombrements d' <i>E.coli</i> dans les urines et les broyats de vessies	116
Tableau 14. Impact de l'inoculum sur l'adhésion à 4 heures	119
Tableau 15. Dénombrements d'UTI89 dans les broyats de vessies selon l'exposition à C102	123
Tableau 16. Inhibition de l'adhésion <i>ex vivo</i> d'UTI 89 (pré-incubée ou non) aux cellules T24	124
Tableau 17. Dénombrement des UFC /vessie 4 heures après inoculation.	124
Tableau 18. Principales expériences menées chez la souris et principaux résultats.	126
Tableau 19. Opérons codant pour les protéines impliquées dans le chémotactisme.	154
Tableau 20. Protéines impliquées dans l'assemblage et la fonction du moteur.	155

Figures

Figure 1. Organisation des fimbriae P.	28
Figure 2. Organisation du flagelle	31
Figure 3. Test de cytotoxicité par transformation des sels de XTT en formazan.	64
Figure 4. Champ large : mesure de la longueur totale et de la distance absolue	71
Figure 5. Cytotoxicité des surnageants de souches d' <i>E.coli</i> sur les cellules T24 après 2 heures de contact.	79
Figure 6. Pourcentage de cellules T24 viables avec 4 extraits différents de canneberge.	81
Figure 7. Croissance bactérienne (DO) de 4 souches d' <i>E.coli</i> selon l'exposition à C102	83
Figure 8. Adhésion de 9 souches d' <i>E.coli</i> aux cellules T24 après 2h de contact	84
Figure 9. Adhésion d'UTI89 en présence de C102, différentes modalités d'exposition.	88
Figure 10. Adhésion d'UTI89 aux cellules T24 en présence de 3 produits	90
Figure 11. Affymetrix: scatterplots des huit échantillons analysés d' <i>E.coli</i> UTI89	97
Figure 12. Affymetrix: vulcanoplot du transcriptome (chaîne de chémotactisme)	100
Figure 13. Affymetrix: diagramme de KEGG (cascade de chémotaxie).	100
Figure 14. Affymetrix: vulcanoplot du transcriptome (structure et fonction du flagelle)	102
Figure 15. Affymetrix: diagramme de KEGG (flagelle)	104
Figure 16. Surfaces des cultures bactériennes sur géloses molles « twitching », « swimming » et « swarming » selon l'exposition à C102,	105
Figure 17. Surfaces des cultures bactériennes sur gélose swarming, selon 6 modalités d'exposition à C102.	106
Figure 18. Swarming : cultures à trois temps de lecture, selon 4 conditions d'exposition à C102 (photographies).	107
Figure 19. Surfaces des cultures bactériennes sur gélose « swarming », à 3 temps de lecture, selon les différentes conditions d'exposition à C102.	107
Figure 20. Microscopie à champ large : déplacements d' <i>E.coli</i> UTI89	111
Figure 21. Microscopie électronique à transmission (photographies).	112
Figure 22. Microscopie électronique : modifications de la taille et de la surface	113
Figure 23. Dénombrements bactériens dans la broyats de vessies de souris	116
Figure 24. Aspect histologique normal de vessie de souris.	118
Figure 25. Variations des poids des animaux et épaisseur de la paroi vésicale	121
Figure 26. Analyse histologique des vessies de souris inoculées par <i>E. coli</i>	122

Remerciements

A mes co-directeurs

- Pr C. Roques, Laboratoire de Génie Chimique, Faculté de Pharmacie, Université Paul Sabatier, Toulouse

Pour ta confiance, les portes ouvertes du laboratoire de recherche et de la Fonderephar, le sujet et la réflexion associée

- Pr B. Malavaud, Urologie, CHU de Toulouse et IUCT-Oncopôle, CNRS

Pour ta rigueur intellectuelle, tes connaissances adaptables à « tout terrain », ton soutien sans faille, le fil d'Ariane dans les moments de découragement, ta patience jamais démentie, l'initiation à EndNote... et tout le reste !

A l'équipe de la Fonderephar, pour son accueil ; à Leila Haddioui, sa bonne humeur et ses encouragements ; tout particulièrement à Haouaria Belkhef, la paillasse c'est toi, ta patience –la pédagogie, c'est la répétition, tu as été servie ! - ta rigueur, ta passion pour ton métier, tes petits gâteaux, et ta gentillesse en me disant, au terme de tant d'années, « elles me manquent nos manip canneberge »...

A S. Pécastaings, la pro de l'extraction des ARN, Laboratoire de Microbiologie Industrielle, Faculté de Pharmacie, Université Paul Sabatier

A l'équipe de la Plateforme Transcriptome GeT-biopuces, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, Université Paul Sabatier (puce Affymetrix)

A M.Vigneau et J.Rouquette, ITAV-USR3505, Centre Pierre Pottier, Université Paul Sabatier (Microscopie à champ large)

A l'équipe de la Plateforme Microscopie Électronique, Faculté de Médecine de Rangueil, Université Paul Sabatier

A C. Mazerolles, pour l'anatomo-pathologie et la tristesse de ne plus te compter parmi nous.

A l'équipe de l'animalerie, Faculté de Pharmacie, Université Paul Sabatier

A A. Mandeau et B. Fabre (Laboratoires Pierre Fabre), pour l'intérêt porté à ce travail

A l'équipe de l'EOHH de Rangueil, pour sa compréhension et son soutien

1 Introduction

L'infection urinaire (IU) est l'une des infections bactériennes humaines les plus fréquentes (1), atteignant 150 millions de personnes chaque année dans le monde (2). *Escherichia coli* est la bactérie la plus souvent isolée dans les infections urinaires, tant celles dites « de ville » (3), que celles associées aux soins. Les souches répondant à un pathotype distinct, les UPEC (uropathogenic *E.coli*) (4), sont isolées dans plus de 80% des IU. La fréquence des récurrences constitue l'enjeu majeur de ces infections: plus de 25% des femmes présentant une cystite en feront une nouvelle dans les 6 mois suivants.

L'IU résulte de facteurs anatomiques, d'altérations des mécanismes de défense de l'hôte et de la virulence de la bactérie. La capacité des UPEC à générer des infections urinaires est liée à l'expression de nombreux facteurs de virulence (5), parmi lesquels les molécules permettant l'adhésion semblent jouer un rôle majeur (6). Les souches d'UPEC ne sont pas strictement extra-cellulaires et se comportent comme des pathogènes intracellulaires opportunistes. Parmi les facteurs de virulence décrits, le premier a été l'adhésine Fim H permettant non seulement l'attachement de la bactérie aux cellules urothéliales mais aussi le déclenchement d'une cascade de signaux cellulaires conduisant à l'internalisation des bactéries (7, 8). Ainsi, au cours de la phase aiguë de cystite sont créées les conditions d'un réservoir persistant d'*E.coli* (9) pouvant expliquer les récurrences. FimH, l'adhésine purifiée des pili de type 1, reconnaît également les N-oligosaccharides des intégrines bêta 1 et alpha 3, qui sont ainsi les récepteurs-clé pour les souches d'UPEC (10). Les pili de type 1 peuvent se lier spécifiquement aux uroplakines UPK a et b qui revêtent les cellules en parapluie de l'urothélium, comme le montrent les images de microscopie électronique à balayage (7). Au fil du temps d'autres facteurs de virulence ont été décrits (autres adhésines, flagelle, capsule).

L'ingestion de canneberge (*Vaccinium macrocarpon*) est traditionnellement associée à la prévention des IU. Pendant longtemps son effet a été attribué à l'acidification des urines responsable d'un effet bactériostatique, avant que sa capacité à inhiber l'adhésion bactérienne ne soit avancée (11). Deux composés susceptibles d'inhiber l'adhésion aux cellules via les adhésines d'*E. coli* ont été identifiés (12): le fructose, pour les adhésines mannose-sensibles, et un composé de haut poids moléculaire pour les adhésines mannose-résistantes des UPEC. Ce dernier correspond aux proanthocyanidines (PAC), plus particulièrement aux PAC de type A, et a été pressenti comme responsable de l'effet de la canneberge sur le contrôle et la prévention des infections urinaires, en particulier sur la moindre fixation d'*E.coli* aux cellules urothéliales (13, 14) et épithéliales vaginales, et ce avec un effet-dose (15, 16).

Depuis, de nombreuses études cliniques ont été menées chez des populations diverses (volontaires sains, femmes jeunes sexuellement actives, personnes âgées, enfants souffrant de vessies neurologiques (14, 17) tendant à démontrer une efficacité sur la fréquence de survenue des IU ainsi qu'un effet anti-adhésion bactérienne des urines humaines après consommation de différents produits à base de canneberge (17), effet également observé chez l'animal (18). Cet effet s'exercerait tant à l'encontre de souches d'*E.coli* sensibles que multi-résistantes aux antibiotiques (19).

Dans un avis rendu le 6 avril 2004 (20), l'AFSSA reconnaît que « des études cliniques randomisées démontrent une diminution de la fréquence des IU chez les femmes en lien avec la consommation de jus de fruit de canneberge, effet expliqué par l'inhibition de l'adhérence des bactéries, mécanisme lié à la présence de PAC de type A ». Cependant les preuves existantes ne permettent pas d'établir un lien de causalité entre la consommation et la réduction du risque de survenue d'IU. Plus récemment, à la lumière d'une méta-analyse (21), le jus de canneberge ne semble plus devoir être recommandé dans la prévention des IU, sans que des études précises portant sur d'autres présentations (poudre, comprimés) ainsi que sur le composé actif, ne soient conduites.

Ainsi, l'inhibition des phénomènes d'adhésion semble au cœur de l'action des PAC A, par des mécanismes encore mal connus: diminution de l'expression des molécules d'adhésion par répression génique, contrôle de la traduction, quel que soit le mécanisme sa définition est rendue plus difficile par le caractère composite de l'extrait naturel.

Les Laboratoires Pierre Fabre ont isolé et caractérisé plusieurs molécules/fractions d'intérêt, qui, si l'action anti-adhésion était prouvée permettrait d'en analyser plus finement les mécanismes d'action. Nous avons cherché à mettre au point un modèle d'étude des composés ou fractions candidats médicaments, puis à analyser plus finement les effets du composé retenu dans ce modèle.

2 Etat de l'art

2.1 Qui est *Escherichia coli* ?

E.coli est un bacille à Gram négatif, appartenant à la famille des entérobactéries, anaérobie facultatif, mobile, dont le principal réservoir est le microbiote intestinal de l'animal et de l'homme (environ 80% de la flore aérobie). Sur les 1000 espèces bactériennes probables totalisant les 10^{14} bactéries que comporte la flore colique humaine, 1% correspondrait à *E.coli*.

Il est habituel de distinguer (22, 23):

- les *E.coli* commensaux, constituant l'essentiel de la flore intestinale, dont le rôle est bénéfique puisqu'intervenant, d'une part, dans le métabolisme des sels biliaires, d'autre part dans la protection, par effet compétiteur, à l'égard de l'implantation de bactéries pathogènes. Ces bactéries peuvent être des pathogènes opportunistes chez l'immunodéprimé ou en cas d'altération de la barrière intestinale. Ainsi, lors de l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales en France, en 2012, *E.coli* représentait 15,4% des bactéries identifiées dans les bactériémies nosocomiales, 13,5% de celles identifiées dans les infections de site opératoire, 9% dans les pneumopathies et 7,5% dans les infections de la peau et des tissus mous.
- les *E.coli* entéropathogènes, responsables d'infections intestinales, au sein desquels ont été décrits des souches entéropathogènes (EPEC), entéro-hémorragiques (EHEC), entéro-toxinogènes (ETEC), entéroinvasives (EIEC), entéro-agrégatives (EAEC) et celles adhérant de façon diffuse (DAEC).
- les *E.coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC), qui tout en restant dans l'intestin, ont la faculté de pouvoir aller coloniser d'autres sites anatomiques, parmi lesquels l'arbre urinaire ; les souches sont alors dites uropathogènes (UPEC), sans qu'un profil particulier de virulence ne puisse leur être rattaché à ce jour. Parmi les 4 groupes phylogéniques reconnus (A, B1, B2 et D), les UPEC sont majoritairement rattachés au groupe B2 et dans une moindre mesure, au groupe D (24). Toujours lors de l'enquête nationale de prévalence en 2012, *E.coli* représentait la moitié des microorganismes isolés dans les infections urinaires nosocomiales.

E.coli est habituellement considéré comme un germe extra-cellulaire ; cependant, les UPEC se comportent plutôt comme des pathogènes opportunistes intra-cellulaires (25).

E.coli mesure 2 x 0,5µ, possède un chromosome circulaire, dont la transcription se fait directement dans le cytoplasme. Son génome comporte 4800 gènes (pour 4,6 millions de paires de bases), dont 85% ont une fonction identifiée ; 303 gènes sont probablement essentiels, leur rupture ou délétion n'étant pas compatible avec la viabilité cellulaire. Parmi les gènes d'*E.coli*, environ 1400 régulent le métabolisme bactérien, selon des « parcours » métaboliques correspondant à des réactions chimiques successives, catalysées par des enzymes, permettant à la cellule d'utiliser l'énergie produite par le catabolisme, pour synthétiser les composants dont elle a besoin et éliminer les déchets.

E. coli se divise en 2 bactéries filles toutes les 20 à 40 minutes en milieu nutritif. Le taux de mutation spontanée est de 10^{-9} par paire de bases et par génération.

La membrane cytoplasmique (à Gram -) est constituée de 2 bicouches lipidiques, interne (membrane cytoplasmique) et externe, séparées par l'espace péri-plasmique. La paroi correspond à la bicouche lipidique externe et l'espace péri-plasmique, comportant le peptidoglycane; elle assure la forme de la bactérie et sa stabilité sur le plan osmotique. La communication avec le milieu extérieur se fait par des porines, canaux et pompes transporteurs, actifs ou passifs, généralement spécifiques d'une molécule donnée ; plus de 250 transporteurs sont décrits pour *E.coli* K12 (MG1655).

E. coli est caractérisé par la présence de différents appendices associés à la paroi et présentant des fonctions majeures :

- *E.coli* est une bactérie dotée de **mobilité**, grâce à plusieurs (une dizaine) **flagelles** disposés tout autour de la bactérie (péritriche). Les flagelles sont de longs « cheveux », constitués d'une protéine majoritaire, la flagelline, formant un filament creux de 10µ de longueur, ancré dans la membrane plasmique.

- par l'intermédiaire de **fimbriae ou pili**, petits « poils » protéiques, présents en plusieurs centaines d'exemplaires sur chaque bactérie, *E. coli* est capable d'interagir avec différentes surfaces biotiques ou abiotiques et d'**adhérer** :

- soit à des récepteurs cellulaires spécifiques, étape préalable et indispensable au processus infectieux

- soit sur des surfaces inertes (PVC, verre, polycarbonates...) ou encore entre elles.

Sous forme agrégée ou sessile, les bactéries sont capables de se multiplier et de produire une matrice adhésive et protectrice, constituant ainsi un biofilm. Ce mode de vie ainsi que d'autres

types d'interactions inter-cellulaires sont régis en partie par le **quorum sensing**, système de communication mettant en jeu des effecteurs moléculaires (26).

Des senseurs protéiques sont également présents dans la membrane, capables de détecter des variations du milieu extérieur et transmettre l'information au génome bactérien par l'intermédiaire d'une cascade de modifications chimiques dont la finalité est une modification de l'expression génique.

L'homéostasie d'*E.coli* est rendue possible par une extraordinaire adaptabilité aux stress environnementaux, tels qu'une modification brutale de la température, du pH ou l'épuisement en nutriments. Elle dispose pour cela de senseurs et d'effecteurs, dont la mise en jeu pourra se traduire par une survie au détriment de la croissance et de la mobilité.

2.2 Rôle d'*E.coli* dans les infections urinaires

2.2.1 Epidémiologie

Les infections urinaires sont extrêmement fréquentes, tant en pratique clinique communautaire qu'en infectiologie associée aux soins. *E. coli* occupe la première place, avec environ 80 à 90% des infections urinaires communautaires et 30 à 50% dans les infections urinaires associées aux soins (27-29), la différence, pour ces dernières, se faisant au bénéfice d'autres entérobactéries, des entérocoques, de *Pseudomonas aeruginosa* et des levures (30).

Les IU regroupent les infections hautes (pyélonéphrites) et basses (cystites et prostatites). Les colonisations correspondent aux bactériuries asymptomatiques (31).

Les IU sont plus fréquentes chez la femme, le risque d'IU est 50 fois plus élevé chez la femme que chez l'homme en bonne santé (32) avec deux pics de fréquence, entre 20 et 40 ans en période d'activité sexuelle, puis en post-ménopause, après 60 ans (33).

Le risque qu'une femme fasse au moins une IU symptomatique au cours de sa vie a été estimé à 60% (34).

Une infection urinaire impliquant une entérobactérie telle *E.coli* est définie par la présence de signes cliniques associés à un examen cytot bactériologique des urines présentant une leucocyturie $\geq 10^4$ /ml et une bactériurie $\geq 10^3$ /ml en l'absence de corps étrangers intra-

vésicaux (sonde vésicale) ou $\geq 10^5$ dans le cas contraire (35). En dessous de ces seuils et/ou en l'absence de signes cliniques, il s'agit d'une colonisation de l'arbre urinaire par la bactérie, autrefois appelée infection urinaire asymptomatique.

En dehors de certains groupes à risque de complications (femmes enceintes, chirurgie urologique en contact avec les urines, immunodéprimés profonds), il est désormais admis que ces bactériuries s'inscrivent dans une sorte de commensalité hôte –bactérie et ne doivent être ni dépistées ni traitées.

Cliniquement, les IU se manifestent le plus souvent par des cystites ; chez l'homme il s'agit souvent de cystoprostatites (douleurs suppubiennes, urgenturie, brûlures mictionnelles, hématurie, voire fièvre en cas d'infection parenchymateuse). Les pyélonéphrites, dont l'incidence est faible (0,3 à 0,6%) (2), se présentent classiquement comme une lombalgie fébrile, et peuvent se compliquer dans 2% des cas par un sepsis (2), dont l'évolution peut être sévère. Haute ou basse, l'IU correspond à la réponse inflammatoire de la muqueuse urothéliale, dont la traduction est la douleur, aiguë ou chronique, avec une augmentation des cytokines synthétisées par la cellule au travers d'un mécanisme lipopolysaccharide-dépendant (26, 36, 37). La sévérité de la réponse inflammatoire inaugurale prédisposerait aux formes récurrentes, voire chroniques, d'IU (38).

Les facteurs de risque des cystites non compliquées chez la femme en période d'activité génitale sont une activité sexuelle fréquente, l'utilisation de spermicides, des antécédents d'IU dans l'enfance, le fait de ne pas exprimer des antigènes des groupes sanguins ABH et des antécédents maternels d'IU (39), ce dernier point suggère le rôle de facteurs génétiques chez l'hôte, ainsi que le rôle possible de la transmission verticale du microbiote, de la mère au nouveau-né, à la naissance.

Après une IU inaugurale, 20 à 30% des femmes récidiveront dans les 4 à 6 mois, malgré un traitement antibiotique adapté et l'absence de facteurs de risque personnels (2, 40-42), et parmi elles 25 à 35% auront une histoire d'IU récidivantes (43, 44), qui se définissent comme 4 épisodes ou plus sur une période de 12 mois consécutifs.

Après la ménopause, les facteurs de risque associés aux cystites récidivantes sont les antécédents d'IU, les prolapsus et anomalies fonctionnelles vésicales, la carence

oestrogénique, les antécédents de chirurgie uro-génitale (45). Des facteurs de risque spécifiques se surajoutent dans certains groupes de populations, tels que les traumatisés médullaires, les patients atteints d'anomalies urologiques ou encore porteurs de corps étrangers vésicaux (sonde vésicale), ou diabétiques (46).

Les infections urinaires représenteraient un coût annuel estimé à 5 milliards de dollars aux Etats-Unis (2, 47); elles sont responsables d'une morbidité importante et obèrent considérablement la qualité de vie des femmes qui en souffrent. De plus, avec le développement de souches bactériennes de plus en plus résistantes aux antibiotiques, les infections urinaires, au-delà du seul poids financier, deviennent un enjeu de Santé Publique, à la fois sur le plan thérapeutique mais également en tant que réservoir de bactéries résistantes. Ainsi en 2013, parmi des souches d'*E. coli* isolées d'infections urinaires de ville en France, selon les régions, 1,8 à 5,1% étaient productrices de bêta-lactamases à spectre étendu, 9 à 15,9% étaient résistantes à la ciprofloxacine, 18,5 à 22,7% au triméthoprim, 0,9 à 3,8% à la fosfomycine, 25 à 38,2% à l'amoxicilline-acide clavulanique, 3,9 à 8,2% au cefixime et 0,8 à 1,9% aux furanes (48). Aujourd'hui, les entérobactéries porteuses de carbapénémases, *E.coli* en tête, deviennent une préoccupation majeure pour l'écologie bactérienne et l'efficacité de l'arsenal antibiotique disponible.

C'est pourquoi toute alternative préventive et/ou thérapeutique, surtout si elle est basée sur un mécanisme d'action original, sans résistance croisée, du moins initialement, présente un intérêt tout particulier.

2.2.2 Physiopathologie de l'Infection Urinaire

2.2.2.1 Infection urinaire aiguë

Pour l'heure il est toujours admis que la vessie, ou plutôt les urines, sont normalement stériles, protégées de l'invasion microbienne par des barrières physiques et chimiques.

La genèse d'une infection urinaire aiguë dépend de nombreux facteurs liés à l'hôte et des facteurs de virulence de la bactérie.

Les souches d'*E.coli* uropathogènes (UPEC) utilisent :

- les flagelles pour se mouvoir, auxquels est associée la notion d'infections urinaires ascendantes trouvant leur source dans la flore « périnéale » et de l'urètre (49),
- les adhésines pour initier la colonisation de l'arbre urinaire, par un processus d'adhésion, le cas échéant jusqu'à la formation de communautés bactériennes intra-cellulaires, les maintenant à l'abri des mécanismes de défense de l'hôte,

- d'autres facteurs de virulence, enzymatiques en particulier, contribuant par exemple à l'apoptose des cellules infectées de l'hôte.

La colonisation de la vessie se fait par voie ascendante, par auto-infection, à partir de souches rectales colonisant le périnée, le vagin et le méat péri-urétral. Les flagelles d'*E.coli* jouent un rôle important dans la mobilité et donc certainement dans la progression dans l'arbre urinaire (49-51). La transmission sexuelle est également étayée par la similitude entre les souches d'IU de l'un des partenaires et les souches rectales de l'autre (52, 53).

La prépondérance du mécanisme d'auto-infection peut cependant occulter d'authentiques épidémies clonales communautaires d'IU comme celle décrite par Olesen en 1994 (54).

Deux hypothèses, pouvant agir conjointement, ont été émises quant aux souches causales (55):

- souches les plus représentées en nombre dans la flore fécale de l'individu ou
- souches développant des aptitudes particulières de virulence

Une fois dans la vessie, les bactéries doivent surmonter les défenses de l'hôte. A chaque stade, les interactions hôte-bactéries constituent autant de goulots d'étranglement que seules surpasseront les mieux équipées en facteurs de virulence : la diversité initiale des souches s'en trouvera réduite d'autant.

Différentes stratégies sont développées par la bactérie pour échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. La capacité des UPEC d'adhérer aux cellules hôte est fondamentale pour conduire à la colonisation, résister au flot d'urine, pénétrer la membrane cellulaire par un mécanisme de transfert de type endosomal, arriver dans le cytoplasme, s'y multiplier activement et former des colonies bactériennes intracellulaires (CBI) sur un mode apparenté à un biofilm, à l'abri des mécanismes de défense de l'hôte (5, 56) ainsi que des antibiotiques (57, 58). Ce phénomène est observé tant dans les modèles murins que dans les infections humaines (9, 10, 25, 59). Les cellules urothéliales, siège d'une véritable indigestion d'UPEC, vont exfolier, mettant à nu les cellules sous-jacentes, immatures, qui vont à leur tour pouvoir être infectées. Dans ce mécanisme, le réarrangement du cytosquelette et l'emprisonnement des bactéries dans des filaments d'actine restreint leur réplication, elles sont ainsi moins accessibles aux traitements (inhibiteurs de croissance), probablement moins immunogènes et demeurent quiescentes, constituant un réservoir de germes intra-cytosoliques (9). La récurrence clinique survient lorsque la différenciation terminale de la cellule hôte et le réarrangement des fibres d'actine déclenche leur « libération », la multiplication bactérienne et la réapparition de signes cliniques.

a) Les barrières de l'hôte

L'objectif est d'empêcher l'adhésion d'*E.coli* à l'urothélium. Pour ce faire, plusieurs mécanismes ont été décrits:

- le flot d'urine et le puissant mécanisme de chasse des bactéries, à chaque miction, qui élimine les bactéries pas ou peu adhérentes ; *E.coli* s'y oppose grâce à ses mécanismes de mobilité ;
- la sécrétion de glucosamines par les cellules vésicales de transition, qui constituent le glycocalyx, véritable "tapis" extracellulaire de protéoglycanes, et qui, du fait de sa polarisation négative, limite l'accès aux récepteurs cellulaires ;
- le pH acide, la présence de sels, métabolites protéiques, acides organiques qui réduisent la survie bactérienne dans l'urine ;
- des récepteurs solubles tels que la glycoprotéine de Tamm-Horsfall, qui, grâce à la liaison avec les pili de type 1, forme un complexe éliminé dans l'urine ; ou encore la lactoferrine, la lipocaline, les IgA sécrétoires ;
- les défensines, qui peuvent limiter l'installation, voire tuer bactéries, levures et virus capsulés.

b) La réponse de l'hôte

L'urothélium vésical normal est un épithélium stratifié composé de 4 à 6 couches de cellules, dont les couches inférieures sont peu différenciées et séparées de la musculature par la membrane basale. La couche externe, en contact avec l'urine, est composée de cellules hautement différenciées. Ces cellules dites en ombrelle, sont recouvertes de plaques glycoprotéiques, les uroplakines (UPIa, UPIb, UPII et UPIII), qui rendent l'urothélium imperméable, en particulier à la réabsorption de déchets métaboliques contenus dans l'urine.

Cependant les UPEC qui expriment des pili sont capables de surmonter ces barrières physiques en adhérant aux récepteurs spécifiques présents sur les cellules uroépithéliales.

Les uroplakines portent des intégrines qui seront, une fois l'adhésion effectuée, à l'origine du déclenchement d'une **cascade de phénomènes aboutissant à l'internalisation de la bactérie** dans la cellule urothéliale (6, 7). Les UPIa seraient les plus fréquemment concernées (6, 60).

- L'**inflammation** : la reconnaissance FimH (ou autres adhésines)-récepteur cellulaire déclenche une cascade d'évènements liés à l'activation cellulaire, avec la production

de différentes interleukines (IL-6 et IL-8) et chémokines, qui ont pour effet des dommages tissulaires locaux et le recrutement initial de polynucléaires (36, 61). Ce mécanisme se traduit cliniquement par la leucocyturie.

- l'**activation de la réponse immunitaire**, après reconnaissance des facteurs de virulence bactériens par les récepteurs TLR (toll-like receptors)

- L'**élimination** des cellules infectées : l'inflammation entraîne une rupture de l'intégrité de l'urothélium avec une excrétion des cellules infectées, selon un mécanisme soit d'**exfoliation** soit de type **apoptose**, FimH dépendant, impliquant différents enzymes d'exécution (caspases, protéases...), ainsi qu'une fragmentation de l'ADN. Quant au devenir des bactéries, certaines meurent avec la cellule exfoliée, d'autres s'en échappent et vont infecter les couches cellulaires sous-jacentes, moins différenciées, ou se localiser dans des micro-invaginations tissulaires (9). L'exfoliation est donc un mécanisme à double tranchant, protection par évacuation dans l'urine des cellules bourrées de bactéries, mais aussi dissémination tissulaire des bactéries (9)

c) Les facteurs de virulence des UPEC (8, 22, 23, 39, 62)

Les isolats cliniques d'*E.coli* sont caractérisés par une taille de génome supérieure à celle d'*E.coli* K12. La comparaison des UPEC et des souches commensales et de laboratoire (MG1655=K12, en particulier, encore considéré de niveau de risque 1) montre que les UPEC présentent un nombre plus important de gènes codant pour des facteurs de virulence (antigènes capsulaires, systèmes d'acquisition du fer, adhésines et toxines). Ceci est lié à l'acquisition d'éléments génétiques transmissibles et/ou à la capacité de mutation associée à une déficience de la réparation de l'ADN. Ces gènes sont souvent regroupés dans des régions spécifiques, appelés îlots de virulence ou îlots de pathogénicité (8).

Les UPEC se comportent comme des pathogènes opportunistes intracellulaires, à la faveur du comportement de l'hôte et de ses susceptibilités, grâce à une grande diversité génétique se traduisant par de nombreux facteurs de virulence (Tableau 1). Parmi eux peuvent être distingués les facteurs de virulence associés à la surface de la bactérie et ceux qui sont sécrétés par la bactérie et sont exportés vers leur site d'action. Les facteurs de virulence se définissent par les propriétés qui permettent à la bactérie d'interagir avec l'hôte et de passer outre les barrières de défense de l'hôte.

Tableau 1. Facteurs de virulence les plus étudiés, exprimés par les souches d'*E.coli* uropathogènes

Type	Nom	Gène	Fonction	Cible
Adhésines	Fimbriae Dr	<i>Afa/draBC</i>	Adhésion, invasion de l'urothélium, associée avec cystite et PN (en particulier pendant la grossesse)	Antigène groupe sanguin Dr présent sur le facteur régulateur de la cascade d'activation du complément, le collagène type IV et une intégrine
	Fimbriae M gr sanguins	<i>bmaE</i>	Adhésion	
	Fimbriae type 1 FimH	<i>fim</i>	Adhésion mannose sensible, invasion, formation de biofilm	Glycoprotéines mannosylées (uroplakines Ia, CD48), protéine Tamm-Horsfall, collagène type I et IV, fibronectine
	Fimbriae P	<i>papAH</i>	Adhésion mannose-résistante, induction de cytokine ; associée avec PN, invasion de l'urothélium (transplanté rénal notamment)	Récepteurs gal-gal
	Fimbriae G	<i>gafD</i>	Adhésion	
	Fimbriae S	<i>sfa</i>	Adhésion associée à cystites et PN	
	FIC	<i>focG</i>	Adhésion aux cellules muqueuses et endothéliales, induction cytokines	lactosilcéramide
	Adhésine afimbriale	<i>afa</i>	Adhésion urothélium	
	Adhésine non fimbriale	<i>nfa</i>	Adhésion	Glycophorine A
	Curli Fimbriae	<i>csg</i>	Promotion de la colonisation périnéale,	Matrice et protéines plasmatiques

	aggrégatifs		formation du biofilm et adhésion	(fibronectine, plasminogène, laminine)
	Adhésine autotransporteuse UPEC	<i>upa</i>	Aggrégation cellulaire, biofilm, adhésion urothélium	Fibronectine, laminine à la surface cellulaire
Systèmes d'acquisition du fer	Recepteurs pour les sidérophores (aérobactine, entérobactine, salmocheline et yersiniabactine)	<i>Différents gènes</i>	Détournement des ions ferriques	
Protectines	Iss		Résistance au pouvoir bactéricide du sérum	
	Ag capsulaires		Protection contre la phagocytose, opsonisation et lyse	
Toxines	CNF 1 Cytotoxic necrotizing factor	<i>cnf1</i>	Phagocytose, réorganisation du cytosquelette, modulation de la signalisation, apoptose	excrétion
	CDT Cytotoxic distending toxin	<i>cdtB</i>	Anomalies fonctionnelles et morphologiques chez la cellule hôte, arrêt cycle cellulaire, lyse	excrétion
	HlyA Alpha hémolysine	<i>hlyD</i>	Lyse à forte concentration dont exfoliation cellules urothéliales, apoptose à faible concentration, modulation cascade de signalisation, dommage tissulaire,	« pore-forming toxin »
	SAT secreted autotransporter toxin	<i>sat</i>	Anomalies fonctionnelles et morphologiques de la cellule hôte, arrêt cycle cellulaire, lyse	excrétion
	VAT	<i>vat</i>	cytotoxicité	excrétion

	Vacuolating autotransporter toxin			
Mobilité	Flagelle Antigène H	<i>fliC</i>	Motilité, fitness, facilite l'ascension dans l'arbre urinaire	Surface cellulaire, TLR5
Autres	Protéine extra-membranaire	<i>ireA, iha, ompACT</i>	Récepteur et fonction transporteur, participe à l'invasion bactérienne, à la maturation des communautés bactériennes intra-cellulaires et à la persistance chronique	Surface cellulaire
Biofilm	CPA24/CP1	<i>flu</i>	Autoaggrégation, formation biofilm, autotransporteur	excrété
	Antigène 43	<i>flu (Différents allèles chez CFT073)</i>	Adhésion, autotransporteur, aggrégation, biofilm	Surface cellulaire
Réponse Inflammatoire	Capsule		Anti-phagocytose et anti-bactéricidie à médiation voie du complément Mimétisme moléculaire vis à vis des composants des tissus de l'hôte	Surface cellulaire
	Lipopolysaccharide LPS		Production de cytokines par l'hôte	TLR4 paroi cellulaire

PN : pyélonéphrite.

Adapté de Johnson (63), Ejrnaes, (22), Bien (62) Bower (64), Rafsanjani (65))

L'adhésion est considérée comme le processus initial qui permet l'interaction bactérie-hôte; la plupart des adhésines fimbriales sont constituées de plusieurs sous-unités, formant le plus souvent des hétéropolymères dont la sous-unité terminale est l'adhésine. Ces adhésines peuvent présenter différents niveaux de spécificité d'interactions, conduisant à des adhésions spécifiques d'un type de cellules ou, à l'inverse, être plus ubiquitaires. Certaines sont mannose-sensibles, d'autres mannose-résistantes.

- **Les fimbriae** sont des facteurs de virulence de surface incluant différents types d'adhésines fimbriales qui vont être à l'origine du contact bactérie-cellule hôte, et par là même :
 - déclencher la cascade de signalisation chez l'hôte
 - faciliter la délivrance de certains produits bactériens
 - promouvoir l'invasion de la cellule par *E.coli*

La contribution de chaque type de pili à la virulence des UPEC est difficile à établir. Les échanges d'information entre les différents opérons codant pour les pili, sont à l'origine d'oscillations d'un pili exprimé à un autre pili exprimé (variations de phase), accroissant la plasticité des fonctions et favorisant l'adaptation à l'environnement afin de permettre en toutes circonstances l'adhésion de la bactérie et d'invasion de la cellule hôte.

Les fimbriae appartiennent pour nombre d'entre eux à la famille des CUP-pili (Chaperone Usher Pathways), car assemblés par les machineries "chaperone-usher" correspondantes (2), codée par des opérons contenant toute l'information génétique nécessaire à l'export et l'assemblage d'un pili mature, à savoir: une protéine formant un "canal d'excrétion" dans la membrane externe, une protéine chaperone périplasmique, des sub-unités de piline et le plus souvent, une adhésine protéique terminale. En 2013, Wurpel *et al.* (66) ont identifié 458 CUP opérons et 38 types distincts de CUP pili sur la base de la phylogénie des usher. Ces pili déterminent l'adhésion aux cellules hôtes et aux surfaces, facilitent l'invasion et interviennent dans les interactions entre bactéries pour former le biofilm. Parmi les plus étudiés, nous retrouvons les pili 1 (fim), P (pap) et S (sfa), pili souvent exprimés par les UPEC, leur conférant leur capacité à provoquer des IU. Le génome des souches d'*E.coli* uropathogènes contient 5 à 10 opérons CUP complets différents. Ces opérons sont dits à « phase variable », mécanisme en rapport avec des oscillations calciques, et régulant la virulence, qui dans le cas de l'opéron *fim*, conduit à une réorientation de la région promoteur de *fimS* se traduisant par une position ON ou OFF ; les variations de phase ne reposent pas sur des modifications du

chromosome mais bien sur des mécanismes de régulation (67). Schématiquement, les pili de type 1 sont associés aux cystites et les fimbriae P aux pyélonéphrites (68).

➤ Les **pili de type 1**, possédant à leur extrémité l'adhésine FimH mannose-sensible (69).

Cette adhésine reconnaît les glycoprotéines mannosylées présentes à la surface des cellules urothéliales de la lumière des vessies humaines et murines, et permettent l'adhésion d'*E.coli* aux cellules hôte, par l'intermédiaire de récepteurs de type mannose (69).

Ils sont impliqués chez toutes les souches extra-intestinales ExPEC (UPEC, ainsi que souches responsables de méningites néo-natales NMEC) responsables d'infections (70).

Si, dans les modèles animaux, les pili de type 1 sont des facteurs de virulence majeurs (5, 62, 64, 71), leur rôle en pathologie humaine est moins clair ; ils sont exprimés à la fois par les souches pathogènes et les souches commensales et la prévalence du gène *fim* ne varie pas de façon significative selon le degré de virulence des souches d'UPEC (62).

Dans les modèles murins, les fimbriae de type 1 des UPEC s'expriment dans la vessie, permettent l'adhésion aux cellules urothéliales, stimulent la réponse inflammatoire, déclenchent l'invasion et conduisent à la formation de communautés bactériennes intracellulaires CBI (6, 39, 72-74).

Les fimbriae de type 1 sont codés par l'opéron *fimAICDFGH* (*fim*) où *fimA* code pour la sous-unité majeure et *fimH* code pour l'adhésine mannose spécifique. L'expression de l'opéron *fim* est gouvernée par *fimS*, gène promoteur à variation de phase, en position ON/OFF selon le cas.

FimH reconnaît le récepteur glycoprotéique mannose+ de la cellule vésicale bien différenciée, exprimé au niveau des uroplakines UPIa notamment (60), présent en abondance à la surface des cellules en ombrelle. FimH peut se lier à d'autres protéines des cellules de l'hôte, comme par exemple aux sous-unité bêta1-alpha3 des intégrines des cellules moins différenciées des couches sous-jacentes, reliant alors la matrice protéique extracellulaire au cytosquelette actinique, et favorisant ainsi les flux entre les compartiments extracellulaire et intracellulaire. L'interaction FimH-récepteur déclenche alors une cascade de signalisation qui active les GTPases de la famille Rho(2), déterminant des réarrangements dynamiques du cytosquelette qui permettront l'invasion. Ainsi, FimH joue un rôle important non seulement dans l'adhésion, mais aussi dans l'invasion (10, 70).

L'agrégation des UPEC en communautés bactériennes intracellulaires (CBI) nécessite la persistance de l'expression de FimH après l'invasion ; les CBI matures contiennent environ 10^4 bactéries d'aspect filamenteux, pouvant sortir de la cellule vers la lumière vésicale et

adhérer/envahir les cellules des couches sous-jacentes. Un processus d'exfoliation et apoptose caspase-dépendante est initié qui permet l'expulsion des cellules infectées, mais qui, en contrepartie met à nu les cellules des couches sous-jacentes qui vont à leur pouvoir être envahies. En l'absence d'exfoliation, l'hôte peut expulser les bactéries des cellules envahies directement par un mécanisme dans lequel interviennent les TLR4; après plusieurs cycles réplicatifs, la formation des CBI est progressivement ralentie et les CBI deviennent plus petites.

La formation des CBI est clonale ; c'est un mécanisme universel dans les infections urinaires par des bactéries à Gram négatif chez les mammifères, qui permet d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte et aux traitements antibiotiques.

Les bactéries adhérees expriment les pili de type 1, alors que ceux-ci ne sont pas exprimés par les bactéries planctoniques(2).

Schwartz *et al.* (75) ont montré que pour deux souches fréquemment étudiées, CFT073 et UTI89 :

- la séquence d'acides nucléiques déterminant FimH, selon l'allèle sélectionné, module les communautés bactériennes intra-cellulaires
- cette séquence modifie l'aptitude à persister de façon chronique
- dans les co-infections CFT073 et UTI89, UTI89 présente un avantage compétiteur, probablement grâce à l'expression d'autres facteurs que FimH
- l'affinité pour le récepteur mannose n'est pas directement liée à la pathogénicité.

FimH peut reconnaître d'autres résidus indépendants du mannose (76), avec différentes configurations pouvant lui conférer des affinités variables se traduisant par une virulence variable, plus faible lors d'infections urinaires chroniques. Ces constatations pourraient ouvrir la voie à de nouvelles approches thérapeutiques, soit en empêchant les interconversions de FimH, soit en bloquant FimH dans une configuration donnée.

Enfin, notons que l'expression constitutive ou une surexpression des pili de type 1 est associée à de moindres niveaux de mobilité et expression de la flagelline chez plusieurs souches d'UPEC, alors que la perte de l'expression des pili de type 1 n'est pas associée à une motilité accrue. De plus, une hypermotilité, une sous- ou sur-expression des gènes gouvernant la motilité n'affectent pas l'expression des pili de type 1 ; cependant, la synthèse et la présence de pili de type 1 à la surface de la bactérie n'est que partiellement responsable de la répression de la motilité (49).

Les pili de type 1 seraient essentiels dans la formation de biofilm et la colonisation de cathéters intra-vésicaux(2)

➤ Le 2^{ème} facteur de virulence reconnu correspond aux **P fimbriae**.

Responsables de l'adhésion mannose-résistante, ils jouent un rôle important dans les infections urinaires ascendantes et les pyélonéphrites humaines (62).

Ils sont codés par l'opéron *papA-K*, et composés de 6 sous-unités protéiques différentes, PapAHGEFK (Figure 1). PapG est l'adhésine protéique spécifique qu'ils portent sur leur portion distale et dont 3 types sont décrits (PapG I en position terminale, II en position interne et III). qui reconnaît les récepteurs; PapE, les sous-unités composant le fimbriae ; PapA, la tige ; Pap F et K relie l'extrémité proximale du fimbriae à la surface externe de la membrane ; PapD, une chaperone périplasmique et PapC, la protéine membranaire facilitant la croissance extérieure du fimbria (77). PapB régule l'opéron *pap* sous une forme répressive ; il agit de la même forme sur FimB et FimE (78); PapB et FocB interagissent pour intervenir dans la biogénèse fimbriale.

Ils reconnaissent les oligosaccharides P des groupes sanguins. Ils jouent un rôle important dans les pyélonéphrites chez l'homme (PapGII), et les cystites (PapGIII) (79) et contribuent à l'adhésion et à la production de cytokines. Ils reconnaissent les épitopes des glycosphingolipides portant un déterminant Gal α 1-4Gal des cellules tubulaires rénales et urétérales des mammifères, la liaison déclenche le relargage de céramide qui agit comme un agoniste des Toll-like receptors TLR4. Ils contribuent à l'adhésion et à la production de cytokines et permettent à la bactérie de résister au flot d'urine. Plus de 80% des UPEC responsables de pyélonéphrites aiguës et 60% dans les cystites aiguës portent des P fimbriae, alors que seules 20% des souches rencontrées dans les bactériuries asymptomatiques en sont pourvues (80).

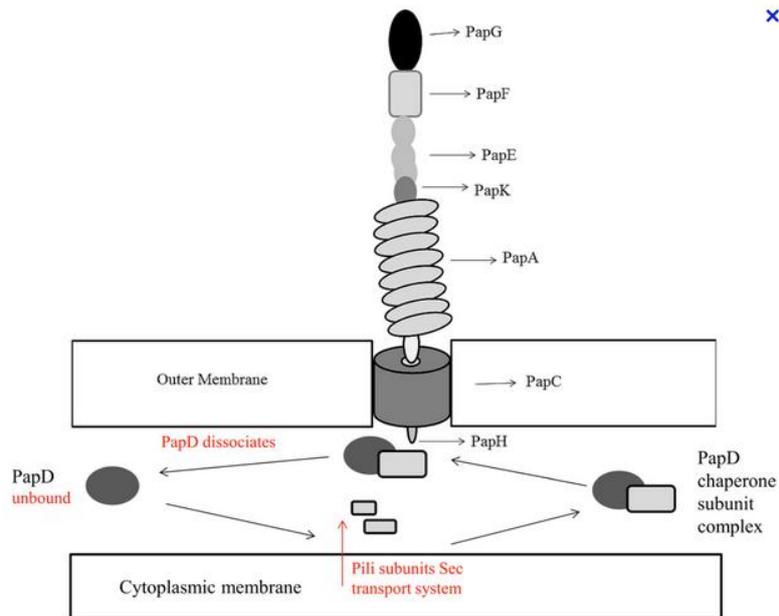


Figure 1. Organisation des fimbriae P, selon Laverty (77)

Des « synergies » existent entre ces deux types de fimbriae, facilitant la colonisation dans les conditions dynamiques *in vivo*: les P fimbriae renforcent la colonisation précoce de l'épithélium tubulaire, les fimbriae de type 1 permettent la colonisation du centre des tubules rénaux, à la fois par attachement et formation de biofilm (81).

Enfin, il existe une régulation entre deux phénomènes a priori contradictoires, l'adhésion et la motilité liée au flagelle. Lorsque *papX* est surexprimé, PapX exerce une répression transcriptionnelle sur plusieurs gènes de la motilité dont le master-régulateur *flhDC* (82).

➤ D'autres types de fimbriae existent :

- S (mannose-sensible), se lie à différentes parties des sialylgalactosides oligosaccharides, présents sur toutes les cellules de l'arbre urinaire et sur les globules rouges humains, codés par l'opéron *sfa* ; ils sont souvent associés à des formes cliniques plus sévères d'infections(2)
- F1C, qui n'a pas de propriétés hémagglutinantes, mais contribue à l'adhésion en se liant aux glycosphingolipides des cellules rénales et déclenche la production l'interleukine 8, indépendante de la voie des TLR4, inexistante dans les cellules rénales. Son expression est gouvernée par l'opéron *foc*, qui possède un degré élevé d'homologie avec l'opéron *sfa* qui gouverne les pili S ;
- Dr, qui agglutine les hématies humaines et promeut un tropisme rénal ;
- des adhésines non fimbriales Afa, mannose-résistantes, reconnaissant une glycoprotéine membranaire qui régule la cascade du complément (83); elles ont un tropisme rénal, et favorisent les infections chroniques ou récurrentes ;

- Pili Pix qui agglutine les GR humains ;
- Fimbriae Ygi, qui intervient dans l'adhésion aux cellules rénales ;
- Fimbriae Yad, qui intervient dans l'adhésion aux cellules vésicales ;
- Pili de type IV, qui par des phénomènes d'extension-rétraction, intervient dans une mobilité de surface, lente, appelée « Twitching ». Décrit surtout chez des *E.coli* entéropathogènes et d'autres bactéries à Gram négatif, il interviendrait en outre comme une structure multifonctionnelle, dans l'adhésion, la formation de microcolonies et de biofilm, l'aggrégation bactérienne, comme récepteurs pour les phages, la signalisation cellulaire(84);
- récemment, une nouvelle adhésine FdeC (factor adhérence *E.coli*) a été mise en évidence ; l'expression de cet antigène à la surface de la bactérie est déclenchée par l'interaction bactérie-cellule hôte. Ce phénotype a été observé tant dans des souches intestinales qu'extra-intestinales, uropathogènes, jouant un rôle dans la virulence, et plus spécifiquement pendant la colonisation. Cet antigène est capable d'induire une protection dans un modèle murin de sepsis et pourrait ouvrir la voie vers un vaccin couvrant un large éventail de souches grâce à une immunité croisée (85).

La variation de phase met en jeu des mécanismes de recombinaison dans le cas des pili de type 1 et des liaisons ou méthylation dans les régions promoteur pour les pili P et S (67).

Malgré leur rôle évident en tant que facteur de virulence chez *E.coli*, Miyazaki en 2002 démontre que les fimbriae de type 1, P, S ainsi que l'adhésine afimbriale ne sont pas essentiels à l'établissement de la colonisation et de l'invasion *in vitro* (86).

En outre, il existerait une hiérarchie dans l'expression des adhésines fimbriales (78), avec certaines protéines des systèmes d'exportation qui seraient interchangeables entre les types 1 et F1C. La perte d'un type de pili conduit généralement à l'expression d'un autre type (87), par exemple, la perte de pili P ou de type 1 chez CFT073 conduit à l'expression des pili F1C (88), ou chez UTI89, la perte de pili 1, conduit à exprimer des pili S.

- **Les flagelles.**

Ils permettent à la bactérie de se déplacer. Lane *et al* (49) ont démontré que l'expression du flagelle chez les UPEC était corrélée à leur capacité d'ascension de l'arbre urinaire.

Un flagelle comporte 3 structures essentielles (Figure 2):

- un moteur, la pièce basale, véritable rotor doté d'un stator, embase incrustée dans la membrane cytoplasmique, ancrant ainsi le flagelle à la cellule; une tige qui est un arbre de

transmission qui va traverser le peptidoglycane jusqu'à la membrane externe et un complexe autour de la distalité de la tige formant un pore au niveau de la membrane externe au travers duquel les sous-unités monomériques de flagelline vont pouvoir être exportées, avant d'être polymérisées. Il fonctionne comme une pompe à protons et permet des rotations de l'ordre de 1000 cycles par seconde (89).

- un propulseur, filament hélicoïdal de 10 μm de long et 20nm de diamètre, constitué d'environ 20.000 monomères de flagelline (flagelline= protéine FliC, codée par *fliC*),
- et un crochet qui connecte le rotor au propulseur suffisamment souple pour permettre des différences de rotations angulaires entre la tige et le filament (90).

Chez *E. coli*, la mobilité est assurée par environ 6 flagelles répartis de manière aléatoire à la surface de la cellule (péritriche). Regroupés à un pôle de la bactérie, les flagelles tournant dans un sens antihoraire lui permettent de se propulser, de se déplacer en ligne droite, de parcourir une distance dans une direction donnée. En tournant dans un sens horaire, cette propulsion est ralentie, annulée, permettant à la bactérie de se réorienter et de changer de direction. La fréquence à laquelle ces deux phénomènes interviennent dépend de l'environnement et des signaux transmis au rotor. Dans un environnement homogène, les 2 modalités alternent de telle façon que la bactérie se meut de façon aléatoire (89). L'énergie nécessaire aux rotations, horaires et anti-horaires, proviendrait de la phosphorylation oxydative, et non directement de l'ATP (91).

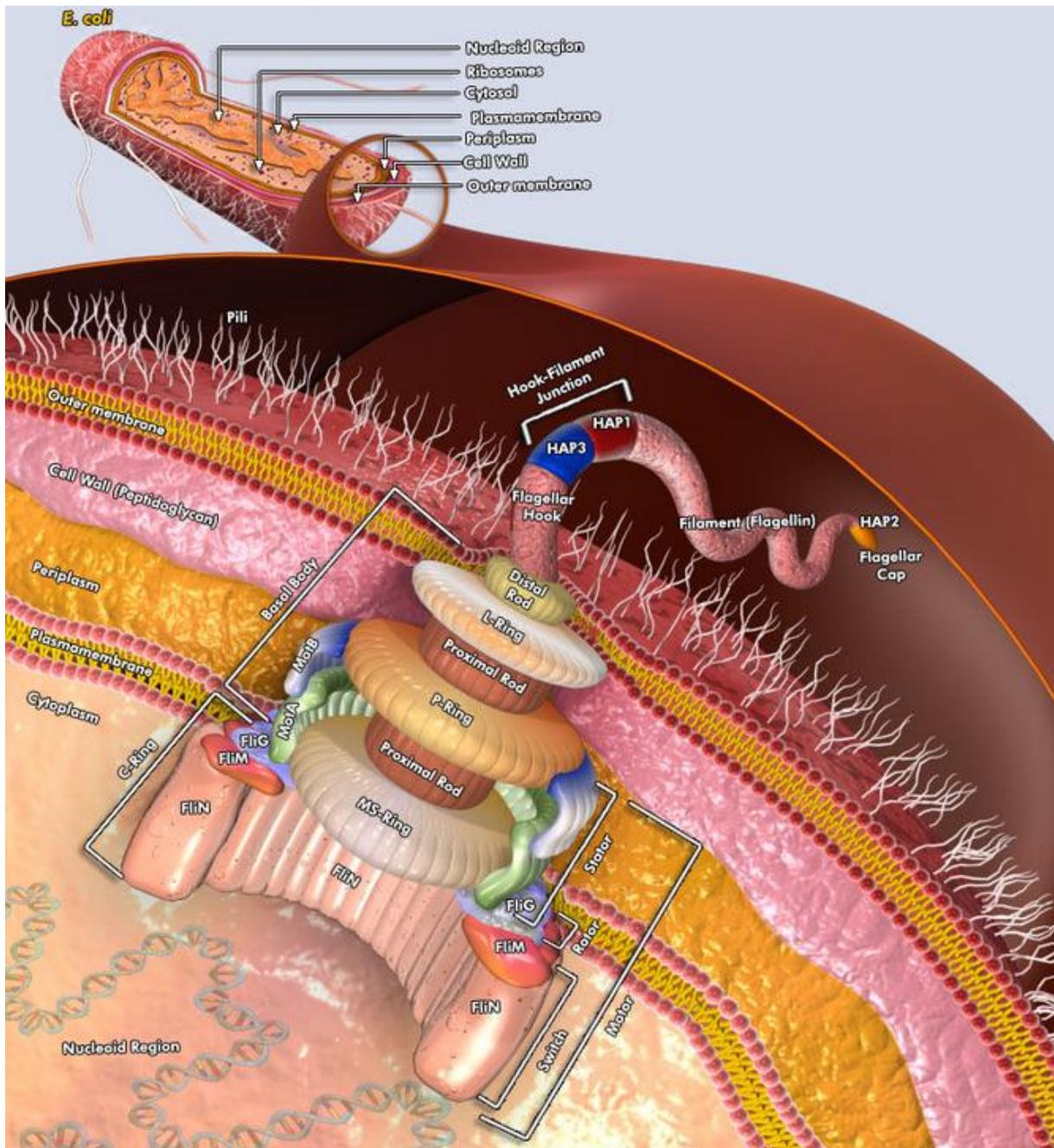


Figure 2. Organisation du flagelle (www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways)

Le chimiotactisme correspond à une mobilité dirigée. Ce mécanisme permet à la bactérie de faire des comparaisons spatiales et temporelles des concentrations, croissantes ou décroissantes, de substances attirantes ou répulsives qu'elle rencontre (91), et d'envoyer les signaux intra-cellulaires requis au rotor. Ceci met en jeu le système des protéines Che, déclenché par des chémorécepteurs membranaires, selon qu'ils vont être déméthylés ou méthylés.

Les flagelles permettent donc à la bactérie de se propulser directement, en s'éloignant d'une substance toxique ou se rapprochant de nutriments (swimming).

La nature hélicoïdale de chaque filament flagellaire est essentielle à ces mouvements, et la flagelline des bactéries dotées de flagelles est assez constante dans le monde bactérien.

Deux types de mobilité sont sous la dépendance du flagelle (92):

1. Swimming : mobilité flagellaire de bactéries planctoniques évoluant sous forme individuelle dans un milieu liquidien. Un ou quelques flagelles interviennent pour une dépense énergétique minimale.
2. Swarming : mouvement de surface (à la surface d'un support solide), très rapide, de plusieurs bactéries côte à côte (« rafts »), sous l'action de la rotation du flagelle.

Les flagelles sont disposés tout autour de la surface d'*E.coli*, ce qui permettrait à la bactérie de s'adapter pour évoluer à la surface et entre milieux visqueux.

Le passage en swarming nécessite un accroissement de la biosynthèse du flagelle, d'où la nécessité de milieux riches en composés énergétiques, et des interactions cellule à cellule.

Chez certaines espèces bactériennes, la production de surfactant facilite le swarming par diminution de la tension superficielle; *E.coli* peut se déplacer par swarming sans production de surfactant, grâce à la « mouillabilité » du lipopolysaccharide du feuillet externe de sa paroi.

Au total, le swarming pourrait permettre à nombre de bactéries de se déplacer au-dessus, d'adhérer à et de se disperser à partir des foyers infectieux, il protégerait aussi les bactéries des macrophages en renforçant la résistance à phagocytose ; enfin, il semblerait que la sécrétion de toxines puisse être co-réglée avec la mobilité par swarming (92).

S'agissant de structures externes, les protéines du flagelle sont exportées et l'expression des CUP pili et des flagelles fait intervenir des mécanismes complexes de coordination (67, 93) conduisant à la construction des parties membranaires et extra-membranaires et interférant avec l'expression des CUP pili (67), comme le montre l'effet du pilicide ec240. Ce produit diminue la piliation 1, P et S, dérégule la CUP pili et réduit la motilité. Le flagelle interviendrait également dans l'adhésion (51), et dans l'activation d'une réponse immunitaire TLR5.

Grâce à un système complexe de régulation, les bactéries alternent la production de pili pour coloniser un environnement spécifique et l'expression d'autres facteurs de virulence, telle la production de flagelles pour se déplacer vers un nouvel environnement, dès lors qu'il ne s'agit pas d'un environnement hostile dans lequel elles auraient à privilégier la survie au détriment de processus énergivores que sont la filamentation/flagellation. L'expression des flagelles peut, de façon coordonnée, empêcher l'expression des pili de type 1 (94, 95). C'est donc un processus adaptatif qui permet de coloniser de nouvelles niches et/ou de nouveaux hôtes, en fonction des récepteurs détectés à leurs surfaces.

- **La capsule** : protège la bactérie de la phagocytose et de l'effet bactéricide de la voie du complément, ou encore pour certaines elle empêche une réponse immunitaire humorale adaptée.
- **Le lipopolysaccharide** (endotoxine) de la paroi des bactéries à Gram négatif, qui active la réponse inflammatoire de l'hôte, via les TLR4.
- **Les facteurs sécrétés de virulence** : ils sont nombreux; différentes **toxines** sont sécrétées par les UPEC.

La plus importante est l'**alpha hémolysine** (HlyA), qui, à forte concentration, est capable de lyser les globules rouges et de tuer des cellules eucaryotes. A faible concentration, elle induit une apoptose des cellules cibles dont les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes T, les cellules rénales et participe de l'exfoliation des cellules vésicales, ainsi qu'à différents signaux dont des oscillations calciques. Elle est sécrétée par 50% des UPEC, et son expression est associée à une sévérité accrue des IU cliniques. Les souches CFT073 et UTI 89 contiennent une copie de l'opéron codant pour cette toxine ;

*Le **CNF1** (cytotoxic necrotising factor) dont le rôle serait de faciliter la pénétration des bactéries dans les cellules, d'interférer avec la phagocytose par les polynucléaires et de contribuer à l'apoptose.

Dans une revue de la littérature de 2015, Flores-Mireles *et al.* (93) proposent une analyse de la séquence chronologique d'intervention des différents facteurs de virulence:

- après l'adhésion, l'invasion : l'adhésine FimH des pili de type 1 se lie aux récepteurs mannosylés des uroplakines et des intégrines qui tapissent la surface des cellules urothéliales en ombrelle. Le complexe Fim H- α 3- β 1 intégrine des uroplakines, par le biais d'une activation des ATPases, va déclencher des réarrangements de l'actine du cytosquelette et favoriser l'internalisation des bactéries.

- après l'invasion, les mécanismes d'échappement aux défenses de l'hôte : la cellule via le lipopolysaccharide bactérien reconnu par les TLR4 induit l'expulsion des *E.coli* sous forme de vésicules. *E.coli* contre ce mécanisme en s'échappant dans le cytoplasme cellulaire où la bactérie va se multiplier et former des communautés bactériennes intra-cellulaires. Selon Justice *et al.* (96), 4 phases se déroulent 1) les bactéries sont non motiles et se divisent rapidement, les CIB sont de véritables usines à bactéries dispersées dans le cytoplasme 2) la croissance des CBI est ralentie, elles sont matures, sous forme coccoïde et organisées dans un

biofilm intra-cellulaire qui remplit tout le cytoplasme 3) les bactéries redeviennent mobiles, elles peuvent se détacher des CBI et sortir de la cellule hôte. 4) les bactéries vont filamento, afin d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte dont ceux médiés par les TLR4 ; la dispersion des bactéries est alors possible, elles vont pouvoir amorcer un nouveau cycle de formation de CBI, plus lentement, en envahissant d'autres cellules; lorsqu'il s'agit de cellules transitionnelles sous-jacentes, cela conduit à l'établissement de réservoirs intra-cellulaires quiescents (RIQ) de 4 à 10 bactéries non répliquatives, mais viables pendant des mois.

- après l'installation, la survie en milieu hostile, avec la sécrétion de certains facteurs de virulence importants pour l'acquisition de nutriments par la bactérie: la toxine HlyA qui promeut la lyse de la cellule hôte et la libération de fer et nutriments ; les sidérophores, qui permettent l'acquisition de fer et la survie dans le tractus urinaire pauvre en fer. HlyA déclenche également l'exfoliation des cellules urothéliales et favorise la dissémination des bactéries à d'autres cellules hôtes ou aux cellules des couches sous-jacentes moins matures, dépourvues d'uoplakines et donc plus susceptibles. La toxine CNF1 par un mécanisme complexe conduit à des réarrangements du cytosquelette, induit des mécanismes de survie et de défense contre l'apoptose de la part des cellules infectées ce qui en définitive va permettre à la bactérie d'étendre son emprise. Quant à la survie des bactéries à l'extérieur des cellules, elle s'appuie sur la filamentation ce qui rend leur opsonisation et leur phagocytose par les polynucléaires plus difficile.

2.2.2.2 Les infections urinaires chroniques et récurrentes

Elles soulèvent une interrogation supplémentaire : s'agit-il d'une récurrence, la souche responsable étant la même que celle ayant provoqué l'IU inaugurale ou s'agit-il de réinfections avec une nouvelle souche, différente de la première ?

a) IU récurrentes

Les études basées sur des comparaisons phénotypiques (sérotypes et biotypes) des souches isolées concluaient plutôt à une réinfection. Le développement des techniques de typage par biologie moléculaire a changé cette perception. Dans le cadre de l'étude d'une cohorte de femmes ayant fait une IU, traitées et non traitées, suivies avec un point à 8-10 jours et 35-49 jours, Ejrnaes (24) a utilisé l'électrophorèse en champ pulsé pour mettre en évidence:

- chez les femmes traitées et ayant eu l'une ou l'autre des visites (+) : 32/98 persistances, 32%

- chez les femmes traitées et ayant eu l'une ou l'autre des visites (+) : 46/98 récurrences, 47%
 - chez les femmes traitées et ayant eu l'une ou l'autre des visites (+) : 13/98 réinfections, 13% (nouvelles infections avec une souche différente),
 - chez les femmes contrôle et ayant eu l'une ou l'autre des visites (+) : 1/52 récurrences, 2%
 - chez les femmes contrôle et ayant eu l'une ou l'autre des visites (+) : 50/52 persistances, 96%
 - chez les femmes contrôle et ayant eu l'une ou l'autre des visites (+) : 1/52 réinfections, 2%
- Sur les 150 femmes ayant eu l'une ou l'autre ou les deux visites (+), il y a au final 9% de réinfections, 55% de persistances et 31% de récurrences.

Ce même travail montrait que les UPEC retrouvées dans les persistances et les récurrences appartenaient plutôt au groupe phylogénique B2, celles rencontrées dans les IU suivies de guérison ou de réinfection plutôt au groupe D.

D'autres études vont dans le même sens, quoiqu'avec des techniques et des durées de suivi différentes (97-99).

Enfin, parmi les facteurs de risque de récurrence d'IU chez la femme, ont été identifiés : une augmentation importante de la prévalence du portage péri-urétral de la souche responsable dans les 14 jours précédents (comparées par électrophorèse en champ pulsé), la présence d'une bactériurie et d'une pyurie, dans les quelques jours précédant les signes cliniques, ou un déclenchement par l'activité sexuelle (100).

La persistance de quelques bactéries latentes sous forme de réservoirs intracellulaires quiescents (RIQ), avec des rosettes de 4 à 10 bactéries non répliquatives, mais néanmoins viables sur de longues périodes, ne suscitent pas de réponse inflammatoire détectable chez l'hôte. A la faveur du renouvellement de l'urothélium, ces bactéries peuvent être libérées et redémarrer un nouveau cycle d'infection se traduisant par un nouvel épisode aigu d'IU.

Lors d'essais in vivo chez la souris, et selon la lignée étudiée, des titres persistants variant de 1 (C57BL/6) à 10 (BALB/c) ont été observés alors que les urines sont définies comme étant stériles. Les souris BALBc ont plus de RIQ, associés à de petits granulomes inflammatoires autour de bactéries extracellulaires au sein du tissu urothélial, évoquant des micro-abcès de la muqueuse. La traduction pathologique de ces RIQ des couches basales de l'urothélium reste à élucider: cystites chroniques, cystites interstitielles, hyperactivité vésicale sont autant de pathologies dont le mécanisme pour l'heure non connu pourrait ainsi trouver une explication (101, 102).

La survie des UPEC à l'intérieur des cellules macrophagiques a été observée, elle pourrait contribuer à une évolution sub-aiguë de l'infection à l'image des souches AIEC dans la maladie de Crohn de l'intestin.

Dans les communautés intra-cellulaires de bactéries, celles-ci sont à l'abri des défenses de l'hôte et des antibiotiques (9, 59, 103-105), ce qui explique qu'environ la moitié des 2èmes IU sont provoquées par la même souche que celle de l'IU inaugurale (41, 42).

b) Cystites chroniques (39)

Certains modèles murins développent des IU à UTI89 sur un mode de cystite chronique, à savoir bactériurie $>10^4$ ufc/ml d'urine associée à $>10^4$ ufc/vessie pendant plus de 4 semaines après l'inoculation.

La cystite chronique s'accompagne d'une hyperplasie de l'urothélium avec une perte de la différenciation terminale et l'absence d'uroplakines de surface ; une inflammation chronique avec des infiltrats de lymphocytes et des follicules lymphocytaires isolés, comparables à ce qui est observé en pathologie humaine.

Des marqueurs de cystite chronique ont été identifiés 24h après l'IU inaugurale. Différentes interleukines, sériques et urinaires, la perte de poids et une pyurie massive, en rapport avec une réponse inflammatoire très intense, une nécrose de l'urothélium, sont prédictives d'une évolution sur un mode chronique. Les souris déficientes en TLR4 ou en lymphocytes ne développent pas ou peu de cystites chroniques démontrant bien l'importance du processus inflammatoire dans ce type d'infections. De même, une dose unique de dexaméthasone 2 heures avant l'infection rend les souris significativement plus résistantes à une évolution sur un mode chronique, alors que tous les signes inflammatoires à la 24^{ème} heure sont réduits de façon significative.

Par ailleurs, une durée d'évolution de 2 à 4 semaines en l'absence de traitement prédispose à l'infection chronique, par opposition à un traitement antibiotique instauré précocément ; il n'y a donc pas d'immunité protectrice mise en oeuvre.

c) Bactériurie asymptomatique

Multifactorielle, elle s'apparente à un commensalisme et protégerait les patients de super-infections :

- côté bactérie, les souches isolées dans les bactériuries asymptomatiques seraient fonctionnellement différentes de celles isolées dans les infections. Une perte de l'expression

de facteurs de virulence, en particulier les adhésines (pili) et flagelles, associée à une capacité accrue à former des biofilms à la surface de la vessie, et à acquérir du fer via une synthèse accrue de sidérophores, ont été décrites (106, 107). Cependant, la souche ABU83972 d'*E.coli*, supposée protectrice chez des patients présentant des IU récurrentes chez qui elle demeure présente sous forme de portage chronique après inoculation, ne présente pas d'altérations du répertoire des facteurs de virulence et peut induire la réapparition sporadique de symptômes (108), sans que l'on sache pourquoi.

- côté hôte, une diminution de l'expression du TLR4, un moindre recrutement des polynucléaires neutrophiles et une réponse moindre au LPS bactérien sont mis en avant.

2.2.2.3 Pathologies urinaires non infectieuses et persistance des bactéries

a) Hyperactivité vésicale

Elle concerne 17% des plus de 40 ans et est attribuée à une augmentation de la contractilité du detrusor sans que l'on sache pourquoi ; le traitement en est symptomatique, par anticholinergiques, peu efficace sur le long terme. Récemment, Gill a montré qu'en associant anticholinergiques et antibiotiques ces patients pouvaient être améliorés (109), alors que des biopsies vésicales révèlent des lésions de cystite chronique (110); une proportion significative de ces patients présente des bactériuries.

b) Cystite interstitielle

Elle affecte 20% des femmes et 5% des hommes et se traduit par une douleur suspubienne persistante avec dysurie mais sans mictions impérieuses. Dans les formes sévères, des ulcérations vésicales et des zones hémorragiques sont visibles en cystoscopie, et les urines sont stériles ; à l'inverse des vessies de petite capacité sont également retrouvées, dites hypersensibles, dans lesquelles une bactériurie est retrouvée dans un tiers des cas.

Les points-clé de la physiopathologie et de l'épidémiologie

- ***E.coli représente 1% de la flore colique, et est la bactérie la plus fréquemment isolée des infections urinaires, communautaires et associées aux soins (UPEC)***
- ***Les souches d'UPEC présentent de nombreux facteurs de virulence (adhésines, flagelles, toxines, enzymes), associés à une grande plasticité génomique (nombreuses séquences d'insertion, pouvant impliquer des bactériophages ; capacité de muter...)***
- ***L'IU est un processus complexe, reposant sur :***

-les flagelles, support de la mobilité, en particulier dans les IU ascendantes. Pour des raisons anatomiques, les femmes ont 50 fois plus de « chances » de faire une IU que les hommes ; une femme a 60% de chances de faire une IU au cours de sa vie.

-les adhésines, support de l'adhésion aux récepteurs cellulaires des uroplakines des cellules urothéliales ; elles permettent ainsi la colonisation de l'appareil urinaire, suivie de l'internalisation des bactéries, de leur multiplication intra-cellulaire, du déclenchement de la réponse inflammatoire, de l'apoptose des cellules urothéliales, conduisant à l'infection aiguë.

-la persistance de colonies bactériennes intracellulaires. Ce réservoir quiescent détermine la possibilité de réurrences d'IU : une femme sur 2 récidivera dans l'année, malgré un traitement antibiotique adapté, et une sur 3 récidivera au-delà.

- l'IU coûterait 5 milliards de dollars chaque année aux USA*
- l'IU est un véritable enjeu dans la progression des résistances aux antibiotiques : en infection urinaire « de ville », 2 à 5% des E.coli sont sécrétors de Béta-lactamases à spectre étendu et 9 à 16% sont résistantes aux fluoro-quinolones.*

2.2.3 Traitements antibiotiques des infections urinaires basses

Les traitements antibiotiques des IU, dont les indications et la mise en oeuvre dans une stratégie d'épargne et de moindre impact sur le microbiote digestif, font l'objet de recommandations nationales régulièrement mises à jour (35).

2.2.3.1 Traitement antibiotique probabiliste des cystites aiguës simples

Trois niveaux de traitement sont codifiés:

- en première intention: prise unique de fosfomycine-trométamol
- en deuxième intention: 5 jours de pivmécillinam
- en troisième intention: fluoroquinolones en prise unique ou 5 jours de nitrofurantoïne.

En tenant compte du taux de résistance, élevé, et/ou d'un impact sur le microbiote, ne doivent pas être utilisés: l'amoxicilline, seule ou associée à l'acide clavulanique, le triméthoprime seul ou associé au sulfaméthoxazole (TMP-SMX), les céphalosporines de 3ème génération. La nitrofurantoïne est placée en 3ème intention pour des raisons de rare toxicité.

Dans les cystites aiguës à risque de complication, le traitement devra chaque fois que possible être adapté à l'antibiogramme; dans les rares cas où un traitement différé n'est pas possible, le choix se portera sur la nitrofurantoïne de préférence, puis sur le céfixime ou une fluoroquinolone.

2.2.3.2 Traitement antibiotique des cystites récidivantes

Le traitement curatif d'un épisode de cystite récidivante rejoint celui de la cystite simple. L'antibioprophylaxie, quant à elle, ne sera proposée qu'aux patientes présentant au moins une cystite par mois, après échec des mesures simples d'hygiène de vie et de prophylaxie non antibiotique.

Elle sera débutée après l'obtention d'un ECBU négatif, et fera appel 1) au TMP ou TMP-SMX 2) à la fosfomycine-trométamol.

Dans ce cadre, la nitrofurantoïne est contre-indiquée; les bêta-lactamines et les fluor-quinolones doivent être évitées, pour des raisons écologiques.

2.3 Les traitements actuels non antibiotiques, préventifs et curatifs, de l'IU

Les IU conduisent à des traitements antibiotiques fréquents, voire prolongés. Non dénués d'effets secondaires, ils participent de la pression de sélection avec le développement inéluctable de résistances. Ces résistances, particulièrement fréquentes chez *E.coli*, concernent des antibiotiques de première ligne, puis de 2^{ème} ligne (quinolones en particulier) et actuellement de 3^{ème} ligne, avec la progression constante des bêtalactamases et l'émergence de nouveaux mécanismes tels que différentes carbapénémases. Le poids des IU dans les problèmes de santé et les inquiétudes concernant l'efficacité des antibiotiques font de la recherche sur des traitements, préventifs et curatifs non antibiotiques, un enjeu majeur.

Les modèles murins ont démontré d'une part, et les études chez l'homme suggèrent d'autre part, des différences dans la nature des phases précoces de la réponse de l'hôte à l'IU entre individus dont le rôle est déterminant sur l'évolution de la maladie et le risque de récurrence.

L'analyse des mécanismes de l'IU aiguë et de la progression vers la récurrence ou la chronicité est incontournable pour développer de nouvelles approches thérapeutiques et prophylactiques.

Une fois dans le cytoplasme des cellules hôte, les UPEC se multiplient (temps de doublement 30 mn environ) à l'abri des mécanismes de défense de l'urine, mais aussi des antibiotiques tels que le triméthoprime-sulfaméthoxazole (TMP-STX). Cet antibiotique, largement utilisé et efficace dans les IU du fait de son excrétion urinaire, a une pénétration dans les cellules faible ou nulle (58), et de ce fait n'est plus efficace dès lors que l'UPEC est sous forme intracellulaire. De la même façon, un nombre important de molécules, bactéricides *in vitro* sur des cultures de cellules vésicales infectées par UTI89, ne sont pas efficaces *in vivo*, rendant compte des échecs thérapeutiques, récurrences sous traitement ou récurrences post-traitement.

Différentes approches thérapeutiques ont pu être envisagées, voir développées : compétition, inhibition de l'adhésion, modification de la réponse immune

2.3.1 Approche compétitive

Le traitement de patients présentant des cystites chroniques récidivantes repose sur l'inoculation de la souche non adhérente ABU 83972 (111, 112), cependant cette approche ne connaît pas pour l'heure de grands développements.

2.3.2 Approche inhibition de l'adhésion

2.3.2.1 Vaccins

Ils ont plusieurs cibles possibles:

a) **l'adhésion bactérienne**: Cette approche implique les pili, reposant sur le fait que les UPEC responsables de cystites aiguës expriment des fimbriae de type 1, que ceux-ci déclenchent une réponse convergente de l'hôte, et conduisent les UPEC à passer de leur forme planctonique urinaire vers des CBI. Ces éléments font des pili de type 1 une cible préférentielle pour développer des stratégies thérapeutiques, vaccins ou composés à activité anti-infectieuse. L'approche vaccinale dirigée contre les pili de type 1 et leur adhésine FimH conduit à une protection vis à vis de la cystite aiguë, tant chez la souris que chez les primates, et ce par voie locale ou systémique (113-116). De nombreux vaccins ont été testés chez l'homme, deux se sont révélés efficaces, l'un utilisant 10 souches d'UPEC tuées par la chaleur, l'autre utilisant un recombinant FimH. Le vaccin tué chauffé semble prometteur lorsqu'administré sous forme intra-vaginale chez des femmes sexuellement actives. Le vaccin recombinant FimH s'est avéré avoir une efficacité comparable, qu'il soit administré par voie systémique ou par voie intra-nasale. Cependant, le blocage de FimH en une configuration à haute affinité pour le mannose pourrait remettre en question l'intérêt de ce vaccin *in vitro* ; les essais *in vivo* confirment néanmoins une protection vis à vis de la cystite à UPEC. b) les **toxines et les protéases** c) les **sidérophores** (93)

2.3.2.2 Immunothérapie active

Le principe est l'administration par voie orale d'un produit composé d'extraits bactériens provenant de 18 souches d'UPEC ; ceci s'est avéré efficace dans la prévention d'IU récurrentes chez des patients ayant des antécédents d'IU chroniques et récidivantes. Chez la souris, le mécanisme passe par une élévation d'interleukine 6 et d'interféron dans la vessie et

une réponse inflammatoire au LPS moindre. Le mécanisme est donc anti-inflammatoire et non immunitaire.

2.3.2.3 Antagonistes FimH dérivés du biarylmannose

Le mécanisme d'action repose sur la modification au niveau des résidus d'acides aminés invariables du site mannose de FimH ; la liaison mannose ne peut plus se faire et la virulence des UPEC est atténuée (117).

2.3.2.4 Autres molécules ciblant l'adhésion bactérienne

a) les **pilicides** : le pilicide ec240 (67), dont les transcriptomes et protéomes d'*E.coli* UTI89 révèlent qu'il agit essentiellement sur les pili de type 1, en agissant sur le gène promoteur *fim* S, en le maintenant dans une orientation de type OFF. D'autres pilicides existent, actifs sur les pili Dr par exemple.

b) les **mannosides compétiteurs du mannose** (39, 118): plusieurs composés comportant de petites molécules mannosidiques, agissant comme des analogues des récepteurs de FimH, disponibles par voie orale, d'action puissante et rapide, seraient efficaces sur des souches d'UPEC y compris multi-résistantes aux antibiotiques : en les maintenant sous la forme planctonique, en les empêchant d'adhérer à l'urothélium, ils empêchent la colonisation et l'invasion, et rendraient les souches d'*E.coli* plus accessibles aux traitements antibiotiques. D'autre part, en agissant sans avoir à pénétrer la paroi de la bactérie, ces mannosides seraient totalement exempts d'apparition de mécanismes de résistance et dans tous les cas, échappent aux mécanismes de type modifications de porines ou efflux. Leur utilité pour prévenir l'IU sur sonde vésicale a également été rapportée sur modèle murin C57BL/6 - UPEC UTI89 (119), dans lequel la prise orale de mannosides réduit l'adhésion, l'invasion, le biofilm intracellulaire et la formation de colonies bactériennes intra-cellulaires; l'action sur le biofilm se formant sur le matériau de la sonde n'est pas démontrée sur ce modèle mais les auteurs suggèrent cette possibilité *in vivo*. La recherche se poursuit sur l'amélioration des propriétés pharmacocinétiques, la sélection d'autres composés mannosidiques et les associations avec d'autres classes d'inhibiteurs de biofilms.

Ces composés sont potentiellement intéressants dans :

- la prévention des IU chez les populations à risque (femmes sexuellement actives sujettes aux IU, personnes âgées, patients sondés);
- le traitement des cystites aiguës 1) en améliorant la sensibilité aux antibiotiques et réduisant les durées de traitement 2) en prévenant leur évolution chronique en empêchant la formation de CBI;

- le traitement des cystites récidivantes, en améliorant l'action des antibiotiques proposés, en particulier le triméthoprime, largement utilisé.

2.3.2.5 Des probiotiques galactooligosaccharides

Bien qu'appliqués à des souches intestinales d'EPEC, sur des cellules Hep-2, ces composés confirment un mécanisme d'action impliquant l'inhibition de l'adhésion (compétition ?) (120).

2.3.2.6 Les dérivés de la canneberge.

Les Amérindiens utilisaient la canneberge (*Vaccinium macrocarpon*, famille des *Ericaceae*) à différentes fins, en particulier pour prévenir et traiter les infections des voies urinaires. Sa forte teneur en Vitamine C la rendait également efficace dans la prévention du scorbut chez les marins de la Nouvelle Angleterre durant leurs campagnes en mer. La culture du « cranberry » commença en 1815, dans l'état du Massachussets et dès le milieu du XIX^{ème} siècle, les médecins allemands la prescrivait pour prévenir et traiter la cystite (121). L'équivalent européen est le « lingonberry » ou airelle (*V. vitisidaea*). Il a été étudié en association avec de la canneberge (122). Une multitude de produits sont désormais proposés sous des formes très diverses, jus, sirops, concentrés, fruits déshydratés. En médecine, de nombreuses spécialités existent, généralement proposées sous forme de gélules ou de capsules de jus déshydraté. Les essais cliniques ont surtout fait appel à ces présentations ainsi qu'aux cocktails, composés d'environ un tiers de jus de canneberge.

Les baies de canneberge sont composées d'eau (88%) et d'hydrates de carbone, acides organiques (salicylique, citrique, malique), fructose, vitamine C en quantité importante, flavonoïdes, catéchines, triterpinoïdes et anthocyanidines (123). Les anthocyanidines et proanthocyanidines sont des tannins, (polyphénols stables) retrouvés uniquement dans les baies du genre *Vaccinium*, qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne et l'adhésion à des surfaces cellulaires (122); les profils des tannins varient selon les baies. Les proanthocyanidines, ou tanins condensés, sont des oligomères ou des polymères de flavanols, particulièrement présentes dans certains fruits (pomme, myrtille, canneberge, cassis, raisin...) et ou graines (fève de cacao) mais aussi dans les feuilles de thé, les écorces de pin..., leur conférant astringence et couleur. La diversité des proanthocyanidines résulte de la nature et du nombre d'unités de flavanols associées ainsi que des liaisons inter-flavoniques. La canneberge (*Vaccinium macrocarpon* ou canneberge américaine) est particulièrement riche en dimères et trimères de type A (deux liaisons interflavoniques), alors que le jus de raisin est riche en dimères de type B (une seule liaison inter-flavonique). Les études portant sur la bioactivité des

autres genres de *Vaccinium* (canneberge européenne : *V. oxycoccus*, airelle : *V. vitis-idaea*, et myrtille : *V. myrtillus*) sont rares et plutôt décevantes (122, 124, 125).

Le(s) mécanisme(s) d'action de la canneberge ne sont pas complètement elucidés.

Différentes hypothèses « historiques » ont été avancées pour expliquer l'action de la canneberge: action antiseptique de l'acide hypurique, acidification urinaire, bien que l'on sache aujourd'hui que la réduction du pH est faible et transitoire (11).

L'action anti-adhérence de la canneberge a été montrée pour la première fois en 1984 par Sobota (11). L'un des composés de la canneberge inhiberait les pili de type P, mannose-résistants (effet bactérioflush), impliqués dans les pyélonéphrites (12), alors que le fructose de nombreux fruits inhibe les pili de type 1 (mannose-sensibles) (13).

En 1994, une étude clinique (126) conclut en faveur de l'efficacité sur la prévention des IU. L'hypothèse habituelle est celle d'un **effet lié à une inhibition de l'adhésion via les fimbriae de type 1 et les P fimbriae.**

Deux mécanismes sont avancés :

- celui d'un analogue des récepteurs cellulaire aux fimbriae, avec un effet dose-dépendant *in vitro* (15-17)

- celui d'une contre-régulation génétique sur la synthèse des sous-unités des pili (127), avec une réduction de l'expression des fimbriae P *in vitro* associée à un changement de leur configuration (taille et densité) (128). Stapleton met en évidence une réduction du nombre d'*E.coli* porteurs de P fimbriae dans les urines de femme du bras « jus de canneberge » d'un essai thérapeutique jus de canneberge vs placebo (129). La canneberge diminue ainsi la virulence des souches d'UPEC (16).

Cependant, la canneberge exerce un effet anti-adhésion chez des souches n'exprimant ni pili de type 1 ni fimbriae P (16), suggérant que d'autres adhésines ou mécanismes sont concernées.

La canneberge contient deux fractions inhibitrices différentes identifiées, dont l'une est dialysable. La fraction dialysable correspond à des composés de faible poids moléculaire (fructose, acides citrique, malique, quinique, vitamine C) et inhibe les pili de type 1 mannose-sensibles. La non dialysable, de haut poids moléculaire, correspond aux proanthocyanidines, qui inhibent les pili P, mannose résistants, en particulier les PAC de type A.

L'inhibition de l'adhésion d'*E.coli* par les PAC a été montrée sur des souches exprimant les pili P et les pili de type 1 (12). L'analyse de la littérature est depuis en faveur d'un effet de la

canneberge sur les pili non sensibles au D-mannose et notamment les fimbriae P (13, 65, 130-132), avec une disparition complète de ces pili en cas d'exposition prolongée (83).

Howell démontre un effet anti-adhésion d'*E.coli* aux cellules urothéliales de proanthocyanidines purifiées de type A (PAC). L'effet anti-adhésion est détectable à des concentrations comprises entre 10 et 50 microgrammes par ml.

Cet effet est observé sur les urines après consommation (*ex vivo*) et lors d'essais *in vitro* avec des PAC extraites de jus de canneberge.

Les modifications induites par la canneberge pourraient intervenir dans l'arbre urinaire, mais aussi sur les UPEC présents dans le microbiote intestinal, les rendant moins ou pas adhérents avant leur introduction dans l'arbre urinaire (133).

Plus récemment, un effet plus large au niveau des microbiotes digestifs (intestinal surtout mais aussi buccal) a été avancé, sur d'autres micro-organismes (par exemple *Streptococcus mutans*, bactérie cariogène (134), dont elle inhiberait l'adhésion *in vitro* à l'hydroxyapatite), y compris des levures (*Candida*) avec toujours une inhibition de l'adhésion et de la co-aggrégation, une formation moindre du biofilm et une réduction de l'inflammation, attribuée à une inhibition de la réponse induite par le LPS (135). Ainsi, au-delà de la pathogénèse des infections urinaires, des applications envisageables dans des domaines aussi variés que le maintien de la « santé cardio-métabolique » ou les pathologies inflammatoires intestinales, voire systémiques (136). Le devenir des PAC une fois la canneberge consommée est débattu : molécules trop grosses pour être absorbées et excrétées telles quelles dans l'urine (133, 137), absorption intestinale sous forme de dimères ou trimères, les cellules intestinales humaines Caco-2 leur étant perméables (138).

Peu d'études se sont consacrées à la pharmacocinétique de la canneberge chez l'homme (139). L'ingestion de PAC chez le rat se traduit par un pic d'absorption à 45 minutes, et une excrétion dans les urines (19%), les selles (45%) et par exhalaison (6%). Chez la femme, Valentova (140) a montré qu'une consommation de 1200 mg de jus de canneberge pendant 8 semaines se traduisait d'une part, par un effet inhibiteur de l'adhésion des UPEC, en l'absence de modification du pH urinaire, d'autre part par une réduction du stress oxydatif, les métabolites retrouvés dans l'urine étant l'acide hippurique, des isomères d'acides salicylurique et dihydroxybenzoïque, de la quercetine glucuronide.

Parallèlement, l'effet inhibiteur est retrouvé également sur des urines ne présentant pas de PAC chez de personnes ayant consommé de l'airelle, suggérant l'existence d'autres composés possiblement actifs dans la canneberge ou d'autres mécanismes.

Plus récemment, Wang (141) a étudié l'élimination urinaire chez des femmes volontaires saines de flavonol glycosides et leurs métabolites, en en identifiant cinq : le plus abondant, la quercétine-3-galactoside, puis les quercétines 3-rhamnoside et arabinoside, puis les myricétines 3-arabinoside et galactoside, avec une élimination très retardée pour la quercétine 3-arabinoside (4 heures vs 1.5-2.5 heures pour les autres composants). Tant élimination que biodisponibilité présentaient des variations entre individus. D'autres études expérimentales indiquent qu'après ingestion de PAC, l'excrétion urinaire serait au mieux de 5%, débiterait 2 heures après l'ingestion, avec un pic d'activité 4 à 6 heures après l'ingestion, et une disparition quasi complète dans les 12 heures (142, 143). L'effet anti-adhésion persiste jusqu'à 8h après l'ingestion (144).

2.4 Modèles d'étude de l'activité de la canneberge

L'effet de la canneberge a fait l'objet de nombreuses études et différents modèles d'étude ont été décrits.

2.4.1 Modèles *in vitro*

Deux grands types de design d'études existent, conduisant à tester :

- *ex vivo*, l'effet *in vitro* d'urines provenant d'individus ayant consommé de la canneberge sous diverses formes
- l'effet *in vitro* sur des souches d'*E.coli* directement incubées en présence de canneberge sous différentes formes, notamment en termes de capacité d'adhésion aux cellules eucaryotes.

Le tableau 2 résume les principales caractéristiques de certaines de ces études.

Tableau 2. Etudes *in vitro* confirmant l'effet anti-adhésion des « canneberges »,

	Protocole	Produit	Germes	Résultats
Chen 2013 (145)	<i>Ex vivo</i> activité urine après consommation de canneberge	jus	<i>E.coli</i>	Anti-adhésion Inhibition de l'hémagglutination Réduction formation biofilm
Wojnicz, 2012 (146)	<i>In vitro</i> culture d' <i>E.coli</i> et cellules urothéliales	Extrait commercial	2 souches <i>E.coli</i>	Anti-adhésion Réduction mobilité (swimming) Réduction formation biofilm Filamentation Propriétés anti-oxydantes

				Réduction de l'hydrophobicité de l'une des souches Pas d'effet sur l'expression des curli
Ermel, 2012 (83)	<i>In vitro</i> culture d' <i>E.coli</i> et cellules urothéliales	Différents extraits contenant 50 µg/ml PAC	<i>E.coli</i>	Anti-adhésion Effet variable selon extrait
Gupta, 2012 (19)	<i>In vitro</i> activité anti-adhésion sur cellules vésicales et vaginales	Différents extraits contenant 10 à 50 µg/ml PAC	<i>E.coli</i> MR aux antibiotiques	Anti-adhésion
Risco, 2010 (18)	Activité <i>ex vivo</i> d'urines de rates après consommation de canneberge. <i>In vitro</i>	PAC 118 mg/dose différentes concentrations	<i>E.coli</i>	Anti-adhésion <i>in vitro</i> Effet dose
Lee, 2010 (147)	Activité <i>ex vivo</i> d'urines humaines après consommation de canneberge.	275 mg de canneberges séchées et 25 mg de canneberge concentrée	<i>E.coli</i> <i>K.pneumoniae</i> <i>C.albicans</i>	Activité <i>in vitro</i> anti-adhésion : 35%, 65%, et 45% respectivement
Pinzon-Arango, 2009 (148)	<i>In vitro</i> co-culture d' <i>E.coli</i> et cellules urothéliales	PAC 0, 64, 128 et 345,8 µg/ml	<i>E.coli</i>	Anti-adhésion Effet dose
Lavigne, 2008 (16)	Activité <i>ex vivo</i> d'urines humaines après consommation de canneberge.	Capsules de canneberge de 36 mg, 108 mg ou placebo	<i>E.coli</i>	Effet anti-adhésion <i>in vitro</i> Effet dose Réduction virulence <i>E.coli</i> sur ver <i>Caenorhabditis elegans</i>
Gupta, 2007 (15)	Activité anti-adhésion <i>in vitro</i> sur cellules vésicales et vaginales	PAC diluée de 0 à 75 µg	<i>E.coli</i>	Effet anti-adhésion Effet-dose
Howell, 2010 (17)	Activité <i>ex vivo</i> d'urines humaines après consommation de canneberge. Essai multi-centrique en double aveugle	Capsules de 0, 18, 36, 72 mg de PAC	<i>E.coli</i>	Anti-adhésion Effet-dose Aténuation de la virulence dose-dépendante

Valentova, 2007 (140)	Activité <i>ex vivo</i> d'urines humaines après consommation de canneberge. Essai en double aveugle placebo vs 400 et 1200 mg	0, 400, 1200 mg de canneberge séchée	<i>E.coli</i> <i>K.pneumoniae</i> <i>S.aureus</i> <i>E.faecalis</i> <i>E.faecium</i> <i>P.aeruginosa</i>	Anti-adhésion <i>in vitro</i> Effet-dose Activité maximale sur <i>P.aeruginosa</i>
Di Martino 2006 (149)	Activité <i>ex vivo</i> d'urines humaines après consommation de canneberge. Essai en double aveugle vs placebo	250 ou 750 ml de jus à 27%	<i>E.coli</i>	Anti-adhésion <i>in vitro</i> (45% et 62%) Effet-dose Indépendant de la résistance aux antibiotiques

Adapté de Hisano (139)

Différentes techniques peuvent être utilisées, selon les études : a) l'inhibition de l'agglutination sur levures et hématies (FimH), tant sur billes recouvertes de récepteurs Gal-Gal que sur hématies (pili P), b) l'inhibition de l'adhésion aux cellules eucaryotes. La lignée cellulaire humaine T24 de carcinome de vessie est classiquement utilisée dans les essais d'adhésion des bactéries type UPEC sur les cellules (150-152).

Dès lors, il est possible de faire a) une numération des bactéries adhérees par cellule pour un nombre suffisant de cellules, par observation microscopique b) le comptage de la radioactivité après marquage des bactéries, contact bactéries-cellules et élimination des bactéries non-adhérees (153, 154). Cette dernière technique a été évaluée par comparaison avec le comptage microscopique après coloration et paraît moins sujette aux variations inter et intra-expérimentations (153, 155, 156).

L'utilisation d'une lignée cellulaire est souvent remise en cause du fait de son origine cancéreuse pouvant conduire à une modification d'expression et de comportement par rapport aux cellules *in vivo*. Cependant, elle permet d'occulter l'effet hôte, une réceptivité spécifique des cellules épithéliales urinaires en fonction de l'origine ayant été antérieurement observée (157, 158).

Le choix de la ou des souches bactériennes est primordial dans ce type d'approche. Le répertoire ATCC ou CIP ne donne pas toujours d'indication particulière ou du moins exhaustive sur le type de fimbriae des souches d'*E.coli* utilisées. Parmi les antigènes protéiques (antigènes F) impliqués dans l'adhérence des souches d'*E.coli*, existent les antigènes associés aux pili communs, spécifiques du mannose, et d'autres antigènes impliqués

dans l'adhésion à un type cellulaire précis, dont en particulier les fimbriae P pour les souches d'UPEC, présentant une résistance au mannose. Les deux types d'adhésines sont d'intérêt dans les infections du tractus urinaire (159, 160), ainsi que dans la persistance des bactéries, se traduisant par des infections récurrentes (7, 161, 162).

La capacité des souches d'UPEC à provoquer des IU symptomatiques est associée à l'expression d'une large panoplie de facteurs de virulence, parmi lesquels, nous l'avons vu, les adhésines jouent un rôle majeur; certaines souches, comme le mutant MG 1655 klm Pcl-film, expriment de manière constitutive FimH. A l'inverse, le caractère asymptomatique de certaines bactériuries n'est pas encore totalement élucidé, mais il a été observé que certaines des souches isolées dans ce contexte sont non adhérentes et non hémolytiques (80, 159). Ainsi, la souche ABU 83972, isolée chez un patient qui en était porteur depuis 3 ans, a perdu toute capacité à exprimer des pili de type 1, sa persistance ne déclenchant pas de réponse immunitaire de l'hôte (62); par délétion génique et mutation, elle devient apte au commensalisme (163, 164), avec de rares émergences de périodes symptomatiques, encore inexplicables (108), mais garde paradoxalement, sa virulence chez la femme enceinte (165).

D'autres souches, *pst* mutantes dont l'expression des fimbriae de type 1 est réduite, sont associées à une réduction de la colonisation, de l'invasion des cellules, et de ce fait des infections urinaires (70); ceci a pu être montré chez la souris avec la souche CFT073 après inactivation de l'opéron *pst*. Toutefois, les mécanismes de régulation génique sont complexes. Des variations de phase dans l'expression de FimH, *in vivo* et *in vitro*, sont liées à des modifications portant sur la régulation de l'expression de *fimS*.

Bien que le génome de différentes souches d'UPEC (CFT073, UTI89) ait été totalement séquencé, il n'a pas été possible d'isoler des caractéristiques spécifiques des UPEC, et il y a des différences considérables dans les répertoires géniques et les niveaux d'expression selon les souches d'UPEC (22). La souche *E.coli* UTI89, provenant de cystite humaine, a été utilisée dans plusieurs études (5, 38).

Leurs facteurs de virulence les mieux connus chez les principales UPEC étudiées figurent dans le tableau 3.

Tableau 3: Facteurs de virulence présents chez 5 souches ExPEC

Souche <i>E.coli</i>	CFT073	MG1655	UTI89	ABU83972	APEC01
Facteurs de virulence					
Système acquisition du fer					
Entérobactine sidérophore	+	+	+	+	+
Iro salmochelin sidérophore		+	+	+	+
Chu hemin uptake system	+	+	+	+	+
Sit iron.manganese transport	+	-	+	+	+
iutA aerobactine sidérophore	+	-	-	+	+
fyuA yersiniabactin sidérophore	+ nf	+	+	+	+
Pili					
fim (type1)	+	+	+	+ nf	+
Pap (P)	++	+	+	+nf	+
Sfa (S)	+	+	+	-	-
Foc (F1C)	+	+	-	+ nf	-
Toxines					
Hly (alpha hémolysine)	+	++	+	+nf	-
CNF1	-	-	+	+	-
VAT	+	+	+	?	+
SAT	+	-	-	?	-

Selon Wiles (8) nf : non fonctionnel

L'exposition à des concentrations croissantes de canneberge ou de PAC s'accompagne d'une réduction de l'adhésion d'*E.coli* exprimant les fimbriae P aux cellules urothéliales. Cet effet est **réversible**, les bactéries à nouveau cultivées en l'absence de canneberge retrouvent leurs capacités d'adhésion (148); ceci conforte l'hypothèse qu'il ne s'agit pas d'une réduction de l'expression des fimbriae P par les PAC liée à une acquisition ou délétion génétique, des changements de configuration des pilis ayant, de surcroît, été visualisés en microscopie électronique.

Enfin, les souches d'*E.coli* exposées à la canneberge voient diminuer la biomasse du biofilm qu'elles constituent (146), ce qui pourrait avoir un intérêt dans la prévention des IU récurrentes. Leurs capacités d'adhérer à du verre ou du plastique seraient également diminuées.

2.4.2 Modèles in vivo

De nombreux essais cliniques chez l'homme ont été réalisés pour étudier l'efficacité de la canneberge *in vivo* dans la prévention des IU.

Des essais cliniques de type comparaison d'un traitement versus placebo ont été réalisés, retrouvant une bactériurie persistant plusieurs semaines chez des femmes ayant fait un épisode aigu d'infection urinaire et non traitées (166). Par ailleurs, même lorsque traités de façon efficace à court terme, certains individus évoluent sur un mode chronique, avec des récurrences conduisant à des traitements longs (46, 167).

Les essais les plus récents sur l'efficacité de la canneberge apportent des conclusions insuffisantes ou contradictoires (17, 139, 165, 168-171). Ils sont par ailleurs d'interprétation délicate, car les méthodologies varient de par :

- la nature, le dosage du principe actif, la formulation et la présentation des produits,
- les doses et les durées d'administration,
- la population cible : femmes jeunes, femmes enceintes, femmes âgées, traumatisés médullaires, vessies neurologiques de sclérose en plaques, enfants, enfants ayant des sondages vésicaux intermittents, cystites radicales, et même des hommes âgés souffrant d'adénomes prostatiques (172)
- critères de jugement : prévention des IU en présence de facteurs de risque, prévention des cystites récurrentes,
- caractéristiques techniques des essais : effectifs parfois modestes, tolérance et observance du traitement variables, perdus de vue, les rendant difficilement comparables.

Le point clé est l'objectif de ces essais : démonstration d'un effet préventif et/ou curatif.

Devant la difficulté de conduite et d'interprétation des essais chez l'homme, les modèles murins ont été très largement utilisés. Ils ont permis de mettre en évidence des différences entre individus portant sur la nature de la réponse précoce de l'hôte à l'infection, différences qui jouent un rôle dans l'évolution et sur les récurrences (38).

Les modèles murins sont fondamentaux pour comprendre les mécanismes conduisant à l'infection urinaire puis à son évolution sur un mode chronique, ainsi que pour développer de nouveaux traitements et de nouvelles approches thérapeutiques. Ils permettent :

- d'identifier des caractéristiques individuelles de l'hôte, impliquées dans la colonisation initiale de la vessie et accessibles à des approches thérapeutiques, comme par exemple l'étude de l'efficacité de traitements antibiotiques (103) et non antibiotiques,

- de suivre quantitativement l'infection urinaire, par l'étude de la charge bactérienne à différents temps du processus infectieux,
- de réaliser des analyses histologiques et microscopiques illustrant, pour une meilleure compréhension, l'évolution des différentes phases de l'infection,
- d'étudier de nombreuses bactéries, non seulement des souches différentes d'*E.coli* mais également de nombreuses autres espèces (173).

Différents modèles murins ont été utilisés avec des variantes concernant l'inoculum, la voie d'introduction (intra-urétrale ou transurétrale), tous conduisent à une inoculation efficace de la vessie (174); par la suite, l'inoculation de 50 microlitres d'une suspension à 10^8 ufc par voie transurétrale a été retenue dans de nombreuses études.

Le modèle décrit par Hung (173), retenant la souche murine C3H/HeN, précise :

- la vérification de la stérilité des urines en phase d'appropriation de la technique
- l'utilisation de souches bactériennes sauvages comme témoins positifs
- l'optimisation de l'anesthésie : bien que la concentration d'Isoflurane soit déterminée de façon empirique, elle devrait être de l'ordre de 4% pendant la phase d'induction et de 2,5 à 3% pendant la phase d'entretien. Cependant, pour la souche murine C57BL/6, la concentration nécessaire en phase de maintien est inférieure.
- l'optimisation de l'inoculum d'*E.coli* entre 1 et 3×10^7 UFC dans 50 microlitres de volume inoculé. A 10^8 UFC par souris, la réponse inflammatoire robuste se traduit par une exfoliation rapide et massive, tout particulièrement pour les souris C57BL/6, pour lesquelles il est donc particulièrement important de ne pas dépasser 10^7
- les souches murines : des souches les plus diverses peuvent être infectées avec succès, mais la charge bactérienne dans le tissu vésical varie selon la souche de souris. Les souches murines les plus souvent utilisées sont C57BL/6, C3H/HeN, mais d'autres lignées ont pu être utilisées (CBA/J, FVB/NJ, C3H/HeJ) ou infectées avec succès (BALB/c, C3H/HeOuJ, C3H/HeSnJ et Swiss Webster). Alors que la réponse inflammatoire est précoce et importante pour la souche C57BL/6, avec la souche C3H/HeJ, elle est quasiment inexistante avec une filamentation de l'UPEC apparaissant très tardivement dans le cours de l'infection.
- l'âge et le poids des souris : l'âge idéal est entre 7 à 9 semaines ; les souris plus âgées ne conduisent pas à des niveaux aussi probants d'infection. Par ailleurs, entre 7 et 9 semaines le poids des souris varie peu et est sans effet sur la susceptibilité et le niveau d'infection

obtenu. A noter la nécessité d'acclimater les souris pendant une semaine avant l'expérimentation.

- l'inoculation, lente, de 50 microlitres de suspension bactérienne par cathétérisme vésical respectant les conditions d'asepsie

La souche bactérienne habituellement retenue pour ces essais est UTI 89 isolée dans des cystites cliniques.

Une fois les vessies récupérées par cystectomie, la moitié de la vessie est habituellement utilisée pour procéder au dénombrement des bactéries et l'autre moitié pour d'autres manipulations (extractions ARN, Western blott, par ex) incluant de l'histologie, de la microscopie électronique....

L'histologie permet de voir les conséquences de l'infection au niveau tissulaire, avec un oedème de la paroi vésicale, des infiltrats cellulaires inflammatoires, un endommagement du glycocalyx et des cellules en ombrelle qui se détachent, gradée par Hopkins de la façon suivante (174, 175):

0 : Normal

1 : infiltrat inflammatoire subépithélial focalisé

2 : œdème et infiltrat inflammatoire subépithélial diffus

3 : infiltrat subépithélial marqué avec nécrose et des polynucléaires dans et sur l'urothélium

4 : infiltrat touchant le muscle en plus des critères 3

5 : perte de l'épithélium de surface

D'autres modèles animaux ont pu être utilisés, faisant appel:

- à des rats femelles pour l'étude des effets d'extraits de canneberge (18).

- à un nématode, *Caenorhabditis elegans*, basé sur la capacité d'ingestion d'*E.coli* par ce ver, chez qui la bactérie produit une infection létale; le pourcentage de vers morts en présence de la souche d'*E.coli* est un marqueur direct de la virulence de la souche. Lorsque l'essai est fait en présence d'urine collectée après consommation de canneberge, une réduction de la virulence est constatée, par effet anti-adhésion, dose-dépendant (176, 177).

Enfin, l'analyse fonctionnelle du génome bactérien, par l'étude des profils transcriptionnels, est promise à un bel avenir. Les techniques d'hybridation de l'ADN ont connu ces dernières années un essor important ; plus récemment, le séquençage des ARN apparaît lui aussi prometteur. Par l'étude du transcriptome, en faisant varier les conditions d'étude, il est

possible d'analyser plus finement l'impact de différents produits agissant sur l'expression du génome.

2.5 Place de la canneberge dans la prise en charge des infections urinaires basses.

L'intérêt de la canneberge dans la prévention des IU demeure controversé.

L'identification du/des composé(s) actif(s), de son ou de leur(s) mécanisme(s) d'action, le manque de standardisation des produits dérivés de la canneberge et de leur teneur en composé(s) actif(s) rend les comparaisons de produits délicates, l'extrapolation de résultats impossible et la formulation de recommandations difficile.

Quant aux essais cliniques, nombreux mais portant sur des populations diverses avec des méthodologies variables, ils alimentent régulièrement la controverse.

Il n'existe aucune contre-indication formelle (143). En termes de tolérance, si les interactions sont connues et prises en compte (notamment l'effet inhibiteur des flavonoïdes sur le cytochrome P459), les effets secondaires semblent modestes (effet laxatif, intolérance digestive, prise de poids); des lithiases rénales oxaliques ont pu être rapportées sur de longues périodes d'absorption, liée à l'excrétion accrue d'oxalates et à une légère acidification des urines (143); il serait recommandé de boire beaucoup d'eau lors de l'ingestion de canneberge déshydratée. Cependant, leur impact sur l'observance d'une administration nécessairement au long cours peut s'avérer importante (jusqu'à 55% d'abandon) (178).

En 2008, la Cochrane review concluait que l'utilisation potentielle de la canneberge n'avait de place que dans la prévention des IU récurrentes de la femme jeune, en réduisant le nombre de récurrences sur une période de 1 an (179).

En 2010, une note d'information a été diffusée par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes, en France, qui portait sur le dosage des PAC de type A dans la canneberge. Outre la question des conditions d'emploi minimales requises pour que des PAC puissent prétendre à une efficacité par le biais d'une moindre adhésion d'*E.coli*, cette note insistait sur le problème du dosage de ces molécules. En effet, différentes techniques de dosage des PAC existent (spectrophotométrie, chromatographie en phase liquide, gravimétrie...), donnant lieu à des écarts importants. De plus, ne s'agissant pas d'un médicament mais d'un supplément alimentaire, d'origine naturelle et donc de composition complexe et potentiellement variable, les contraintes réglementaires de mise sur le marché sont moindres voire inexistantes, n'incitant ni à l'identification des principes actifs ni à leur(s) dosage(s) précis.

L'autorité européenne de sécurité des aliments, après analyse de deux dossiers soumis par des opérateurs, a conclu que les preuves fournies n'étaient pas suffisantes pour établir une relation de cause à effet entre la consommation des produits et la réduction d'un risque de survenue d'infections urinaires.

La question de la dose minimale requise n'est pas résolue, d'autant plus difficile à examiner que les modes de préparation des produits peuvent entraîner des variations de composition, la sélection, voire l'addition, de produits inhibiteurs de l'activité, et que par ailleurs, la question du dosage même des molécules n'est pas résolue.

La dernière mise à jour de la Cochrane Database of Systematic Reviews en 2012 (21) recensait 24 études, essais contrôlés randomisés, dont 6 études cross-over, 11 études comparant deux bras, 5 avec 3 bras et deux multifactorielles, pour un total de 4473 participants. L'inclusion de 14 études supplémentaires suggère que la canneberge est moins efficace que ce que l'on pensait, la conclusion étant que la canneberge ne peut être actuellement préconisée dans la prévention des IU (21). La canneberge ne réduirait pas les récurrences d'IU dans aucun sous-groupe étudié : femmes ou enfants ayant des IU récurrentes, personnes âgées, femmes enceintes, patients atteints de cancer ou de vessie neurologique (143)

C'est peut-être la raison pour laquelle, dans la revue faite en 2015 par Flores-Mireles (93), la canneberge n'est pas même citée dans les options thérapeutiques abordées par l'auteur.

Cependant, les limites de ce type de méta-analyses ont été rappelées (44, 180, 181) ainsi que la parution de conclusions opposées (129, 182), brouillant un peu plus la situation(44). Howell (183) indique ainsi, dans un commentaire portant sur cette méta-analyse, que les consommateurs devraient acheter des produits contenant au moins 36 mg de PAC, que la canneberge est presque aussi efficace que des traitements antibiotiques faiblement dosés chez la femme et l'enfant, mais sans risques de résistances, préconisant aussi de poursuivre la recherche sur *Vaccinium macrocarpon*. Les recommandations françaises SPILF-AFU proposent, en 2015, la canneberge en prévention des cystites récurrentes à la dose de 36 mg de proanthocyanidine/ jour (35, 143).

Enfin, deux études ont comparé l'efficacité d'extraits de canneberge et d'antibiotiques (TMP) à faible dose en prophylaxie des récurrences d'IU chez la femme âgée d'une part, et chez la femme pré-ménopausée, d'autre part: la canneberge s'avère efficace, mais dans une moindre mesure, présentant cependant l'avantage de ne pas être associée à la survenue de BMR dans la flore commensale (184, 185). D'éventuels phénomènes d'acquisition de résistances

bactériennes aux antibiotiques lorsqu'associés à la canneberge, n'ont pas été, non plus, rapportés (149).

Loin d'abandonner définitivement la voie thérapeutique que peut représenter la canneberge, de nouvelles études paraissent, qui :

- cherchent à évaluer la potentialisation de l'effet des PAC par d'autres composés, tels que le propolis (177, 186);
- insistent sur la nécessité de pouvoir disposer de dosages précis en teneur en dimères et trimères de PAC-A (65, 186), en ne se contentant pas de doser les PAC globaux ;
- ou encore ciblent d'autres composés présents dans les extraits de canneberge et présumés actifs, tels que les polyphénols (187), le xyloglucane (68), la myricétine (188) ou encore des métabolites des PAC.

Ce qu'il faut retenir concernant la canneberge

- *Intérêt dans un contexte d'épargne des antibiotiques et de maîtrise de la pression de sélection*
- *Pas de résistances décrites ; attribution ancienne d'un effet sur le maintien d'un bon état de santé de l'arbre urinaire.*
- *Etudes cliniques nombreuses, résultats controversés,*
- *Mécanismes d'action, étudiés ex vivo et in vitro, incomplètement élucidés : inhibition de l'adhésion (FimH, P), attribué aux proanthocyanidines, A en particulier, altérations de la mobilité flagellaire ;*
- *Composition complexe de la baie et caractéristiques mal définies des produits commercialisés (teneurs en proanthocyanidines, autres composés possiblement actifs)*
- *Action sur le microbiote fécal probable mais non élucidée, pharmacocinétique peu étudiée*

Dans un tel contexte, ce travail a pour objectifs :

- de rechercher, en culture et chez l'animal, des effets d'extraits d'intérêt sur l'adhésion d'*E.coli* de statut FimH connu,
- de définir un modèle d'étude simple et reproductible, applicable à l'évaluation de candidats médicaments.

-

Le protocole expérimental comprend différents types d'essais :

- *in vitro* avec l'évaluation de l'adhésion de différentes souches d'*E.coli* et de l'inhibition de l'adhésion par des extraits de canneberge proposés par les laboratoires Pierre Fabre
- *in vivo* sur modèle murin (souris femelles C57BL/6 de 8 semaines), avec l'étude de la colonisation vésicale par différentes souches d'*E.coli*, puis l'évaluation des produits sur la prévention de la colonisation et/ou de l'infection, par pré-incubation de la souche sélectionnée avec le produit soumis à l'essai.

Secondairement, les résultats de ces différents essais nous ont conduits à explorer les effets du produit retenu sur la structure de surface et la mobilité bactérienne, ainsi que sur l'expression des gènes correspondants.

3 Matériel et méthodes

L'objectif de ce travail est de rechercher en culture et chez l'animal les effets d'extraits d'intérêt (canneberge) sur l'adhésion et la prolifération d'*E.coli* uropathogènes de statut FimH connu ou non. L'accent a été mis sur l'optimisation d'un modèle d'étude.

Les essais *in vitro* comportent :

- l'évaluation d'un panel de souches d'*E.coli* de différentes origines et de statut fimbriæ connu ou non pour leurs propriétés hémagglutinantes et d'adhésion aux cellules eucaryotes en culture
- l'évaluation de l'activité cytotoxique potentielle des composés de canneberge et des surnageants de cultures bactériennes
- l'évaluation de l'effet anti-adhésion des composés de canneberge : essais d'adhésion de la souche retenue (UTI89 pour tous les essais, essais spécifiques sur souches exprimant FimH) aux cellules eucaryotes, en présence et en l'absence de produits pendant les essais et selon différents protocoles de culture de la souche bactérienne, en présence ou en absence de produit.
- traduction mécanistique de l'action du produit retenue dans le modèle sur l'expression génotypique par séquençage des ARN messagers
- confirmation de l'impact mécanistique par des tests fonctionnels adaptés.

Les essais *in vivo* comportent :

- une validation du choix des souches en termes d'aptitudes à la colonisation vésicale chez la souris
- l'évaluation de l'effet des composés de canneberge sur la prévention de la colonisation et/ou de l'infection.

3.1 Matériel

3.1.1 La collection de souches d'*E.coli*

Sur la base des données de la littérature, l'effet des proanthocyanidines (PAC) est considéré dépendant du statut FimH de la souche bactérienne. Les souches initialement sélectionnées proviennent notamment de la Collection de l'Institut Pasteur et du centre de référence des entérobactéries (Institut Pasteur, colishig@pasteur.fr, Paris) ou ont été fournies par le Dr JM Ghigo (Institut Pasteur, Paris) et le Pr E. Oswald (Laboratoire de Microbiologie, Institut

Fédératif de Biologie, CHU de Toulouse) et présentent des caractéristiques adaptées (isolement à partir d'infections urinaires, expression connue de FimH).

Le tableau 4 répertorie la collection initiale de 27 souches d'*E.coli*, testées pour leurs propriétés hémagglutinantes. Ces souches sont toutes des souches d'origine humaine, provenant soit de fécès, soit d'origine urinaire, en situation d'infection urinaire, à l'exception de la souche de la dernière ABU83972, isolée d'une bactériurie asymptomatique chez une petite fille. L'hypothèse étant une action de la canneberge sur les adhésines, en particulier des pili de type 1, nous avons privilégié les souches connues pour exprimer des adhésines, en particulier le couple MG1655 et la souche parente GGB1561 surexprimant Fim H de manière constitutive.

Tableau 4. Souches d'*E.coli* initialement testées pour leurs propriétés hémagglutinantes

Collection	Souche	Origine	Caractéristiques	Adhésines
CIP	54117	Fécès, humaine	susceptibles phages T1 à T17	non décrites
CIP	53126 = ATCC 8739	Fécès, humaine	Stx1-, Stx2-, eae-, htyA- séquençage complet séduit l'ac déhydroascorbique	ND
CIP	54127=ATC C 10536		utilisée dans contrôles qualité pharmacopée, normes AFNOR, normes ISO et pharmacopée USA	ND
CIP	105986	Humaine PNA	sérotype O25 :H1	ND
CIP	105994	Humaine PNA	sérotype O2	ND
CIP	106006	Humaine, Infection urinaire symptomatique	sérotype O78 souche mobile	ND
CIP	106012	Humaine PNA	sérotype O7 souche mobile	ND
CIP	106016	Humaine Cystite aigüe	sérotype O6 :H10	ND
CIP	106023	Humaine ; Cystite	non typable	ND
CIP	106032	Humaine ; Cystite	sérotype O4	ND
CIP	106041	Humaine ; Cystite	sérotype O75 ; non mobile	ND
CIP	106530	Fécès d'enfant	sérotype O3 :H2 plasmide p17-2	adhésine fimbriale
CIP	106531	Fécès d'enfant	sérotype O44 :H18	adhésine fimbriale

			plasmide pAA2	encodée par plasmide pAA2
CIP	108106	Humaine urine	non typable production toxine CNF1 (NTEC-1)	adhésines (P, F1C, fimbriae de type 1)
CRBIP	19.170	Souche sauvage uropathogène	PAI-II LeuX +	ND
CRBIP	19.211 (JM Ghigo) = CFT073	Souche uropathogène sur le plan génotypique	milieu de Luria	ND UPEC
CRBIP	19.79 (JM Ghigo)	Souche uropathogène	TG1 <i>fimA</i>	génotype <i>fim A</i>
CRBIP	14.19	Humaine ; Cystite	<i>E.coli</i> diffusely adherent diffuse adherence on HeLa cells	expression adhésine <i>Afa/Dr</i>
CRBIP	14.21	Humaine, PN	<i>E.coli</i> diffusely adherent	expression adhésine <i>Afa/Dr</i>
CRBIP	14.24	Humaine, PN	<i>E.coli</i> extra-intestinal groupe phylogénétique B2 Opérons <i>sfa/foc, pap, hly</i>	ND
CRBIP	14.28	Humaine ; Cystite	<i>E.coli</i> diffusely adherent <i>AfaE-II</i> et <i>AfaE-III</i>	expression 2 adhésines <i>Afa/Dr</i>
CRBIP	14.31	?		produit des pili, pas de type 1 <i>Delta fimB-H</i>
GGB1561	souche parente MG1655	Groupe de génétique des biofilms – Pr Ghigo		surexpression des fimbriae de type 1 <i>FimH</i> de manière constitutive
UTI89		humaine pyélonéphrite UMR –Pr Oswald		exprime pili type 1, P et S et plusieurs toxines
MG1655		UMR –Pr Oswald		exprime pili type 1, P, S et F1C et plusieurs toxines surtout <i>Hly</i>
CFT073		UMR –Pr Oswald		exprime pili type 1, S, F1C et surtout P

				et plusieurs toxines
ABU 83972		UMR –Pr Oswald humaine, colonisation urinaire	immobile, ni flagelle ni capsule, dépourvue d'Ag O et K, pas de fimbriae 1, P ni F1C	adésines non fonctionnelles ou inexistantes toxine CNF1

PN: Pyélonéphrite. PNA: Pyélonéphrite aiguë

3.1.2 Les lignées cellulaires utilisées in vitro

Ont été utilisées :

- les cellules de carcinome vésical humain, de la lignée T24

Code fournisseur : HTB-4 (American Type Culture Collection, USA), numéro de lot 2406038

- les cellules urothéliales de la vessie de souris NUC-1

Code fournisseur : ACC 225 (DMSZ, Allemagne) numéro de lot P2B

Les deux lignées sont conservées à -180°C (azote liquide) à une concentration comprise entre 5.10^6 et 1.10^7 cellules/mL. Les cellules sont mises en culture en milieu Mac Coy5A (T24) ou DMEM F12 (NUC-1) (Biowhittaker, Emerainville, France) supplémenté en acides amines non essentiels (Biowhittaker) 1% (p/v), glutamine (Biowhittaker) 1% (p/v), penicillin/streptomycin (Biowhittaker) 1% (p/v) et sérum de veau décomplémenté (Biowhittaker) 10% (v/v). Après 48h d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, les cellules sont remises en culture selon le protocole suivant :

- trypsinisation : élimination du milieu de culture des flacons de cellules, rinçage avec tampon PBS, élimination du liquide de rinçage, ajout de la solution de trypsine à 0,05% (Biowhittaker). Incubation 5 mn à 37°C des cellules, arrêt de la trypsinisation par ajout de 10 ml de milieu de culture.
- centrifugation à 1600 t /mn 5 mn à 20°C
- reprise du culot cellulaire dans 1 ml de milieu de culture pour obtenir la suspension cellulaire
- contrôle de viabilité et ajustement du titre de la suspension après coloration au bleu Trypan (colorant vital): dilution au 1/10 de la suspension cellulaire dans le bleu Trypan, remplissage de la chambre de cellule de Malassez et comptage au microscope optique X40 (cellules viables réfringentes, cellules mortes en bleu). Limite acceptable < 10% de

cellules mortes. Au delà, la viabilité est compromise, la culture est éliminée. Pour les essais, la suspension est ajustée à 2.10^5 cellules/mL.

3.1.3 Les animaux utilisés in vivo

Les animaux utilisés sont des souris femelles C57BL/6 de 8 semaines (élevage Janvier, France). Après réception, les souris sont hébergées en cages collectives (5 souris par cage) pendant 7 jours, dans l'animalerie de la faculté de Pharmacie, à température et luminosité contrôlées, afin de leur permettre de s'acclimater en dehors de tout stress.

Le matériel et les produits utilisés sont:

- pour l'anesthésie : gaz isoflurane, anesthésie par inhalation,
- pour le sondage vésical : povidone iodée (PVPI) pour la désinfection du méat urétral. Matériel de sondage : Arrow Cath, 0,46 mm de diamètre, 4 Fr, spring wire guide, sonde : BD Insite Autoguard^R, cathéter veineux 0,9mm diamètre, 22 Gauges, Becton Dickinson
- pour l'inoculation : seringues à insuline
- une cage de maintien du sommeil équipée pour entretenir le sommeil pendant 45 min, en décubitus dorsal
- pour le sacrifice : xylocaïne à 1% en injection intra-péritonéale
- pour le prélèvement des vessies : matériel chirurgical adapté à la réalisation d'une laparotomie médiane.

3.1.4 Les produits utilisés pour la mise au point du modèle

3.1.4.1 Extraits de canneberge

Dans la phase de mise au point du modèle d'étude, 4 échantillons ont été fournis par l'industriel : **C102, lots E600347, O81111, KO0013 et E 600597** correspondant à la préparation commerciale.

Cet extrait concentré correspond au produit commercialisé Urisanol® (Naturactive, Pierre Fabre Médicament, Castres, France). Il est composé de 90% de canneberge et 10% d'hydroxyde de sodium et de phosphate tricalcique.

La quantité de proanthocyanines présente dans l'extrait a été déterminée selon la méthode de Porter dérivée de celle de Bate-Smith (189). Six mL d'une solution concentrée à 5% d'HCl dans le butanol et 0.2 mL d'une solution à 2% $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ dans l'HCl 2N sont

ajoutés à 0.5 mL d'une solution méthanolique contenant l'extrait de canneberge ou le C3G (cyanidine-3-glucoside). L'hydrolyse acide est réalisée à 95°C durant 90 min. Les solutions sont ramenées à température ambiante et analysées en spectrophotométrie ($\lambda = 520 - 580$ nm). Les résultats sont exprimés en mg de cyanidine-3-glucoside dans 1 g d'extrait de canneberge (poids sec). Toutes les mesures ont été réalisées en duplicate.

La **quantité de proanthocyanidines mesurée dans l'extrait est de 18.65 ± 0.35 mg / g** de poids sec.

Les **produits C121, C118 et BF189-1** correspondent à des préparations ou fractions provenant également des Laboratoires Pierre Fabre.

Les solutions d'essai sont préparées extemporanément dans l'EPPI.

3.1.4.1 Principaux milieux, réactifs et appareils utilisés pour les différents essais *in vitro*

- Sang de mouton (Biomérieux, France)
- Géloses et bouillons trypticase soja TS (Biomérieux)
- Géloses et bouillons de Luria (composition : Agar (Biomérieux), tryptone (Oxoid), NaCl (Sigma), extrait de levure (Biomérieux), eau distillée)
- Géloses moles swarming (par litre: agar 5g, tryptone 10g, NaCl 0,6g, extrait de levure 5g, glucose 5g), 5ml coulés dans des boîtes de Petri de 55 mm de diamètre
- PBS
- ^3H -adenidine triphosphate (Perkin-Elmer, USA)
- Liquide de scintillation Ultima Gold (Perkin-Elmer)
- Milieu de culture MacCoy 5A (Dutscher)
- Milieu de culture DMEM F12 (Dutscher)
- Galactose (Sigma)
- Dodécyl Sulfate de sodium (SDS) (Sigma-Aldrich)
- XTT et co-enzyme Q (Sigma-Aldrich)
- Phénol à 0,5% (Sigma-Aldrich)
- Microplaques 96 puits à fond rond (Falcon, Dutscher)
- Plaques 24 puits pour cultures cellulaires et flacons 25 cm² (Falcon, Dutscher)
- Spectrophotomètre (Polarstar, BMG, France)
- Centrifugeuse (3i, Hearus)
- Compteur Béta (TriCarb 2800-TR, Perkin-Elmer)
- Appareil agitateur de plaque (Stuart Orbital)
- Microscopie électronique :

- fixation: solution de glutaraldéhyde à 1%, tampon Sorensen 0,1 M
- contrastant : acétate d'uranyle
- lecture au microscope à transmission Hitachi HT 7700,
- Histologie : liquide de Bouin et trichrome de Masson
- Mesure des surfaces de pousse sur géloses swarming : fond papier millimétré sur tablette iPad, logiciel Image J (NIH).

3.2 Méthodes

3.2.1 *In vitro*

Tous les tests ont été réalisés au moins deux fois.

3.2.1.1 Hémagglutination

Les suspensions bactériennes sont préparées après 24 heures de culture à 37°C en aérobiose, sur milieu Trypcase Soja.

Après centrifugation, les bactéries sont mises en suspension dans du PBS (10^{10} bactéries/ml).

Les hématies de mouton (Biomérieux) stériles et défibrinées sont centrifugées (4000 tours/mn, x5), suspendues (2% v/v) dans du PBS et déposées (25µl) sur microplaque 96 puits.

Un même volume (25µl) d'une série de dilutions de raison 2 de la suspension bactérienne est ajouté et homogénéisé (2mn) sur plaque oscillante. Les plaques sont incubées à 37°C pendant 2 heures, avec maintien ou non de l'agitation.

L'hémagglutination se traduit par la formation d'un voile uniforme. Le témoin négatif (PBS + suspension d'hématies) est caractérisé par la formation d'un culot d'hématies au fond du puits. Dans le cas des essais sous agitation, la lecture a été réalisée 15mn après arrêt de l'agitation. Le titre d'hémagglutination correspond à l'inverse de la dilution la plus élevée ayant donné une hémagglutination visible. La limite de détection correspond à un titre 2.

Les mesures d'inhibition de l'hémagglutination sont réalisées de la même manière par addition de dilutions de raison 2 du produit à tester (25µl) dans des puits contenant 25µl d'hématies de mouton et 25µl de suspension bactérienne de titre 4 d'hémagglutination. Le contrôle est constitué par un même volume d'une solution aqueuse de galactose à 200mM.

3.2.1.2 Cytotoxicité

Le principe du test est basé sur la transformation enzymatique d'un sel de tétrazolium, le sodium 3,3 [1[(phenyl amino) carbonyl]-3-4-tetrazolium bis (4-methoxy-6nitro)] benzène sulfonic acid hydrate soit XTT, en un produit coloré, le formazan. Le XTT est réduit par la déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes en présence d'un agent couplant d'électrons, le coenzyme Q, en un composé hydrosoluble jaune/orangé, le formazan, dosable par spectrophotométrie à 450 nm, selon le principe décrit par Roehm (190). La densité optique relevée est proportionnelle à la population cellulaire viable.



Fig 3. Révélation du test de cytotoxicité par transformation des sels de XTT en formazan, coloré en orange.

Des microplaques de 96 puits sontensemencées à 2.10^5 cellules/mL et incubées pendant 24 heures à l'étuve. Le milieu de culture est alors éliminé et les puits rincés au PBS.

100 μ l de dilutions de raison 2 des produits à tester sont déposés dans chaque puits avec comme témoin 100 μ l de milieu de culture (témoin négatif) et 100 μ l de phénol (10mg/ml, témoin positif).

Les plaques sont mises à incuber pendant à 37°C (5% CO₂) au temps de contact défini. Elles sont ensuite lavées (PBS, x2) et 100 μ l du mélange XTT (1mg/ml)/coenzyme Q (0,2 mg/ml) sont ajoutés dans chaque puits. Après 3 heures d'incubation, 100 μ l d'une solution de SDS à 10% sont ajoutés dans chaque puits. La lecture immédiate de la densité optique à 450 nm est effectuée au spectrophotomètre POLARstar (BMG, France). Le pourcentage de viabilité est calculé comme suit :

$$\frac{[\text{densité optique}_{(\text{produit})} - \text{densité optique}_{(\text{témoin négatif})}]}{\text{densité optique}_{(\text{témoin négatif})}}$$

Le test est interprétable quand la valeur du témoin positif de cytotoxicité est $\leq -50\%$. Le produit est défini comme cytotoxique si le pourcentage de perte de viabilité correspondant est $\leq -30\%$ (191). Ce test a été appliqué à l'étude des produits suivants vis-à-vis de la lignée T24:

- canneberge et extraits produits par le Laboratoire Pierre Fabre aux concentrations de 1 à $1,95 \times 10^{-3}\%$ (p/v) pour C102, C121, et C118 et de 0,1 à $1,95 \times 10^{-4}\%$ (p/v) pour BF189-1.
- surnageant des cultures bactériennes obtenues en bouillon Trypcase-Soja après 24h d'incubation à 37°C.

Il a été complété par des contrôles visuels au bleu Trypan de:

- cytotoxicité des 4 extraits de canneberge
- cytotoxicité finale après 2 heures de contact des 3 composantes de l'essai C102, *E.coli* UTI89 et cellules T24.

3.2.1.3 Croissance bactérienne

La croissance bactérienne de différentes souches (UTI89, MG1655, CFT 073, GGB 1561, ABU 83972) inoculées à faible concentration (10^2 UFC/mL) en milieu liquide trypcase soja a été mesurée par absorbance à 640nm sur une période de 10j en présence de C102 à 1 et 0,1% (P/V).

L'évaluation de la population bactérienne en milieu de culture cellulaire (Mac Coy5A, sans sérum de veau fœtal) durant 2h a été vérifiée de la même manière, avec et sans C102.

3.2.1.4 Adhésion aux cellules vésicales

Les bactéries sont marquées en milieu liquide en phase exponentielle de croissance par incubation pendant 18 heures à 37°C en présence de 5 μ ci d'adénine tritiée. La radioactivité non incorporée est ensuite éliminée par lavage et centrifugation (1600 tours/mn, 10min, 18°C, x3). Les bactéries sont remises en suspension dans le milieu de culture correspondant à la lignée cellulaire, sans addition de sérum de veau fœtal et ajustées par spectrophotométrie à 10^8 UFC/ml.

Les bactéries sont alors mises en contact sur plaque de 24 puits (500 μ l de suspension bactérienne) avec une monocouche de cellules vésicales obtenue par incubation pendant 48h à 37°C sous 5%CO₂ d'une suspension de 500 μ l/puits de cellules T24 ou NUC-1 (2.10^5 cellules/ml) cultivées dans le milieu approprié additionné de 10% de SVF.

Après 2 heures d'incubation (t2h), le surnageant est éliminé et les bactéries non adhérentes éliminées par 3 lavages au tampon PBS. Le bruit de fond (t0) correspondant à une adhésion

non spécifique est obtenu par lavage et lyse immédiate, sans incubation, comme décrit ci-après.

Le tapis cellulaire et les bactéries adhérentes sont lysés avec 500 µl d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5N + 0,1% de SDS. Les lysats sont placés dans les tubes de comptage et 2mL/tube de liquide de scintillation ajoutés avant comptage au compteur Béta. Chaque condition d'analyse a été répétée quatre fois.

Pour chaque série, l'activité apportée par les bactéries (cpm totaux) est mesurée. Un contrôle positif (phénol 0,5%) est effectué. La validation du test repose sur la démonstration d'un taux d'adhésion réduit (exprimé en cpm) de plus de 50% par l'addition de phénol (0.5%) avant incubation (192).

Les résultats sont présentés en pourcentage d'adhésion selon la formule :

$$\% \text{ d'adhésion} = (t2h_{cpm} - t0_{cpm}) / \text{activité apportée}_{cpm}. (193)$$

L'effet d'inhibiteurs d'adhésion est mesuré selon le calcul suivant : $(t2h_{inhibiteur_{cpm}} - t2h_{témoin_{cpm}}) / t2h_{témoin_{cpm}}$. (194)

Cette technique a été utilisée pour étudier :

- l'adhésion sur cellules eucaryotes vésicales T24 de neuf souches non cytotoxiques d'*E.coli*,
- l'inhibition d'adhésion induite par le composé C102 (1% et 0,1% P/V)
 - o apporté au moment de l'essai correspondant à l'adhésion de référence,
 - o mis en contact avec les cellules T24 pendant 2h avant l'essai,
 - o mis en contact avec UTI89 pendant 48h (2 subcultures) ou 10 jours (10 subcultures) avant l'essai,
 - o mis en contact avec UTI89 pendant 10 subcultures avec retrait du produit les 10 subcultures suivantes.
- L'adhésion sur les cellules de rein de souris NUC1 d'UTI89, MG1655 et GGB1561 et l'inhibition d'adhésion par C102.

Afin d'assurer la validité de ces essais, notamment en termes de subcultures bactériennes en présence du produit C102, un contrôle de la viabilité bactérienne dans les conditions d'essai a été réalisé (T0 versus T2h).

Une fois le modèle défini, il sera appliqué à l'évaluation *in vitro* de candidats médicaments

L'industriel a souhaité évaluer l'efficacité de trois produits :

- P1 : produit soluble dans le bouillon TS ; concentration test 1%
- P2 : produit soluble dans diluant à 37°C, concentration test 0,95%

- P3 : produit soluble dans le bouillon TS, concentration test 0,06%

Un essai d'inhibition de l'adhésion sur cellules T24, d'*E.coli* UTI89 selon le modèle retenu (10 subcultures) sera réalisé en présence de chacun des 3 produits, avec C102 en référence.

3.2.1.5 Etude des ARNm chez UTI89 (puce Affymetrix, Agilent)

Pour ces essais, le traitement des souches et les extractions d'ARN ont été réalisés au laboratoire. La pureté des ARN extraits et la suite du protocole d'analyse des niveaux d'expression des différents gènes d'*E.coli* UTI89 a été réalisée par la plateforme Transcriptome GeT-Biopuces, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP, INSA, Université Paul Sabatier, Toulouse III).

a) **Extraction des ARNm** de *E.coli* UTI89 provenant de cultures fraîches au terme de 10 subcultures en présence et en absence de C102 1%P/V

Les suspensions bactériennes, ajustée à 0,4 (DO 640), ont été homogénéisées par vortex et mises à décanter 25 min à 4°C. Un mL de surnageant de chaque suspension a été centrifugé 10 min à 4°C. Les culots ont été lavés une fois avec 500 µL de bouillon TS froid puis à nouveau centrifugés 10 min à 4°C afin d'éliminer tout résidu de canneberge. Les culots bactériens ont été conservés à -80°C en attendant l'extraction des ARN.

L'extraction a été réalisée avec le kit RNeasy Plus Mini (Qiagen) selon les instructions du fabricant.

b) **Contrôle de la qualité** des ARN

La qualité des ARN a été vérifiée par dosage spectrophotométrique (Nanodrop, Thermo – $A_{260}/A_{280} > 2,1$ et $A_{260}/A_{230} > 2,3$) et migration électrophorétique (Bioanalyzer, Agilent – $\text{ratio } 16S/28S > 1,2$ et $RIN > 8,5$). Seuls les échantillons ayant un RIN (RNA Integrity Number) supérieur à 8.5 ont été utilisés pour les puces à ADN.

c) **Marquage et amplification** des ARN

Le kit *One-Color Low Input Quick Amp WT Labeling Kit*TM (Agilent Technologies, Massy, France) a été utilisé pour amplifier et marquer 100ng d'ARN selon les instructions du fabricant. L'efficacité du marquage a été vérifiée au nanodrop par une mesure d'absorbance à 260 nm pour le cRNA produit et à 550 nm pour la Cyanine3 (Cy3) incorporée puis calculée comme indiqué dans le protocole du fabricant.

d) **Hybridation des puces**

Pour chaque échantillon, 600ng de cRNA marqué et amplifié ont été utilisés pour préparer le mix d'hybridation comme décrit dans le protocole Agilent (Agilent Technologies, Massy, France). 40 µl de chaque mix d'hybridation ont été déposés sur une lame "joint" et la puce à ADN (*E. coli* Gene Expression Microarray, 8x15k, design 020097, Agilent Technologies, Massy, France) comme recommandé dans le guide utilisateur *Agilent Microarray Hybridization Chamber User Guide*. Les lames sont ensuite insérées dans une chambre d'hybridation puis placées immédiatement dans un four à hybridation à 65°C durant 17 heures à une rotation de 10 rpm. La puce à ADN a été lavée après hybridation et a été scannée à l'aide du scanner MS200 (NimbleGen Roche Diagnostics, Meylan, France) avec le logiciel NimbleGen MS200 v1.2 à 5 microns de résolution.

La puce est élaborée à partir de plusieurs souches d'*E.coli* : CFT073, K12 MG1655, O157 :H7, EDL 933 et VT2 Sakai.

e) **Analyse des données**

L'intensité de fluorescence a été quantifiée avec le logiciel Feature Extraction software v11.5.1.1. Les données d'expression ont été normalisées avec le package RMA de Bioconductor. Seules les sondes exprimées normalisées et transformées en log2 ont été utilisées. La normalisation (méthode des quartiles simultanément sur toutes les conditions) et l'analyse statistique a été faite à l'aide de packages Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>) et du logiciel R v3.2.2.

La valeur d'intensité du gène est retenue gène par gène, correspondant à la médiane des valeurs pour les différents oligonucléotides ciblant un même gène.

L'analyse différentielle a été faite en utilisant le package limma package et la liste des gènes discriminés entre les conditions 'Canneberge' et 'Témoin' a été retenue avec un FDR (False Discovery Rate) ajusté, un $p < 0.05$ et un FC (fold change) d'au moins ± 0.5

L'enrichissement fonctionnel (biological process, cellular component and molecular functions) a été fait en utilisant le package GOstats dans Bioconductor. La liste des gènes différentiellement exprimés ($p < 0,05$) entre les cultures témoins et les cultures sur C102 a été établie de la façon suivante :

Fold change : ratio intensité non transformée en log 2 de la condition C102 / ratio intensité non transformée en log 2 de la condition témoin

Log 2 de fold change : intensite en log2 de la condition C102 - intensite en log2 de la condition témoin, le risque associé étant le suivant :

Log2 Fold Change	p corrigé
<=-2 et >= 2	0,01
<=-0.5 et >= 0.5	0,01
<=-2 et >= 2	0,05
<=-0.5 et >= 0.5	0,05

3.2.1.6 Mobilité bactérienne sur gélose

Trois types de mobilité sont décrits chez *E.coli* (92) :

Leur mise en évidence se fait par culture en géloses molles, riches en sources d'énergie (195, 196),

Cette technique a été utilisée pour étudier les modifications de mobilité induites par le composé C102 (1% et 0,1% P/V) :

- mis en contact ou non avec UTI89 pendant 10 jours (10 subcultures) avant l'essai,
- incorporé ou non dans la gélose molle,

par référence au témoin (absence de C102 dans le bouillon et dans la gélose).

Analyse des mouvements de «twitching»

Des boîtes de 55mm de gélose molle (Milieu de Luria enrichi en tryptone 5g/L, casamine 5g/L et NaCl 0,6g/L, agar 10g/l) sont préparées et laissées pendant 15 min sous flux laminaire. Un cylindre central de 5mm de diamètre est retiré à l'emporte-pièce stérile puis remplacé avec la suspension bactérienne UTI89 (10^8 UFC/mL, 10 μ l) avant incubation en étuve à 37°C.

Lors de la lecture, la gélose est retirée délicatement et la culture ayant adhéré à la boîte est colorée au cristal violet à 1%, (5 sec, 2 rinçages à l'eau distillée). Deux diamètres orthogonaux de la colonie bactérienne sont mesurés au pied à coulisse à 24 et 48h. La surface de croissance est obtenue par la formule: $\Pi[(d1+d2)/2]^2 /4$

Analyse des mouvements de «swimming »

10µl de suspension de la souche UTI89 (10⁸ UFC/mL) sont déposés en boîte de 55mm à la surface d'une gélose molle (Trypcase Soja, Agar 3g/l) puis incubés en étuve à 36°C.

Deux diamètres orthogonaux de la colonie bactérienne sont mesurés au pied à coulisse à 8, 24 et 48h. La surface de croissance est obtenue par la formule: $\Pi[(d1+d2)/2]^2 /4$

Analyse des mouvements de «swarming»

10µl de suspension de la souche UTI89 (10⁸ UFC/mL) sont déposés en boîte de 55mm à la surface d'une gélose molle (Trypcase Soja enrichi en glucose 5g/L, casamine 5g/L et NaCl 10g/L, Agar 5g/l) puis incubés en étuve à 36°C.

Les boîtes sont déposées sur papier millimétré et les colonies photographiées à 8, 24 et 48h.

Les surfaces de croissance sont mesurées par analyse d'image (Image J°, NIH).

Tous les essais ont été répétés au moins trois fois.

3.2.1.7 Mobilité bactérienne par microscopie électronique à champ large.

Ces analyses ont été réalisées à l'ITAV-USR3505, Centre Paul Pottier (Toulouse, France).

Les acquisitions ont été réalisées, sur suspensions de *E. coli* UTI89 après 10 subcultures en présence ou non de C102 à 1% P/V, directement après marquage extemporané au Syto9®, avec un vidéomicroscope à champ large (Axio Observer Z1, Carl Zeiss) équipé d'un objectif apochromatique 40X/0.95 NA. Les échantillons imagés sont excités à l'aide d'une lampe aux halogénures métalliques (HXP, Osram) combinée à un filtre d'excitation (470/40) permettant d'exciter le fluorophore. La lumière émise est filtrée à l'aide d'un filtre passe-bande 525/50 puis détectée par une caméra monochrome Axiocam 506 pilotée par le logiciel ZEN 2012 (Carl Zeiss).

L'effet du traitement sur la mobilité cellulaire a été analysé avec le logiciel Imaris 7.7 (Bitplane) avec le module Imaris Track qui permet de suivre au cours du temps des échantillons en 2D ou en 3D, de détecter leurs trajets/mouvements et de les analyser. La première étape de l'analyse consiste à détecter la position dans l'espace des différents objets d'intérêt (diamètre des objets à détecter > 1.8µm). Cette détection automatique est effectuée pour chaque temps d'acquisition. Un algorithme automatique va ensuite identifier les correspondances – en termes de position spatiale - entre les objets d'un temps de référence et ceux du temps adjacent, permettant ainsi de mesurer le déplacement de chaque objet.

Dans un premier temps, le *pourcentage d'objets ayant une distance absolue de déplacement > 5 microns*, correspondant à une mesure de la proportion de déplacements non-browniens, a été déterminé. Afin de mieux explorer la mobilité bactérienne, les déplacements non browniens (>5 microns) ont été filtrés selon leur durée (temps > 2.5 secondes) et leur taille correspondant à la distance absolue séparant un objet en début d'acquisition et le même objet en fin d'acquisition (distance > 5 μm), permettant d'analyser uniquement les trajectoires correspondant à des déplacements non-browniens (ou non-aléatoires).

Les différences de déplacement entre les 2 conditions « subcultures en présence de C102 » versus « subcultures en absence de C102 » ont été analysées selon plusieurs critères :

- 1- *distance absolue de déplacement*, correspondant à la distance (en micromètres) séparant un objet en début d'acquisition et le même objet en fin d'acquisition (Figure 4) ;
- 2- *durée totale de déplacement* en secondes, correspondant à la somme des temps de déplacement d'un objet de la première à la dernière acquisition ;
- 3- *longueur totale du déplacement* (en micromètres), correspondant à la somme des mouvements d'un objet sur la durée totale de déplacement (Figure 4);
- 4- *vitesse de déplacement* (en micromètres par seconde), définie comme étant la distance (en microns) entre le premier point en début d'acquisition et le dernier point en fin d'acquisition rapporté à la durée totale de déplacement ;
- 5- *linéarité du déplacement*, définie comme le rapport entre la distance absolue de déplacement et la longueur totale de déplacement.

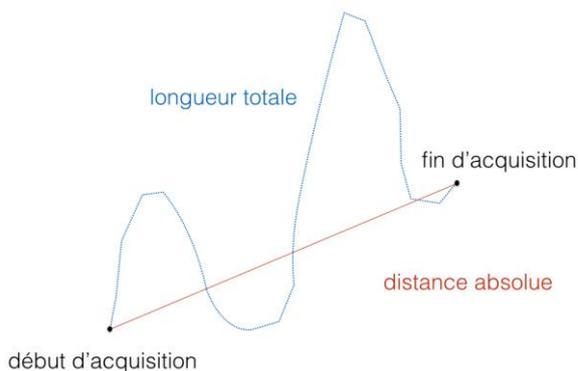


Fig 4 mesures de la longueur totale et de la distance absolue sur une durée de déplacement

Pour chaque critère, nous avons évalué l'effet de la condition « subcultures en présence de C102 » versus « subcultures en absence de C102 », à l'aide du t de Student non apparié pour échantillons à variances non égales.

3.2.1.8 Structure bactérienne par microscopie électronique par transmission (MET)

Cette expérience a été réalisée en collaboration avec le Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie, Faculté de Médecine Toulouse Rangueil (Université de Toulouse, France)

Les bactéries sont lavées au PBS (2mL de suspension à 10^8 UFC/mL, 10mL PBS, 2000 tours/mn, x3). Le culot est fixé par addition de 100 μ L de fixateur (Glutaraldehyde 1% v/v dans tampon Sorensen 0,1M,) et conservé en chambre froide jusqu'à manipulation.

Les bactéries sont colorées négativement par incubation l'acétate d'uranyle pendant 3 minutes : 20 μ L d'échantillon sont déposés sur une grille en cuivre recouverte par du collodion/carbone, après 1 minute, l'ensemble est coloré négativement par dépôt d'une goutte de solution aqueuse d'acétate d'uranyle (10s). Après élimination du surplus par papier filtre, les échantillons sont observés à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi HT7700 (80 kV).

Au moins trois zones représentatives par échantillon sont photographiées. Chaque photographie est gradée de 0 à +++ en termes de présence de pili et de flagelles. Les longueurs, largeurs et surfaces apparentes des bactéries sont mesurées par analyse d'image (Image J ; NIH).

Cette technique a été utilisée pour étudier les modifications de structure induites par le composé C102 (1%P/V)

- mis en contact avec UTI89 pendant 10j (10 subcultures) avant l'essai,
- mis en contact avec UTI89 pendant 10 subcultures avec retrait du produit les 10 subcultures suivantes,

par référence aux cultures en absence de C102.

3.2.2 *Expériences in vivo*

Etant donné la difficulté de sélection de souches sur la seule base des essais *in vitro*, des essais préliminaires ont été réalisés *in vivo*, chez la souris, pour 5 souches pré-sélectionnées, afin de définir leur capacité de colonisation vésicale et de passage à l'infection urinaire. L'objectif était de sélectionner la souche ayant la meilleure capacité de colonisation vésicale.

Sur la base des données de la littérature, de leur description (tableau 4) et des résultats des essais *in vitro*, 5 souches d'*E.coli* ont été pré-sélectionnées : ABU 83973, UTI89, MG1655, GGB1561 (souche parente MG1655, FimH+), CFT073.

Animaux et conditions générales d'expérimentation

Les animaux utilisés sont des souris femelles C-57BL6 de 8 semaines. Après réception (animalerie de l'UFR de Pharmacie, Toulouse), les souris ont été hébergées en cages collectives (5 souris par cage) pendant 7 jours, afin de leur permettre de s'acclimater en dehors de tout stress.

L'inoculation des animaux se déroulent toujours comme suit :

- anesthésie par inhalation d'isoflurane,
- désinfection du méat urétral (PVPI), et cathétérisme vésical sur guide
- vacuité vésicale vérifiée par expression digitale (pooling des urines pour détection de bactéries – contrôle de stérilité)
- instillation de 50 microlitres de suspension d'*E.coli* ajustée à 2.10^8 UFC/ml,
- maintien du sommeil pdt 45 min, en décubitus dorsal

Le sacrifice des animaux se déroule toujours comme suit :

- anesthésie par inhalation d'isoflurane
- sacrifice par injection intra-péritonéale de xylocaïne à 1%
- prélèvement des vessies par laparotomie médiane large, extension en pyjama, dégagement de la vessie, clampage au niveau du col vésical, extraction et dépose de la vessie pleine dans un cryotube de 10ml.

3.2.2.1 Inoculation de différentes souches d'*E.coli* en l'absence de pré-incubation avec C102

a) Cinétique de l'excrétion urinaire d'*E.coli* et persistance d'*E.coli* dans la paroi vésicale

Pour chacune des 5 souches pré-sélectionnées, 12 souris sont parallèlement inoculées avec la même souche et la même suspension (50 microlitres de suspension d'*E.coli* ajustée à 10^7 UFC/50 microlitres en tampon PBS (soit 2.10^8 UFC/ml). Les animaux sont ensuite placés dans une boîte « post-interventionnelle », en atmosphère d'isoflurane pendant 15 mn puis, placées par groupes de 12 en 10 cages métaboliques (5 groupes, 60 souris en tout).

A des temps définis (J1, J3, J7, J14), les animaux sont pesés, placés au plus par 6 dans des cages métaboliques sans eau de boisson, avec un buvard neuf. Après 1 heure de repos, 3 souris sont soustraites, à nouveau pesées, endormies et injectées (injection IP 200 microlitres de furosémide, 20mg/50ml). Elles sont ensuite sacrifiées et les vessies prélevées.

La caractérisation de la colonisation est réalisée par dénombrements des UFC d'*E.coli* au niveau de différents types d'échantillons :

-l'urine des mictions spontanées est recueillie sur buvard, le volume d'urine est estimé à partir du diamètre des taches sur les buvards (197). Il sera ainsi possible d'estimer, de manière non invasive le nombre d'UFC/ml d'urine. Les taches d'urine sont découpées, dispersées dans 10 ml de PBS pendant 30mn. Des dilutions sériées de raison 10 sont ensuite réalisées et 1ml de chaque dilution est ensemencé en gélose TS supplémenté en désoxycholate de sodium (milieu sélectif). La limite de détection est considérée à 10 UFC par échantillon.

Parallèlement à chaque temps d'analyse - J1, J3, J7, J14- 3 souris inoculées avec la même souche de chaque groupe sont prélevées :

- les **urines prélevées par sondage** avec expression digitale) pour dénombrement des UFC d'*E.coli* /ml. Les échantillons d'urine sont directement dilués au 1/100 et des dilutions de raison 10 sont ensuite réalisées, 1ml de chaque dilution étant ensemencé en milieu sélectif (gélose TS + désoxycholate de sodium). La limite de détection est considérée à 10 UFC/ml.

- les **vessies** sont collectées pour dénombrement des UFC/vessie (essai 1). Elles sont rincées par du PBS, broyées au Potter et diluées directement au 1/100 ; des dilutions de raison 10 sont ensuite réalisées, 1ml de la dilution est ensemencé en milieu sélectif (gélose TS + désoxycholate de sodium). La limite de détection est considérée à 100 UFC/vessie.

Trois souris de chaque groupe ont leur vessie prélevée à des fins d'analyse histomorphométrique (essai 2).

b) Histologie

Chaque vessie a été vidée puis distendue par 50 microlitres d'une solution de paraformaldéhyde dans du PBS (5%), fixation dans du liquide de Bouin (formol 5%), coloration au trichrome de Masson, et analysée par microscopie optique, en délimitant la même zone d'analyse.

c) Impact de l'inoculum sur la phase d'adhésion (T4h)

Traitement des souris

40 souris femelles C-57Bl6 de 8 semaines ont été utilisées.

La souche bactérienne étudiée est *E.coli* UTI89, telle qu'obtenue à l'issue de deux subcultures (2X24h) en l'absence de C102.

- 4 groupes de 10 souris, instillation de 50 microlitres de suspension d'*E.coli* ajustée à environ 2.10^8 /ml, 2.10^7 /ml, 2.10^6 /ml et 2.10^5 /ml.

- dénombrement des suspensions (témoin de comptage)

- Quatre heures (T4h) après l'inoculation, les vessies sont prélevées après distension par 50 microlitres de paraformaldéhyde à 5%, pour numération des UFC (9 souris/inoculum ; limite de détection 100 ufc/vessie) et histologie (1 souris/inoculum).

Dénombrement des UFC

Les vessies prélevées et rincées par du PBS sont broyées au Potter et diluées directement au 1/100 (1 vessie dans 10 ml de PBS). Des dilutions de série 10 sont ensuite réalisées et 1 ml de chaque dilution est ensemencé en gélose TS supplémenté en désoxycholate de sodium. La limite de détection est considérée à 100 UFC/vessie.

3.2.2.2 Effet sur l'adhésion à l'urothélium de souris inoculées avec *E.coli* UTI89, pré-incubée ou non avec C102

L'objectif est de savoir si *in vivo* C102 agit plutôt très précocement, dès l'adhésion (T4h) ou plutôt sur la colonisation, à des temps intermédiaires (J3).

Pré-incubation de la souche

La souche d'*E.coli* UTI89 a été entretenue sur milieu TS. Dix subcultures de 24 heures en milieu liquide, en présence du composé C102 à 1% (P/V), et en absence (culture témoin) ont été réalisées.

Avant essai, les bactéries sont récupérées et lavées au PBS. Les suspensions finales sont ajustées par mesure au spectrophotomètre (640nm) à environ $2 \cdot 10^8$ UFC/ml.

La capacité d'adhésion de la souche UTI89 aux cellules vésicales *in vitro* (pré-incubées ou non) a été contrôlée le jour de l'inoculation. L'activité d'adhésion d'UTI89 a également été contrôlée *in vitro (ex vivo)* sur les bactéries isolées à partir des broyats de vessies.

Essai 4h

50 souris femelles C-57Bl6 de 8 semaines ont été utilisées, en suivant le protocole général :

Gr. 1x20 souris inoculées avec 50 μ l $2 \cdot 10^8$ de la suspension de *E. coli* UTI89 ayant subi 10 subcultures en milieu TS en présence de C102 (Gr1)

Gr. 2x20 souris inoculées avec 50 μ l 10^7 de la suspension de *E. coli* UTI89 ayant subi 10 subcultures en milieu TS en l'absence de C102 à 1% (Gr 2)

Gr. 3x10 souris témoins inoculées avec 50 μ l de bouillon de culture stérile.

Les souris sont placées par groupe de 5 en cage métabolique.

Trois heures et 15 minutes après l'inoculation (restriction hydrique), les souris sont anesthésiées (anesthésie gazeuse) et subissent un cathétérisme vésical avec expression digitale

(vidange vésicale) suivie d'un rinçage. Les vessies sont prélevées après distension (euthanasie par injection intrapéritonéale de lidocaïne 1%, prélèvement vésical par laparotomie médiane).
Dénombrement des UFC : Les vessies prélevées et rincées par du PBS sont broyées au Potter et diluées directement au 1/100 (1 vessie pour 10 ml de PBS). Des dilutions séries de raison 10 sont ensuite réalisées et 1ml de chaque dilution est ensemencé en gélose TS supplémenté en Désoxycholate de sodium. La limite détection est considérée à 100 UFC/vessie.

Essai J3

Les vessies sont prélevées : numération des UFC/vessie (8 souris témoin et 16 souris/inoculum) et histologie (2 souris témoin et 4 souris/inoculum).

Conditions réglementaires des essais chez l'animal

- Certificat d'autorisation d'expérimenter sur animaux vivants n° 311155550 du 31 mai 2011
- Animalerie agréée (renouvellement de l'agrément D3155507, en date du 18 juin 2015)
- Avis du comité d'éthique US006 CREFRE.

3.3 Analyse des données

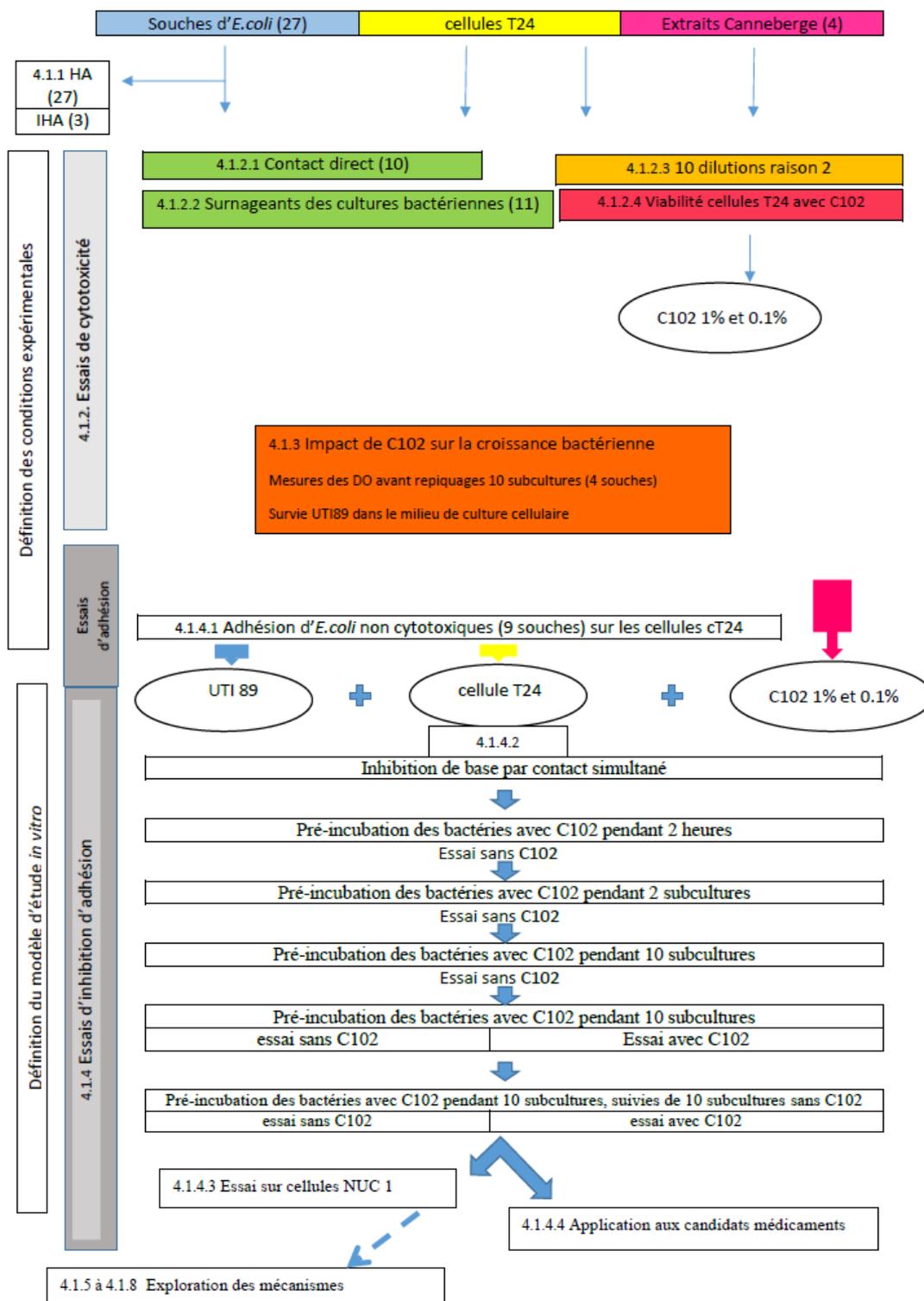
Les logiciels utilisés sont Excel (version 2010) et PRISME version 3

- le test T de Student ou des tests non paramétriques seront appliqués aux comparaisons de données qualitatives et semi-quantitatives ;
- le test de corrélation de Spearman sera utilisé pour les données quantitatives.
- Les comparaisons de pourcentages feront appel au test du Chi 2 corrigé (Yates) ou au test exact de Fischer.

4 Résultats

4.1 Essais *in vitro*

Compte tenu de la diversité des techniques et afin de favoriser la compréhension de notre démarche, les essais réalisés *in vitro* sont présentés dans la « flow chart » ci-dessous, avec un rappel des paragraphes correspondants.



Les résultats sont ensuite présentés, puis un tableau récapitulatif de l'ensemble est proposé en fin de chapitre.

4.1.1 Hémagglutination

Sur les 27 souches testées, trois seulement permettent d'obtenir, avec ou sans agitation, une hémagglutination sur GR de mouton : CIP54117, CIP54127 et CIP106531, qui sont des souches fécales. De ces souches, les 2 premières n'ont pas d'adhésines décrites, la 3^{ème} possède une adhésine fimbriale codée par le plasmide pAA2.

Pour ces 3 souches, l'hémagglutination n'est pas inhibée par adjonction de galactose, le mécanisme n'est donc pas mannose –dépendant, de type FimH.

4.1.2 Essais de cytotoxicité

Afin d'éliminer d'éventuels effets intrinsèques des différentes composantes lors des essais d'adhésion de nature à en gêner l'interprétation, nous nous sommes assurés que :

- les bactéries n'avaient pas un effet toxique direct sur la lignée cellulaire T24
- les surnageants des cultures bactériennes ne sont pas cytotoxiques sur les cellules T24
- l'extrait de canneberge retenu n'était pas cytotoxique
- le composé retenu ne modifiait pas de manière significative la croissance, a minima de certaines souches de *E. coli*
- le milieu de culture de la lignée cellulaire T24 (Mac Coy5A) n'interférait pas, en l'absence d'adjonction de sérum de veau fœtal, avec la viabilité bactérienne, que ce soit en présence ou non du composé retenu.

Chaque essai est précédé d'un contrôle microscopique de la qualité du tapis cellulaire.

4.1.2.1 Cytotoxicité directe des bactéries sur les cellules T24 (test au bleu Trypan)

Sur les 10 souches testées en toxicité directe, après 2 heures de contact, les souches classiquement utilisées dans la littérature (UTI89 et CFT073) présentent les pourcentages de mortalité cellulaire les plus élevés :

- CFT073 : 25-25,4%
- UTI89 : 5,4-15,8%
- CIP 53126 : 0-7,1%
- MG1655klmPc.film : 0-4%
- ABU 83972, MG1655, CRBIP14.31, CIP106531 et 54117 (K12) : 0% de cellules mortes, pour un témoin à 5,8% de cellules mortes.

Le test n'est pas interprétable pour la souche CIP 108106.

Une autre technique, le test XTT, mieux adaptée à la répétition des essais (n=32) a été utilisée afin de mieux quantifier les résultats.

4.1.2.2 Cytotoxicité des surnageants bactériens par test XTT

Les résultats sont présentés dans la figure 5.

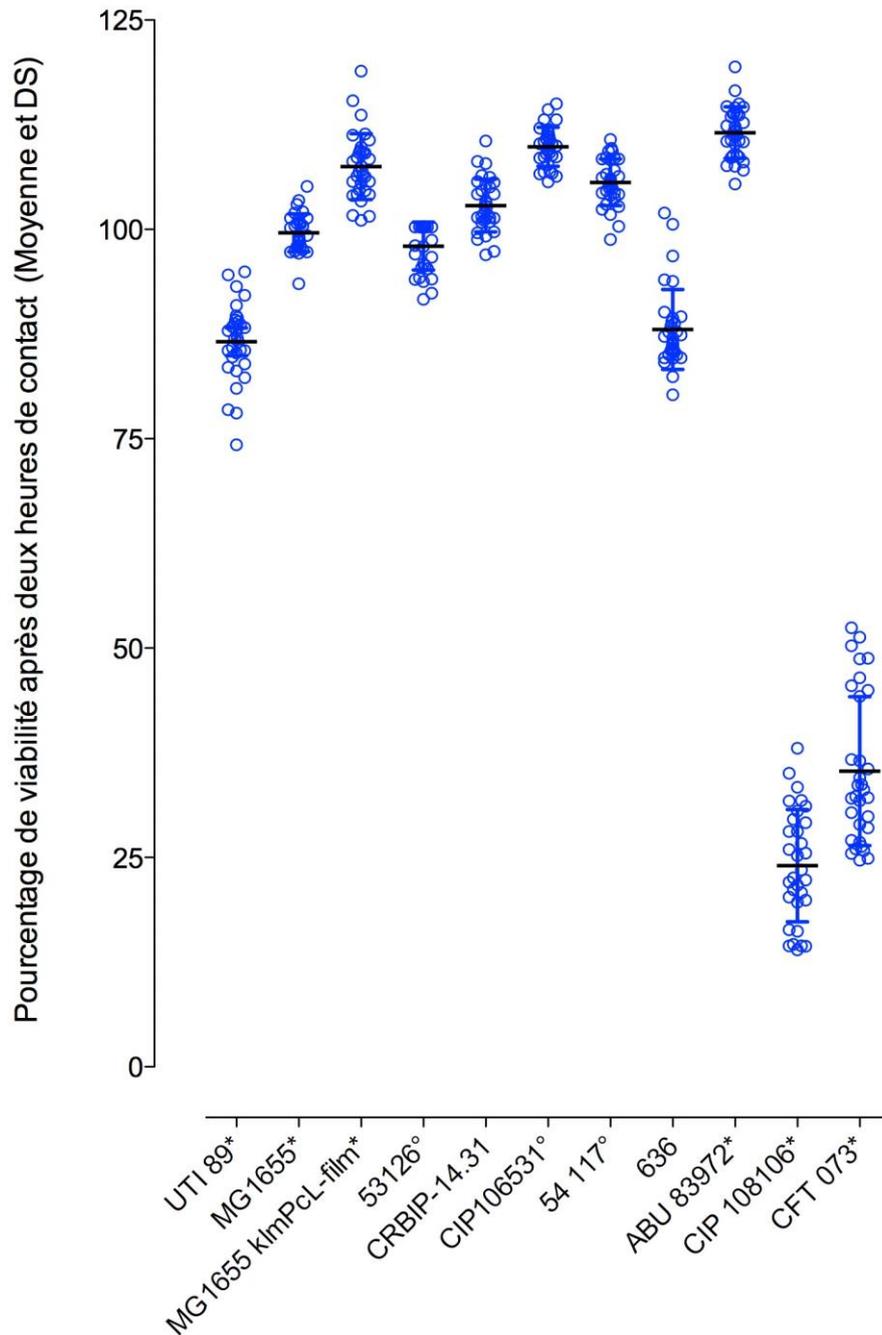


Figure 5. Pourcentages de cellules T24 viables (test XTT) après deux heures d'exposition aux surnageants de culture des 11 souches d'*E.coli*, après 2 heures de contact. * souches d'origine urinaire, ° souches d'origine fécale (moyenne \pm DS; n=32)

- le surnageant de la souche d'*E.coli* CIP 108106, apparentée à CFT073, est considérée cytotoxique vis-à-vis des cellules T24, après 2 heures de contact. Cette souche est connue pour produire de nombreuses toxines, alpha-hémolysine (HLYA) sous la gouvernance du gène hly, toxine vacuolisante/vat et toxine sécrétée auto-transportrice/sat mais pas le facteur nécrosant cytotoxique/CNF1 (8)

- le surnageant de la souche ABU 83972 n'induit aucun effet cytotoxique. Elle est caractérisée par une alpha-hémolysine non fonctionnelle. Toutefois, la souche peut produire la toxine CNF1 dont la fonctionnalité n'est pas vérifiée (8). Cette souche n'exprime pas de facteurs de virulence associés aux IU, ne porte pas de plasmides conjugatifs, et a un génome plus petit que les UPEC, la délétion de gènes de virulence se traduisant par l'absence d'expression des fimbriae et donc une adhésion nulle (108). Les essais d'adhésion (cf. ci-après) ayant confirmé le faible taux d'adhésion, cette souche sera utilisée comme témoin négatif dans certains essais ultérieurs.

- les autres souches testées ne montrent pas d'effet cytotoxique significatif, bien que la production d'une alpha-hémolysine, de CNF1 et de VAT soit connue chez UTI89, et celle d'une alpha-hémolysine et de VAT chez MG1655 (8). HLYA est produite par 50% environ des souches d'*E.coli* uropathogènes et est associée à des infections urinaires de sévérité clinique accrue.

4.1.2.3 Cytotoxicité des différents composés (extraits de canneberge) (test XTT)

Quatre extraits ont été testés à des concentrations variables (dilutions de raison 2), à partir :

- d'une concentration à 1% (P/V) pour les échantillons C102 (correspondant au produit commercialisé Urisanol[®]), C121, et C118,
- d'une concentration à 0,1% (P/V) pour l'échantillon BF 189-1

Le produit BF189-1 est non cytotoxique pour des concentrations $\leq 0,5\%$ (P/V)

Le produit C121 est non cytotoxique pour des concentrations $\leq 0,125\%$ (P/V)

Les produits C102 et C118 présentent un effet cytotoxique nul ou faible ($< 30\%$) aux concentrations testées après 2 heures de contact.

Le produit C102 correspondant au produit commercialisé, sera retenu pour les essais ultérieurs, aux concentrations 1 et 0,1% (P/V).

La figure 6 présente les résultats de cytotoxicité des différents composés de canneberge testés à différentes concentrations.

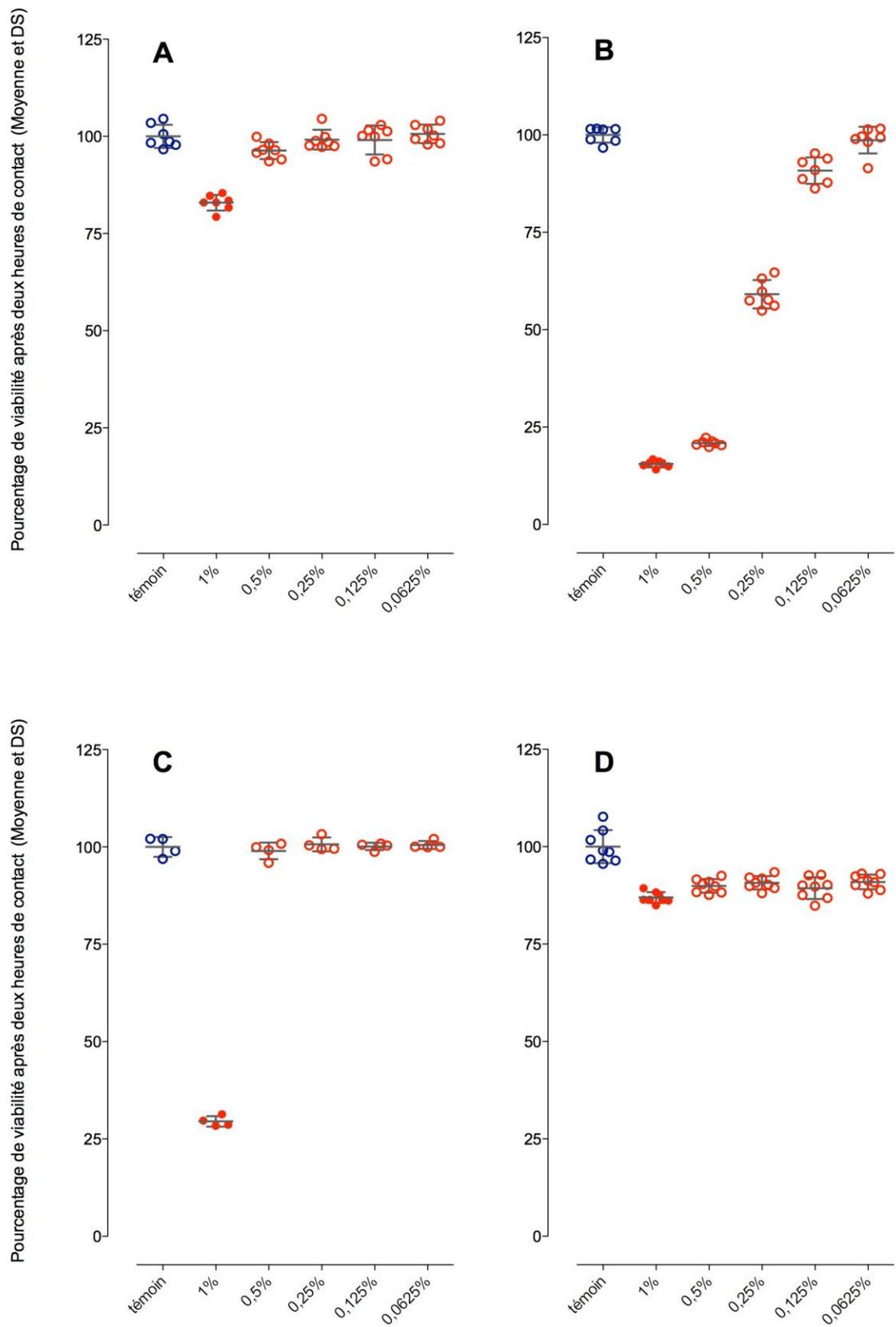


Figure 6. Pourcentages de cellules T24 viables (test XTT) après deux heures d'exposition à quatre composés différents (A:C102, B:C121, C:BF189-1, D:C118) et à différentes concentrations (1% à 0,0625%, P/V) (Moyenne \pm DS; n=8).

4.1.2.4 Cytotoxicité du composé C102 à 1 et 0,1% (test au bleu Trypan)

Afin de conforter le choix de C102, son absence de cytotoxicité a été confirmée par utilisation d'un colorant vital, en quadruplicat pour chacune des 2 concentrations après 2 heures de temps de contact.

Le pourcentage de cellules mortes varie selon les puits de 0 à 13% pour C102 à 1% (P/V) et de 0 à 3,7% pour C102 à 0,1%, le témoin non traité variant de 0 à 15,3%.

Le choix des concentrations de C102 est ainsi validé.

4.1.3 Croissance bactérienne en présence de C102 à 1 et 0,1%

L'impact du composé C102 sur la croissance bactérienne a été évalué en mesurant les valeurs de densité optique (DO) observées pour chaque souche avant chaque repiquage pendant 10 jours pour les souches CFT073, UTI89, MG1655 et sa souche parente.

Pour MG1655 et sa souche parente GGB1561, des valeurs de DO inférieures à celles du témoin sont notées pour les cultures en présence de C102 (effet dose-dépendant), démontrant une activité potentiellement inhibitrice de croissance au cours des repiquages. Les tests d'adhésion *in vitro* avec ces souches pourraient ainsi être faussés par l'activité anti-bactérienne « intrinsèque ».

Il n'y a pas de différence de valeurs de DO entre le témoin et les subcultures en présence de C102, pour la souche CFT073 (Figure 7).

Concernant UTI89, il n'y a pas de différence de valeurs de DO entre le témoin et C102 à 0,1%, un effet est cependant noté à 1% (Figure 7).

Afin de compléter cet essai, une évaluation de la population bactérienne a été réalisée à T0 et T2h dans le milieu de culture cellulaire, en présence de C102 à 0.1% et 1% (P/V).

Le nombre d'UFC/mL (moyenne ; n=2) passe de :

- $1,2 \cdot 10^8$ à $7,5 \cdot 10^8$ pour le témoin
- $1,8 \cdot 10^8$ à $2,1 \cdot 10^9$ en présence de C102 à 0.1% (P/V)
- $1,2 \cdot 10^8$ à $4,3 \cdot 10^8$ en présence de C102 à 1% (P/V)

Ces valeurs indiquent une légère croissance au temps 2h dans les 3 conditions. A T2h, les variations par rapport au témoin sont inférieures à 0.5 log.

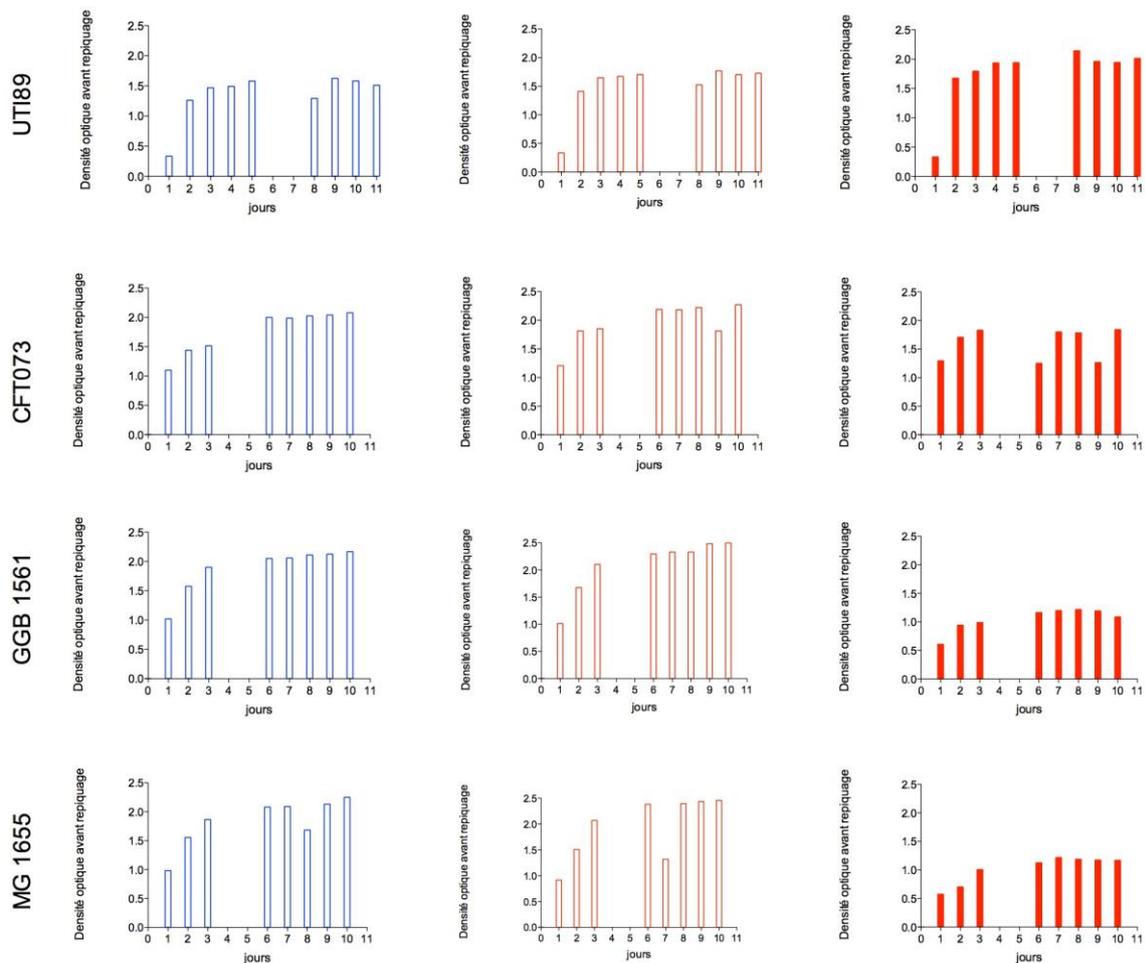


Figure 7. Suivi de la croissance bactérienne de 4 souches d'*E.coli* UTI89, CFT073, GGB1561 et MG 1655 par mesure de DO (640nm) pendant 10 jours, avant chaque repiquage, en l'absence de caneberry (bleu), en présence de C102 à 0,1% (P/V) (rouge pale) et C102 à 1% (P/V) (rouge vif).

4.1.4 Etude de l'adhésion et de l'inhibition d'adhésion par le composé C102

4.1.4.1 Capacité d'adhésion de neuf souches différentes d'*E.coli* aux cellules urothéliales humaines T24 après un temps de contact de 2 heures

Les pourcentages moyens d'adhésion des différentes souches d'*E.coli* testées (9) sont présentés dans la figure 8.

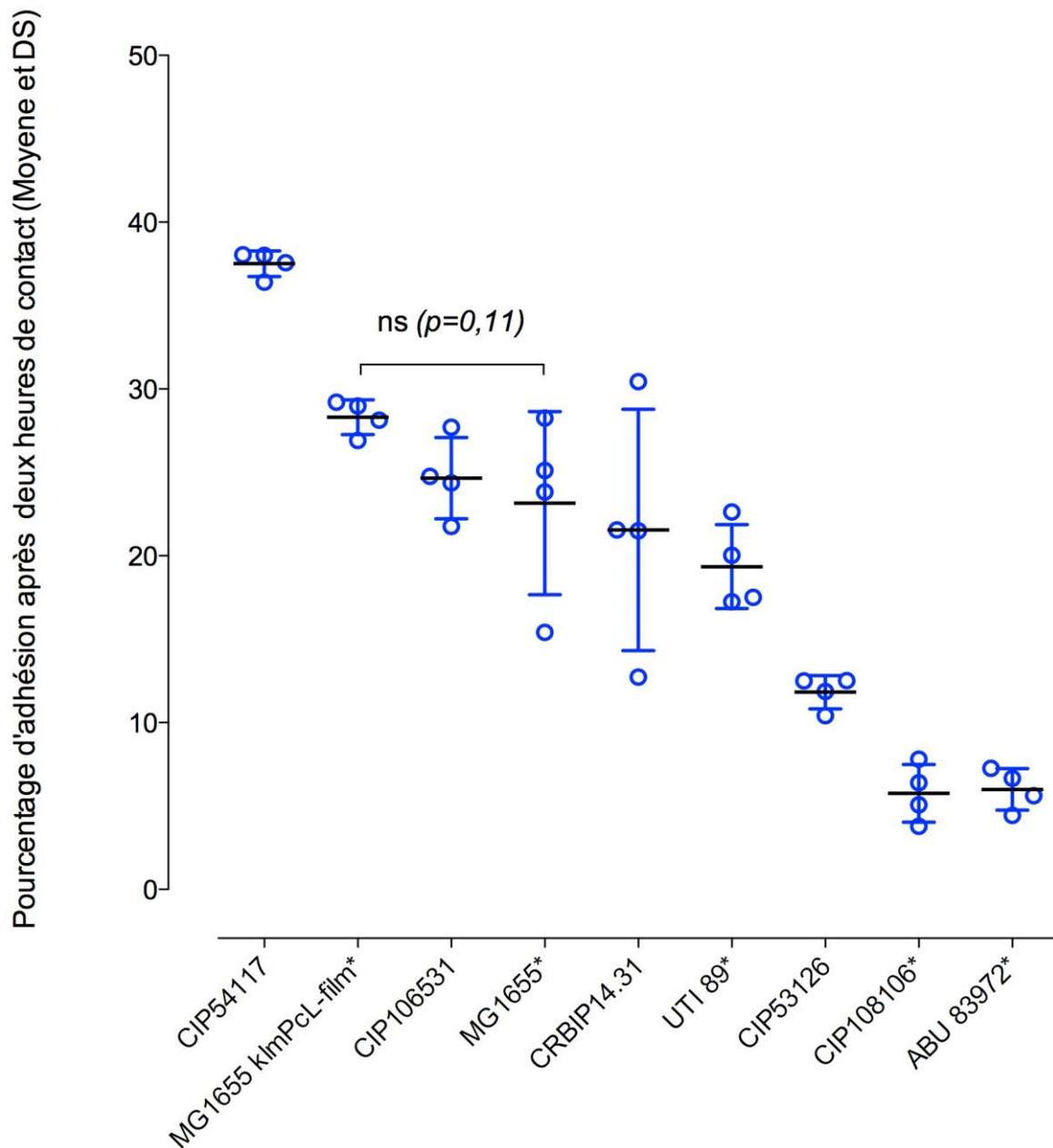


Figure 8. Pourcentages d'adhésion (cpmT2h-cpmT0/cpm totaux) de 9 souches d'*E.coli* aux cellules T24 après 2h de contact (moyenne \pm DS; n=4). * souches d'origine urinaire.

Les souches ABU 83972 et CIP 108106 sont caractérisées par une faible capacité d'adhésion aux cellules vésicales, *in vitro*.

Toutes les autres souches présentent un taux d'adhésion supérieur à 10%.

Ces résultats sont à rapporter à ce qui est connu pour ces souches :

- la souche CRBIP 14.31 ne possède pas de pili de type I et n'est pas hémagglutinante (198);

- la souche CIP106531 hémagglutine et possède plusieurs adhésines fimbriales (199);
- la souche CIP108106 est très proche de la souche CFT073, dont le génome a été entièrement décrypté (200). Il est particulièrement riche en gènes codant pour des adhésines fimbriales spécifiques (adhésines P, F1C, fimbriae de type 1), ainsi que divers autres facteurs de virulence : auto-transporteurs, systèmes de séquestration du fer et recombinases intervenant dans les changements de phase; production de toxine CNF1. Lors de nos essais antérieurs ces deux souches ont présenté une activité cytotoxique significative sur les cellules T24 après 2h de contact. Cette cytotoxicité pourrait expliquer les faibles taux d'adhésion détectés (altération du tapis cellulaire).
- la souche MG 1655 est une souche de référence, possédant des pili de type 1. Parmi les opérons codant pour des adhésines, l'opéron codant pour les pili de type I est commun à d'autres souches, dont la souche de référence MG1655. Cependant, bien qu'ubiquitaires, les fimbriae de type 1 ne sont pas tous identiques, et il a été rapporté une divergence de 53% entre les séquences d'acides aminés de CFT073 et celles de MG1655 (200). MG1655 présente un taux d'adhésion significatif (24.2%). La souche parente GGB1561, mutant issu de MG 1655 et surexprimant FimH de manière constitutive présente un taux d'adhésion supérieur (29.8%)
- la souche CIP 54117, d'origine fécale, est une souche hémagglutinante, fortement adhérente.
- la souche CIP 53216, également d'origine fécale, adhère fortement.
- la souche UTI89 est adhérente, confirmant les données de la littérature

Au total :

- La souche ABU83972, non cytotoxique et faiblement adhérente sera prise comme témoin négatif pour les essais ultérieurs.
- Les souches CFT073 et CIP 108106 sont exclues de par leur cytotoxicité et l'impact potentiel de cette propriété sur le test d'adhésion aux cellules T24.
- La souche MG 1655 et la souche GGB1561 surexprimant FimH, présentent une différence du taux d'adhésion de 5% ($p=0,11$), suggérant que **l'adhésion n'est pas exclusivement dépendante des pili 1 FimH.**
- Les souches d'origine fécale présentent des capacités d'adhésion significatives, similaires voire supérieures à celles des souches d'origine urinaire ; ceci soutient l'idée d'une origine fécale des UPEC.

L'ensemble de ces éléments nous a conduits à sélectionner la souche E.coli UTI89 pour les essais ultérieurs, sur les arguments suivants :

- *uropathogène, isolée d'une cystite humaine*
- *propriétés adhérentes aux cellules humaines T24*
- *non cytotoxique pour les cellules T24*
- *impact faible de C102 à 1% sur sa croissance*
- *utilisée dans la littérature.*

4.1.4.2 Inhibition de l'adhésion d'*E.coli* UTI89 aux cellules humaines T24 par C102, selon différentes modalités d'exposition

Différentes modalités d'exposition à C102 (1 et 0,1%) ont été étudiées, selon le nombre de subcultures en présence et en absence de C102, et selon la présence ou non avec C102 lors de la mise en contact bactéries-cellules T24 pendant les 2 heures d'essai d'adhésion, temps de contact habituel (83).

a) Inhibition de base

Les cellules T24 sont mises simultanément en contact avec la souche non pré-incubée UTI89 et C102 à 1 et 0,1%.

Aucun effet inhibiteur de l'adhésion n'a été observé ; de ce fait, nous avons poursuivi nos travaux en testant l'effet de subcultures en présence de C102, à 0,1 et 1% (P/V) préalablement à l'essai.

Lors de cet essai, l'absence d'effet cytotoxique en fin d'expérimentation a été contrôlée par coloration au bleu trypan (% de cellules mortes, moyenne \pm ET, n=4) :

Témoin	2.32 ± 1.97
C102 0.1% (P/V)	1.47 ± 1.77
C102 1% (P/V)	0 ± 0

b) Pré-incubation des cellules T24

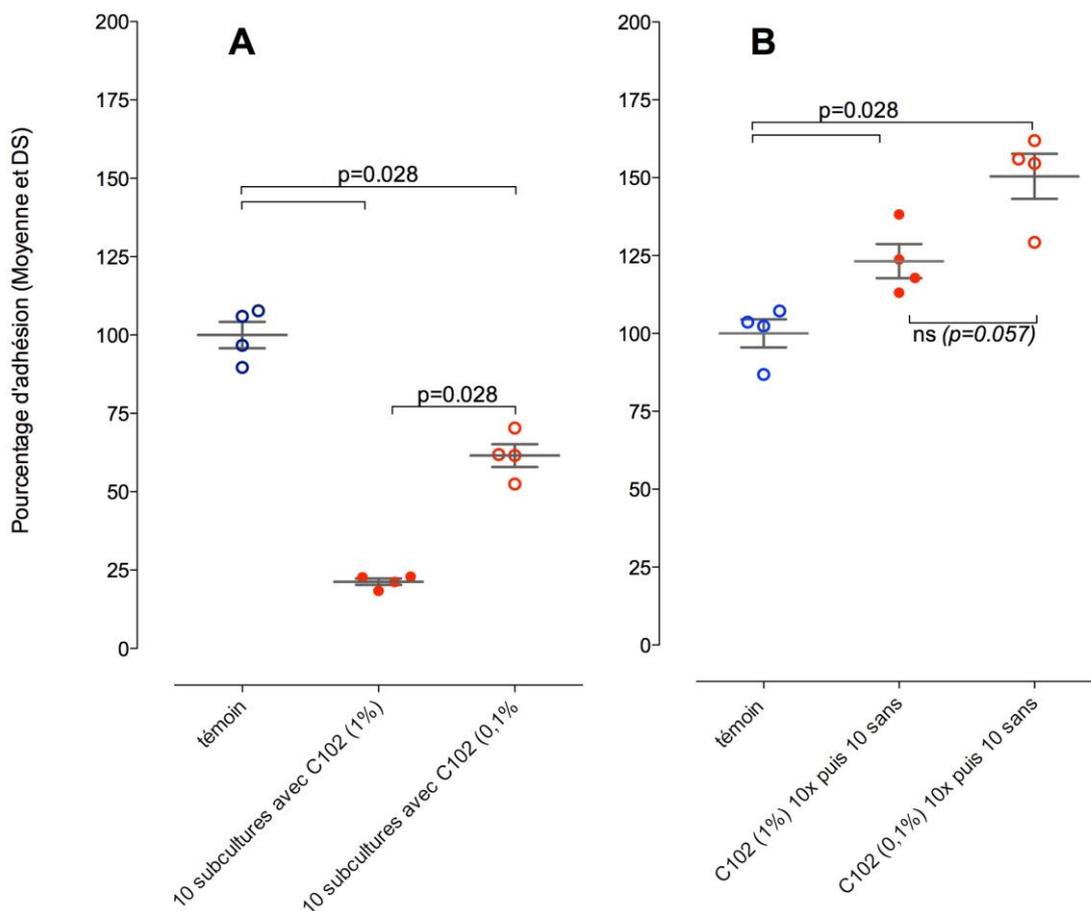
Les cellules T24 sont mises en présence de C102 à 1 et 0,1% pendant 2 heures avant l'essai. L'essai est réalisé avec la souche UTI89 non pré-incubée en présence de C102, et sans contact avec C102 pendant la durée de l'essai, l'adhésion moyenne est supérieure à 100%, aucun effet inhibiteur de l'adhésion n'est donc observé.

c) Pré-incubation de la souche d'UTI89 selon 3 protocoles différents

- **Pré-incubation de la souche UTI89** avec C102, essai avec contact avec C102 : les bactéries sont incubées ou non en présence de C102, pendant 2 ou 10 subcultures. Dans un premier temps, l'essai a été réalisé en présence de C102 (1% P/V). Ces conditions ne se traduisent par aucun effet inhibiteur d'adhésion, voire même un taux d'adhésion supérieur au témoin non traité.

- **Pré-incubation de la souche UTI89** avec C102, essai sans contact avec C102 : les bactéries sont incubées ou non en présence de C102 à 1 et 0.1% (P/V), pendant 2 ou 10 subcultures. L'essai lui-même a été réalisé en absence de C102 au vu des résultats des essais antérieurs (augmentation d'adhésion en présence de C102). **Dans ces conditions, nous observons un effet inhibiteur d'adhésion :**
 - **Fonction du nombre de subcultures : pour 1% (P/V) de C102, -33% d'adhésion après 2 subcultures et – 79% d'adhésion après 10 subcultures**
 - **Dose-dépendant : l'effet inhibiteur d'adhésion, observé en présence de C102 1% (P/V), devient plus faible en présence de C102 à 0.1% (P/V), -38% après 10 subcultures (vs -79%) et absence d'effet inhibiteur significatif après 2 subcultures (vs -33%).**

- **Pré-incubation de la souche en présence de produit, suivie de pré-incubation en l'absence de produit** : cet essai a été réalisé afin de définir si le phénomène observé était réversible ou non. Nous observons bien une réversibilité, avec des taux d'adhésion qui peuvent même être > 100% (Figure 9).



Figures 9. Pourcentages d'adhésion d'UTI89 (cpmT2h-cpmT0/cpm totaux) par C102 (0.1 et 1% (P/V)) selon différentes modalités d'exposition. A) après 10 subcultures en présence de C102 ; B) après 10 subcultures en présence de C102 suivies de 10 subcultures en absence de C102 (moyenne \pm DS; n=4 ; test de rang de Mann&Witney)

4.1.4.3 Etude *in vitro* sur les cellules de rein de souris NUC-1.

Confrontés à un modèle murin non contributif, nous avons évalué les limites en comparant *in vitro* l'adhésion d'*E.coli* UTI89 sur deux lignées de cellules eucaryotes, les cellules humaines T24 et cellules rénales murines NUC1.

Au préalable, les essais de cytotoxicité de C102 à différentes concentrations sur cellules NUC, en parallèle de nouveaux essais sur cellules humaines T24, ont été faits : pour les concentrations \leq 1%, C102 est non cytotoxique sur les deux lignées cellulaires après un temps de contact de 2 heures.

Le tableau 5 présente les valeurs des pourcentages d'inhibition de l'adhésion sur les trois souches d'*E.coli* testées et les deux lignées cellulaires eucaryotes, de carcinome urothélial de vessie humaine T24 et de rein de souris NUC-1.

Tableau 5. Comparaison des % d'adhésion et d'inhibition de l'adhésion par C102 sur cellules NUC-1 et T24

		UTI 89	MG1655	GGB1561
Cellules rénales de souris NUC1	Témoin	18.2%	11.4%	16.8%
	Adhésion	35.9	26.1	39
	Inhibition adhésion C102 1% (P/V)	36.6	284	128
Cellules de carcinome de vessie humaines T24	témoin	21.5	14.3	15.1
	Adhésion	2.5	23.1	32.5
	Inhibition adhésion C102 1% (P/V)	-88.9	192.5	118.3

C102 1% (P/V) ; 3 souches d'*E.coli* (UTI89, MG1655 et GGB1561) ; 2 lignées de cellules eucaryotes (NUC-1 et T24).

La canneberge selon les conditions de l'essai inhibe significativement l'adhésion d'*E. coli* UTI89 aux cellules épithéliales de vessie humaine (- 88,9%, tableau 21), confirmant nos résultats antérieurs.

Par opposition, les résultats de ces nouveaux essais d'adhésion montrent que le produit C102 à 1% (P/V) est sans effet sur l'adhésion des 3 souches d'*E.coli* retenues (UTI89, MG1655 et GGB1561) sur cellules murines NUC1, quels que soient les protocoles de pré-incubation des bactéries avec C102.

Une augmentation d'adhésion d'*E coli* UTI89 (+37%) aux cellules épithéliales de vessie de souris NUC-1 est même observée (tableau 5).

L'essai d'adhésion sur deux lignés cellulaires vésicales, humaines et murines, conforte le **choix *in vitro*, du modèle cellules de vessie humaine T24 et E.coli souche UTI89.**

4.1.4.4 Application du modèle *in vitro* à l'évaluation de candidats médicaments

Au départ, nous souhaitions définir un modèle d'évaluation de médicaments dérivés de la canneberge, aussi nous l'avons appliqué à trois préparations de canneberge transmises par l'industriel.

Le modèle 10 subcultures en présence du produit a été appliqué à l'évaluation de l'effet anti-adhésion des 3 produits développés par le Laboratoire Pierre Fabre :

- jus atomisé de canneberge, lot E600597
- fraction aqueuse, lot LW1911
- fraction éthanolique, lot LW1912

La figure 10 montre les résultats obtenus en pourcentages d'adhésion.

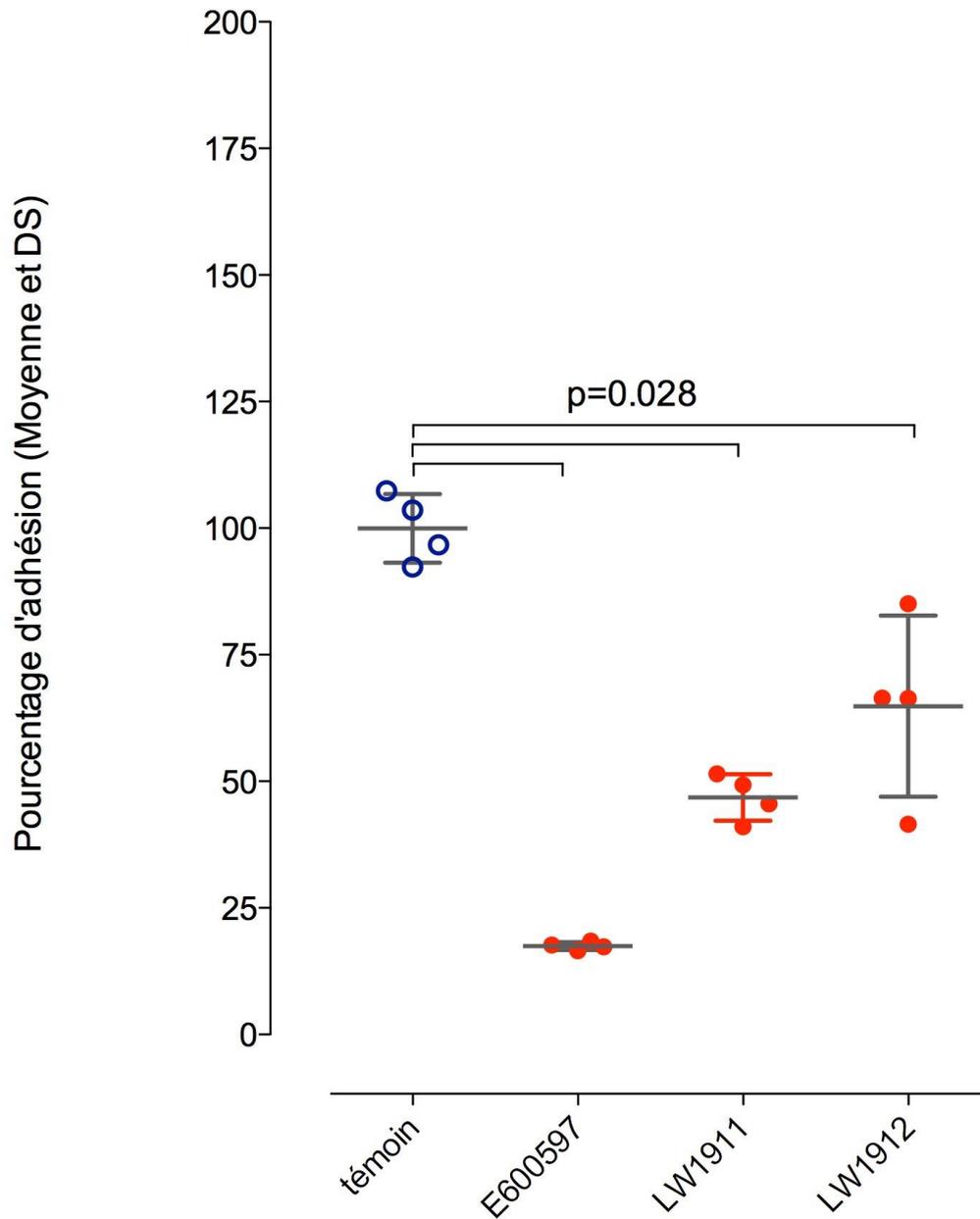


Figure 10. Pourcentages d'adhésion d'*E.coli* UTI89 aux cellules T24 en présence de 3 produits (E600597, LW1911 et LW1912) à la concentration de 1% (P/V) versus témoin (moyenne \pm DS; n=4, test de rang de Mann&Whitney).

Par comparaison au témoin, les 3 produits réduisent de façon significative l'adhésion, le plus efficace étant le jus atomisé de canneberge (-82,5%), qui s'avère être un lot de C102. Le fractionnement réalisé ne permet pas de « concentrer » l'effet canneberge : fraction aqueuse (-53.2%) et fraction éthanolique (-35.2%).

Le modèle défini *in vitro* s'avère discriminant pour évaluer l'efficacité de fractions et/ou de composés dérivés de la canneberge.

Le tableau 6 récapitule les différents essais *in vitro* avec les principaux résultats.

Tableau 6: Tableau récapitulatif des différents essais préliminaires, des différents essais d'adhésion et d'inhibition de l'adhésion, *in vitro*, et résultats obtenus

Type d'essai	Matériel	Technique	Particularités	Résultats	Commentaires
Hémagglutination	hématies	Technique d'agglutination (détection Ac agglutinant)	GR mouton	Titre <2 pour la plupart des souches Maximum 4 à 8	3 souches seulement agglutinent
IHA, inhibition hemagglutination	Hématies + mannose	Technique d'agglutination	GR mouton	négatif	Pas d'effet mannose
Survie des bactéries en suspension dans le milieu de culture cellulaire	Milieu de culture Mac Coy 5A sans SVF <i>E.coli</i> : UTI89, ABU83972, CFT073 MG1655	Mise en présence des bactéries et du milieu de culture sans cellules T24 0,3 à 1,3.10 ⁸ UFC/ml à T0	Dénombrement à T2h	6,5 .10 ⁸ UFC/ml à 1,7.10 ⁹ UFC/ml à T2h	Viabilité bactérienne maintenue dans les conditions d'essai d'adhésion aux cellules eucaryotes
Cytotoxicité Cytotoxicité du contact direct des souches d' <i>E.coli</i> avec les cellules T24	ABU 83972, MG1655, CRBIP14.31, CIP106531 et 54117 (K12) MG1655klmPc.film53126 UTI89, CFT073 CIP 108106 Cellules T24	Test au bleu Trypan	% de cellules mortes (colorées en bleu) après 2h de contact	CFT073 : 25% UTI89 : 15,8% Autres souches : ≤ 7.1% Témoin : 5.8%	CFT 073 cytotoxique
Cytotoxicité des surageants de cultures bactériennes	CIP 108106 MG1655 et la parente surexprimant	Méthode XTT (technique colorimétrique par réaction enzymatique)	Contact T0 et T2h	CIP 108106 et CFT073 cytotoxiques	Éliminées

sur cellules T24	FimH, UTI89, ABU83972, CFT073 Cellules T24			Autres souches : non ou faiblement cytotoxiques	Sélection témoin négatif : ABU83972
Cytotoxicité des différents extraits de canneberge sur les cellules T24	4 extraits (effet-dose) : C102 , C121 , C-118 BF189-1 cellules T24	Méthode XTT	Contact T0 et T2h	Variable selon les extraits C102 ≤ 1% non cytotoxique sur cellules T24	Choix C102 à une concentration ≤ 1%
Contrôle de viabilité des cellules T24 exposées à C102	C102 à 1% et 0,1% Cellules T24	Test au bleu Trypan	T2h	C102 1% : T0 < 6% T2h < 13%	Confirmation choix C102 à 1% et 0,1%
Impact de C102 sur la croissance bactérienne	UTI89, MG1655, GGB1561, CFT073 C102 à 0,1 et 1% vs témoin	Mesure DO avant chaque repiquage quotidien des bactéries pendant 10 jours		Effet « antibactérien » du C102 sur les souches MG1655 GGB1561 Effet nul ou faible sur les souches CFT073 et UTI89	C102 utilisable dans le modèle sur UTI89
Adhésion Screening des souches d'E. coli : adhésion aux cellules vésicales T24	ABU83972 CIP106531 et 54117 (K12) MG1655klmPc.film 53126 UTI89 , CFT073 CIP 108106 Cellules vésicales T24	Marquage Adénine tritiée Co-culture 1. 10 ⁷ bact/ml + cellules	Lecture T0 et T2h	Taux d'adhésion moyen 10 à 20% UTI89 25%	Pas de différence entre souche FimH+ (GGB1561 et sa parente MG1655) UTI89 retenue

Inhibition adhésion	Matériel	Technique	Particularités	Résultats	Commentaires
Inhibition de base	C102 à 1% Cellules T24 <i>E.coli</i> UTI89	Inhibition de l'adhésion de bactéries marquées par de l'adénine tritiée	Contact simultané à T0-T2h de UTI 89, Cellules T24 et C102 1% et 0,1%	+463% +64%	Absence d'effet inhibiteur
Inhibition de l'adhésion pour un temps de contact de 2 heures	C102 à 1% Cellules T24 <i>E.coli</i> UTI89	Inhibition de l'adhésion de bactéries marquées par de l'adénine tritiée	Pré-incubation de cellules T24 en présence de C102 1% et 0,1% pendant 2h Essai T0 -T2h sans contact C102	+ 618% + 107%	Absence d'effet inhibiteur lorsque contact aigü
Inhibition de l'adhésion de bactéries obtenues après subcultures Protocole 1	<i>E.coli</i> UTI 89 Cellules T24 C102 1% et 0,1%	Inhibition de l'adhésion de bactéries marquées par de l'adénine tritiée	2 Subcultures (2X24 h) en présence de C102 1%et 0,1% Essai T0 -T2h sans contact C102	-31 à -35% d'inhibition pour C102 à 1% + 71 à + 85% pour C102 à 0,1%	Effet inhibiteur de l'adhésion de bas niveau pour C102 à 1% Aucun effet pour C102 à 0,1%
Protocole 2	Cellules T24 <i>E. coli</i> UTI 89 C102 1% et 0,1%	Inhibition de l'adhésion de bactéries marquées par de l'adénine tritiée	10 Subcultures (10X24h) en présence de C102 1% et 0,1%	Environ - 80% avec C102 à 1% (-78,7% et -88,9%)	Adaptation de la souche bactérienne aux subcultures, avec une forte diminution de l'adhésion pour C102 à

			Essai T0 -T2h sans contact avec C102	- 38,4% avec C102 à 0,1%	1%, mais pas à 0,1% (dose-dépendante)
	<i>E.coli</i> UTI 89 Cellules T24 C102 1%	Inhibition de l'adhésion de bactéries marquées par de l'adénine tritiée	10 subcultures (10x24h) en présence de C102 1%		Effet pré-incubation des bactéries Effet moindre si contact en présence de produit pendant l'essai
			Essai T0-T2h avec contact C102 1%	Pas d'inhibition : + 94 % à + 169%	
			Essai T0-T2h sans contact C102 1%	Inhibition d'adhésion de - 15 à - 63%	
Protocole 3	Cellules T24 <i>E.coli</i> UTI89 C102 1% et 0,1%	Inhibition de l'adhésion de bactéries marquées par l'adénine tritiée	10 subcultures (10X24h) en présence de C102 à 1% suivies de 10 subcultures en l'absence de C102		Effet réversible
			Essai T0-T2h sans contact C102 1% et 0,1%	Absence d'inhibition de l'adhésion : + 23% pour C102 1% + 50% pour C102 à 0,1%	
			Essai T0-T2h avec contact C102 1% et 0,1%	Inhibition de l'adhésion - 20% pour C102 1% + 33 % pour C102 à 0,1%	

En conclusion:

- *la pré-incubation des cellules T24 seules avec C102 ne se traduit pas par une inhibition de l'adhésion*
- *la mise en contact des bactéries et des cellules T24 avec C102 uniquement pendant l'essai, sans pré-incubation des bactéries ne se traduit pas par un effet inhibiteur de l'adhésion*
- *la pré-incubation des bactéries avec C102 avant l'essai se traduit par un effet inhibiteur de l'adhésion, lorsque le nombre de subcultures est suffisant, l'effet n'est donc pas immédiat.*
- *l'inhibition de l'adhésion augmente avec le nombre de subcultures en présence de C102*
- *l'effet observé est dose-dépendant*
- *l'effet est réversible puisqu'il disparaît lorsque UTI89 est à nouveau cultivée en l'absence de C10*

4.1.5 Etude des ARNm par séquençage

L'étude des ARNm par puce Affymetrix Agilent a été réalisée dans deux conditions d'essai :

- *E. coli* UTI89 avec 10 subcultures successives en absence de C102
- *E. coli* UTI89 avec 10 subcultures successives en présence de C102 à 1% (P/V)

Quatre échantillons de chaque condition ont été analysés.

Le contrôle de qualité des arrays présente peu de bruit de fond, ne gênant pas l'analyse, tant pour les conditions « témoin » que « C102 1% ». Les scatterplots des arrays après normalisation témoignent de la bonne qualité des échantillons (Figure 11).

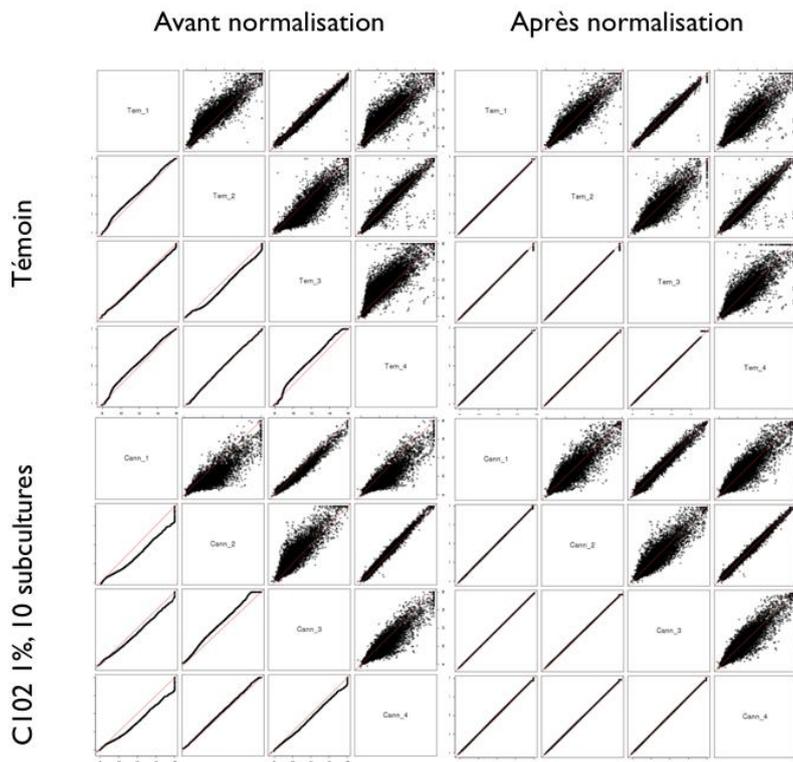


Figure 11 : Scatterplots des huit échantillons analysés (E. coli UTI89 : Témoin et après 10 subcultures sur C102 à 1%)

Les échantillons T1 et T3, et T2 et T4 ont des distributions similaires et présentent une variabilité avec les autres échantillons de la condition « témoin ». Les points sont assez bien alignés le long de la droite ; la reproductibilité des arrays après normalisation reste bonne même s'il demeure une variabilité entre les échantillons.

Les échantillons « C102 » 1 et 3, et « C102 », 2 et 4, ont des distributions similaires et présentent une variabilité avec les autres échantillons « C102 »

L'échantillon 1 se différencie des autres, mais la normalisation en atténue l'effet.

Il y a donc une bonne reproductibilité entre les arrays, après normalisation.

La distribution des log₂ intensités est semblable d'un array à l'autre. Il n'y a pas de différence notable de distribution entre les conditions. La normalisation par les quantiles est appliquée sur toutes les conditions.

Dans ces conditions, l'analyse réalisée conduit à la définition de modifications d'expression significatives en fonction de la différence des valeurs log observées pour les échantillons traités par la canneberge, versus le groupe témoin (tableau 7).

Tableau 7 : Nombre de gènes dont l'expression a été affectée de façon significative et force de l'impact

Log2 fold change	P value corrigée	Nb de gènes concernés
-2 à +2	0,01	74
-0,5 à +0,5	0,01	288
-2 à +2	0,05	101
-0,5 à +0,5	0,05	606

Expression en Log de variation, C102 à 1% pendant les 10 subcultures, par comparaison au témoin.

Les modifications d'expression sont quantifiées par la différence observée entre l'expression en logarithme du groupe canneberge et celle du témoin. Des valeurs négatives correspondent à une répression sous canneberge, des valeurs positives à une promotion. Dans les tableaux suivants, les chiffres entre parenthèses correspondent aux différents loci.

Le tableau 8 résume les essais réalisés, ainsi que les modifications de transcription significatives (grandes fonctions).

Tableau 8. Protocole et principaux résultats de l'essai ARNm par puce Affymetrix

Type d'essai	Matériel	Technique	Particularités	Résultats	Commentaires
Séquençage ARN	UTI89 sur milieu TS C102 à 1% Puce à ADN Agilent	quadriplicates témoin et C102	X10 subcultures avec et sans C102 1%	Sur 10659 gènes testés, 1069 ont des variations significatives en fonction de l'exposition à C102	4 groupes de gènes varient après exposition au C102 : - adhésines - transporteurs de fer - chémotactisme - flagelles

Les modifications d'expression significatives (réduction) détectées sont décrites dans les chapitres suivants pour les 3 grandes fonctions impactées que nous avons retenues.

4.1.5.1 Modifications induites par C102 sur la transcription des gènes impliqués dans les fimbriae

Plusieurs protéines fimbriales sont sous-exprimées, après 10 subcultures sur C102 à 1% (P/V) versus le témoin (10 subcultures sans C102).

Le tableau 9 présente les gènes du système fimbrial intervenant dans la structure et l'assemblage des pili et la régulation de l'adhésion, dont l'expression est réduite de façon statistiquement significative après 10 subcultures en présence de C102 1% (P/V). Nous remarquons qu'il s'agit de: *fim I*, *fim H*, *fim G*, *fim C*, *fim F*, *fim D*, *fim A*, *sta B*, *foc F*, *foc D*, *sta D*, mais pas de *papG*

Tableau 9. Répression du transcriptome correspondant aux fimbriae

Gène	Description	Log2 Fold change	P value ajustée BH
<i>fimI</i>	fimbrial protein (b4315)	-3,20	0,00003
<i>fimF</i>	fimbrial morphology (b4318)	-2,84	0,00022
<i>fimF</i>	FimF protein precursor (c_5397)	-2,71	0,00022
<i>fimD</i>	outer membrane protein	-2,83	0,00029
<i>fimG</i>	fimbrial morphology (b4319)	-3,14	0,00041
<i>fimA</i>	major type 1 subunit fimbrin (Z5912)	-4,17	0,00054
<i>staB</i>	putative F1C and S fimbrial switch Regulatory (c-1238)	-2,42	0,00194
<i>focF</i>	F1C minor fimbrial subunit F precursor (c_1243)	-2,25	0,00556
<i>focD</i>	F1C fimbrial usher (c_1242)	-1,33	0,00700
<i>fimA</i>	type-1 fimbrial protein, A chain precursor (c_5393)	-1,01	0,02762
<i>fimH</i>	minor fimbrial subunit, D-mannose specific adhesin (b4320)	-2,26	0,00072
<i>fimA</i>	major type 1 subunit fimbrin (b4314)	-4,01	0,00073
<i>staD</i>	putative minor F1C fimbrial subunit precursor (c_1240)	-1,43	0,00118
<i>fimC</i>	periplasmic chaperone, required for type 1 fimbriae (b4316)	-3,95	0,00118

4.1.5.2 Modifications induites par C102 sur la transcription des gènes impliqués dans la chaîne moléculaire du chimotactisme.

Les gènes dont l'expression est modifiée de façon significative par C102 sont ceux correspondant à différentes protéines intervenant dans le chimotactisme ainsi qu'à des récepteurs transmembranaires. Deux représentations en sont données, par Vulcanoplot qui permet de visualiser la variation, négative en l'espèce et l'intensité de la variation (Figure 12), et par diagramme de KEGG qui cible, en les faisant figurer en vert, les protéines impactées (Figure 13) par l'exposition à C102 1% (P/V) au cours des 10 subcultures.

Le tableau 10 précise l'ampleur de la modification avec de degré de confiance qui peut lui être affecté.

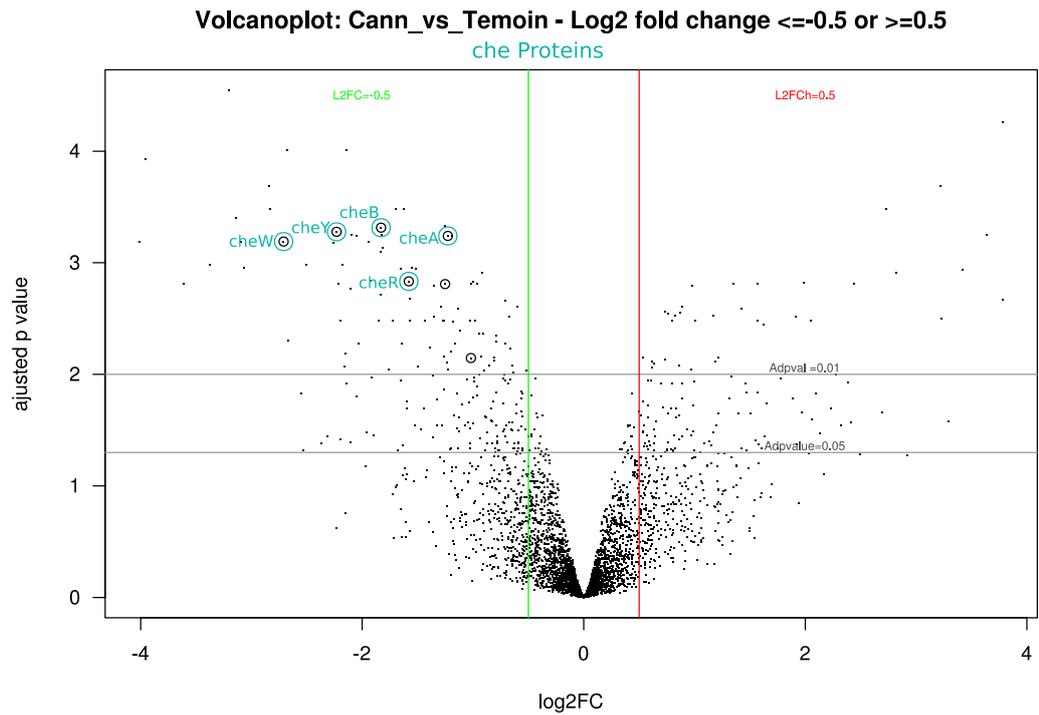


Figure 12. Représentation par volcanoplot du transcriptome correspondant à la chaîne de chémotactisme dont l'expression est diminuée par l'exposition à C102 (cadrant supérieur gauche).

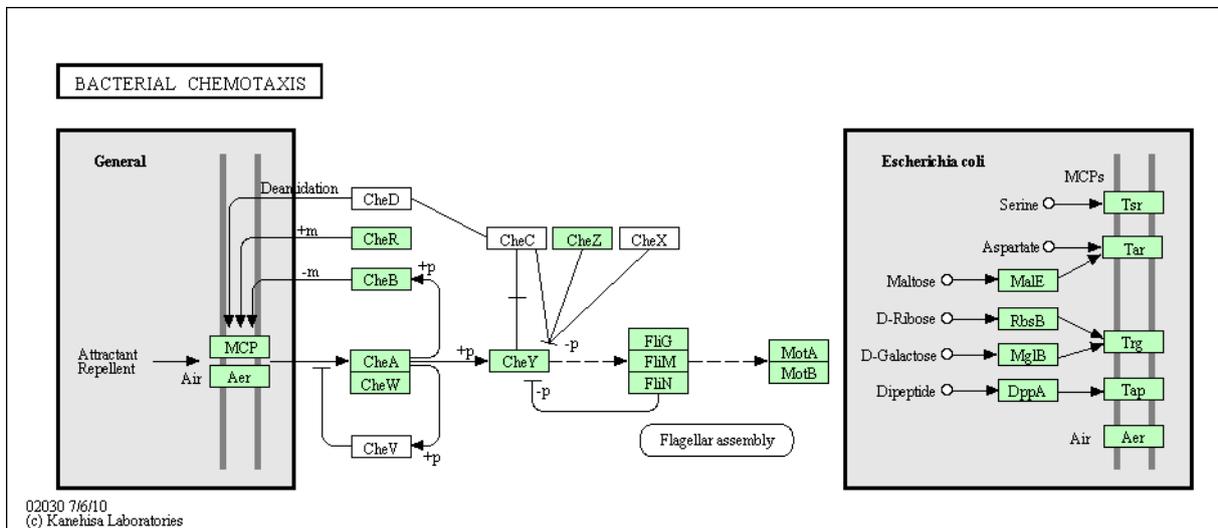


Figure 13. Diagramme de KEGG explicitant, en vert, les modifications portant sur la cascade de chémotaxie.

Tableau 10. Répression par C102 1% (P/V) du transcriptome correspondant aux protéines du chémotactisme.

Gène	Description	Log2 Fold change	P value ajustée BH
<i>cheB</i>	response regulator for chemotaxis (b1883)	-1,83	0,00042
<i>cheA</i>	sensory transducer kinase between chemo-signal receptors and CheB and CheY (b1888)	-1,23	0,00046
<i>cheY</i>	chemotaxis regulator transmits chemoreceptor signals to flagellar motor components (b1882)	-2,23	0,00047
<i>cheW</i>	positive regulator of CheA protein activity (b1887)	-2,71	0,00068
ECs 2591	CheY protein phosphatase (ECs2591)	-1,43	0,00077
<i>cheR</i>	response regulator for chemotaxis	-1,58	0,00140
<i>tar</i>	methyl-accepting chemotaxis protein II, aspartate sensor receptor (b1886)	-1,25	0,00155
<i>cheZ</i>	chemotactic response CheY protein phosphatase	-1,25	0,00371
<i>cheZ</i>	chemotaxis protein cheZ (c_2296)	-1,31	0,00423
<i>tap</i>	methyl-accepting chemotaxis protein IV, peptide sensor receptor (b1885)	-1,02	0,00695
<i>tsr</i>	methyl-accepting chemotaxis protein (c_5430)	-1,30	0,00803
<i>tsr</i>	methyl-accepting chemotaxis protein I, serine sensor receptor (b4355)	-1,03	0,01820

4.1.5.3 Modifications induites par C102 sur la transcription des gènes impliqués dans la construction et la mobilité des flagelles

Les gènes dont la transcription est modifiée interviennent dans la synthèse de la protéine flagellaire (fliO, flgB, flhB, fliM), l'empilement des unités de flagelline (fliC, fliE, fliA et fliG) permettant la construction de la portion externe du flagelle, ainsi que de l'anneau constituant la base du rotor flagellaire, incluant des protéines impliquées dans le fonctionnement même du moteur et la rotation du flagelle.

Le tableau 11 décrit les principaux gènes du flagelle dont l'expression est réprimée et l'intensité de la modification, illustrés dans les figures 14 (vulcanoplot) et 15 (diagramme de KEGG indiquant en vert les transcriptions impactées).

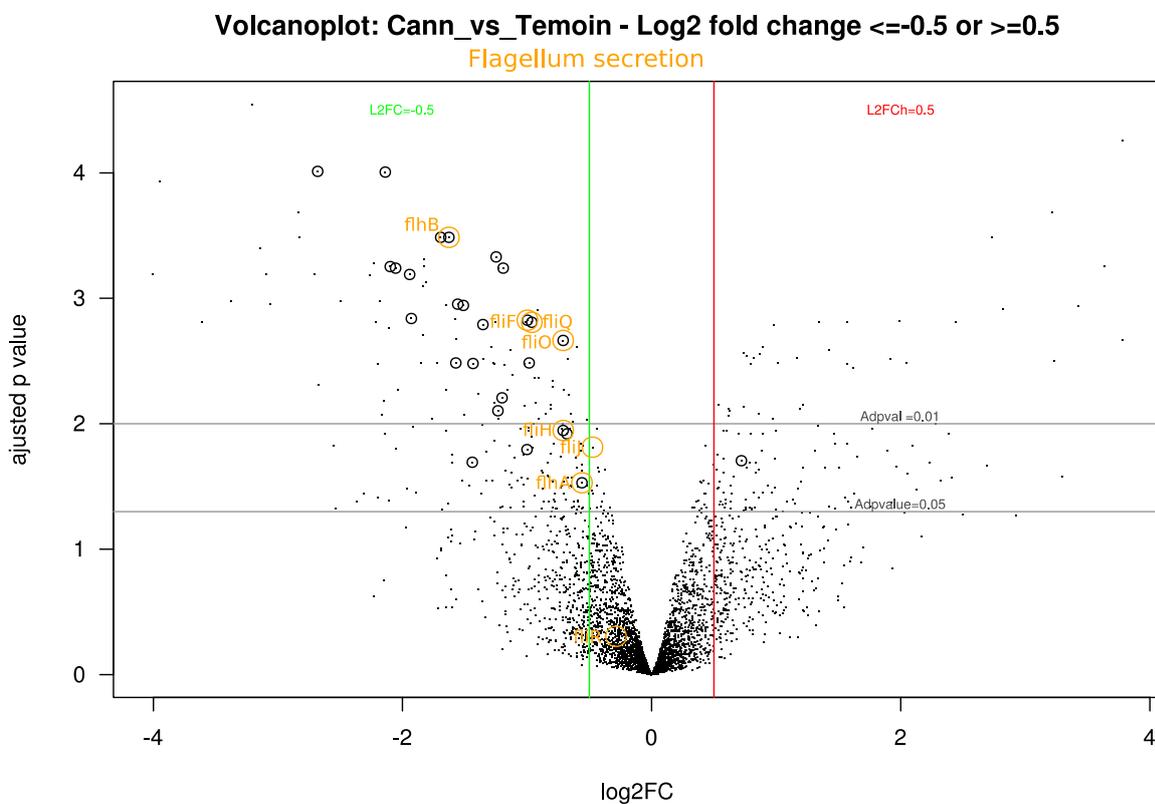


Figure 14. Représentation par vulcanoplot du transcriptome correspondant à la structure et à la fonction du flagelle dont l'expression est diminuée par exposition à C102.

Tableau 11. Répression par C102 1% (P/V) du transcriptome correspondant au flagelle.

Gène	Description	Log2 Fold change	P value ajustée BH
ECs2662	flagellin (Ecs2662)	-4,52	0,00029
ECs2686	flagellar protein FliO (ECs2686)	-0,56	0,00187
<i>flgA</i>	flagellar biosynthesis	-1,00	0,01640
<i>flgB</i>	flagellar biosynthesis, cell proximal portion of basal-body rod (b1073)	-1,43	0,00371
<i>flgC</i>	flagellar biosynthesis, cell proximal portion of basal-body rod (b1074)	-1,35	0,00170
<i>flgD</i>	flagellar biosynthesis, initiation of hook assembly (b1075)	-1,56	0,00109
<i>flgE</i>	flagellar biosynthesis, hook protein (b1076)	-1,69	0,00028
<i>flgF</i>	flagellar biosynthesis, cell proximal portion of basal-body rod (b1077)	-1,51	0,00109
<i>flgG</i>	flagellar biosynthesis, cell-distal portion of basal-body rod (b1078)	-2,68	0,00016
<i>flgH</i>	flagellar biosynthesis, basal-body outer-membrane L (b1079)	-1,19	0,00046
<i>flgI</i>	Homolog of Salmonella P-ring of flagella basal body (b1080)	-0,68	0,01048
<i>flgJ</i>	flagellar biosynthesis (b1081)	-1,23	0,00827
<i>flgK</i>	flagellar biosynthesis, hook-filament junction protein (b1082)	-2,10	0,00050
<i>flgL</i>	flagellar biosynthesis	-1,94	0,00067
<i>flhA</i>	flagellar biosynthesis	-0,56	0,02563
<i>flhB</i>	Putative part of export apparatus for flagellar proteins (b1880)	-1,63	0,00028
<i>flhD</i>	Regulator of flagellar biosynthesis, acting on class 2 operons	0,72	0,01794
<i>fliC</i>	flagellar biosynthesis flagellin, filament structural protein (Z3013)	-4,57	0,00029
<i>fliD</i>	flagellar biosynthesis	-2,05	0,00056
<i>fliF</i>	flagellar biosynthesis	-1,00	0,00113
<i>fliH</i>	flagellar biosynthesis	-0,71	0,00995
<i>fliI</i>	Flagellum –specific ATP synthase (c_2358)	-0,77	0,00445
<i>fliL</i>	flagellar biosynthesis (b1944)	-0,98	0,00307
<i>fliM</i>	flagellar biosynthesis, component of motor switch and energizing, enabling rotation and determining its direction (b1945)	-2,14	0,00016
<i>fliN</i>	flagellar biosynthesis, component of motor switch and energizing, enabling rotation and determining its direction (b1946)	-1,25	0,00029
<i>fliO</i>	flagellar biosynthesis (b1947)	-0,71	0,00128
<i>fliO</i>	Flagellar protein fliO (c2364)	-0,67	0,00140
<i>fliO</i>	flagellar biosynthesis (Z3037)	-0,61	0,00202
<i>fliP</i>	Flagellar biosynthetic protein flip precursor (c_2365)	-1,09	0,00023
<i>fliQ</i>	flagellar biosynthetic (b1949)	-0,96	0,00118
<i>fliS</i>	flagellar biosynthesis	-1,20	0,00623
<i>fliT</i>	flagellar biosynthesis	-1,44	0,02254

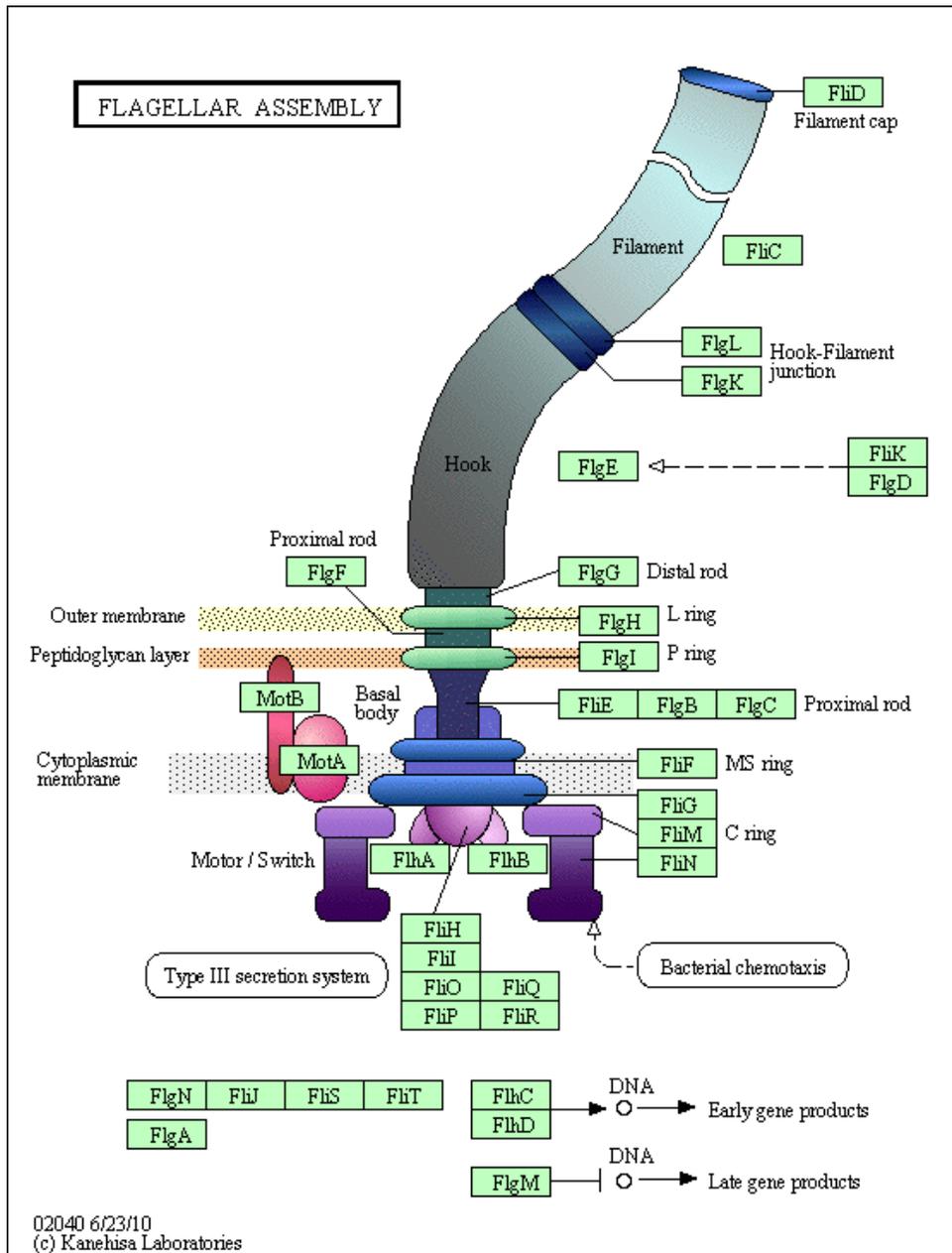


Figure 15. Diagramme de KEGG représentant les éléments composant le flagelle, avec en vert ceux qui sont modifiés par l'exposition à C102.

De la même manière que dans le chapitre précédent concernant la chimotaxie, le diagramme de KEGG (figure 15) concernant l'assemblage du flagelle souligne bien la répression de l'expression de tous les gènes impliqués dans la synthèse, l'assemblage et le fonctionnement du flagelle.

L'action du composé C102 s'exerce donc à plusieurs niveaux ; du fait de l'importance de l'impact sur le flagelle, nous avons choisi d'explorer son expression fonctionnelle par la mobilité.

4.1.6 Etude fonctionnelle de la mobilité bactérienne

Les premiers essais de mobilité fonctionnelle d'*E. coli* UTI89 ont été réalisés en ensemençant les géloses molles, adaptées à chacun des trois types de mobilité, « twitching », « swimming » et « swarming », avec les bactéries obtenues après 10 subcultures en présence ou non de C102 1%.

Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 16): nous constatons qu'il existe une différence de diffusion significative entre les bactéries pré-incubées ou non en présence de C102, 48 heures après le dépôt sur la gélose sur les milieux « twitching » (mouvements à type de reptations, en lien avec les pili de type IV) et « swarming ». Le swarming repose sur des rotations très rapides du flagelle, de plusieurs cellules bactériennes en "rafts" à la surface d'un milieu solide vers un objectif. La mobilité de type swimming, également liée au flagelle, concerne la bactérie individuellement et en milieu planctonique ; elle n'est pas impactée de façon significative.

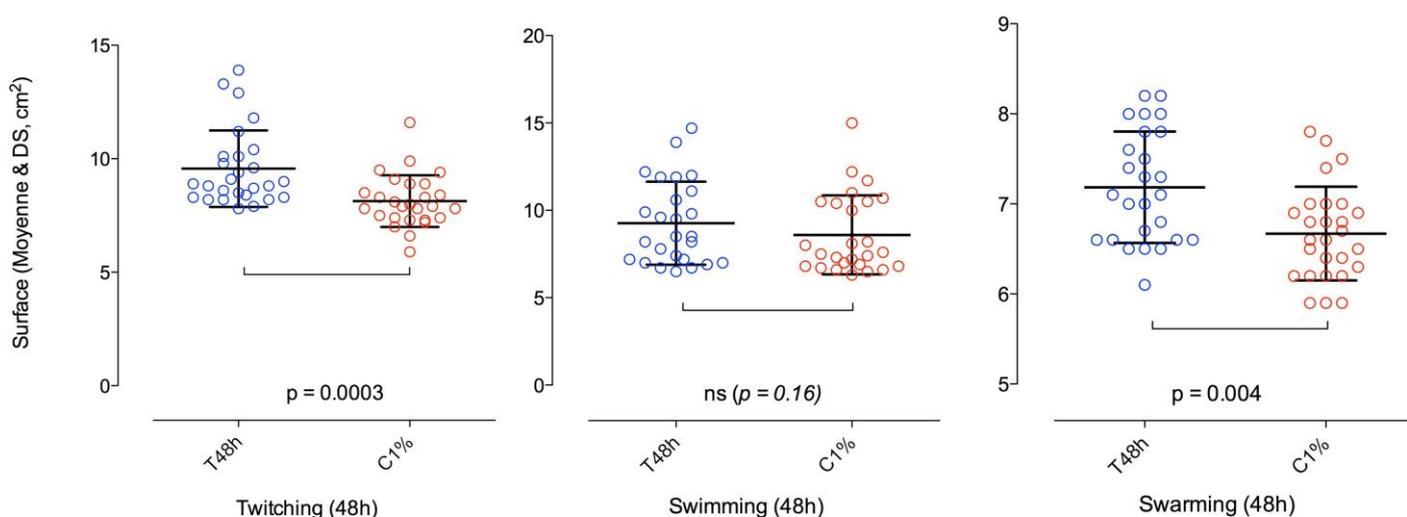


Figure 16. Surfaces des culture bactérienne en cm² après 10 subcultures en présence de C102 à 1% (P/V) (en rouge) et en l'absence (en bleu) mesurées à 48h sur gélose molle de composition adaptée à l'étude de chacun des types de mobilité « twitching », « swimming » et « swarming », (moyenne ± DS; n=27, test de rang de Mann & Whitney).

Afin de conforter les résultats du transcriptome par l'impact sur la fonction, nous avons choisi d'approfondir l'étude du « swarming », en mesurant les aires de colonies observées 8 heures, 24 heures et 48 heures après ensemencement de géloses « swarming » contenant ou non C102

à 1% ou 0,1% (P/V) avec des *E.coli* UTI89 obtenus après 10 subcultures en présence ou non de C102 à 1% (P/V) (5 géloses par condition) (Figure 17).

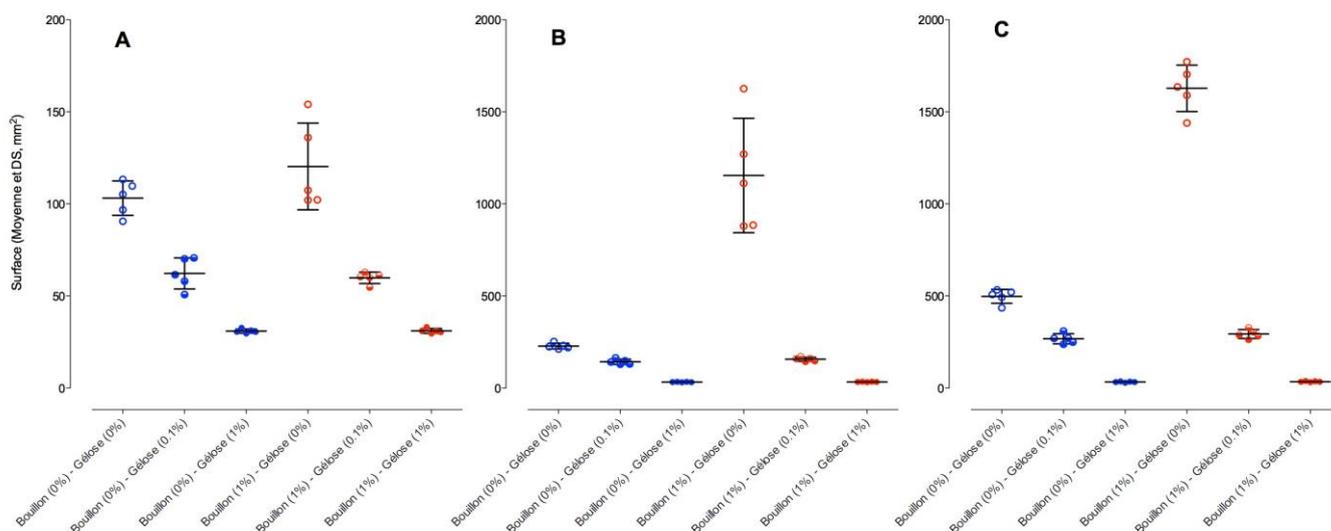


Figure 17. Surfaces des colonies, en mm², observées à 8h (A), 24h (B) et 48h (C), selon six conditions d'exposition ou non à C102: a) subcultures et gélose sans C102 b) subcultures sans C102, gélose avec C102 0,1% (P/V) c) subcultures sans C102 gélose avec C102 1% (P/V) d) subcultures C102 1% (P/V) et gélose sans C102 e) subcultures C102 1% (P/V) et gélose avec C102 0,1% (P/V) f) subcultures C102 1% (P/V) et gélose avec C102 1% (P/V) (moyenne ± DS; n=5).

Dans chaque graphique de la figure 17, les différences observées pour la même condition de culture (bouillon) selon différentes condition de gélose (0%; 0,1%, 1% de C102 P/V) sont statistiquement significatives ($p=0,008$, test de rang de Mann & Whitney). La pré-incubation avec C102 se traduit par une moindre surface de la culture dans tous les cas où la culture se fait elle-même en présence de C102. Cet effet est **dose-dépendant** puisque nous constatons une limitation de la diffusion de la colonie quand la gélose comporte de la canneberge, avec une moindre inhibition pour la gélose à 0,1% par rapport à celle à 1% C102 (P/V). En revanche, lorsque UTI89 a été pré-incubé en présence de C102, mais que la culture est faite sur une gélose ne contenant pas de C102 nous observons un "excès" de surface, en faveur d'un **effet "rebond"**.

Ces observations ont été confirmées lors d'une seconde série d'essais réalisée avec UTI89 ayant subi 10 subcultures en absence ou présence de C102 à 1% P/V et ensemencement sur gélose « swarming » contenant ou non du C102 à 1% P/V. Pour cet essai, 15 réplicats ont été réalisés avec prise d'images.

Les images (figure 18) présentent une série de gélases "swarming" prises au hasard parmi les 15 séries de 4 boîtes numérotées. Les 4 boîtes correspondent à 4 conditions différentes, selon que les subcultures ont été faites ou non en présence de C102 1% (P/V) et que les gélases ensemencées contenaient ou non du C102 1% (P/V). Les images des 14 autres séries de boîtes sont superposables.

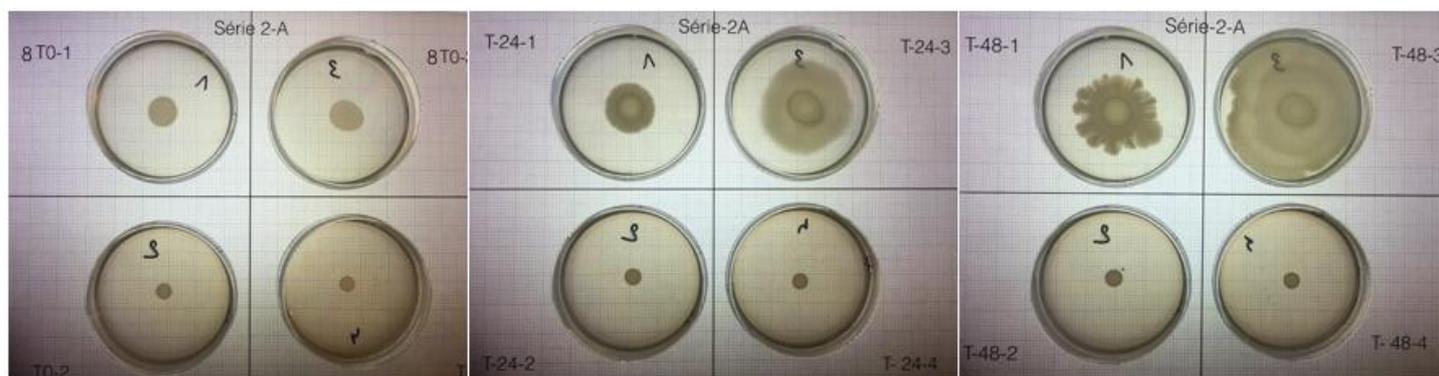


Figure 18. Swarming : Condition 1 : subcultures témoin & gélose témoin. Condition 2 : subcultures témoin & gélose avec C102 (1%). Condition 3 : subcultures en présence de C102 (1%) & gélose témoin. Condition 4 : subcultures en présence de C102 (1%) & gélose avec C102 (1%). Lecture à : T8h, T24h et T48h.

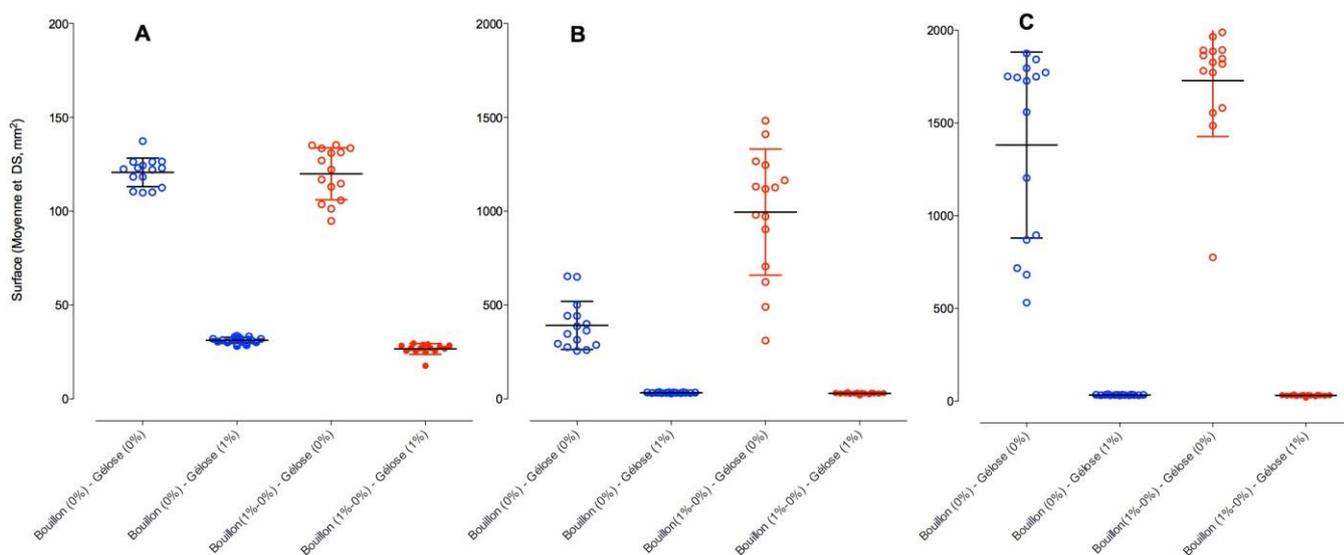


Figure 19. Surfaces des cultures d'UTI89 (mm^2) mesurées à A : 8 heures, B : 24 heures et C : 48 heures, sur les boîtes de gélose « swarming », selon les différentes conditions d'exposition ou non de C102 (1%). a) subcultures témoin & gélose témoin. b) subcultures témoin & gélose avec C102 1% (P/V). c) subcultures en présence de C102 1% (P/V) & gélose témoin. d) subcultures en présence de C102 1% (P/V) & gélose avec C102 1% (P/V), (moyenne \pm SD ; n=15, $p < 0,0001$, test de rang de Mann&Whitney).

Les surfaces de recouvrement des colonies ont été mesurées aux 3 temps, 8, 24 et 48 heures pour les 15 boîtes de culture correspondant à chacune des 4 conditions. (Figure 19). Dans chaque graphique les différences observées pour la même condition de culture (bouillon) selon différentes condition de gélose (0% et 1% de C102 P/V) sont très hautement significatives ($p < 0,0001$, test de rang de Mann & Whitney).

Ainsi, sur gélose comportant du C102 (sans notion de subcultures en présence de C102) (figures 17 et 19 en bleu; figure 18, conditions 2 et 4), on note une inhibition de la diffusion des bactéries à partir du spot d'inoculation.

Dans le cas où 10 subcultures sur C102 ont été réalisées avant dépôt sur gélose avec C102, la présence de C102 dans la gélose maintient l'effet inhibiteur du phénomène de swarming (figure 18: condition 4).

En revanche, dans le cas où 10 subcultures sur C102 ont été réalisées avant dépôt sur gélose sans C102 (figure 17: en rouge; figure 18: condition 3), on observe un développement important de la colonie, développement fonction de la durée d'incubation. Ces résultats démontrent l'effet réversible déjà observé (tests d'adhésion aux cellules T24), mais au-delà de cette observation, les bactéries diffusent rapidement sur les géloses sans C102 avec à nouveau un avantage apparent pour celles préalablement cultivées en présence de canneberge.

Au total

Les essais réalisés avec subcultures des bactéries en présence ou non de C102 et sur géloses molles sans C102 ne montrent pas de réduction significative de la mobilité quelle qu'elle soit. En revanche, la présence de C102 dans le milieu gélosé test se traduit par une réduction significative des diamètres de croissance et donc des surfaces colonisées. Ce phénomène est observé que les bactéries aient été ou non préalablement incubées en présence de C102.

L'effet inhibiteur du swarming nécessite donc un contact permanent avec C102, il s'épuise lorsque la bactérie n'est plus en contact avec C102 (multiplication bactérienne en absence de C102). L'absence d'effet observé sur gélose sans C102, malgré les 10 subcultures en présence de C102 pourrait être lié au nombre important de générations lors de la réalisation du test permettant la réversibilité des effets (adhésion aux cellules T24) et des modifications d'expression géniques observées.

4.1.7 Microscopie à champs large

Cette méthode nous a permis d'étudier la mobilité de *E. coli* UTI89 en fin de série de 10 subcultures en présence ou non de C102, directement dans le milieu de culture utilisé ; ceci limitant le biais éventuel noté lors des essais de mobilité sur gélose.

Six paramètres ont pu être mesurés (figure 20):

- a. La proportion de bactéries ayant des **déplacements > 5 microns**, correspondant à des mouvements non browniens, et présidant à la définition des cinq paramètres suivants
- b. la **distance absolue de déplacement** étant définie comme la distance (en microns) séparant la bactérie au premier point d'acquisition et au dernier point d'acquisition
- c. **durées totales de déplacement**, en secondes, correspondant à la somme des temps de déplacement de la bactérie entre la première et la dernière acquisition
- d. **longueur totale du déplacement**, en microns, correspondant à la somme des mouvements effectués par la bactérie sur la durée totale de déplacement
- e. **vitesse de déplacement** de la bactérie pendant le suivi (en microns par seconde), défini comme la longueur totale rapportée à la durée totale du déplacement
- f. la **linéarité de déplacement**, ou rectitude du déplacement de la bactérie, définie comme le rapport entre la distance absolue et la longueur totale des déplacements

et comparés entre les deux groupes d'*E.coli* UTI89, exposés et non exposés à C102 1% pendant les 10 subcultures.

Les moyennes des valeurs mesurées sur 4 observations dans chacun des deux groupes d'*E.coli* UTI89 (subcultures en présence et en absence de C102 1%) figurent dans le tableau 12, sur la première ligne la moyenne des proportions de bactéries suivies ayant des déplacements >5 microns, puis les moyennes des mesures effectuées pour les 5 paramètres de mobilité retenus.

Tableau 12. Observations des mouvements d'UTI89 en microscopie à champ large.

paramètres	10 Subcultures UTI89		p
	En présence de C102 moyenne ±DS	En l'absence de C102 moyenne ±DS	
% déplacements >5 μ	5,98±2,8	58,6±20,5	<0,05
Distance absolue (μ)	7,9±1,0	20,9±7,8	<0,05
Durée totale (secondes)	65,2±12,5	22,5±7,2	<0,01
Longueur totale (μ)	74,6±9,9	40,2±15,1	<0,05
Vitesse (μ /seconde)	1,3+/-0,3	5,2+/-2,7	0,0586
rectitude	0,15±0,05	0,58±0,04	<0,001

Proportion moyenne (moy±DS) de bactéries ayant des déplacements >5μ (en grisé), et parmi elles, moyenne (moy±DS) de mesures effectuées pour les cinq autres paramètres de mobilité retenus (distance absolue (μ), durée totale (s), longueur totale (μ), vitesse (μs⁻¹) et rectitude) (moyenne ± SD ; n=4, T de Student non apparié).

Ainsi, en présence de pré-incubation avec C102 :

- un plus petit nombre de bactéries a des déplacements > à 5 microns
- leur distance absolue de déplacement est plus faible
- leur durée totale de déplacement est plus élevée
- la longueur totale est plus élevée
- la vitesse de déplacement est plus lente, mais la différence est à la limite de la significativité
- la rectitude (ou linéarité) est moindre

alors qu'en l'absence de pré-incubation avec C102, les bactéries sont plus nombreuses à parcourir des distances de plus de 5 μm, plus rapidement, selon des trajectoires plus rectilignes et orientées, et finalement plus « efficaces » (Figure 18).

Les bactéries exposées à C102 ont perdu pratiquement toute possibilité de déplacement rapide.

Nous disposons en outre de films dans lesquels les bactéries non exposées se déplacent essentiellement de façon linéaire, extrêmement rapide et orientée, alors que les bactéries exposées à C102 ont plutôt des mouvements de très faible amplitude, peu efficaces, de type brownien.

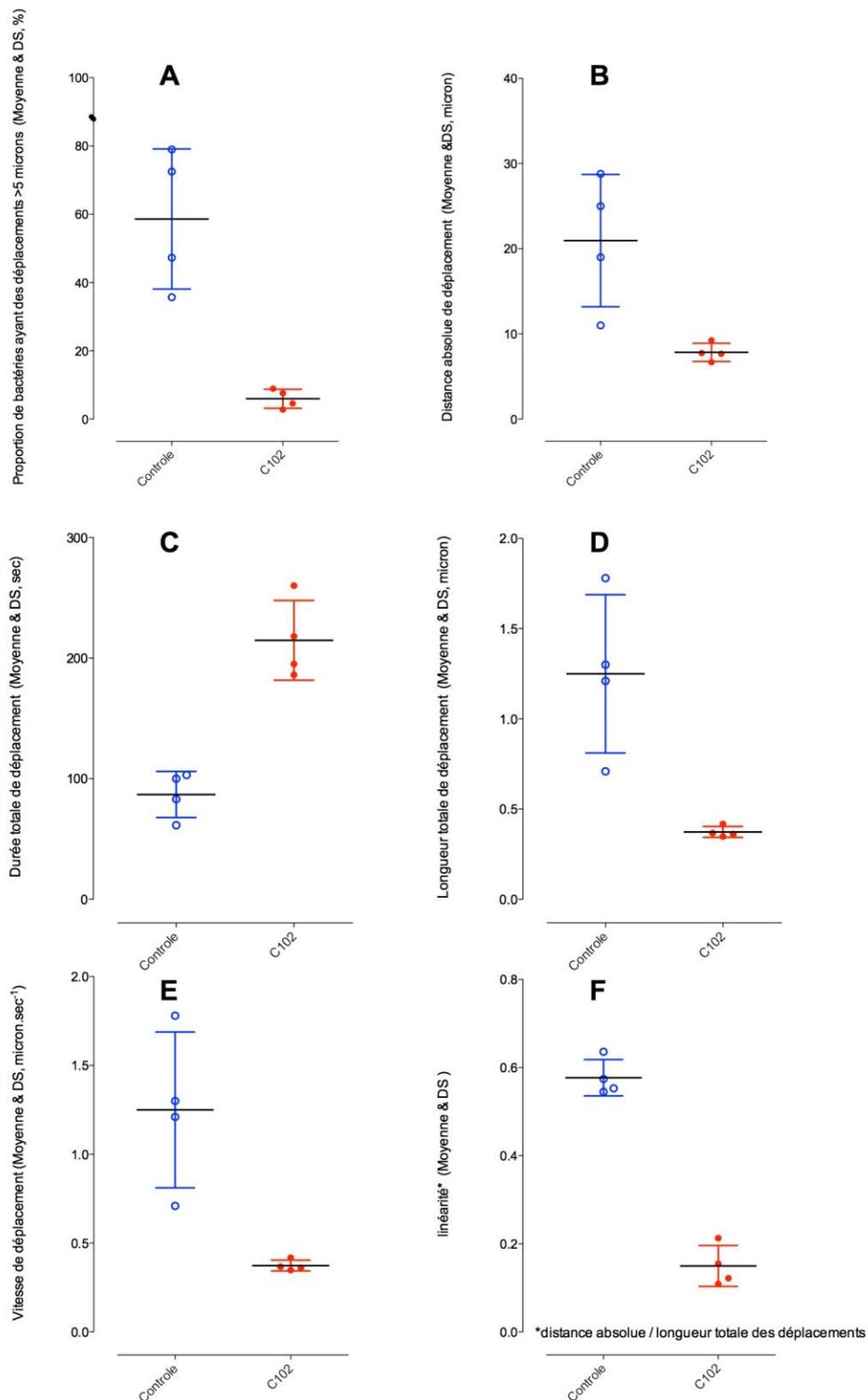


Figure 20: Evaluation des déplacements de *E. coli* UTI89 (moyenne \pm SD) après 10 subcultures en absence de C102 (Témoin, en bleu) et en présence de C102 à 1% (P/V) (C102, en rouge). A: Proportion de bactéries parcourant plus de 5 μ m, B: distance absolue moyenne de déplacement en micron, C: durée totale moyenne de déplacement en secondes, D: longueur totale moyenne de déplacement en micron, E: vitesse moyenne de déplacement en micron/seconde, F: linéarité moyenne des déplacements

Pour chaque variable mesurée n=4. Différence significative entre témoin (bleu) et C102 (rouge), p= 0.028 test de rang de Mann&Whitney).

4.1.8 Microscopie électronique à transmission

Les modifications d'expression génique détectées, ainsi que la perte de mobilité observée en champ large lorsqu'UTI89 a été incubée sur 10 subcultures en présence de C102 1% (P/V), nous ont amené à visualiser la bactérie traitée ou non par C102 afin de confirmer l'impact sur le constitution/présence des flagelles.

Après 10 subcultures en présence de C102, nous avons observé (Figure 21)

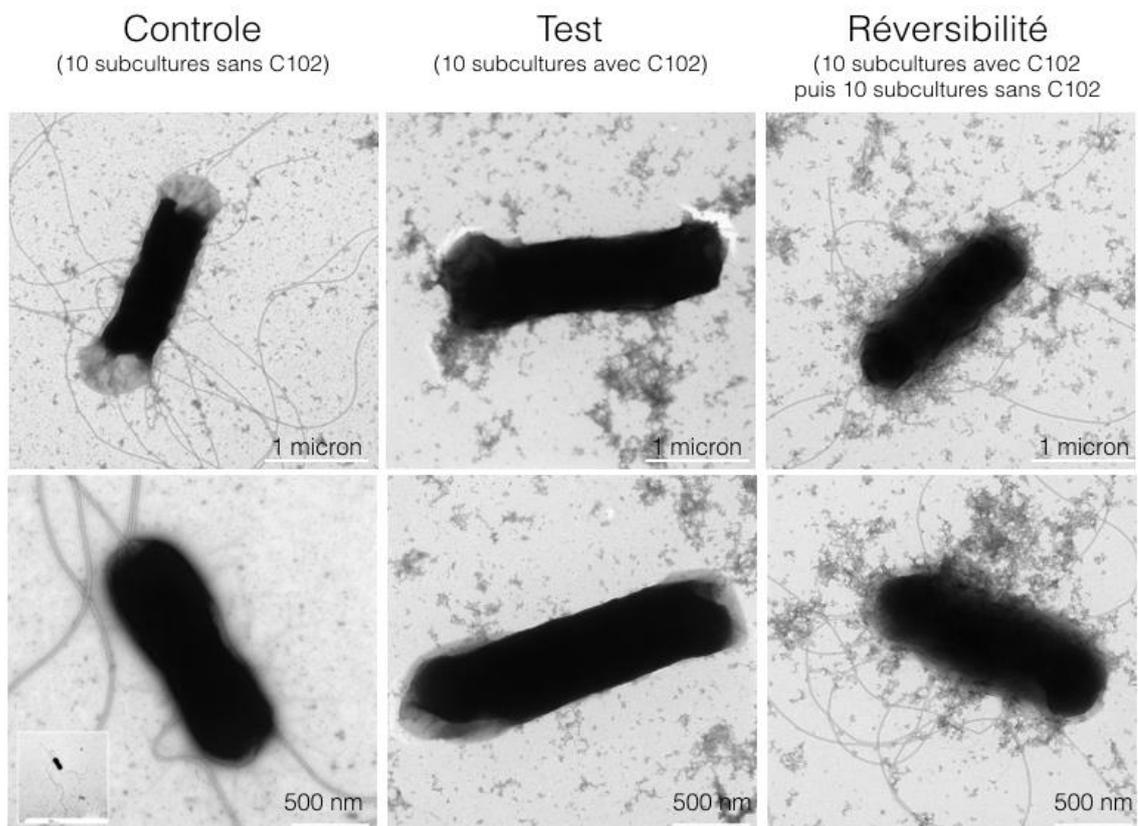


Figure 21. Modifications des structures de surface (fimbrie et flagelles) et de la taille d'*E.coli* UTI89 après exposition à C102 1% (P/V) pendant 10 subcultures (test) et pendant 10 subcultures suivies de 10 subcultures en l'absence d'exposition à C102 (réversibilité).

- a. une élévation des bactéries : très denses, plus longues, avec des altérations de la paroi, sans qu'il y ait pour autant éclatement de la bactérie

- b. une disparition complète des éléments filamenteux, fimbriae et flagelles
- c. une réversibilité du phénomène lorsque les bactéries sont à nouveau cultivées en absence de C102

Les observations en microscopie électronique à transmission nous ont également permis de mesurer des différences de longueur, largeur et surface entre les bactéries témoin et celles pré-incubées avec C102 à 1% (P/V) (Figure 22).

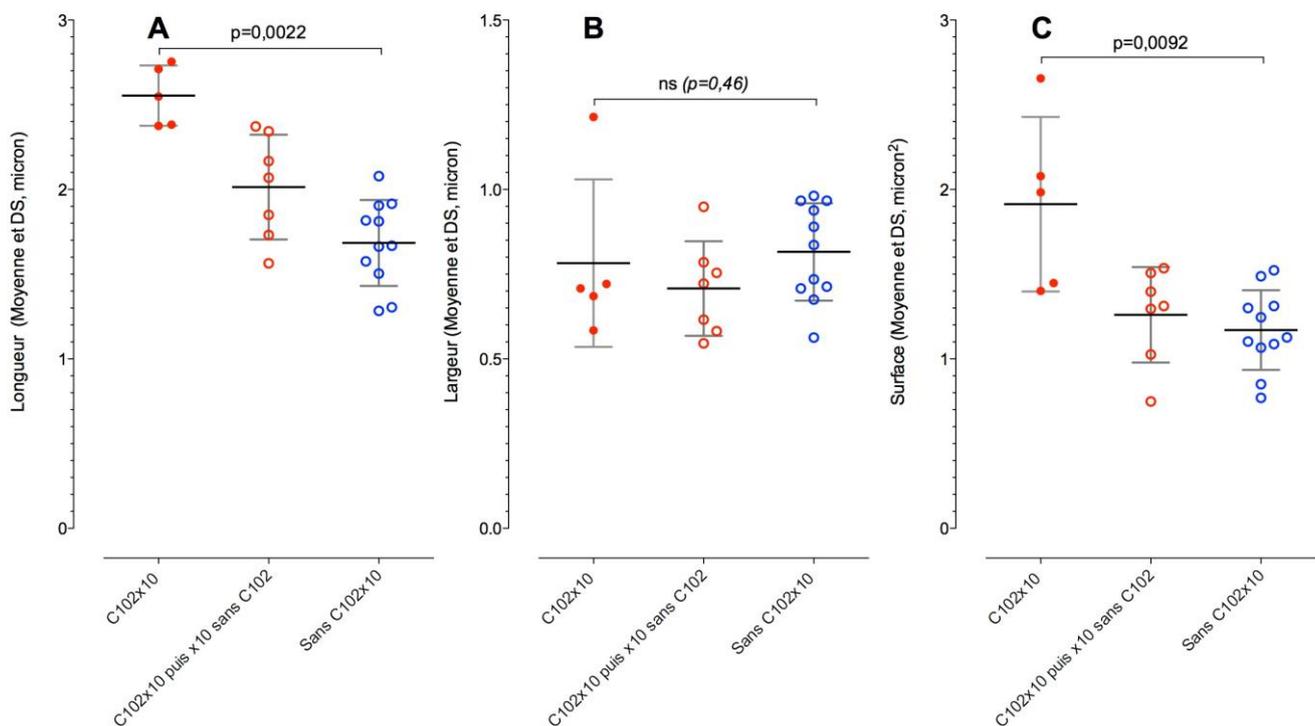


Figure 22. Modifications de longueur (A, μ), largeur (B, μ) et surface (C, μ^2) d'*E. coli* UTI89 après 10 subcultures en présence de C102 (1% , P/V) ou 10 subcultures en présence de C102 (1%, P/V, point rouge, n=5) suivies de 10 subcultures sans C102 (cercle rouge, n=7) ou subcultures en bouillon TS sans C102. (cercle bleu, n=11) (Moyenne \pm DS), test de rang de Mann&Whitney.

La figure 22 montre qu'après 10 subcultures en présence de C102, la bactérie est deux fois et demie plus longue, les surfaces mesurées reflétant cet allongement (figures 22 A et 22 C), sans qu'il y ait d'élargissement (figure 22 B).

Après arrêt de l'exposition, le phénomène est réversible, la longueur des bactéries exposées à C102 n'est pas différente de celle des bactéries non exposées.

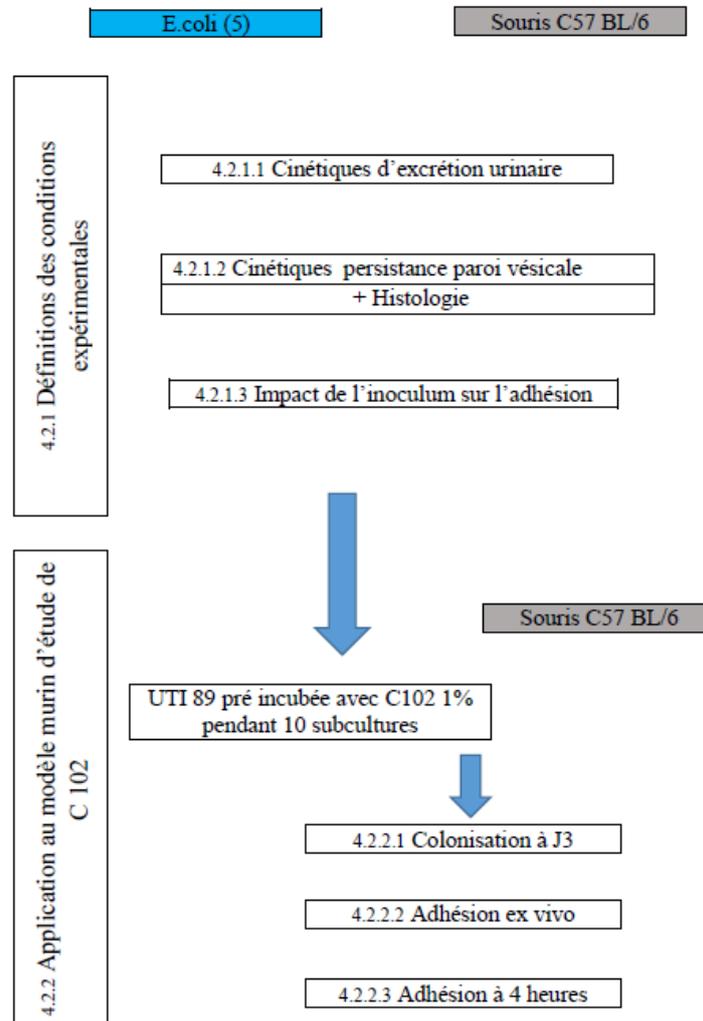
En résumé :

L'exposition de E.coli UTI89 au composé C102 se traduit in vitro par :

- *une diminution de l'adhésion aux cellules urothéliales humaines T24*
- *une diminution des transcriptomes portant sur certains éléments des fimbriae, sur la quasi totalité de la chaîne du chémotactisme, ainsi que sur la structure et la fonction des flagelles*
- *un arrêt quasi total de la mobilité swarming, à condition que le composé C102 soit incorporé à la gélose molle, c'est à dire correspondant à une exposition maintenue durant la croissance bactérienne*
- *des altérations très marquées, en microscopie champ large, portant tant sur la vitesse que les distances parcourues et leur linéarité, les bactéries exposées à C102 ne présentant plus qu'un mouvement de type brownien*
- *des modifications phénotypiques marquées, se traduisant par une longueur plus importante des cellules bactériennes et une quasi disparition des organites extra-cellulaires (pili et flagelles).*

4.2 Expériences *in vivo* chez la souris

La flow chart ci-dessous présente la succession des essais faits chez l'animal.



4.2.1 Définition des conditions expérimentales : Inoculation de différentes souches d'*E.coli* en l'absence de pré-incubation avec C102

4.2.1.1 Cinétiques de l'excrétion urinaire et persistance tissulaire

Les résultats sont présentés sous forme de cinétiques microbiennes dans urines et dans les broyats de vessies.

Le tableau 13 correspond à une cotation interprétative des différentes cinétiques observées dans les urines et les vessies aux différents temps d'observation (J1, J3, J7 et J14), pour

chacune des 5 souches d'*E.coli* (ABU83973, UTI89, MG1655, GGB1561 et CFT073), inoculées. Un contrôle de stérilité des urines a été fait à J0 avant inoculation de chacun des cinq groupes.

Tableau 13. Dénombrement de *E.coli* dans les urines et les broyats de vessies de souris

<i>E.coli</i>	J1		J3		J7		J14	
	V	U	V	U	V	U	V	U
UTI89	+++	+++	+++	++	++	0	+	0
ABU83972	0	0	0	0	0	0	0	0
CFT073	+ à ++	++	+++	++	0	0	0	0
MG1655	+ à ++	+	+	0	0	0	0	0
GGB1561	+ à ++	+	+	+	+/-	0	+	0

J1, J3, J7 et J14 après inoculation (V=vessie broyée ; U=urines), n=3 souris pour chaque souche d'*E.coli* et pour chaque temps. Zéro: ≤ 2 log. (+): entre 2 et 3 log. (++) : entre 3 et 4 log. (+++): ≥ 4 log.

La figure 23A représente le pourcentage d'adhésion d'*E.coli* UTI89 4 heures après inoculation de l'animal. La figure 23B représente le nombre de bactéries récupérées dans les vessies des souris sacrifiées au cours des 14 jours suivant l'inoculation d'UTI89.

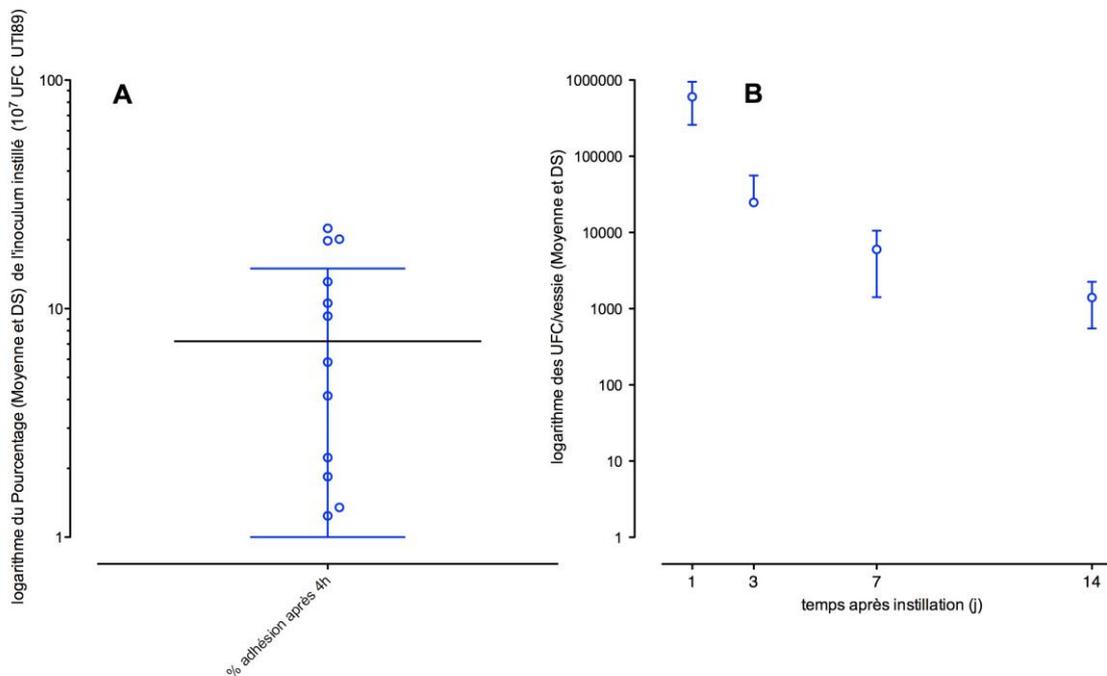


Figure 23. Dénombrements bactériens (UTI89) dans la paroi vésicale. A: pourcentage d'adhésion de l'inoculum 4h après l'instillation (moyenne±DS, n=16). B: nombre d'UFC récupérées dans les broyats de vessies à J1 (n=5), J3 (n=4), J7 (n=3) et J14 (n=2) après l'instillation initiale (Moyenne±DS)

Sur la base de ces résultats, des essais complémentaires ont été réalisés sur la phase initiale d'adhésion d'*E.coli* à la paroi vésicale.

Par ailleurs, cliniquement :

- à J1, les animaux sont tous vifs, en bonne santé.

- à J3, une souris est morte parmi celles inoculées avec UTI 89 ; tous les animaux inoculés avec les souches « virulentes » sont moins vifs que ceux inoculés avec la souche témoin ABU83972. Macroscopiquement, les vessies inoculées avec CFT073 et dans une moindre mesure par GGB1561 sont plus rouges et richement vascularisées que les vessies inoculées avec les autres souches.

- à J7, les souris restantes sont toutes surexcitées et pollakiuriques, la surface urinée horaire (buvards) a triplé entre J1 et J7, alors que les souris témoins ont des volumes urinaires comparables à ceux des autres souris avant inoculation.

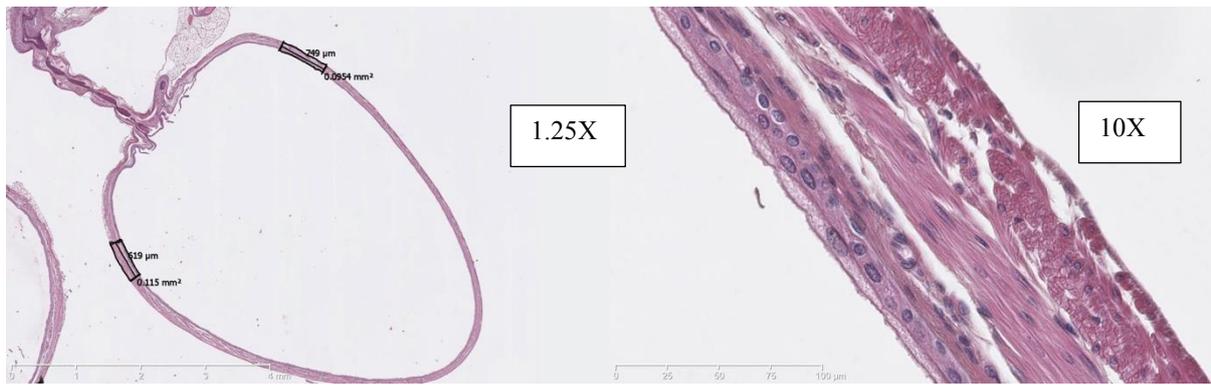
- à J14, les animaux ont tous un comportement redevenu normal

Le contrôle des urines des 5 groupes à J0, fait avant inoculation, retrouve des urines stériles, pour l'ensemble des échantillons, résultat en faveur d'une technique de sondage maîtrisée.

4.2.1.2 Histologie

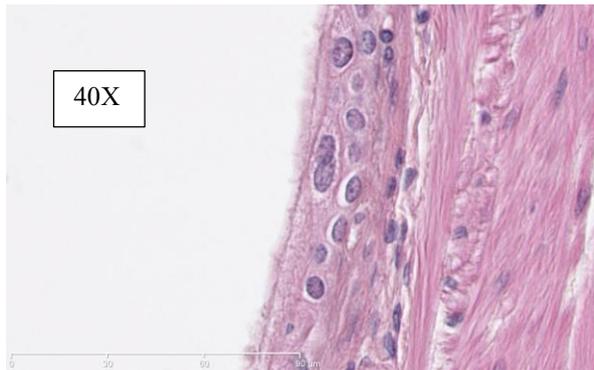
Les observations histologiques ont été réalisées sur les mêmes séries d'expériences.

Les caractéristiques histologiques d'une vessie de souris normale, instillée avec le milieu de culture stérile sont reconnaissables sur la figure 24. Nous y indiquons la zone retenue pour procéder aux mesures de l'épaisseur des parois vésicales (fig 24 A). Cette vessie présente côté lumière vésicale des cellules en ombrelle, tapissées par un glycocalyx en fine brosse, le nombre de couches cellulaires sous-jacentes est au plus de 4 à 6, il n'existe pas d'infiltrat cellulaire ni d'hyper-vascularisation (fig 24 B et C).



A

B



C

Figure 24 : aspect histologique normal de vessie de souris

- Présence de glycocalyx
- Cellules en ombrelle, matures, en surface
- Nombre de couches cellulaires sous-jacentes <4,
- Vaisseaux peu nombreux dans la musculature, sans signes d'inflammation (dilatation ou afflux de polynucléaires)

Nous avons constaté chez l'animal inoculé avec *E.coli* UTI89 :

- les modifications histologiques des vessies inoculées avec UTI89 « native », non pré-incubée. De nombreux signes d'inflammation de la muqueuse vésicale sont visibles, la muqueuse est oedématisée, épaissie, le nombre de couches cellulaires de l'épithélium est augmenté. Nous n'avons pas observé de zones de nécrose, mais par endroits perte du glycocalyx et surtout un infiltrat cellulaire diffus avec une hypervascularisation, soit des grades 1 et 2, selon la gradation histo-pathologique proposée par Hopkins(175), correspondant bien au mode de réponse déjà décrit pour la souche murine C57BL/6, se caractérisant par :
 - une résolution progressive de l'IU induite, de façon linéaire, (CFU/mg de vessie)
 - une réponse inflammatoire vésicale initiale modérée, de grade 1 à 2, décroissant avec le temps et parallèlement à la diminution des CFU, la réponse inflammatoire la plus intense intervient entre le 1^{er} et le 3^{ème} jour après l'inoculation.

4.2.1.3 Impact de la taille de l'inoculum d'UTI89 sur l'adhésion vésicale à T4 heures

Afin de finaliser le choix des conditions expérimentales, nous avons également évalué l'impact de la taille de l'inoculum sur la phase d'adhésion (numération des UFC d'*E.coli* UTI89 au niveau de la vessie, 4 heures après inoculation).

Tableau 14. Impact de l'inoculum initial sur la colonisation à 4 heures

Inoculum initial (UFC)	10^4	10^5	10^6	10^7
Moy Log UFC \pm DS dans les vessies	–	3,07 +/- 0,96	4,13 +/- 1,41	4,49 +/- 0,50

Moyennes des log du nombre de bactéries récupérées (UFC/ml) pour chaque groupe de 9 souris (moy \pm DS), en fonction de l'inoculum initial (UFC/ml).

Le tableau 14 présente les logarithmes des UFC obtenues en fonction de l'inoculum initial. En faisant varier l'inoculum bactérien de 10^4 à 10^7 UFC/ml nous constatons que l'adhésion d'*E.coli* UTI89 à la muqueuse vésicale est proportionnelle à l'inoculum initial, avec:

- une absence de bactéries détectables à 4h pour des inoculi inférieurs ou égaux à 10^4 UFC/ml
- une détection d'*E.coli* chez toutes les souris dès 10^5 UFC/ml
- un taux d'adhésion croissant pour atteindre plus de 4 log en moyenne à partir de 10^6 UFC/ml
- une colonisation relativement homogène sur l'ensemble des animaux pour un inoculum à 10^7 UFC

Les observations conduisent à conclure que:

- *UTI 89 est la souche qui persiste le plus longtemps, sa sélection pour évaluer l'effet du composé d'intérêt est ainsi confortée ;*
- *la poursuite de temps de contact au-delà de J3 semble inutile, les bactéries ne s'installent pas et la guérison (non détection de E. coli et disparition de la réponse inflammatoire) est obtenue spontanément entre J7 et J14 sur ce modèle murin*
- *l'urine n'est pas le meilleur reflet de l'inoculum colonisant, les dénombrements d'UFC/ml d'urines sont abandonnés au bénéfice des UFC sur vessie, plus sensibles.*
- *sur la base de la littérature(173) et de notre observation sur l'impact de l'inoculum sur la colonisation, les conditions d'inoculation choisies pour les essais ultérieurs sont 50 μ l de suspension bactérienne à 2.10^8 UFC/mL, soit un inoculum de 10^7*

4.2.2 Effet de la pré-incubation avec C102 de la bactérie inoculée chez la souris

En partant de :

- 10 subcultures d'UTI 89 en présence ou en absence de C102 1% (P/V)
- essai fait sans adjonction de C102 à T0 de l'essai (inoculation de la vessie),
- absence d'administration *ad libitum* de C102 chez la souris, donc pas d'excrétion urinaire,

Dans les conditions expérimentales définies ci-dessus, plusieurs essais ont été conduits chez l'animal, notre objectif étant de conforter le modèle, en confirmant l'effet *in vitro* par l'observation d'une efficacité *in vivo*. Les essais sont résumés dans le tableau 18.

4.2.2.1 Effet sur la colonisation à J3

➤ **Données générales** sur les animaux (poids, épaisseur de la paroi vésicale)

Les figures 25 A et B indiquent respectivement les variations de poids et d'épaisseur de vessie entre J0 et J3, des souris témoins (inoculées avec du bouillon TS stérile), des souris inoculées avec UTI89 non pré-incubée et des souris inoculées avec UTI89 pré-incubée pendant 10 jours avec C102 1%.

L'inoculation d'*E.coli* UTI89 native se traduit par une discrète élévation du poids des souris entre J0 et J3 ($p=0,045$ Test de rang de Mann&Whitney). Dans tous les autres cas, les variations de poids entre J0 et J3 (groupe témoin et groupe inoculé avec les bactéries pré-incubées avec C102 1% (P/V)) et entre les J0 et les J3 des trois groupes entre eux ne sont pas significatives.

Par rapport au groupe témoin, une augmentation significative de l'épaisseur de la paroi vésicale est observée tant pour le groupe inoculé avec *E. coli* natif que pour celui inoculé avec *E.coli* pré-incubé avec C102 1% (P/V), témoignant du développement d'un processus inflammatoire. En revanche, la différence n'est pas significative entre les 2 groupes inoculés avec UTI89 que celui-ci ait été pré-incubé ou non avec C102 1% (P/V), traduisant une absence d'effet sur ce paramètre de C102.

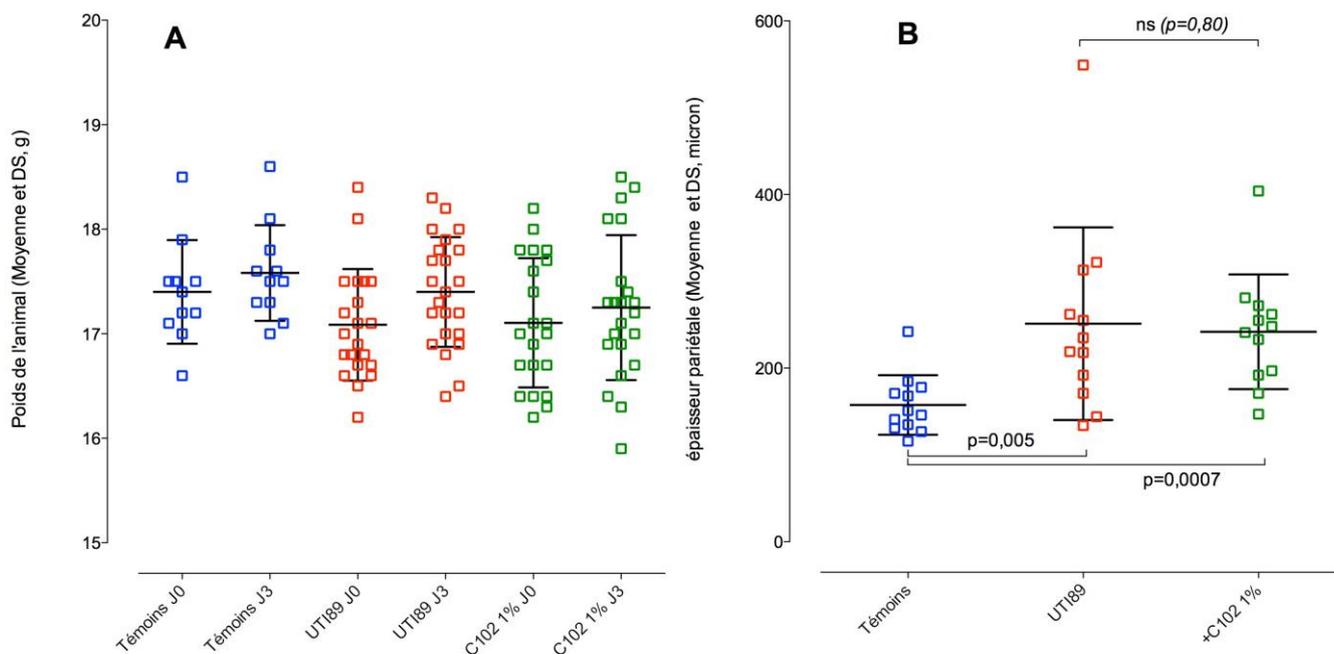


Figure 25. Variations: A: du poids des animaux, en grammes B: de l'épaisseur de la paroi vésicale, en microns, entre J0 et J3 après l'instillation de bouillon stérile (témoin en bleu, n=11), inoculation d'*E.coli* UTI 89 natif (en rouge, n=21) et d'*E.coli* UTI 89 pré-incubé avec C102 (en vert, n=21) (moyenne±DS; test de rang de Mann&Whitney).

➤ **Analyse histologique** de la série *E. coli* UTI89 pré-incubée avec C102:

La figure 24 présente les résultats de l'analyse histologique réalisée sur vessie de souris inoculées par *E. coli* pré-traité par C102 1% (P/V).

L'analyse histologique (figures 26 A et B) ne permet pas d'observer une minoration ou une absence de signes inflammatoires dans les vessies observées : après inoculation de la souche UTI89 pré-incubée avec C102 1% (P/V), les images sont celles d'un grade 2 d'Hopkins, tout à fait superposables à celles des vessies inoculées avec les souches d'*E.coli* UTI89 non pré-incubées avec C102.

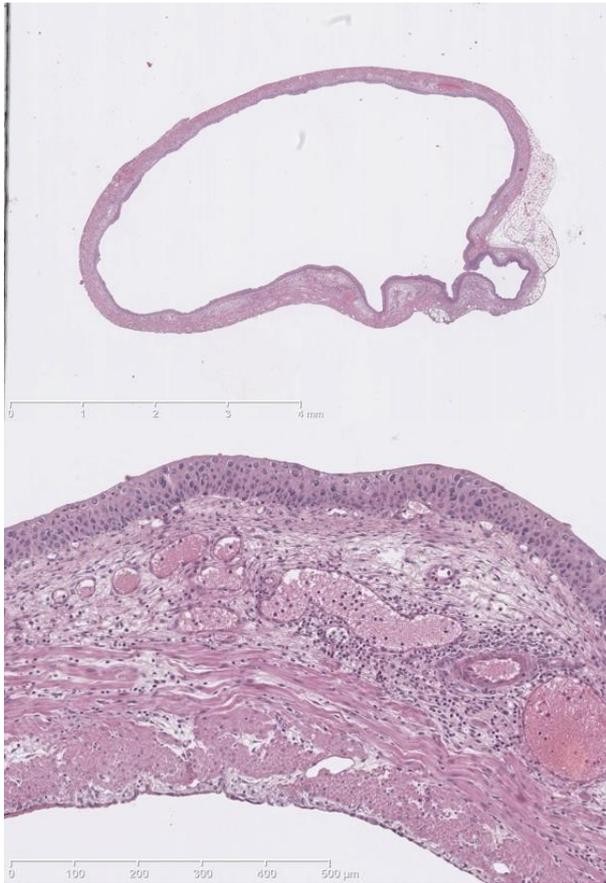


Figure 26 A: aspect général d'une vessie (1,25X): paroi épaissie de façon diffuse.

Figure 26 B (10X): disparition du glycocalix, présence d'un nombre de couches cellulaires > 6 , d'un infiltrat diffus de globules blancs et de plusieurs vaisseaux dilatés

➤ **Dénombrements des UFC (log UFC/vessie)**

Les valeurs observées sont indiquées dans le tableau 15.

Tableau 15. Dénombrements des UFC dans les broyats de vessies

Souris	Témoin	UTI89 non pré-incubée avec C102	UTI89 pré-incubée avec C102
	8 souris toutes <100	16 souris variant de $7,5.10^3$ à $3,8.10^8$	16 souris variant de $1,3.10^3$ à $6,6.10^8$
Moyenne (log) ±DS	< 2	5,73 ± 1,48	6,14 ± 1,33

Animaux inoculés avec UTI89 pré-incubée ou non avec C102 1% (P/V) (moyenne±DS, n=16)

A nouveau, la différence des log d'UFC dénombrées dans les broyats de vessie entre le groupe de souris témoin et les deux groupes de souris inoculées par *E. coli* UTI89 est hautement significative ($p < 0.001$, test de Student non apparié). En revanche, la différence des log d'UFC dénombrées entre le groupe de souris inoculées par *E. coli* non pré-incubé avec C102 et le groupe inoculé par *E. coli* pré-incubé C102 à 1% (P/V) n'est pas significative ($p = 0.209$, test de Student non apparié).

Ceci est corroboré par les résultats histologiques, les signes d'inflammation sont nombreux chez les souris inoculées par *E.coli* UTI89: œdème, vascularisation, épaisseur augmentée de la paroi vésicale, par rapport au groupe témoin, alors qu'aucune différence significative n'est notée entre le groupe inoculé avec *E. coli* non pré-incubé et le groupe inoculé avec *E. coli* incubé par C102.

4.2.2.2 Contrôle de l'adhésion de la souche d'UTI89 obtenue *ex vivo*

L'essai d'adhésion *in vitro* aux cellules T24, a été réalisé dans deux conditions :

- sur la suspension bactérienne obtenue après 10 subcultures en présence de C102, avant inoculation à la souris afin de contrôler l'efficacité des 10 subcultures.
- sur suspension bactérienne réalisée directement à partir des boîtes de dénombrement issues des broyats des vessies de souris, sans repiquage supplémentaire afin de vérifier la persistance ou non de l'effet après passage *in vivo*.

Les suspensions ont été ajustées à 2.10^8 cellules/ml.

Les pourcentages d'inhibition d'adhésion sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16. Inhibition de l'adhésion *ex vivo* aux cellules T24 de la souche UTI89 pré-incubée avec C102 et inoculée à l'animal.

	Souche pré-incubée <i>in vitro</i> avec C102 1% P/V	Témoin (+) (phénol)
Avant l'inoculation	- 70%	- 82%
Après test <i>in vivo</i>	- 51%	- 78%

Nous observons :

- une inhibition d'adhésion aux cellules T24 conforme après les 10 jours de subculture de *E. coli* UTI89 en présence du produit-essai C102 (-70%) ;
- une réduction partielle de l'effet observé sur les isolats récupérés après la phase d'essai *in vivo* (-51%), en faveur d'une perte partielle de l'efficacité du produit.

4.2.2.3 Effet sur l'adhésion à la muqueuse vésicale à T 4 heures après inoculation

Après l'inoculation des souris, le taux d'adhésion a été contrôlé par dénombrement des UFC sur les broyats de vessies, 4 heures après inoculation de 50 µL de suspension :

- d'*E.coli* UTI89 non pré-incubée, sur 20 souris (Témoin comptage: TC, UTI89 native: $2,50 \cdot 10^8$ UFC/ml)
- d'*E.coli* UTI89, pré-incubée (10 subcultures en présence de C102), sur 20 souris, (TC UTI89 avec C102 1% (P/V): $1,38 \cdot 10^8$ UFC/ml).

Les groupes étaient constitués de 16 souris pour la série témoin et 17 souris pour la série essai (histologie éventuelle) (tableau 17). Les résultats des dénombrements (log UFC/vessie) sont présentés dans le

Tableau 17. Dénombrement des UFC /vessie 4 heures après inoculation

T4h	UTI89 non pré-incubée		UTI89 pré-incubée avec C102 1% P/V	
	UFC/vessie	Log	UFC/vessie	Log
	16 souris min.: $8,0 \cdot 10^4$ max.: $2,81 \cdot 10^6$	4,90 à 6,45	17 souris min.: $4,8 \cdot 10^3$ max.: $2,0 \cdot 10^7$	3,98 à 7,31
Log UFC (moyenne ± DS)	-	5,65 ± 0,57		5,51 ± 1,10

Dénombrements (Log UFC/vessie), 2 groupes de souris : UTI 89 native (n=16), pré-incubée C102 1% (P/V) (n=17) (moyenne±DS).

Nous observons :

- une adhésion chez l'ensemble des souris
- une adhésion conforme aux résultats observés lors de l'essai antérieur, pour les souris inoculées avec la souche d'*E.coli* UTI89 non pré-incubée avec C102
- une adhésion de niveau comparable pour les souris inoculées par la souche d'*E.coli* UTI89 pré-incubée par C102.
- une homogénéité et une reproductibilité des résultats sur les valeurs minimum et maximum dans chaque groupe
- une absence de différence entre les 2 groupes : les 10 subcultures en présence ou non de C102 n'ont pas d'effet sur l'adhésion initiale, dans les conditions de l'essai.

Au total, *in vivo*,

- la colonisation de la vessie des souris est transitoire quelle que soit la souche d'*E.coli* considérée,
- une cure « naturelle » est également observée 7 à 14 jours après inoculation.

En ce qui concerne la pré-incubation d'*E.coli* UTI89 par C102, il n'est pas observé de différence significative (histologie et dénombrement des UFC) entre les souris inoculées avec les bactéries pré-incubées avec C102 1% (P/V) et les souris inoculées avec les bactéries non pré-incubées ni sur la phase de colonisation (J3), ni sur la phase d'adhésion (T4h).

Le tableau 18 synthétise les essais réalisés chez l'animal (souris C57BL/6) et leurs résultats, ayant eu pour objectif, d'une part de définir les conditions expérimentales, d'autre part, d'évaluer les effets de la canneberge.

Tableau 18. Principales expériences menées chez la souris et principaux résultats.

Type d'essai	Matériel	Technique	Particularités	Résultats	Commentaires
Cinétiques -de l'excrétion urinaire d' <i>E.coli</i> -persistance dans la paroi vésicale -pollakiurie	Souris C57BL/6 5 souches d' <i>E.coli</i> ABU83973 MG1655 CFT073 UTI89 GGB1561	Inoculation par cathétérisme vésical de 50 µl de suspension à 2.10 ⁸ UFC/ml	Numérations UFC dans les urines et les broyats de vessies Limite de détection 10UFC/ml urine et 100 UFC/vessie Histologie Estimation de la pollakiurie à partir des taches d'urine sur buvard	Cinétiques de colonisation souche- dépendante Pic de colonisation à J3 Guérison spontanée à J14 (bactériurie et inflammation) Pas d'arguments pour un réservoir tissulaire chronique	Pas d'infection : colonisation et inflammation transitoires. UTI89 persiste sensiblement plus longtemps Remise en question du modèle souris. Lignée souris plus pertinente que celle utilisée ? Broyat de vessie plus pertinent que la bactériurie
Histologie	Milieu de culture (témoin) Suspensions bactériennes Formol 5%)	Après Inoculation 50 µl			Vessie saine Vessies inflammatoires
Etude de l'impact de l'inoculum sur l'adhésion	Souris C57BL/6 <i>E.coli</i> UTI89 2.10 ⁸ /ml, 2.10 ⁷ /ml, 2.10 ⁶ /ml et 2.10 ⁵ /ml	Adhésion à T4h	Numération UFC/ml urines et histologie Limite détection 100 UFC/ml	Phase inoculum- dépendante	Choix UTI 89 en excès (2.10 ⁸ /ml de suspension)

Effet de C102 à 1% sur la colonisation à J3	Souris C57-BL6 8 semaines <i>E.coli</i> UTI 89 à 10^8 /ml C102 à 1%	Inoculation d' <i>E.coli</i> obtenu après 10 subcultures avec C102 vs 10 subcultures sans C102 Souris T non inoculées Histologie	Numération UFC/vessie broyée en phase de colonisation J3	UFC souris témoins (non traitées) vs souris traitées : $p < 0,001$ UFC souris inoculées avec <i>E.coli</i> pré-traitée vs non pré-traitée NS idem	
Inhibition de l'adhésion <i>ex vivo</i> des bactéries obtenues des broyats de vessies	<i>E.coli</i> UTI 89 à 10^8 /ml C102 à 1% Cellules T24		<i>E.coli</i> obtenues à partir des broyats des vessies inoculées (essai réalisé à partir des boites de dénombrement)	Perte partielle de l'activité de C102	Validation de l'importance des 10 subcultures (réponse adaptative)
Effet de C102 à 1% (P/V) sur l'adhésion à T4 heures	40 souris C57-BL6 8 semaines <i>E.coli</i> UTI 89 à 10^8 /ml C102 à 1% (P/V)	Inoculation d' <i>E.coli</i> obtenu après 10 subcultures avec C102 vs 10 subcultures sans C102	Numération UFC/vessie broyée en phase d'adhésion à T4h	Pas de différence entre souris traitées et non traitées	Pas de visualisation d'effet canneberge (réponse adaptative) sur la capacité d'adhésion <i>in vivo</i>

Le modèle souris (ou du moins la souche choisie C57BL/6), ne semble pas pertinent pour démontrer l'activité des produits issus de la canneberge, aux temps précoces de l'infection urinaire.

Les différences de réponses observées entre la lignée cellulaire humaine de carcinome vésical T24 et la lignée de cellules rénales de souris NUC1 montrent que les facteurs hôte sont déterminants en termes de physiopathologie et secondairement dans l'évaluation de l'effet que peut avoir un produit sur la pathologie considérée.

Au terme de l'étude chez l'animal, l'impact de C102 peut se résumer ainsi :

➤ *au travers des essais réalisés in vitro :*

- *une inhibition d'adhésion conforme après les 10 jours de subcultures d'E.coli UTI89 en présence du produit (-70%) (suspension d'instillation)*
- *une réduction de l'effet observé sur les isolats récupérés après la phase d'essai (-51%)*

➤ *au travers des essais in vivo:*

- *une colonisation conforme aux résultats observés lors de l'essai antérieur pour les souris inoculées avec la souche d'E.coli non pré-incubée avec C102,*
- *une colonisation (4h et 3j) de niveau similaire pour les souris inoculées par la souche d'E.coli pré-incubée avec C102.*
- *une absence d'effet inhibiteur d'adhésion du C102, in vitro, aux cellules d'origine murine,*
- *nous conduisant à abandonner le modèle murin C57BL/6*

Nous avons ainsi mis au point un modèle d'étude de l'effet de médicaments reposant **sur l'adhésion in vitro par marquage radioactif d'E.coli souche UTI89, pré-incubée ou non avec les produits-essai pendant 10 subcultures, sur lignée cellulaire de tumeur humaine de vessie T24.**

5 Discussion

5.1 Des modèles d'études

Dans les années 90 et 2000 la littérature insistait sur (cf partie Etat de l'Art) le rôle des pili de type 1 et de leur adhésine FimH dans l'adhésion des *Escherichia coli* uropathogènes (UPEC) à la surface des cellules urothéliales, et sur l'effet d'inhibition des composés de la canneberge sur de l'adhésion bactérienne. Cet effet était principalement attribué (11-13) aux proanthocyanidines de type A (PCA) plus que de type B (PCB) (186).

Malgré quelques voix discordantes (21, 168) l'intérêt à l'égard de la canneberge s'est ensuite maintenu alors que notre compréhension des mécanismes d'adhésion évoluait. L'implication des fimbriae P et leur inhibition par les PAC A ont été démontrées (13, 15, 65, 83, 130, 132, 139), avec une action principale portant sur leur configuration (127, 148, 201). De plus, des composés exempts de PAC gardaient une efficacité anti-adhésion, suggérant que d'autres composantes de la canneberge puissent exercer une action.

Puis l'effet inhibiteur étant toujours constaté y compris sur des souches dépourvues de pili de type 1 et P, d'autres mécanismes ont été mis en avant et nous verrons comment, à côté des phénomènes d'adhésion, les extraits de canneberge peuvent agir sur le flagelle et donc la mobilité comme cela avait été suggéré par l'observation d'une modification de l'expression de la flagelline, brique structurelle du flagelle (196) et finalement modifier l'ensemble de la physiologie bactérienne.

Il apparaît ainsi qu'à mesure que les connaissances progressaient sur la physiopathologie des UTI et l'implication des UTEC, notamment dans les domaines de l'adhésion et de la mobilité, éléments essentiels dans l'invasion bactérienne, apparaissaient de nouvelles cibles et approches thérapeutiques tels les pili par action du ec240 (67), ou plus spécifiquement FimH par interaction avec le biarylmannoside (117), ou encore la capsule (202).

Compte tenu de la multiplicité des voies de recherche, tant dans les cibles moléculaires que les structures et les fonctions, il devenait essentiel de mettre au point un système robuste d'évaluation de candidats médicaments issus de la canneberge, d'autres composés naturels ou de synthèse. Nous avons souhaité développer un modèle permettant de sélectionner des

médicaments d'intérêt potentiel dérivés de la canneberge. Pour ce faire, trois approches étaient possibles :

- les essais en clinique humaine,
- les études sur modèle animal,
- les études sur modèle de cellules eucaryotes

5.1.1 Les essais en clinique humaine

De nombreux essais cliniques ont été rapportés, le premier par Papas en 1966, (17, 122, 123, 126, 131, 177, 186, 203), démontrant pour la plupart d'entre eux l'efficacité de la canneberge au long cours dans la prévention des récurrences d'infections urinaires du bas appareil, dans différents contextes, chez la femme sexuellement active (204) et chez des populations féminines âgées, institutionnalisées (169), ou après chirurgie gynécologique électorive avec sondage vésical (205). Ces essais ont également conduit à définir les limites de l'efficacité de la canneberge dans d'autres types de populations (enfants, vessies neurologiques chez les traumatisés médullaires ou les scléroses en plaques, femmes enceintes) (139).

Ces dernières années, des conclusions contradictoires (21, 168, 180), liées probablement à la variabilité du produit soumis à essai, des doses de PAC et des populations étudiées, ont remis en question l'intérêt de la canneberge, relançant de débat sur la nécessité d'une meilleure compréhension des mécanismes d'action de la canneberge et de l'identification précise des composés actifs et de leurs dosages dans les produits commercialisés.

L'éthique interdit de tester d'emblée chez l'homme des xénobiotiques, d'autant plus s'il s'agit de produits complexes, de composition mal définie. Cette approche, longue et coûteuse, doit être considérée comme une validation finale de l'objectivation d'un candidat médicament, mais ne peut en aucun cas être utilisée directement si l'on considère notre objectif premier de « screening » de fractions ou composés actifs et secondaire de caractérisation des mécanismes d'action

5.1.2 Des essais sur modèle animal.

Ceux-ci peuvent se concevoir en clinique vétérinaire ou en expérimentation animale. En clinique vétérinaire, deux études ont été publiées chez le chien (206, 207). Ces auteurs ont montré que les chiens ayant consommé des extraits de canneberge font moins souvent d'IU et

que leurs urines présentent une adhésion d'*E.coli* aux cellules MDCK fortement diminuée après 30 et 60 jours de consommation.

En expérimentation animale, différents modèles ont été utilisés (208), comme le ver *Caenorhabditis elegans* (16, 176), le rat femelle (18, 145), le singe (113), mais le modèle murin est le plus souvent utilisé. Dans les modèles murins, les fimbriae de type 1 des UPEC s'expriment intensément dans la vessie, ils sont particulièrement importants dans les premières 24 heures lors de colonisations expérimentales de vessies (87); ils permettent l'adhésion aux cellules urothéliales, stimulent la réponse inflammatoire, déclenchent l'invasion et conduisent à la formation de communautés bactériennes intra-cellulaires ou IBC considéré comme un biofilm intracellulaire (6, 39, 72-74). Les modèles murins sont fréquemment utilisés pour évaluer des médicaments potentiels contre l'infection urinaire (117).

Parallèlement aux essais *in vitro*, nous avons conduit des essais *in vivo*, selon un protocole expérimental éprouvé (173, 209).

Dans un premier temps, dans les **essais de colonisation** de souris C57BL/6, nous avons observé une réponse de grades 1 et 2, correspondant au mode de réponse déjà décrit (175) pour cette souche murine et qui se caractérise par :

- une résolution progressive de la colonisation urinaire induite, de façon linéaire, (CFU/mg de vessie)
- une réponse inflammatoire vésicale initiale modérée, de grade 1 à 2, décroissant avec le temps, parallèlement à la diminution des CFU,

Comme Hopkins (175), nous avons observé que la réponse inflammatoire la plus intense intervient entre le 1^{er} et le 3^{ème} jour après l'inoculation. La guérison spontanée intervient avant le 14^{ème} jour après inoculation. Sur ce point la littérature est divergente. Goneau (210) a récemment observé que vessies, urines mais surtout reins sont positifs jusqu'à J14, sur un modèle utilisant la même souche de souris. Notre modèle visant à juger de l'effet de la canneberge dans les infections du bas appareil, nous ne nous sommes pas intéressés à la cinétique dans le parenchyme rénal et, dans nos conditions expérimentales, en accord avec Hung (173), la cure naturelle et systématique observée représente certainement une limite du modèle murin dans l'étude des infections urinaires chroniques et de leur prévention.

Selon Hopkins, les facteurs génétiques de l'hôte jouent un rôle important dans la susceptibilité et la défense vis à vis de l'infection(175).

Deux questions se posent donc : validité du modèle murin pour les UTI et variabilité de la réponse/choix de la lignée de souris. Ainsi, la souche de souris utilisée n'est pas neutre, pouvant avoir un impact sur la clearance bactérienne (173, 175); par exemple, la souche C3H/HeJ est génétiquement susceptible au reflux vésico-uréthéral, la colonisation rénale se produit précocement dans les IU expérimentales, indépendamment de la colonisation vésicale (117); elle montre un haut niveau de colonisation ($>10^4$ UFC/vessie), deux semaines après l'infection et peut développer une cystite chronique, dont l'incidence est hôte-dépendante et dose infectante-dépendante. Elle est alors précédée par des marqueurs locaux et systémiques très intenses à 24 heures : pyurie, inflammation vésicale avec lésions de la muqueuse et des niveaux très élevés de certaines cytokines (38). Elle est très utilisée pour l'étude des infections urinaires associées au cathéterisme vésical, car tolérante à l'implantation des cathéters (211).

La **souche murine C57BL/56** que nous avons utilisée, est le modèle expérimental type pour les cystites (117, 212). La souris est susceptible de façon intermédiaire à l'infection aiguë, avec une réponse inflammatoire et une exfoliation vésicale plus importante, la bactériurie est progressivement résolutive en 14 jours, avec cependant la persistance de communautés bactériennes intracellulaires. Elle manifeste une sensibilité particulière aux « superinfections » avec des inoculi élevés ($> 10^7$ UFC). La souche C57BL/6 peut enfin faire des pyélonéphrites de façon sporadique et à faible niveau. Elle est résistante à l'infection chronique, et elle présente de faibles niveaux de colonisation urinaire (10^4 CFU/vessie) (209), en faveur de la persistance de bactéries intracellulaires quiescentes, alors que les urines sont redevenues stériles.

Le **milieu** joue également un rôle dans la capacité de colonisation par *E. coli*: l'urine de souris étant très concentrée et pauvre en nutriments, il est possible que cela affecte l'expression, énergivore, des pili de type 1 au profit d'un métabolisme de survie. Staerk *et al.* (213) ont récemment montré, en utilisant la souche UTI89, que deux sous-populations microbiennes pouvaient être distinguées : les bactéries planctoniques dans lesquelles les pili de type 1 ne s'expriment pas ou peu, et les agrégats bactériens sessiles, tant sur des surfaces inertes que urothéliales, qui expriment alors les pili de type 1. Les bactéries planctoniques sont plus facilement éliminées par le flot urinaire, les urines redevenant stériles alors que l'urothélium ne l'est pas.

Enfin, le choix de la **souche UPEC** est important. Toutes les souches ne se comportent pas de la même façon, par exemple, la survie au sein de macrophages murins est meilleure pour UTI89 que pour CFT073 et ABU83972, ce qui n'est pas vérifié chez les macrophages humains, suggérant à nouveau que les différences existantes entre les espèces hôtes peuvent affecter la physiopathologie des IU dans sa composante macrophagique (209). CFT073 est une souche hautement toxinique qui peut produire des lésions sévères de l'urothélium, mais qui peut aussi envahir l'urothélium et former des communautés bactériennes intra-cellulaires. UTI89 est plus invasive : en formant des communautés intra-cellulaires elle survit à l'intérieur de la cellule, ce qui rend le broyat de vessie pertinent pour la quantifier ; elle peut aussi exprimer plusieurs toxines et provoquer des lésions urothéliales (76). La formation des communautés intracellulaires par UTI89 a été démontrée chez plusieurs souches murines dont C57BL/6.

La **chronologie** des évènements a été décrite par Justice *et al.* (96): l'invasion du cytoplasme des cellules en ombrelle dans un modèle murin C3H-*E.coli* UTI89 se produit entre la 1^{ère} et la 3^{ème} heure après l'inoculation. La phase 1 (cf. Etat de l'art) se déroule dans les 8 heures suivantes avec des temps moyens de doublement de 30 à 35mn dans des CBI dispersées dans le cytoplasme, et dans les 6 à 8 heures, les CBI sont établies sur un mode de biofilm (phase 2), avec probablement une communication inter-bactérienne de type « quorum sensing ». Pendant les 10 à 14 heures suivantes se déroule la phase 3 avec un temps de division ralenti et le passage à une forme coccoïde, un aspect dense et globulaires des CBI. Au-delà de la 12^{ème} heure, les bactéries se dissocient des CBI, redeviennent très mobiles et se retrouvent entre les cellules en ombrelle ainsi que dans la lumière vésicale, le tout facilité par l'entrée en apoptose de la cellule infectée. Ceci se traduit par une bactériurie, ainsi que par une dissémination et la colonisation d'autres cellules en ombrelle saines ou des couches cellulaires sous-jacentes, alors que la bactérie entre dans une phase de filamentation. La 2^{ème} génération de CBI présente des temps de doublement de 60 mn.

L'exfoliation des cellules urothéliales se produit dans les 36 à 48 heures après l'inoculation. Le processus se poursuit dans les 12 jours suivants avec l'établissement de bactéries quiescentes.

Les mécanismes de défense de l'hôte se mettent en place dès la 6^{ème} heure, avec un afflux de polynucléaires neutrophiles jusqu'à la 32^{ème} heure dirigé de façon très discriminée sur les cellules infectées. Cependant, les PNN ne sont pas efficaces dès lors que les bactéries sont soit intracellulaires, soit extracellulaires et filamentées.

Dans notre cas, la mise au point du modèle murin avec l'établissement des cinétiques de colonisation, ne permet pas de démontrer de différences entre les souches de *E. coli* testées, UPEC, non UPEC exprimant FimH ou non, en termes de persistance de la colonisation, voire de passage à l'infection. Ces observations sont cohérentes avec les résultats de l'adhésion *in vitro* sur la lignée cellulaire humaine T24. Toutes les numérations effectuées sur paroi vésicale démontrent une non détection finale de *E. coli*. Ceci pourrait indiquer soit une élimination complète, sans prolifération intracellulaire, soit la formation de CBI à un niveau non détectable par numération (bactéries non ou peu cultivables, niveau inférieur à la limite de détection).

Les conditions expérimentales pourraient également expliquer certaines divergences bibliographiques. Nos choix expérimentaux ont essentiellement porté sur: a) la dose infectante $\leq 10^7$ CFU définie comme permettant d'éviter la super-infection et l'évolution vers la cystite chronique et la bactériurie avec une absence d'effet dose au-delà, chez la souche de souris C57BL/6. La dose infectante est par ailleurs liée à une plus forte expression des pili de type 1 et au rôle joué par ceux-ci dans l'adhésion aux uroplakines ; b) le volume (50 μ L) inoculé lentement afin d'éviter un reflux vésico-urétéral sous pression favorisant plutôt un modèle de pyélonéphrite, c) l'inoculation manuelle, intra-vésicale par voie transurétrale en maîtrisant l'espace mort de l'embase du cathéter, en butée douce pour ne pas blesser la vessie. Ce mode d'inoculation ne reproduit pas fidèlement la physio-pathologie de l'infection urinaire par voie ascendante, majorant potentiellement l'adhésion et donc la charge bactérienne récupérée ultérieurement, mais reste le plus approprié et le moins traumatique.

Le couple C57BL/6 –UTI89, à une dose de 10^7 CFU, avec un volume d'inoculation de 50 μ L a été utilisé au moins dans quatre publications depuis 2008 visant à explorer certains mécanismes physiopathologiques de l'IU (209) et dans trois approches thérapeutiques avec des doses inoculées variables(209).

Outre qu'elle a été isolée de cystite humaine, chez un patient ayant des cystites récurrentes, nous avons retenu UTI89 par cohérence avec les autres essais publiés et sur la base de nos premiers résultats d'adhésion aux cellules T24 *in vitro* et la souche de souris C57BL/6 du fait de son adaptation à l'étude des cystites et de leur prévention sur la base de la littérature. L'infection urinaire y est autolimitée, l'inflammation et la bactériurie étant spontanément

résolutive, la bactérie formant rapidement des réservoirs quiescents dans le tissu vésical et pouvant de temps à autres ré-initier une infection aiguë (211).

Les modèles murins ont largement contribué à la connaissance de la physiopathologie de l'infection urinaire. Notons cependant, qu'ils peuvent ne pas rendre compte exactement de la physiopathologie de l'infection urinaire humaine, ainsi l'analyse de transcriptomes d'*E.coli* isolés dans des urines de femmes infectées et de souris montrent des différences entre l'infection murine et l'infection humaine (214). Les gènes codant par exemple pour les fimbriae P, F1C, Auf sont hautement exprimés chez la souris, mais ne s'expriment pas dans les urines humaines. Chez la souris, la souche d'*E.coli* mutante *pst*, dont l'expression des pili de type 1 est moindre, est associée à une aptitude moindre à provoquer des IU (70). Les pili 1 sont nécessaires à l'infection murine (stimulation de l'inflammation, invasion, biofilm) et inconstamment présents dans l'infection humaine, (214), dans laquelle leur fonction est mal précisée (par exemple, liaison à la protéine de Tamm-Horsfall qui agirait comme un récepteur soluble).

Ainsi, si dans les modèles animaux, les pili de type 1 sont des facteurs de virulence majeurs (71), leur rôle en pathologie humaine est moins clair. Ils sont présents à la fois chez les souches pathogènes et les souches commensales et la prévalence du gène *fim* ne varie pas de façon significative selon le degré de virulence des souches d'UPEC (62, 214). Les pili P joueraient un rôle important dans l'IU ascendante et les pyélonéphrites humaines, par une adhésion via PapG (62).

Les essais *in vivo* réalisés en inoculant UTI89 pré-incubée avec C102 (effet inhibiteur d'adhésion démontré sur lignée T24) ne nous ont pas permis de documenter clairement ni l'inhibition de l'adhésion quatre heures après l'inoculation, ni l'inhibition de la colonisation à trois jours, contrairement à certaines publications explorant, il est vrai, d'autres voies et d'autres produits que les dérivés de la canneberge (57, 119, 202).

Ces travaux ont été réalisés suite aux essais sur lignée T24, afin de « valider » les résultats obtenus et doivent être considérés uniquement par rapport à cet objectif. En effet, la réalisation de ces essais *in vivo* présente plusieurs écueils :

- colonisation et réponse inflammatoire transitoire suite à l'inoculation intra-vésicale. Ce point fait déjà l'objet d'une controverse si l'on analyse la littérature avec des résultats très variables que ce soit en termes de réelle infection et/ou de récurrences. La persistance et/ou la recolonisation vésicale pourrait être une nouvelle approche;

- traitement de la souche bactérienne et non des animaux sous expérimentation. Ce choix avait été fait sur la base de nos résultats *in vitro* et surtout afin d'assurer une homogénéité du contact avec le produit. Le traitement des animaux par l'eau de boisson *ad libidum* peut en effet conduire à des variations importantes de prise ; *a contrario*, les conditions choisies induisent une absence de produit et/ou métabolites au niveau vésical;
- de la même manière, l'adaptation de la souche au C102 a été réalisée préalablement à l'inoculation et l'absence de produit et/ou métabolites au niveau vésical pourrait conduire à une perte de l'effet, au moins dans le cas des essais sur plusieurs jours;
- enfin, l'effet canneberge pourrait ne pas être univoque.

L'ensemble de ces éléments nous a donc conduit à privilégier à ce stade le modèle sur cellule eucaryote et les essais et contact *in vitro* afin de valider un type d'effet noté.

5.1.3 Moyens d'étude de l'adhésion bactérienne sur lignées de cellules eucaryotes

Deux grands types de méthodes sont décrits; l'étude *ex vivo* de l'activité anti-adhésion d'urine d'individus ou animaux ayant consommé des dérivés de la canneberge (17, 18, 140, 145, 203) et l'étude de l'inhibition de l'adhésion d'UPEC aux cellules eucaryotes selon différentes modalités de contact avec la canneberge (15, 19, 83, 148, 202). La réglementation actuelle, portant sur les essais cliniques chez l'homme ou sur l'expérimentation animale, rend difficile de mise en œuvre, à des fins de screening, la première approche.

C'est donc la deuxième voie qui a été choisie, nous amenant à conduire en parallèle aux essais *in vivo* une approche *in vitro*.

Au vu de la littérature disponible à l'initiation de ce travail, nous nous sommes centrés sur **l'adhésion bactérienne** (13, 15, 19, 127, 128, 148, 215) et avons montré que celle-ci était inhibée par une phytothérapie disponible dans le commerce (Urisanol®). Cette inhibition était dose dépendante et demandait un temps de contact prolongé avec les bactéries, nous amenant à préciser des conditions robustes d'analyse de l'effet (10 subcultures, concentration de 1%). De plus, en accord avec la littérature, cette inhibition était réversible, en faveur d'un mécanisme indépendant d'une modification du génome, élément important chez une bactérie dont on connaît le taux élevé de mutation.

L'adhésion bactérienne met en jeu des mécanismes considérés à la fois non spécifiques et spécifiques passant par les pili ou fimbriae et le flagelle. Une fois établi l'effet positif de la canneberge dans la santé de l'arbre urinaire, de nombreuses publications se sont attachées d'une part, à étudier la concentration en métabolites dérivés de la canneberge dans les urines humaines après consommation de canneberge sous forme d'extraits ou de jus, et d'autre part à évaluer ensuite l'activité de ces urines sur des souches d'UPEC et à en décrypter le mécanisme.

L'action mise en avant pour la canneberge était plus particulièrement une inhibition de l'adhésion (11, 12, 127).

Alors qu'une grande majorité de souches d'UPEC possède des pili de type 1 (90%), des fimbriae P (40 à 60%), S (30 à 60%) et des adhésines afimbriales (0 à 12,5%), leur rôle dans l'adhésion demeure sujet de controverse et la littérature récente avance d'autres mécanismes d'adhésion des UPEC aux cellules vésicales, l'adhésion FimH dépendante n'étant que l'une des composantes.

L'effet de la canneberge sur l'adhésion associée aux pili 1 est attribué au fructose, cependant dix fois moins puissant que le mannose (12); l'utilisation de mannosides chez la souris offre une protection significative à l'égard des infections associées au cathétérisme vésical provoquée par des UPEC, en réduisant la formation de biofilm et de CBI, et en potentialisant l'activité du triméthoprime-sulfométhoxazole (119).

L'effet de la canneberge sur l'adhésion associée aux pili P est attribué à un composé non dialysable (12), aujourd'hui assimilé aux proanthocyanidines, et qui a fait l'objet de nombreuses études (13, 15, 19, 83, 128, 148, 201, 216), A plus que B (186, 217).

Lors d'exposition prolongée, la canneberge agirait en inhibant la synthèse des P-fimbriae(203).

Lavigne *et al.* (203) ont montré que *V.macrocarpon* inhibait l'adhésion de plusieurs souches d'*E.coli* quelqu'en soient les capacités d'adhésion (présence ou non de de fimbriae de type 1 ou de pili P), mais que les pili P contribuaient pour 85% de l'adhésion totale, l'adhésion « nette » des pili de type 1 était de 2.5, alors que pour les souches possédant les deux adhésines l'adhésion était de 17,5. Cependant, selon ces mêmes auteurs, les souches dépourvues de ces deux adhésines adhèrent à l'uroépithélium, via d'autres adhésines, qualifiées d'accessoires dont la syntgèse ou l'action est également sensible à l'action des PAC.

L'adhésion bactérienne peut s'étudier de manière analytique en utilisant des modèles sans rapport avec la physiopathologie mais qui impliquent une voie d'intérêt, ou de manière intégrative en faisant interagir la bactérie et sa cible naturelle qui est la cellule urothéliale.

5.1.3.1 Approche analytique

Parmi les méthodes d'étude des propriétés adhérentes des UPEC, l'agglutination est très souvent utilisée, avec pour objet la vérification *in vitro* de l'existence de fimbriae fonctionnels.

L'amplification et la vérification de l'expression de FimH des pili 1 fait habituellement appel à des essais (26, 65, 213) :

- d'agglutination sur levures (*Saccharomyces cerevisiae*) après 24 à 48 heures de culture en bouillon de Luria à 37°C, et des suspensions de concentration décroissantes, le titre retenu étant celui pour lequel la suspension la plus diluée donne une aggrégation (70, 117, 209)
- d'hémagglutination sur globules rouges humains ORh-, ou encore sur des hématies de hamster (67, 210, 214, 218, 219); en présence de D-mannose, l'inhibition de l'hémagglutination sur hématies de hamster est une caractéristique importante des pili de type 1 (95).

Pour les fimbriae P, des billes de verre portant des récepteurs Gal-Gal ou hématies humaines A Rh+ (12, 19) ou des hématies de mouton (15) sont utilisées après culture préférentielle sur milieu trypticase soja pour favoriser l'expression des P fimbriae (145).

Les conditions de culture sont importantes à considérer, elles interviennent dans l'expression des pili de type 1 :

- en pratique les bactéries cultivées sous forme planctonique expriment pas ou aussi peu de pili de type 1 que des souches mutantes déficientes en gène *fim* (213) ;
- l'agitation ou non de la culture module également l'expression des gènes, y compris des pili de type 1 (209); ce paramètre va également impacter sur le contact entre cellules;
- l'effet du milieu de culture est aussi avancé, le milieu trypticase-soja serait plus favorables à l'expression des pili P, le milieu de Luria-Bertani favorisant plutôt l'expression des pili de type 1 (117).

Les essais d'agglutination que nous avons initialement menés pour présélectionner les souches d'*E.coli* n'ont pas été contributifs. En utilisant systématiquement un bouillon TS pour

toutes les subcultures, les conditions d'expression de FimH ont pu ne pas être optimales, alors que l'expression des pili P a pu, en revanche, être préférentielle. Cependant, les titres d'hémagglutination observés sont restés bas quelle que soit la souche testée. L'analyse de la littérature démontre également des titres souvent bas (67) et surtout une inhibition du phénomène généralement partielle.

On peut ainsi s'interroger sur la pertinence d'approches aussi focalisées pour analyser de manière robuste un éventuel effet thérapeutique d'extraits naturels comportant un grand nombre de molécules. Comme nous le verrons maintenant, c'est l'approche intégrative qui a permis de mettre en évidence d'autres mécanismes que ceux médiés par les pili et fimbriae.

5.1.3.2 Approche intégrative

a) Vérification de la robustesse du modèle et choix de la souche bactérienne

La lignée de cellules humaines de carcinome de vessie T24 est classiquement utilisée dans les essais d'adhésion (18, 68, 83, 86, 117, 150-152) ; plus rarement d'autres lignées ont pu être utilisées (cellules ovariennes de hamster chinois (12), cellules humaines de carcinome de vessie HTB9, cellules uréthrales humaines (148); cellules vaginales (15, 19); cellules de la lignée urothéliale pD07i viro-immortalisée (220); cellules de carcinome vésical HT1376 (221); cellules humaines de sédiments d'urines fraîches de femmes saines (146), les essais que nous avons conduits sur cellules urothéliales d'origine murine (NUC1) ont été décevants, confirmant comme d'autres (153, 155) qu'il existe une sélectivité des souches d'*E.coli* pour certaines espèces.

L'adhésion peut être évaluée de différentes manières, par numération au microscope (153, 154), cytométrie en fluorescence (188, 220), plus rarement, par radiomarquage des bactéries (uridine ou adénine tritiée), avec une très bonne sensibilité et des coefficients de variation intra et inter-essais inférieurs à 10 et 15% respectivement (156, 188). Nous avons choisi cette dernière méthode peu coûteuse, reproductible, dont le principal inconvénient est d'être une méthode chaude nécessitant un laboratoire équipé.

Avant de procéder aux tests d'adhésion, et afin de choisir les meilleures conditions d'essai, nous avons vérifié un certain nombre de paramètres susceptibles d'interférer avec les essais d'adhésion et leur interprétation.

➤ Cytotoxicité des extraits

Dans un premier temps nous avons analysé la cytotoxicité des extraits mis à notre disposition, ce qui nous a conduits à retenir le composé C102, à une concentration maximale de 1% (P/V). Certains extraits peuvent agir comme des oxydants et provoquer des dommages directs sur les cultures cellulaires (222), il était donc important de s'assurer que cela n'était pas le cas avec le produit retenu.

Pour analyser la viabilité des cellules T24 exposées à différents produits, nous avons utilisé une méthode colorimétrique utilisant un sel de tétrazolium, dont la transformation enzymatique par la déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes, conduit à un produit soluble orange, le formazan, dont la densité optique est proportionnelle au nombre de cellules viables (190).

C102, correspondant à la spécialité Urisanol[®] (Naturactive, Pierre Fabre Médicament, Castres, France) a été caractérisé par le fabricant, il s'agit d'un extrait concentré de canneberge, composé de 90% de canneberge et de 10% d'hydroxyde de magnésium et de triphosphate de calcium. Sa teneur en proanthocyanidines a été déterminée par méthode de Porter (189) et est de 18.65 ± 0.35 mg / g de poids sec.

Dans un article maintenant historique, Sobota (11) montrait l'**absence d'effet bactéricide** du jus de canneberge. La littérature va principalement dans ce sens (83, 127, 196) même si certaines souches semblent voir leur croissance inhibée (83). Nous avons également observé une variabilité d'activité antibactérienne des extraits de canneberge en fonction des souches, les souches MG1655 et GGB1561 se révélant plus sensibles que les souches UTI89 et CFT073. En complément, Ermel montrait que la canneberge, à l'inverse, ne constitue pas un nutriment susceptible de favoriser la croissance bactérienne(83).

Nous avons testé les effets réitérés de C102 sur la croissance bactérienne de 4 souches, estimée par la densité optique de la culture en bouillon immédiatement avant repiquage sur 10 subcultures successives et avons pu nous assurer que C102 n'avait pas d'effet antibactérien direct significatif sur UTI89. Cependant, la densité optique dépend de la masse des bactéries (nombre et/ou taille), et il est possible qu'à DO égale le nombre de bactéries soit plus faible lorsque celles-ci sont plus volumineuses. Nous avons observé, en effet, que l'exposition chronique de la souche UTI89 amène à une augmentation de la longueur, de la surface et par conséquent du volume des bactéries.

➤ **Cytotoxicité des bactéries et des surnageants de culture**

Dans la littérature portant sur les effets de la canneberge sur l'adhésion cellulaire, il est rare que soit vérifiée l'absence d'effet cytotoxique des bactéries sur les cellules épithéliales bien qu'un grand nombre de toxines ait été rapporté chez *E.coli*.

La souche CFT073, dont le génome, entièrement décrypté (200) et particulièrement riche en gènes codant pour des adhésines fimbriales spécifiques (adhésines P, F1C, fimbriae de type 1), a été souvent utilisée pour étudier les phénomènes d'adhésion. Nous l'avons écartée du fait de sa cytotoxicité sur les cellules T24. En effet, cette souche est connue pour produire de nombreuses toxines (8), comme la toxine vacuolisante/*vat* et la toxine sécrétée auto-transporteuse/*sat*. Elle sécrète en particulier l'alpha-hémolysine (HLyA) sous la gouvernance du gène *hly*, HLyA, laquelle est produite par 50% environ des souches d'*E.coli* uropathogènes et est associée à des infections urinaires de sévérité clinique accrue. Contrairement à la souche CIP 108106 qui en est pourtant très proche, CFT073 n'exprime pas le facteur nécrosant cytotoxique/*CNF1* qui dans les modèles murins, peut promouvoir l'apoptose et l'exfoliation des cellules urothéliales et favoriser la dissémination et la persistance des UPEC dans le tractus urinaire.

La souche ABU83972, peut produire la toxine CNF1 et une alpha-hémolysine mais qui ne sont pas fonctionnelles chez cette souche non cytotoxique (8).

Les autres souches testées n'étaient pas cytotoxiques de façon significative, bien que la production de l'alpha-hémolysine et de VAT soit connue chez UTI89 et MG1655, UTI89 exprimant de plus CNF1 (8).

Nous avons donc sélectionné la souche UTI89 sur la base de :

- sa faible cytotoxicité sur les cellules urothéliales,
- sur son niveau d'adhésion (21%) compatible avec la recherche d'un effet inhibiteur.
- son origine : cette souche a été isolée dans un contexte d'infection urinaire basse, correspondant aux indications d'usage du jus de canneberge.
- son utilisation fréquente dans la littérature portant sur les infections urinaires et/ou l'effet canneberge

UTI89 contient un plasmide (pUTI89, de 114230 paires de bases, et 4 grands îlots de pathogénicité dans son génome (de 5065741 paires de bases), ainsi que 10 opérons pili putatifs (76), ainsi que des gènes codant pour 2 entérotoxines, CNF et hémolysine. La catégorisation fonctionnelle de son protéome a été faite et la reconstruction métabolique selon

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) est disponible (www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=eci).

b) Application à l'étude des propriétés d'un extrait commercial de canneberge

➤ **L'exposition préalable**

Par les essais préliminaires, nous avons constaté que l'effet inhibiteur de l'adhésion par C102 est dépendant du nombre de subcultures d'UTI89 en présence de C102 avant mise en contact avec les cellules.

Ahuja *et al.* (127) constataient un effet immédiat de la canneberge sur l'agglutination alors que l'inhibition de l'adhésion nécessitait une exposition plus prolongée, de 2 à 4 subcultures selon les souches bactériennes.

De leur côté, lors d'essais conduits sur milieu LB, Ermel *et al.* (83) ont également constaté que:

- sans pré-incubation avec les extraits de canneberge préalablement à l'essai, la réduction de l'adhésion aux cellules T24 approchait de 75% ; lorsque les bactéries étaient pré-incubées (pendant 30 minutes) la réduction de l'adhésion dépassait les 90%
- l'inhibition était cinq fois plus importante lorsque les bactéries étaient en phase exponentielle de croissance, rendant plus facile la mise en évidence de l'effet anti-adhésion, ce qui serait expliqué par des régulations croisées entre les différents opérons codant pour des adhésines, confortant le choix de notre technique en phase exponentielle de croissance (marquage radioactif avec incorporation d'adénine tritiée par des bactéries)
- cet effet s'exerçait spécifiquement à l'encontre de bactéries ayant des pili P.

Les auteurs notaient de plus que l'action dite non spécifique, décrite par Pinzon-Arango *et al.* (148), et attribuée à un effet portant sur le lipolysaccharide était de moindre ampleur (148, 223).

Un effet d'inhibition de l'adhésion était également observé, mais avec un impact moindre et indépendamment de la dose, lorsque les cellules T24 étaient exposées aux extraits préalablement à l'essai sans en tirer de conclusions spécifiques. Nous n'avons pas pu confirmer cet effet.

Cette observation conduit à s'interroger sur le site d'action des principes actifs de la canneberge et de leurs métabolites. Il peut en effet s'agir a) d'un effet direct des composés

ingérés ou de leurs métabolites sur le réservoir fécal b) d'un effet direct, sur des bactéries en voie de colonisation, des composés ou de leurs métabolites sécrétés dans les urines, c) d'un effet portant sur les cellules urothéliales, ou d) d'une combinaison de l'une ou l'autre de ces hypothèses, pour l'un ou l'autre des composés actifs.

La plupart des études portant sur les effets de la canneberge s'intéressaient à de courtes expositions (15, 132). Les patients sujets aux récurrences d'IU étant encouragés à consommer de la canneberge (extraits, jus) pendant de longues périodes, nous avons choisi de mimer une exposition « chronique » de la souche d'*E.coli* pendant 10 subcultures.

Ce facteur a été pris en compte pour la première fois par Pinzon-Arango qui s'est intéressé :

- à l'intensité des forces d'adhésion, en microscopie à force atomique, de deux souches d'UPEC, l'une non fimbriée (HB101), l'autre mutante exprimant les fimbriae P

(HB101pDC1), à des lames de verre recouvertes d'aminosilane, ainsi que l'adhésion, par comptage en microscopie à contraste de phase, de la souche exprimant des fimbriae P à des cellules uroépithéliales (CRL 9520 VA)(148).

- sous l'effet de la canneberge (cocktail commercial de canneberge à 10% ou de PAC 128µg/mL) à des concentrations variables et à laquelle les bactéries étaient exposées pendant 1, 4, 8 et 12 subcultures (mais pas pendant l'essai proprement dit) versus témoins sans canneberge, en bouillon TS ; l'effet inhibiteur croissait à partir de la 4^{ème} subculture pour les supports inertes et dès la première subculture pour les cellules uroépithéliales, en cohérence avec nos propres observations d'un effet moindre pour 2 subcultures par rapport à 10 subcultures.

L'auteur en conclut qu'il existe bien un effet de la canneberge (jus ou PAC) avec une réduction de l'adhésion a) des 2 souches d'*E.coli* aux supports inertes, par conséquent l'effet ne s'exerce pas qu'au travers des fimbriae P, et le rôle du LPS est avancé b) aux cellules urothéliales pour la souche exprimant les pili P. Ces phénomènes sont nombre de subcultures-dépendants, concentration-dépendants et réversibles, en cohérence avec nos observations.

En outre, l'effet de la canneberge ne s'exercerait pas sur l'expression des fimbriae P, mais plutôt sur des changements de configuration, avec un raccourcissement du polymère qui les constituent (148). Enfin, les auteurs concluent qu'une exposition continue d'*E.coli* au jus de canneberge se traduirait par une incapacité de la bactérie à adhérer aux cellules uroépithéliales, les bactéries croissant dans un environnement riche en canneberge et/ou métabolites.

➤ **Le temps de réaction**

Nous devons ici considérer deux niveaux de temps de réaction : un temps court lié au contact bactéries/cellules et un temps long lié au contact bactéries/produit. Nous montrons que le contact avec le C102 inhibe de façon significative l'adhésion aux cellules T24 dans le cas d'une exposition préalable de la bactérie.

Ainsi, les essais avec présence du produit lors du contact bactérie/cellules correspondent à un effet direct et immédiat comme dans le cas des tests d'hémagglutination (30-60 min) (145) analysant principalement les fimbriae de type P (19), ou d'adhésion aux cellules urothéliales, les temps variant de 1 h (Mathison suggère que 1 heure de temps de contact d'urines issues de consommateurs de canneberge en co-incubation avec *E.coli* et cellules urothéliales est suffisant (156)) à 3 h (145, 221).

Par opposition, tout essai dont le temps de réaction est long au vu du temps de division de la bactérie (20 min en phase exponentielle) conduit à des résultats dépendant de plusieurs phénomènes immédiats ou secondaires, et relevant de mécanismes et de cibles potentiellement différents.

Dans notre étude, le temps de contact des essais d'adhésion était de 2 heures, en accord avec la littérature, couplé à une « adaptation » préalable de la bactérie par 10 subcultures successives en présence de C102. Quelles que soient les conditions d'essai (*in vitro* et *in vivo*), les modifications significatives en termes d'adhésion et de mobilité n'ont été observées que dans le cas d'un maintien de la présence de C102 durant la croissance bactérienne. Seules ces conditions seront discutées par la suite.

➤ **L'effet dose**

La dose d'extrait de canneberge est déterminante dans l'effet anti-adhésion : C102 à 1% est plus efficace qu'à 0,1%, ce que d'autres auteurs ont constaté *in vitro* (15-17, 19, 68, 83, 148). Gupta détecte une activité anti-adhésion de l'ordre de 70%, pour des concentrations de 10 à 50 µg de proanthocyanidines/ml de suspension finale, dose-dépendante, tant en hémagglutination de GR humains que sur les cellules, et ce tant sur souches d'*E.coli* sensibles que résistantes aux antibiotiques(15). Plus les doses en proanthocyanidines sont élevées plus le temps de contact nécessaire pour inhiber l'adhésion est court (148). De façon intéressante, Pinzon-Arango signale que la préparation commerciale présentait un avantage sur la PAC isolée dans l'effet observé, soit que d'autres composés interagissent avec les PAC soit qu'ils

aient eux-mêmes une activité propre, ou encore que les PAC soient dénaturées lors du processus d'extraction(148).

Alors que la dose est un paramètre important de l'efficacité anti-adhésion, l'absence de méthode standardisée et normée pour apprécier la teneur en principes actifs des préparations commerciales explique probablement les disparités d'activité des produits commerciaux et représente un obstacle important pour juger de l'efficacité en clinique humaine et établir des recommandations solides.

➤ **La réversibilité**

L'arrêt des subcultures d'*E.coli* UTI89 en présence de C102, suivi de 10 subcultures sans C102, se traduit par une perte de l'effet anti-adhésion.

Si Ahuja *et al.* (127) avançaient que le jus de canneberge inhibait de façon irréversible l'expression des pili P, des études plus récentes sont, comme la nôtre, en faveur de la réversibilité de cet effet (148).

La réversibilité était déjà suggérée par des observations cliniques anciennes rapportant que la suppression du jus de canneberge dans l'alimentation de patients en ayant consommé pendant 21 jours se traduisait par des infections urinaires récurrentes dans les 6 semaines suivant l'arrêt chez plus de 60% de ces patients(148).

Enfin, l'effet inhibiteur s'exerce autant sur des souches fimbriées qu'afimbriées, suggérant d'autres voies d'adhésion que les pili et fimbriae, notamment le lipopolysaccharide de la paroi est avancé comme piste d'intérêt (148).

Ainsi, des souches de *E. coli* exprimant l'adhésine PapG et les fimbriae de type 1 sont décrites comme plus adhérentes aux cellules T24 que les souches qui ne les produisent pas mais également que celles ne produisant que les fimbriae de type 1 (16). Cependant, l'observation la plus importante est certainement que les souches n'exprimant aucune de ces deux adhésines sont toujours capables d'adhérer aux cellules T24 et que cette capacité d'adhésion est inhibée par de l'urine contenant des métabolites de la canneberge. Ces résultats corroborent l'idée de l'intervention d'autres fimbriae/adhésines, dans le rôle potentiel de la canneberge en termes de prévention des UTI (16), voire d'éléments non fimbriaux.

En revanche, nous n'avons pas trouvé trace dans la littérature de l'effet « rebond » que nous avons observé à l'arrêt des subcultures en présence de C102.

5.2 La complexité des voies intervenant dans l'effet de la canneberge sur l'adhésion microbienne

A la lumière de nos résultats, qui montrent un effet puissant de la canneberge sous la condition d'une exposition prolongée de la bactérie, et de la multiplicité des voies participant à l'adhésion, nous avons voulu analyser de manière holistique les mécanismes impliqués en étudiant les modifications de l'expression du génome d'UTI89 exposé de manière prolongée au C102 1% (P/V).

En effet, comme tout composé naturel, le C102 comporte un grand nombre de molécules et on pouvait envisager que soient impliquées plusieurs voies fonctionnelles dans son action. Cette hypothèse a été validée, tant par les résultats du transcriptome bactérien que par la vérification par microscopie électronique et en champ large, de l'effet sur le flagelle et la mobilité de l'extrait étudié.

5.2.1 Complexité de la composition et des mécanismes d'action de la canneberge

Selon la littérature, la canneberge a deux types différents de molécules inhibant l'adhésion : des molécules de bas poids moléculaire dits dialysables (fructose, acides quinique, citrique et malique, vitamine C) qui inhibent les fimbriae de type 1, mannose-sensibles et des molécules de fort poids moléculaire, les proanthocyanidines, en particulier de type A, composés phénoliques qui inhibent les fimbriae P, mannose-résistants par le biais de récepteurs Gal-Gal (19). Cependant l'activité anti-adhésion était antérieurement décrite comme portant à la fois sur les pili 1 et P (12), ce qui correspond bien à nos essais dont les conditions de culture n'ont pas cherché à privilégier une voie plutôt qu'une autre et dont les extraits atomisés de canneberge comprennent les composés naturellement présents dans la baie.

Pour Miyazaki *et al.* (86) d'autres mécanismes d'adhésion que les pili de type 1, P et S ou les adhésines afimbriales existent. Il s'agit des adhésines auto-transporteuses telles que l'antigène 43, les pili conjugatifs ou le contact direct avec l'enveloppe cellulaire, qui pourraient être suffisants pour initier les premiers temps de la colonisation. Pinzon-Arango *et al.* (148) suggèrent de plus que le lipopolysaccharide (LPS) de la paroi des BGN participe à l'effet observé, les PAC pouvant se lier aux LPS bactériens.

Récemment encore Hotchkiss *et al.* (68) ont avancé dans la compréhension de l'action de la canneberge en montrant que des oligosaccharides de type arabino-xyloglucane ayant une forte affinité pour les pili de type 1, étaient capables d'inhiber l'adhésion d'*E.coli* UTI89 aux

cellules de carcinome urothélial humain T24, au même niveau que le D-mannose pris comme témoin. De la même manière, ces composés inhibaient les fimbriae P chez CFT073, permettant de conclure à l'activité de l'arabinoglucane en plus des pro-anthocyanidines, et confirmant ainsi la diversité des ingrédients bioactifs et potentiellement, celle des cibles des extraits de canneberge.

Parallèlement, Rafsanjany *et al.* (65) montrent que des extraits de canneberge appauvris en proanthocyanidines conservent une activité inhibitrice, dose-dépendante, de l'adhésion aux cellules T24, alors que d'autre part, l'adhésion médiée par les fimbriae P n'est pas influencée par les extraits de canneberge.

D'autres composés, tels que certains polyphénols métabolites des PAC sous l'action du microbiote intestinal ont été identifiés comme ayant des propriétés antiadhésives à l'égard des souches uropathogènes d'*E.coli* (187). La myricétine a également été décrite comme ayant ces mêmes propriétés (188).

Les résultats relativement contradictoires de la littérature pourraient être en partie liés à la difficulté de réalisation des essais en présence de composés purifiés ou de fractions enrichies. En effet, le caractère hydrosoluble ou non des composés et les voies d'obtention des fractions (extraction éthanolique,...) conduisent à la présence de solvants pouvant largement modifier les résultats de tests très sensibles.

Dans une étude récente Rafsanjany (65) défend une vision dynamique de l'effet de la canneberge où l'action directe d'inhibition de la protéine FimH par les PAC et d'autres composés de la canneberge initie un rétrocontrôle positif amenant à l'augmentation de l'expression des gènes *fimH*, *papGII*, *papGIII* et *focG*. Dans cette hypothèse, l'effet final, bénéfique ou négatif, dépend de l'état d'équilibre entre ces différents mécanismes.

Ceci pourrait expliquer en partie l'effet rebond que nous avons observé à l'arrêt de l'incubation en présence de C102 et qui nécessite d'être confirmé et exploré.

5.2.2 Effet post -transcriptionnel des composés du jus de canneberge

L'étude par RT-qPCR du transcriptome de CFT073 a été utilisée par Snyder *et al.* (224) pour quantifier les gènes exprimés *in vivo*, chez la souris, par les bactéries isolées des urines au décours du processus infectieux.

Bien qu'une action de la canneberge, directement dans la bactérie, sur l'expression des gènes codant pour les adhésines ait pu être avancée(143), cet effet est à notre connaissance, pour la

première fois abordé ici de manière exhaustive par analyse Affymetrix, ce qui en montre la puissance et le caractère multidimensionnel déjà reconnu (216).

L'analyse du transcriptome est de plus en plus utilisée pour décrypter les mécanismes de virulence des bactéries et comparer sans *a priori* différentes conditions de culture ou de présentations cliniques (225).

Les profils transcriptionnels et la mutagenèse par transposons sont couramment utilisés pour analyser l'expression des gènes en général et des gènes nécessaires à la croissance et à la survie en particulier.

L'abondance relative d'un transcript particulier est utilisée pour déterminer les gènes surexprimés ou réprimés sous une condition spécifique. Il est également possible de déterminer la quantité absolue d'un transcript particulier en utilisant des batteries spécialisées que sont les puces ADN (Affymetrix), technique que nous avons utilisée.

Le séquençage ARN est en plein essor, selon Subashchandrabose (225) il présente l'avantage de pouvoir analyser, sous différentes conditions, l'expression génomique tant absolue que différentielle, de façon globale et non biaisée ; il est de plus en plus utilisé dans les modèles d'UPEC. La puce que nous avons utilisée combine l'expression de gènes correspondant à différentes souches de *E. coli*. Ceci permet notamment de démontrer un impact étendu de la canneberge.

5.2.2.1 Affymetrix, pili et canneberge.

Les résultats obtenus indiquent que l'extrait de canneberge affecte l'expression des gènes impliqués dans la synthèse, la régulation de certains des pili impliqués dans l'adhésion. Rappelons que les 10 subcultures en présence de C102 1% (P/V) répriment de manière significative l'expression des gènes suivants:

Pour les pili de type 1

<i>fim A</i>	sub-unité majeure de fimbrine de type1
<i>fim C</i>	Chaperone péri-plasmique nécessaire pour les pili de type 1
<i>fim D</i>	Protéine de membrane externe OMP intervenant dans l'export et l'assemblage des pili 1
<i>fim F</i>	Précurseur protéine FimF et morphologie fimbriale
<i>fim G</i>	morphologie fimbriale
<i>fim H</i>	Sub-unité mineure fimbriale correspondant à l'adhésine D-mannose sensible
<i>fim I</i>	Protéine fimbriale

L'opéron *fim* code pour les 9 gènes nécessaires à la synthèse, l'assemblage et la régulation des pili de type 1. (61, 95). Nous observons que la culture en présence de C102 1% (P/V) est associée à une moindre expression de l'ensemble des **gènes de structure** des pili :

- *fim A* gène de structure de la piline ;
- *fim I* codant pour une protéine fimbriale dont la fonction demeure inconnue ;
- *fim H* dont dépend l'adhésine terminale des pili 1 ; il ne s'exprimerait pas chez les bactéries planctoniques; parallèlement, Staerk *et al.* (213) indiquent que l'expression est limitée lorsque les bactéries (UTI89) proviennent de populations sessiles;
- *fim F* et *fim G* codent pour des protéines associées à l'adhésine Fim H formant la structure filamenteuse qui ancre le pili et détermine sa longueur,
- deux gènes impliqués dans le **transport et l'assemblage**, *fim C* et *fim D* ; Fim C est une protéine chaperone périplasmique qui lie et plie les sous-unités fimbriales, et participe au transport des protéines fimbriales jusqu'à la protéine extramembranaire Fim D qui ouvre un pore par lequel les sous-unités sont exportées et assemblées en filament. Au moment d'entrer dans le périplasme, les sous-unités dépliées de piline, dont la configuration est de type immunoglobuline, interagissent instantanément avec la chaperone correspondante qui est FimC. Ces sous-unités vont être complétées par le G1 bêta-stand "donné" par FimC, stabilisant le tout. Les sub-unités qui n'interagissent pas avec FimC sont incapables de se plier correctement et sont dégradées. La chaperone transmet ensuite la sous-unité à FimD qui lui permet de franchir la membrane, pour être alors assemblée en pili mature(2). Il est donc possible que C102 à 1% (P/V), en réduisant l'expression de Fim C et D, conduise à une plus grande proportion de sous-unités de piline dégradées, agissant selon un mécanisme de type pilicide plus que mannosidique. Enfin, ceci serait aussi en cohérence avec l'apparente disparition des fimbriae observée en microscopie électronique.

Notons que l'expression des gènes associés à la régulation et aux inversions de phase (*fim B*, *E*) n'est pas modifiée de façon significative (différence des logarithmes : respectivement 0,03 et -0,14, non significatif).

Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature. En effet, l'effet anti-adhésion de la canneberge ne passe pas par des modifications du génome lui-même mais plutôt par une altération de l'expression des gènes. Dans nos conditions d'essai, l'effet canneberge ne se limite pas à une adhésion médiée par FimH. Les essais avec mannose, considéré comme inhibiteur spécifique de FimH, tels que l'hélagglutination sont des essais par contact direct, ne laissant pas de place aux mécanismes adaptatifs. Les 10 subcultures successives sur C102

induissent une modification d'expression génomique touchant beaucoup plus largement les pili de type 1 que ce soit au niveau constitutif ou fonctionnel.

Les pili de type 1 peuvent être présents et inopérants, car ils sont l'objet de variations de phase selon un mécanisme ON/OFF. Les bactéries peuvent rapidement moduler, selon l'environnement, leur choix en adhésines de surface, grâce aux variations de phase, à la fois stratégie d'évasion et réponse adaptative à un changement d'environnement, leur permettant de choisir l'adhésine la plus appropriée au tissu cible (226). Différents signaux environnementaux affectent les changements de phase du gène promoteur *fimS*, comme par exemple l'osmolarité et l'acidification du milieu: les bactéries qui remontent l'arbre urinaire trouvent dans la vessie une urine dont le pH est acide et l'osmolarité modérée. Une protéine induite par le système de tolérance à l'acidité commencerait alors à mettre l'opéron *fim* sur OFF (95). Le nombre de pili 1 est sous contrôle de l'opéron *fim* qui ne dépend pas seulement de ce mécanisme de variation de phase, mais est aussi modulé par régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle (227), ce que nous observons ici.

Enfin, sur des surfaces inertes, l'adhésion médiée par les pili de type 1 détermine des modifications dans la composition des protéines membranaires (Omp) (outer membrane proteins) (228), OmpA, Omp X, Slp et TolC. Cet aspect pourrait être exploré ultérieurement afin de d'établir un lien ou non avec les modifications pariétales observées.

Fimbriae P

En revanche, concernant les fimbriae P, aucun des opérons de type *pap* ou *foc* ne voit son expression modifiée de façon significative par la C102 1% (P/V), en désaccord avec la littérature rapportant un effet de la canneberge sur les fimbriae P (15, 83, 127, 144, 217), plus précisément sur PapGII tel que décrit par Lavigne *et al.* (15) et Ermel *et al.* (16, 83).

Cependant, l'effet sur les fimbriae P pourrait être lié non pas à une modification de l'expression des protéines mais plutôt à une modification configurationnelle, post-transcriptionnelle. Cet effet est illustré par la modification de la configuration des macromolécules (127, 201), avec un raccourcissement par compression, et un tassement des pili P dont la longueur passe de 148 à 48 nm, alors qu'antérieurement cette inhibition était décrite comme relevant d'une compétition avec les adhésines des pili 1 et P. Nos résultats sont ainsi en accord avec les conclusions des travaux de Pinzon-Arango *et al.* (148), réalisés dans des conditions similaires (10-12 subcultures en miliue TS) et le sont pas discordants avec nos résultats en MET (fimbriae non visibles après subcultures).

Si l'implication des pili de type P dans l'action de la canneberge semble bien établie dans la littérature, les mécanismes restent malgré tout incertains.

Les autres systèmes piliés

C102 modifie l'expression des pili de type F1C et de type S

sfa B Protéine régulatrice putative de conversion des fimbriae F1C et S

sfa D Subunité mineure précurseur putative des fimbriae F1C

foc D F1C fimbrial usher

foc F Subunité précurseur des fimbriae F1C

Outre les pili de type 1 et P, d'autres fimbriae jouent un rôle important, comme les fimbriae S et F1C (opérons *pap*, *sfa* et *foc*); certaines adhésines non fimbriales participent aussi à l'adhésion. Par ailleurs, Lavigne *et al.* (16) constatent que l'activité anti-adhésion est présente aussi pour des souches ne présentant ni pili 1 ni fimbriae P, suggérant soit d'autres adhésines soit d'autres mécanismes. Lors de nos essais, nous notons des réductions significatives d'expression de gènes impliqués dans la synthèse et/ou la régulation des fimbriae F1C. Miyazaki *et al.* (86) montrent parmi des UPEC issues d'urines de cystites, toutes adhérentes aux cellules T24, que la moitié d'entre elles ne présente pas d'adhésines identifiées, et que parmi celles-ci un tiers est pourtant invasive. Ils concluent que les pili de type 1, les fimbriae P et S, et l'adhésine afimbriale I ne sont pas essentiels à l'adhésion et à l'invasion et ils font l'hypothèse que l'adhésion n'est peut-être pas indispensable pour les bactéries à temps de doublement court (86).

Les gènes codés au sein des clusters de gènes correspondant aux fimbriae P (*papB*), S (*sfaB*) et F1C (*focB*) expriment des produits qui répriment la transcription et donc l'expression des pili de type 1 chez CFT073 (88). Lorsque la souche CFT073 n'exprime ni pili de type 1 ni fimbriae P, les auteurs notent une expression des fimbriae F1C. Ainsi, des protéines régulatrices d'autres systèmes piliés peuvent aussi réguler l'opéron *fim* par communication croisée : PapB affecte les variations de phase de l'opéron *pap* et inhibe le passage de la phase OFF vers la phase ON de *fim* S.

Rafsanjani (65) constate par RTq-PCR que selon les souches (*E. coli* 2980, NU14) et les conditions de culture, en présence ou en l'absence de cellules urothéliales (T24), les PAC peuvent augmenter ou diminuer l'expression de gènes clés comme *papGII*, *papGIII*, *focG* et *fimH*. Il conclut que lorsque les essais sont faits avec des souches d'UPEC possédant des

adhésines multifonctionnelles, le blocage d'une adhésine est compensé par d'autres adhésines, la bactérie adhérant quelle qu'en soit l'effecteur. De manière surprenante, l'addition d'extraits de canneberge, complets ou appauvris en PAC, entraîne une augmentation de l'expression de *fimH* que l'auteur attribue à une sorte de rétrocontrôle positif de l'effet d'inhibition directe des extraits sur la protéine.

L'expression des pili de type 1 modifie d'autres CUPs, conduisant à une diminution de l'expression de *pap* et de la motilité (87, 88). Ainsi, les souches d'UPEC ont un système complexe d'expression des CUP pili et des flagelles. La littérature indique un rétro-contrôle entre l'expression des fimbriae et des flagelles, considérés comme impliqués dans des fonctions opposées (adhésion/mobilité). Simms & Mobley (229) indiquent ainsi que la surexpression de *focX* (régulation des fimbriae F1C) par CFT073 est associée à une répression de la mobilité et de la production de flagelline. Cependant les travaux de Greene(67) sur l'action du pilicide ec240 sur UTI89 indiquent des effets comparables sur les deux fonctions en parallèle. Ces aspects concernent le rétrocontrôle entre expression/fonction des adhésines et du flagelle et seront développés dans le chapitre suivant.

Alors qu'antérieurement l'effet inhibiteur de la canneberge était décrit comme reposant sur une compétition avec les adhésines des pili 1 et P (12), les mécanismes aujourd'hui paraissent plus subtils.

Pour conclure, la contribution de chaque pili à la virulence des souches UPEC n'étant pas totalement établie (8), nous devons considérer que l'adhésion est permise par des éléments bactériens très divers, que sont non seulement les adhésines mais aussi d'autres structures de surfaces comme les flagelles, ainsi que le LPS (224), et que la part relative de chacun de ces éléments varie dans le temps au cours du processus infectieux (50)

5.2.2.2 Affymetrix, chimotaxie, flagelle et canneberge.

Les gradients chimiques sont « perçus » par la bactérie grâce à de multiples récepteurs transmembranaires (MCPs, methyl-accepting chemotaxis proteins, dont l'expression est diminuée par C102). Ces récepteurs se lient aux produits « attractifs » ou « répulsifs », soit directement, soit en faisant intervenir d'autres protéines périplasmiques ; les signaux sont transmis aux protéines Che qui altèrent la fréquence des alternations des mouvements du flagelle. Les protéines CheW et CheA se lient au récepteur, l'activation du récepteur est sous la dépendance des régulateurs CheB et CheY. CheY induit le mouvement en interagissant

avec FlhM (flagellar switch protein), le flagelle passe d'un sens rotatoire anti-horaire à horaire et se déplace alors de façon linéaire. CheB, par un système de méthylation, régule la « mémoire » que la bactérie a des concentrations chimiques immédiatement antérieures. D'autres protéines Che interviennent encore dans le réseau de transduction des signaux : CheR (méthyltransférases et déméthylases), CheZ qui a un effet sur la concentration en CheY(89).

Nous avons montré que C102 1% (P/V) affecte profondément l'expression du système flagellaire ainsi que la chaîne de chimiotactisme qui lui est intimement liée:

Chémotaxie

<i>cheA</i>	Sensory transducer kinase between chemo-signals receptors and CheB et CheY
<i>cheB</i>	Régulateur de réponse
<i>cheR</i>	Glutamate méthyltransférase
<i>cheW</i>	Régulateur positif de l'activité de la protéine CheA
<i>cheY</i>	Régulateur de la transmission des signaux des chémorécepteurs vers le moteur flagellaire
<i>cheZ</i>	Protéine antagoniste de la chimiotaxie
<i>Ecs2591</i>	Phosphatase de la protéine CheY
<i>tar</i>	Protéine méthy- acceptante, récepteur senseur aspartate
<i>tap</i>	Protéine méthy- acceptante, récepteur senseur peptidique
<i>tsr</i>	Protéine méthy- acceptante

Il existe donc un lien intime entre flagelles et chimiotactisme (230), la chaîne de transduction du signal agirait comme un mécanisme de mémoire à court terme, permettant des comparaisons séquentielles de la concentration de la substance attirante ou repoussante. Les flagelles ont deux types de mouvements :

- antihoraire, grâce auquel la bactérie « nage » de façon linéaire
- horaire, au travers duquel la bactérie « tourne en rond »,
- la mobilité globale de la bactérie résultant de l'alternance de ces 2 mouvements, les mouvements horaires permettant une réorientation du déplacement (89).

Les gènes qui expriment les différentes composantes du flagelle sont organisés selon un ordre hiérarchique précis (89):

- les gènes de classe 1 comprennent le « master » opéron *flhDC* dont l'expression est requise pour la transcription des opérons de classe 2 et 3.
- la classe 2 comprend 8 opérons qui déterminent les composants de la pièce basale
- la classe 3 comprend 6 opérons intervenant dans l'assemblage du filament et le fonctionnement du rotor.

En milieu riche (glucose par ex), chémotaxie et motilité apparaissent comme un luxe dont la bactérie peut se dispenser.

Tableau 19. Opérons codant pour les protéines impliquées dans le chémotactisme.

Classe 1	Classe 2	Classe 3
<i>flhDC</i>	<i>flgAMN</i> <i>flgBCDEFGHIJKL</i> <i>flhBAE</i> <i>fliAZY</i> <i>fliDST</i> <i>fliE</i> <i>fliFGHIJK</i> <i>fliLMNOPQR</i>	<i>fliC</i> <i>motAB cheAW</i> <i>tar tap cheRBYZ</i> <i>aer</i> <i>trg</i> <i>tsr</i>

Selon H. Berg (89).

Nous constatons que C102 agit sur des opérons de classe 2 pour ce qui concerne le flagelle et de classe 3 pour certains des éléments du chémotactisme (**en gras** dans le tableau 19), les deux étant indissociables du point de vue fonctionnel.

Le tableau 20 répertorie les protéines impliquées dans la constitution du flagelle, ainsi que dans sa fonctionnalité et l'opéron concerné(89, 90, 231)). La dernière colonne précise la variation significative observée chez UTI89 après 10 subcultures en présence de C102 1% P/V.

Tableau 20 Protéines impliquées dans l'assemblage du flagelle et la fonction du moteur et dont l'expression est modifiée par le contact avec C102 1% P/V durant 10 subcultures.

Protéine produite par le gène	Fonction ou composant du moteur	Classe opéron	Diminutions Log2 significatives induites par C102 1% P/V (Affymetrix Agilent)
FlgA	Assemblage de P-ring	2	-1
FlgB	Chapeau proximal	2	-1,43
FlgC	Chapeau proximal	2	-1,35
FlgD	Assemblage du crochet	2	-1,56
FlgE	Crochet	2	-1,69
FlgF	Chapeau proximal	2	-1,51
FlgG	Chapeau distal	2	-2,68
FlgH	L-ring	2	-1,19
FlgI	P-ring	2	-0,68
FlgJ	Muramidase	2	-1,23
FlgK	Jonction crochet filament, côté crochet	3a	-2,10
FlgL	Jonction crochet filament, côté filament	3a	-1,94
FlgM	Facteur anti-sigma	3a	ND
FlgN	FlgK, L chaperone	3a	ND
FlhA	Protein export	2	-0,56
FlhB	Contrôle de la longueur du crochet	2	-1,63
FlhC	Master regulateur opéron classe 2	1	ND
FlhD	Master regulateur opéron classe 2	1	+0,72
FlhE	?	2	ND
FliA	facteur sigma opéron classe 3	3b	ND
FliC	filament (flagelline)	3a	-4,57
FliD	chapeau filament	2	-2,05
FliE	jonction tige MS-anneau	2	ND
FliF	MS-anneau	2	-1,00
FliG	Composant du moteur, portant MotA	2	ND
FliH	Protéine export	2	-0,71
FliI	Protéine export ATPase	2	-0,77
FliJ	Chaperone chapeau, crochet filament	2	ND
FliK	Contrôle de la longueur du crochet	2	ND
FliL	?	2	-0,98
FliM	switch composant, porte CheY-P	2	-2,14
FliN	rotation et switch	2	-1,25

FliO	protéine export	2	-0,67
FliP	protéine export	2	-1,09
FliQ	protéine export	2	-0,96
FliR	protéine export	2	ND
FliS	FliC chaperone	3a	-1,20
FliT	FliD chaperone	3a	-1,44
MotA	Marche du moteur	3b	ND
MotB	Marche du moteur	3b	ND

Adapté de Berg, Chevance, & Fitzgerald (89, 90, 231). ND: non déterminé.

Plus de 50 genes participent à la synthèse du flagelle, déterminant un processus précis où de nombreuses protéines doivent s'associer, certaines ayant des propriétés d'auto-assemblage, dans une chronologie précise d'exportation des sous-unités. 14 protéines sont nécessaires à l'assemblage de la portion externe du flagelle :

- tige proximale : FliE, FlgBCF ;
- tige distale : FlgG ;
- chapeau de la tige : FlgI ;
- crochet : FlgE ;
- contrôle de la longueur du crochet : FliK ;
- protéines de jonction crochet-filament : FlgKL ;
- filament : FliC ou FljB ;
- chapeau du filament : FliD et protéine régulatrice : FlgM.

La sécrétion du flagelle requiert au moins 11 composantes : les protéines de membrane FlhAB, FliFOPQR, et des protéines solubles FliIH et la chaperone de la sécrétion flagellaire FliJ.

Même si dans les modèles murins, flagelles, motilité et chémotaxie ne sont pas indispensables à la colonisation vésicale et rénale (50), les flagelles sont considérés comme intervenant, et indispensables, dans la progression ascendante des souches d'UPEC vers la vessie, (49, 51), ainsi qu'à des étapes spécifiques de l'infection et à des sites spécifiques pour une colonisation plus efficace de la vessie. Les flagelles sont exprimés sur de brefs laps de temps et interviennent dans les étapes précoces de la colonisation (50). Ils sont impliqués dans l'interaction entre la bactérie et la cellule uroépithéliale, à la fois dans le contact de surface et dans l'invasion. Les UPEC flagellées sont responsables de 70 à 90% de toutes les IU (62),

mais pendant le processus infectieux les gènes flagellaires pourraient être rapidement réprimés (224), permettant d'éviter le déclenchement de la production d'interleukine-8 et de l'inflammation par activation des récepteurs TLR-5 par le flagelle (50).

Parallèlement, le flagelle n'a pas que sa fonction première de mobilité : les flagelles de certaines espèces bactériennes, et pour *E. coli* de certaines souches, peuvent adhérer directement aux cellules hôtes ou à des surfaces abiotiques (232), favoriser l'invasion et intervenir dans la formation de biofilm (233).

Le facteur transcrit FlhDC est le master-régulateur de l'ensemble, en activant la transcription d'un ensemble de gènes, dont des gènes flagellaires et le gène codant pour le facteur sigma, particulièrement bien décrits par Fitzgerald *et al.* (231).

Pour l'heure peu de publications concernent l'effet d'extraits de canneberge sur l'expression génomique du flagelle.

Hidalgo *et al.* (196) ont constaté qu'une croissance de CFT073 en présence d'extraits de canneberge ou de proanthocyanidines se traduit par une réduction de l'expression de *fliC*, gène responsable de la synthèse de la flagelline dont l'expression était alors 2,4 fois moindre que chez le témoin non exposé à la canneberge, ce que nous confirmons avec une diminution majeure, la plus significative, de la protéine FliC, lorsque la bactérie a été exposée à C102 1% P/V pendant 10 subcultures. L'auteur précise que la croissance en présence de canneberge ou PAC n'est pas indispensable pour que l'effet se produise : le contact « aigu » est suffisant. Lors de nos essais, de nombreuses autres protéines sont sous-exprimées après 10 subcultures en présence de C102. Cependant, nos observations lorsque la bactérie est déposée sur une gélose molle contenant du C102 1% P/V confirment la possibilité d'un effet direct.

Johnson (216) retrouve une sous-expression des protéines correspondant à la pièce basale et au rotor. Selon Chen (145), la canneberge peut modifier l'expression des gènes gouvernant la pièce basale du flagelle ainsi que les protéines du moteur.

Les modifications dans l'expression des gènes gouvernant d'autres grandes fonctions a été peu étudiée. L'exposition *in vitro* à la canneberge conduit à une forte répression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la flagelline (*fliO*, *flgB*, *flhB* et *fliM*), l'assemblage des sous-unités de flagelline (*fliC*, *fliE*, *fliA* et *fliG*) conduisant à la construction de la partie externe du flagelle. En ce qui concerne le chimotactisme, la répression des gènes impliqués dans l'expression de certaines protéines, ainsi que de récepteurs membranaires a été observée,

alors que l'expression de certaines adhésines est également atteinte. Nos résultats sont à comparer à ceux de Grenne (67) lors de l'utilisation du pilicide ec240 sur la souche UTI89.

Le génome d'UTI89 comprend 10 opérons CUP pilus, dont les type 1, P et S(43). Nous avons observé une réduction dans l'expression des pili, incluant les types 1 et F1C, alors que Greene observait une réduction de l'expression des pili 1 mais une expression accrue des pili P, en lien avec la capacité qu'a le pilicide ec240 d'induire une variation de phase orientée OFF du promoteur de *fimS*. Il a également observé une altération portant sur l'expression et la régulation flagellaire. Il y a ainsi une régulation intriquée contrôlant l'expression du flagelle, dans laquelle le master régulateur FlhDC déclenche la transcription des gènes de classe 2 en composants de structure et des gènes régulateurs FliA et FliM qui contrôlent les gènes de classe 3 déterminant également des composants de structure (234). Greene(67) a montré que dans des conditions où UTI89 exprime des pili de type 1, une interruption de l'expression de *fim* stimule la motilité, indiquant ici encore que les pili de type 1 et les flagelles sont régulés en sens inverse, mais que cette régulation croisée était découplée par le pilicide ec240, qui diminue l'expression des gènes de classe 2 de structure, aussi bien de *fim* que du flagelle (*flgBCDEF*, *fliF*) et de classe 3 (*fliC*). Après exposition *in vitro* à la canneberge, les gènes de classe 2 et 3 sont également réprimés, en particulier *fliC* (-4,57). La répression de l'expression de *fliC* par la canneberge avait déjà été décrite par Hidalgo chez CFT073 (196), sur un mode dose-dépendant (concentration nécessaire également de 1%), l'expression de la mobilité nécessitant une incubation pendant 12h, avec une traduction en swarming comparable à nos résultats.

Des alcaloïdes végétaux (pipérine, réserpine) peuvent aussi inhiber l'expression de *fliC*, ainsi que les gènes associés à la mobilité, *motA* et *motB*, ce qui s'accompagne d'une diminution du swimming et du swarming. Inversement, dans ce modèle, l'expression des gènes *fimA* et *papA* gouvernant des adhésines est augmentée (235).

Nous démontrons que la canneberge agit, non seulement sur *fliC*, mais également sur l'expression de protéines intervenant dans l'assemblage du flagelle, de l'anneau et du rotor.

L'un des gènes dont l'expression est la plus affectée dans nos résultats est *fliL* : la protéine correspondante FliL est une protéine transmembranaire associée à la pièce basale du flagelle qui permettrait à la bactérie de « percevoir » les contraintes de torsion du flagelle (92), sans laquelle des fractures du flagelle se produiraient, comme cela a été observé chez *Proteus mirabilis* (236) et *Salmonella enterica* (237).

Il existe des interactions entre deux phénomènes a priori opposés, l'adhésion et la motilité. L'expression des flagelles pourrait, de manière coordonnée, éteindre l'expression des pili 1, et inversement la synthèse des fimbriae P régule la synthèse du flagelle pour réprimer la motilité, via PapX (82) en agissant sur *flhDC*. Pour certains auteurs, la bactérie maintient un équilibre entre l'expression des fimbriae et des flagelles, considérés antagonistes. Chez la souche *E.coli* CFT073 (82, 229) le rôle de PapX a été démontré dans la régulation de la motilité en se liant au promoteur de *flhD*, qui détermine la répression de *FlhD2C2*, intervenant majeur dans la régulation de la transcription du flagelle. Quand les fimbriae P sont exprimés, PapX est synthétisé et se lie au promoteur *flhDC*, le master régulateur de la synthèse du flagelle, de la chémotaxie et de la motilité. Quand la transcription de *flhDC* est réprimée, les gènes de classe 2 et 3 sont en retour sous-exprimés, et la synthèse du flagelle est réprimée. Quand les variations de phase déterminent l'absence de transcription de l'opéron *pap*, PapX n'est pas transcrit et *flhD2C2* conduit à une expression normale des gènes, déterminant une motilité importante, l'expression de PapX détermine le contrôle réciproque entre adhésion et motilité.

PapX est le produit du gène transcrit grâce à l'allèle *papG* de l'opéron *pap* associé à *pheV*. La fréquence des variations de phase des deux opérons *pap* diffère selon les conditions environnementales (238) et pendant le développement en urines humaines, le premier opéron *pap* (associé à PapX chez CT073) est exprimé à un taux plus élevé que le second, alors que une répression de l'expression du flagelle est observée (239).

S'agissant des fimbriae P, codés par 2 opérons, seul *pap1*, contenant *papX*, interviendrait, la protéine transcrite, PapX, se lie directement au gène promoteur *flhDC*, au niveau de la région *flhD*, inhibant ainsi la transcription du gène régulateur de la synthèse du flagelle, de la motilité et du chimiotactisme (225).

Dans le cadre de nos travaux, nous observons une diminution concomitante portant sur l'expression des gènes impliqués dans les flagelles, le chimiotactisme et les fimbriae après exposition *in vitro* à la canneberge, alors que n'a pas été observée de variation significative de l'expression de PapX. Aussi, les extraits de canneberge pourraient agir sur la liaison entre PapX et le gène promoteur de l'opéron du master régulateur du flagelle *flhD2C2*. Il y a une régulation croisée entre les opérons CUP coordonnant l'expression des CUP pili et flagelles. Les UPEC ont des réseaux complexes de coordination de l'expression des CUP pili et flagelles.

De plus, l'expression constitutive des pili 1 affecte la mobilité et les niveaux de flagelline, à l'inverse, la surexpression des protéines flagellaires ou un phénotype hypermobile n'altère pas l'expression des pili. Ainsi les pili 1 exercent un effet négatif sur la mobilité flagellaire (225). La surexpression de *focX* (régulation des fimbriae F1C) chez CFT073 réprimerait la motilité et la production de flagelline. La majorité des gènes régulés par l'expression de *papX* sont associés avec le chémo-tactisme et la motilité flagellaire, les deux s'avèrent altérés dans notre travail.

Nos résultats montrent ainsi une action profonde de C102 sur le flagelle. Les interactions entre expression des effecteurs impliqués dans la structure et la fonction du flagelle et ceux impliqués dans le chémo-tactisme conduisent à rester prudents quant à la cible ou aux cibles cellulaires, surtout si l'on considère également la complexité de la composition des produits concernés (jus ou extrait de canneberge).

A ce stade, notre objectif a donc été de vérifier l'impact « flagelles » en étudiant la structure et la mobilité d'*E.coli* UTI89.

5.2.3 Visualisation des effets

5.2.3.1 Effets de la canneberge en microscopie électronique

Les extraits de canneberge affectent les structures de surface (127, 148, 156, 196, 201, 216). En microscopie électronique (MET) nous avons constaté que les bactéries inhibées n'avaient aucun pili, plus de flagelles et étaient plus allongées et très denses. Nous avons eu des difficultés à avoir suffisamment de bactéries visibles, et observé parfois des flagelles cassés ou tronqués, alors que nous avons adapté les conditions de préparation des échantillons, notamment par centrifugation douce (2000 t/mn pendant 5 mn) (15mn à 190g, (201)).

Johnson *et al.* (216) ont montré que la morphologie d'*E.coli* et la structure de surface sont modifiées après incubation dans du jus ou en présence d'extraits de canneberge, sans que la coloration de Gram ne soit altérée. Les bactéries sont plus longues, certaines en cours de division, la septation semblant plus difficile, ce qui expliquerait que la cellule grossisse (92); il n'est pas exclu que la canneberge ait également un impact sur la septation.

L'élongation rendrait les *E.coli* incapables d'adhérer à la paroi vésicale (203).

Les structures de surface telles que les fimbriae et les lipopolysaccharides sont modifiées par la canneberge (78), avec une diminution de la taille et de la densité des Fimbriae P (127, 139, 201). La description des effets de la canneberge sur la morphologie des bactéries fait l'objet de variations dans la littérature :

1. En cultivant *E.coli* sur des géloses riches en canneberge, Ahuja (127) constate l'absence de fimbriae en MET.
2. Ultérieurement, Liu (201) constatera que plus les concentrations de canneberge sont élevées plus les fimbriae apparaissent tassées près de la paroi cellulaire, la région correspondante devenant plus dense. La canneberge affecte directement les fimbriae de souches fimbriées et ne modifie pas la surface de souches afimbriées. Cet effet est immédiat, les hypothèses avancées par les auteurs sont non pas une disparition des fimbriae, mais une altération de la configuration des P fimbriae (raccourcissement de 148 à 48nm) et un blocage de l'adhésivité des P fimbriae (diminution de l'hydrophobicité des fimbriae, la surface se liant à des composés hydrophiles. L'élimination des P fimbriae de la cellule, les modifications génotypiques ou phénotypiques des souches fimbriées empêchant l'expression des fimbriae, ne sont cependant pas retenues par les auteurs pour expliquer le phénomène. Enfin, l'exposition à la canneberge pendant un laps de temps court <3h, en dehors de toute croissance bactérienne, produit des changements importants et réversibles des propriétés de surface (201).
3. Wojnicz (146) retrouve des bactéries ayant une morphologie et des filaments normaux, mais avec des modifications de leur hydrophobicité. Ceci pourrait expliquer en partie la réduction de l'adhésivité en présence de canneberge, les bactéries devenant plus hydrophiles pour des doses plus élevées, ce comportement étant toutefois souche-dépendant. Par ailleurs, des modifications de forme (bacille vers sphères coccoïdes ou à l'inverse des formes quasi filamenteuses) et des lésions morphologiques avec perte de l'intégrité de la paroi, de la membrane et du cytoplasme ont aussi été observées.
4. Hidalgo *et al.* (196) observent en microscopie électronique de nombreux flagelles chez les bactéries cultivées dans le bouillon témoin, alors qu'en présence de canneberge, les flagelles sont rares, voire absents, ce qui concorde avec nos observations.
5. Les observations de Johnson *et al.* (216) vont dans le même sens puisqu'en microscopie électronique les changements liés à la canneberge impactent le flagelle, avec une réduction de l'expression des protéines liées à la pièce basale et des protéines

du moteur, tout en notant que pour des expositions prolongées, l'effet anti-adhésion lié aux fimbriae P devient moins pertinent du fait de la raréfaction des fimbriae P.

En outre, il se produirait un changement des propriétés à la surface des bactéries se traduisant par des modifications de la distribution des potentiels électriques(143). La canneberge affecterait aussi les systèmes de signalisation de bactérie à bactérie chez certains *Vibrio* (240). Comme vu précédemment, du fait des oscillations ON/OFF, il est possible que 2 sous-types de populations bactériennes, fimbriées et non fimbriées soient présentes au moment où elles sont fixées pour être ensuite colorées pour les observations en MET.

5.2.3.2 Effets de la canneberge sur la mobilité en gélose molle

La mobilité qui a le plus diminué à T48h sous C102 est le swarming, flagelle-dépendante. Ceci est particulièrement intéressant car c'est probablement ce type de mobilité qui rend compte de la physiopathologie de l'infection (92) : en effet, dans un organe tel que la vessie, les bactéries ne se meuvent pas sous forme planctonique dans l'urine (elles auraient à faire face au flot d'urine), mais probablement par swarming. Elles se déplacent en progressant par rafts à la surface de l'urothélium, comme elles le feraient aussi sur une sonde vésicale, au sein d'un biofilm (241). Ceci soulève d'ailleurs la question de l'intérêt, pour l'heure controversé, de la canneberge dans la prévention des infections urinaires associées aux sondes intravésicales (215, 241, 242). Enfin, le swarming jouerait également un rôle dans la protection des bactéries à l'égard de la phagocytose par le système histiocytaire de l'hôte.

Wojnicz *et al.* (146) ont retrouvé une diminution de la mobilité matérialisée par les diamètres moyens observés sur des géloses swimming.

Les flagelles étant essentiels pour les deux types de motilité, swimming et swarming, Hidalgo a constaté que le swimming était bloqué à forte concentration de canneberge et atténué à de plus faibles concentrations. L'inhibition du swarming sur milieu LB était plus prononcée apparaissant à des concentrations inférieures de canneberge, ce qu'elle explique par le fait que un seul flagelle peut encore permettre le swimming mais que plusieurs sont nécessaires pour le swarming, ce qui est en accord avec ce que nous avons observé.

Cependant, Nicolosi (221) n'a pas observé de réduction de motilité swarming chez *E.coli* sous l'effet de la canneberge, alors qu'elle est observée chez *P. mirabilis* et chez *P.aeruginosa*

(243-245), y compris sur des substrats en silicone(246). Le gène *flhD* serait surexprimé pendant les phases de swarming, son expression étant réduite en présence de PAC.

Dans nos conditions d'essai, la motilité est réduite lorsque le composé C102 est présent dans la gélose molle. Lors des essais sur gélose sans C102, aucune réduction significative du diamètre de la colonie n'a été observée malgré les 10 subcultures préalables. Ceci pourrait indiquer une réversibilité très rapide de l'effet canneberge au cours des doublements de génération. Cette réduction du diamètre est également observée en absence de subcultures sur C102, par simple addition de C102 à la gélose molle, ce qui pourrait indiquer soit un effet direct, immédiat, soit une adaptation durant la croissance bactérienne, sur les nouvelles générations qui deviennent donc non ou peu motiles. La nécessité d'un tel contact persistant avec C102 pourrait être explorée dans le domaine de la prévention des IU sur matériel endovésical, par exemple, en l'enduisant de canneberge.

Dusane a décrit d'autres produits, tels certains alcaloïdes, comme la pipérine contenue dans le poivre noir ou encore la réserpine comme ayant un impact sur la mobilité (235), se traduisant par une réduction du swarming et du swimming, la qRT-PCR traduisant une moindre expression des gènes *fliC*, *motA* et *motB*.

5.2.3.3 Effets de la canneberge sur la mobilité en microscopie à champ large

Les essais en champ large réalisés directement sur la 10^{ème} subculture en présence ou non de C102 constituent la démonstration physiologique majeure des modifications observées antérieurement.

En microscopie champ large, nous observons sur les séquences dynamiques que la mobilité des bactéries cultivées en présence de C102 1%P/V se traduit par un ralentissement très important de la vitesse linéaire, les bactéries ne conservant plus qu'un mouvement brownien.

Les films réalisés nous permettent de conclure sur la perte significative de motilité orientée (ou du moins rectiligne) en présence de C102, motilité liée aux flagelles. Seuls les mouvements browniens persistent (considérés < 5µm). Les paramètres impactés sont alors la distance de déplacement linéaire, la rectitude, et dans une moindre mesure, la vitesse. Ces résultats sont corroborés par nos observations en MET avec perte visible de flagelles.

Les mécanismes mis en jeu lors d'un traitement par la canneberge sont encore difficiles à expliquer dans leur ensemble. Cependant, ils pourraient être en liaison avec des modifications drastiques des caractéristiques de surface de *E. coli* : hydrophobicité/hydrophilie de la

structure pariétale et donc de sa composition, voire de l'externalisation de flagelles et fimbriae efficaces. Liu *et al.* (201) ont ainsi suggéré que le jus de canneberge pouvait affecter les polymères de surface de la bactérie et donc l'adhésion (observations en MFA) et plus récemment qu'il était capable de rompre la liaison ligand-UC receptor (approche thermodynamique) (128). Ces observations sont également en lien avec les changements de morphologie notés chez *E. coli* après croissance en présence de jus ou d'extrait de canneberge. Les auteurs notent dans le même temps une répression de la transcription des protéines du corps basal et du rotor du flagelle, ainsi qu'une réduction des fimbriae P par simple observation (216). Ce point n'a pas été observé durant nos expérimentations ou du moins est non confirmé par l'approche Affymetrix.

Nos observations indiquent clairement une réduction globale de l'expression des composants du flagelle ainsi que de certaines fimbriae chez *E. coli* UTI89 après 10 subcultures sur extrait de *V. macrocarpon* et constituent la première démonstration de la modification des facteurs de motilité comme la vitesse ou la distance linéaire, confirmant ainsi qu'il s'agit d'une cible majeure ou plutôt d'une résultante majeure de l'impact de la canneberge.

6 Conclusion et perspectives

Les infections urinaires sont très fréquentes, leur récurrence pose un véritable problème de santé. De nombreuses approches préventives ont été explorées, y compris d'administration de faibles doses d'antibiotiques au long cours. Le développement inéluctable de résistances aux antibiotiques rend toute autre approche préventive intéressante. La canneberge en fait partie, elle a fait l'objet de nombreuses études ces 30 dernières années, des études cliniques, avec des méthodologies et des populations cibles diverses, et microbiologiques faisant appel à différents modèles et explorant les voies des différents facteurs de virulence des UPEC.

Il y a un faisceau d'arguments, tant cliniques que biologiques en faveur de son activité. Cependant, les extraits de canneberge sont des composés complexes, dont les principes actifs et les mécanismes d'action demeurent insuffisamment compris. Parmi les composés, les proanthocyanidines sont réputées supporter l'action de la canneberge, mais probablement d'autres molécules interviennent. L'action a été longtemps décrite comme s'exerçant au travers de l'adhésion dépendant des fimbriae, tout particulièrement les pili de type 1 et les fimbriae P.

Les extraits de *V. macrocarpon* sont capables de réduire l'expression de différents facteurs de virulence, nous montrons ici pour la première fois de manière globale, la diversité et l'intensité de l'action de la canneberge sur l'ensemble du système flagellaire et de la fonction associée qu'est la chémotaxie. L'activité de *V. macrocarpon* sur l'expression des flagelles est à mettre en perspective avec la physio-pathologie des infections urinaires ascendantes et le rôle que pourrait jouer le réservoir intestinal dans les infections urinaires récurrentes, pour l'heure plutôt attribuées à la persistance de colonies bactériennes dans les cellules vésicales.

Conformément à notre objectif initial, nous avons pu définir **un modèle *in vitro***, classique et robuste, d'évaluation de l'activité anti-adhésion de la canneberge à savoir la modification de capacité d'adhésion aux cellules T24 après une exposition longue (10 subcultures) au produit soumis à essai, que nous avons ensuite pu transposer à l'évaluation de fractions issues du jus de canneberge. Nous avons pu ainsi démontrer des niveaux différents d'efficacité, sans toutefois pouvoir relier les observations à la présence de certains composés. Cependant, ces résultats en démontrent l'intérêt potentiel dans la recherche et sélection de candidats médicaments, présentant une composition précise, ainsi que dans une approche fondamentale

cherchant à définir le ou les mécanismes cellulaires réellement impliqués dans l'effet « canneberge ».

L'approche holistique que permet Affymetrix a conduit à identifier de façon globale, un nombre important de gènes sur l'expression desquels la canneberge a un impact ; ces essais nous permettent **de proposer une autre approche, faisant appel à la RT-qPCR**, en ciblant les gènes les plus impactés au niveau flagelle et chémotaxie (par exemple, *fliC*, *fliM*, *flgG*, *cheY* et *cheW*), mais également fimbriae (*fim A*, *fim C*, *fimG*, *fimI* pour les pili de type 1 et *staB* et *focF* pour les pili F1C). Cette nouvelle approche permettrait de mieux cerner le rôle et surtout les cibles de fractions enrichies en certains composés ou molécules et/ou de molécules isolées, ainsi que les conditions d'essai permettant la mise en évidence de des effets (contact direct et/ou subcultures simulant une phase d'adaptation).

Le modèle murin s'est avéré peu contributif, tant chez l'animal qu'*in vitro*, sur cellules murines. De nouveaux essais pourraient être envisagés, en adaptant les conditions d'essai, en explorant la pertinence du modèle murin au regard a) des facteurs de susceptibilité « hôte » (essais sur d'autres lignées murines/animales) b) des conditions d'inoculation, qui ne reproduisent pas la physiopathologie de l'IU chez la femme c) des modalités d'exposition à la canneberge pour prévenir les IU et du site d'action de ses principes actifs : exposition de la culture bactérienne avant inoculation ; inoculation après ingestion *ad libitum* de canneberge dont l'action (ou celle de ses métabolites) pourrait alors s'exercer à 2 niveaux, soit directement sur la flore fécale en modifiant les souches d'*E.coli* et en les rendant moins aptes à la colonisation ascendante, soit lors de l'excrétion urinaire du ou de ses métabolites, en altérant l'aptitude à l'adhésion d'*E.coli* présentes dans l'arbre urinaire ou encore en ayant un effet sur les cellules uroépithéliales.

D'autres aspects liés à la physiopathologie des IU méritent d'être explorés plus avant :

- des temps plus précoces ou l'effet d'une exposition chronique ou aiguë,
- plus finement, la notion d'adaptation et de réversibilité (nombres de subcultures, voire de générations ; en condition de croissance ou non),
- l'effet de la canneberge sur des souches issues du microbiote fécal.

L'objectif initial de validation d'un modèle robuste de sélection d'actifs *in vitro* nous a conduits à **une approche plus fondamentale**. Les outils mis en œuvre nous ont ainsi permis de démontrer des effets canneberge significatifs au niveau de l'expression génomique de différents effecteurs et ainsi la complexité des mécanismes mis en jeu.

La démonstration d'une sous-expression concomitante de protéines impliquées dans la synthèse, la régulation ou les fonctions liées à différentes adhésines, mais surtout au flagelle et à la chimotaxie constitue un apport original à la littérature concernant les UPEC.

Ces premiers résultats introduisent différents développements potentiels:

- a) exploration des mécanismes par l'intermédiaire de souches d'UPEC mutantes déficientes en un élément donné, afin de mieux cerner notamment l'implication des systèmes de rétro-contrôle entre expression des adhésines et motilité
- b) évaluation de l'impact de la canneberge en termes de **modifications pariétales**. Nos observations en MET confirment la non détection de fimbriae et flagelle ; dans le même temps les observations en champ large après marquage au Syto9® indiquent une perturbation de la pénétration intracellulaire du marqueur sans modification de la viabilité/cultivabilité cellulaire. Ceci pourrait correspondre à des modifications drastiques de la structure pariétale de *E. coli* que nous pourrions explorer par mesure de l'hydrophobicité de surface des souches d'UPEC (avant/après contact avec la canneberge), du potentiel zéta (polarité), voir par quantification et caractérisation du LPS des souches d'UPEC et quantification de la flagelline,
- c) exploration des résultats concernant le twitching (réduction significative après 10 subcultures sur C102 1% P/V) chez les souches d'UPEC, ainsi que **du phénomène de « rebond »** visualisé lors des essais de swarming.

Enfin, l'approche par puce Affymetrix indique une **modification d'expression d'autres effecteurs**, notamment ceux concernant le système des sidérophores. Ceci confirme la complexité de l'effet préventif canneberge sur les IU, et parallèlement incite à approfondir l'analyse afin de déterminer l'implication d'autres cibles potentielles.

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêt.

7 Bibliographie

1. Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann Epidemiol.* 2000;10(8):509-15.
2. Spaulding CN, Hultgren SJ. Adhesive Pili in UTI Pathogenesis and Drug Development. *Pathogens.* 2016;5(1).
3. Johnson JR, Stamm WE. Urinary tract infections in women: diagnosis and treatment. *Ann Intern Med.* 1989;111(11):906-17.
4. Marrs CF, Zhang L, Foxman B. Escherichia coli mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic E. coli (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiol Lett.* 2005;252(2):183-90.
5. Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J, et al. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic Escherichia coli. *Science.* 1998;282(5393):1494-7.
6. Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS, Hultgren SJ. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J.* 2000;19(12):2803-12.
7. Mulvey MA, Schilling JD, Martinez JJ, Hultgren SJ. Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic Escherichia coli and innate host defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(16):8829-35.
8. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli. *Exp Mol Pathol.* 2008;85(1):11-9.
9. Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. Establishment of a persistent Escherichia coli reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun.* 2001;69(7):4572-9.
10. Eto DS, Jones TA, Sundsbak JL, Mulvey MA. Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic Escherichia coli. *PLoS Pathog.* 2007;3(7):e100.
11. Sobota AE. Inhibition of bacterial adherence by cranberry juice: potential use for the treatment of urinary tract infections. *J Urol.* 1984;131(5):1013-6.
12. Zafiri D, Ofek I, Adar R, Pocino M, Sharon N. Inhibitory activity of cranberry juice on adherence of type 1 and type P fimbriated Escherichia coli to eucaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(1):92-8.
13. Howell AB, Vorsa N, Der Marderosian A, Foo LY. Inhibition of the adherence of P-fimbriated Escherichia coli to uroepithelial-cell surfaces by proanthocyanidin extracts from cranberries. *N Engl J Med.* 1998;339(15):1085-6.
14. Raz R, Chazan B, Dan M. [Cranberry juice and urinary tract infection]. *Harefuah.* 2004;143(12):891-4, 909.
15. Gupta K, Chou MY, Howell A, Wobbe C, Grady R, Stapleton AE. Cranberry products inhibit adherence of p-fimbriated Escherichia coli to primary cultured bladder and vaginal epithelial cells. *J Urol.* 2007;177(6):2357-60.
16. Lavigne JP, Bourg G, Combescure C, Botto H, Sotto A. In-vitro and in-vivo evidence of dose-dependent decrease of uropathogenic Escherichia coli virulence after consumption of commercial Vaccinium macrocarpon (cranberry) capsules. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(4):350-5.
17. Howell AB, Botto H, Combescure C, Blanc-Potard AB, Gausa L, Matsumoto T, et al. Dosage effect on uropathogenic Escherichia coli anti-adhesion activity in urine following consumption of cranberry powder standardized for proanthocyanidin content: a multicentric randomized double blind study. *BMC Infect Dis.* 2010;10:94.
18. Risco E, Miguez C, Sanchez de Badajoz E, Rouseaud A. Effect of american cranberry (Cysticlean) on Escherichia coli adherence to bladder epithelial cells. In vitro and in vivo study. *Arch Esp Urol.* 2010;63(6):422-30.

19. Gupta A, Dwivedi M, Mahdi AA, Nagana Gowda GA, Khetrapal CL, Bhandari M. Inhibition of adherence of multi-drug resistant *E. coli* by proanthocyanidin. *Urol Res.* 2012;40(2):143-50.
20. Aliments AFdSSd. AVIS de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation des justificatifs concernant l'allégation « contribue à diminuer la fixation de certaines bactéries *E.coli* sur les parois des voies urinaires » et sur l'emploi de la « cranberry/canneberge » ou « *Vaccinium macrocarpon* » dans des jus concentrés, des compléments alimentaires et un cocktail/nectar de jus. Paris2004.
21. Jepson RG, Williams G, Craig JC. Cranberries for preventing urinary tract infections. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;10:CD001321.
22. Ejrnaes K. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Dan Med Bull.* 2011;58(4):B4187.
23. Ejrnaes K, Stegger M, Reisner A, Ferry S, Monsen T, Holm SE, et al. Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections: phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. *Virulence.* 2011;2(6):528-37.
24. Ejrnaes K, Sandvang D, Lundgren B, Ferry S, Holm S, Monsen T, et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of *Escherichia coli* strains from samples collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community-acquired urinary tract infection in women. *J Clin Microbiol.* 2006;44(5):1776-81.
25. Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, Humphrey PA, Hultgren SJ. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med.* 2007;4(12):e329.
26. Schilling JD, Mulvey MA, Vincent CD, Lorenz RG, Hultgren SJ. Bacterial invasion augments epithelial cytokine responses to *Escherichia coli* through a lipopolysaccharide-dependent mechanism. *J Immunol.* 2001;166(2):1148-55.
27. Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med.* 2002;113 Suppl 1A:14S-9S.
28. Réseau d'alerte diesdindR. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012. Résultats. . Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire: Institut de veille sanitaire, 2013 Contract No.: 978-2-11-131146-6.
29. Suetens C, Hopkins S, Kolman J, Diaz Högberg L. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm: ECDC; 2013. . Stockholm: European Center for Disease Prevention and Control, 2013.
30. Bouza E, San Juan R, Munoz P, Voss A, Kluytmans J, Co-operative Group of the European Study Group on Nosocomial I. A European perspective on nosocomial urinary tract infections I. Report on the microbiology workload, etiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-003 study). European Study Group on Nosocomial Infections. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7(10):523-31.
31. SPILF-AFU. Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires de l'adulte. 2014.
32. Cranberry Products or Topical Estrogen-Based Therapy for the Prevention of Urinary Tract Infections: A Review of Clinical Effectiveness and Guidelines. CADTH Rapid Response Reports. Ottawa (ON)2016.
33. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis Mon.* 2003;49(2):53-70.

34. Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. *Phytochemistry*. 2000;54(2):173-81.
35. SPILF, editor *Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires de l'adulte* 2015; Paris.
36. Schilling JD, Martin SM, Hunstad DA, Patel KP, Mulvey MA, Justice SS, et al. CD14- and Toll-like receptor-dependent activation of bladder epithelial cells by lipopolysaccharide and type 1 piliated *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2003;71(3):1470-80.
37. Rudick CN, Berry RE, Johnson JR, Johnston B, Klumpp DJ, Schaeffer AJ, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* induces chronic pelvic pain. *Infect Immun*. 2011;79(2):628-35.
38. Hannan TJ, Mysorekar IU, Hung CS, Isaacson-Schmid ML, Hultgren SJ. Early severe inflammatory responses to uropathogenic *E. coli* predispose to chronic and recurrent urinary tract infection. *PLoS Pathog*. 2010;6(8):e1001042.
39. Hannan TJ, Totsika M, Mansfield KJ, Moore KH, Schembri MA, Hultgren SJ. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(3):616-48.
40. Karkkainen UM, Ikaheimo R, Katila ML, Siitonen A. Recurrence of urinary tract infections in adult patients with community-acquired pyelonephritis caused by *E. coli*: a 1-year follow-up. *Scand J Infect Dis*. 2000;32(5):495-9.
41. Ikaheimo R, Siitonen A, Heiskanen T, Karkkainen U, Kuosmanen P, Lipponen P, et al. Recurrence of urinary tract infection in a primary care setting: analysis of a 1-year follow-up of 179 women. *Clin Infect Dis*. 1996;22(1):91-9.
42. Foxman B, Zhang L, Tallman P, Palin K, Rode C, Bloch C, et al. Virulence characteristics of *Escherichia coli* causing first urinary tract infection predict risk of second infection. *J Infect Dis*. 1995;172(6):1536-41.
43. Chen SL, Wu M, Henderson JP, Hooton TM, Hibbing ME, Hultgren SJ, et al. Genomic diversity and fitness of *E. coli* strains recovered from the intestinal and urinary tracts of women with recurrent urinary tract infection. *Sci Transl Med*. 2013;5(184):184ra60.
44. Liska DJ, Kern HJ, Maki KC. Cranberries and Urinary Tract Infections: How Can the Same Evidence Lead to Conflicting Advice? *Adv Nutr*. 2016;7(3):498-506.
45. Aydin A, Ahmed K, Zaman I, Khan MS, Dasgupta P. Recurrent urinary tract infections in women. *Int Urogynecol J*. 2015;26(6):795-804.
46. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med*. 2002;113 Suppl 1A:5S-13S.
47. Litwin MS, Saigal CS, Yano EM, Avila C, Geschwind SA, Hanley JM, et al. Urologic diseases in America Project: analytical methods and principal findings. *J Urol*. 2005;173(3):933-7.
48. Martin D, Thibaut-Jivelin S, Fougnot S, Caillon J, Gueudet T, de Mouy D, et al. Prévalence régionale de la production de bêta-lactamase à spectre élargi et de la résistance aux antibiotiques au sein des souches de *E. coli* isolées d'infections urinaires en ville en 2013 en France. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire*. 2016;24-25:414-8.
49. Lane MC, Alteri CJ, Smith SN, Mobley HL. Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(42):16669-74.
50. Lane MC, Lockett V, Monterosso G, Lamphier D, Weinert J, Hebel JR, et al. Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. *Infect Immun*. 2005;73(11):7644-56.
51. Wright KJ, Seed PC, Hultgren SJ. Uropathogenic *Escherichia coli* flagella aid in efficient urinary tract colonization. *Infect Immun*. 2005;73(11):7657-68.

52. Foxman B, Manning SD, Tallman P, Bauer R, Zhang L, Koopman JS, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* are more likely than commensal *E. coli* to be shared between heterosexual sex partners. *Am J Epidemiol.* 2002;156(12):1133-40.
53. Johnson JR, Delavari P. Concurrent fecal colonization with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a homosexual man with recurrent urinary tract infection and in his male sex partner. *Clin Infect Dis.* 2002;35(6):E65-8.
54. Olesen B, Kolmos HJ, Orskov F, Orskov I. Cluster of multiresistant *Escherichia coli* O78:H10 in Greater Copenhagen. *Scand J Infect Dis.* 1994;26(4):406-10.
55. Moreno E, Andreu A, Pigrau C, Kuskowski MA, Johnson JR, Prats G. Relationship between *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in women and the fecal *E. coli* population of the host. *J Clin Microbiol.* 2008;46(8):2529-34.
56. Hunstad DA, Justice SS. Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol.* 2010;64:203-21.
57. Schilling JD, Lorenz RG, Hultgren SJ. Effect of trimethoprim-sulfamethoxazole on recurrent bacteriuria and bacterial persistence in mice infected with uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2002;70(12):7042-9.
58. Blango MG, Mulvey MA. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(5):1855-63.
59. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science.* 2003;301(5629):105-7.
60. Zhou G, Mo WJ, Sebbel P, Min G, Neubert TA, Glockshuber R, et al. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 22):4095-103.
61. Schilling JD, Mulvey MA, Hultgren SJ. Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. *J Infect Dis.* 2001;183 Suppl 1:S36-40.
62. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *Int J Nephrol.* 2012;2012:681473.
63. Johnson JR, Russo TA. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* 2005;295(6-7):383-404.
64. Bower JM, Eto DS, Mulvey MA. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic.* 2005;6(1):18-31.
65. Rafsanjany N, Senker J, Brandt S, Dobrindt U, Hensel A. In Vivo Consumption of Cranberry Exerts ex Vivo Antiadhesive Activity against FimH-Dominated Uropathogenic *Escherichia coli*: A Combined in Vivo, ex Vivo, and in Vitro Study of an Extract from *Vaccinium macrocarpon*. *J Agric Food Chem.* 2015;63(40):8804-18.
66. Wurpel DJ, Beatson SA, Totsika M, Petty NK, Schembri MA. Chaperone-usher fimbriae of *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2013;8(1):e52835.
67. Greene SE, Pinkner JS, Chorell E, Dodson KW, Shaffer CL, Conover MS, et al. Pilicide ec240 disrupts virulence circuits in uropathogenic *Escherichia coli*. *MBio.* 2014;5(6):e02038.
68. Hotchkiss AT, Jr., Nunez A, Strahan GD, Chau HK, White AK, Marais JP, et al. Cranberry Xyloglucan Structure and Inhibition of *Escherichia coli* Adhesion to Epithelial Cells. *J Agric Food Chem.* 2015;63(23):5622-33.
69. Krogfelt KA, Bergmans H, Klemm P. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect Immun.* 1990;58(6):1995-8.

70. Crepin S, Houle S, Charbonneau ME, Mourez M, Harel J, Dozois CM. Decreased expression of type 1 fimbriae by a pst mutant of uropathogenic *Escherichia coli* reduces urinary tract infection. *Infect Immun*. 2012;80(8):2802-15.
71. Bahrani-Mougeot FK, Buckles EL, Lockatell CV, Hebel JR, Johnson DE, Tang CM, et al. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol Microbiol*. 2002;45(4):1079-93.
72. Smith SN, Hagan EC, Lane MC, Mobley HL. Dissemination and systemic colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in a murine model of bacteremia. *MBio*. 2010;1(5).
73. Snyder JA, Lloyd AL, Lockatell CV, Johnson DE, Mobley HL. Role of phase variation of type 1 fimbriae in a uropathogenic *Escherichia coli* cystitis isolate during urinary tract infection. *Infect Immun*. 2006;74(2):1387-93.
74. Wright KJ, Seed PC, Hultgren SJ. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell Microbiol*. 2007;9(9):2230-41.
75. Schwartz DJ, Kalas V, Pinkner JS, Chen SL, Spaulding CN, Dodson KW, et al. Positively selected FimH residues enhance virulence during urinary tract infection by altering FimH conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(39):15530-7.
76. Chen SL, Hung CS, Pinkner JS, Walker JN, Cusumano CK, Li Z, et al. Positive selection identifies an in vivo role for FimH during urinary tract infection in addition to mannose binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(52):22439-44.
77. Laverty G, Gorman SP, Gilmore BF. Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. *Pathogens*. 2014;3(3):596-632.
78. Lindberg S, Xia Y, Sonden B, Goransson M, Hacker J, Uhlin BE. Regulatory Interactions among adhesin gene systems of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2008;76(2):771-80.
79. Sung MA, Fleming K, Chen HA, Matthews S. The solution structure of PapGII from uropathogenic *Escherichia coli* and its recognition of glycolipid receptors. *EMBO Rep*. 2001;2(7):621-7.
80. Eden CS, Hanson LA, Jodal U, Lindberg U, Akerlund AS. Variable adherence to normal human urinary-tract epithelial cells of *Escherichia coli* strains associated with various forms of urinary-tract infection. *Lancet*. 1976;1(7984):490-2.
81. Melican K, Sandoval RM, Kader A, Josefsson L, Tanner GA, Molitoris BA, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* P and Type 1 fimbriae act in synergy in a living host to facilitate renal colonization leading to nephron obstruction. *PLoS Pathog*. 2011;7(2):e1001298.
82. Simms AN, Mobley HL. PapX, a P fimbrial operon-encoded inhibitor of motility in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2008;76(11):4833-41.
83. Ermel G, Georgeault S, Inisan C, Besnard M. Inhibition of adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* bacteria to uroepithelial cells by extracts from cranberry. *J Med Food*. 2012;15(2):126-34.
84. Xicohtencatl-Cortes J, Monteiro-Neto V, Saldana Z, Ledesma MA, Puente JL, Giron JA. The type 4 pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 are multipurpose structures with pathogenic attributes. *J Bacteriol*. 2009;191(1):411-21.
85. Nesta B, Spraggon G, Alteri C, Moriel DG, Rosini R, Veggi D, et al. FdeC, a novel broadly conserved *Escherichia coli* adhesin eliciting protection against urinary tract infections. *MBio*. 2012;3(2).
86. Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Obata Yasuoka M, Akaza H, Hayshi H. Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to

- adhere to and invade bladder epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002;33(1):23-6.
87. Lane MC, Simms AN, Mobley HL. complex interplay between type 1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2007;189(15):5523-33.
88. Snyder JA, Haugen BJ, Lockatell CV, Maroncle N, Hagan EC, Johnson DE, et al. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2005;73(11):7588-96.
89. Berg HC. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:19-54.
90. Chevance FF, Hughes KT. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(6):455-65.
91. Adler J. Chemotaxis in bacteria. *Annual Reviews of Biochemistry*. 1975;44:341-56.
92. Kearns DB. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(9):634-44.
93. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(5):269-84.
94. Schwan WR, Lee JL, Lenard FA, Matthews BT, Beck MT. Osmolarity and pH growth conditions regulate *fim* gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2002;70(3):1391-402.
95. Schwan WR. Regulation of *fim* genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *World J Clin Infect Dis*. 2011;1(1):17-25.
96. Justice SS, Hung C, Theriot JA, Fletcher DA, Anderson GG, Footer MJ, et al. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(5):1333-8.
97. Foxman B, Zhang L, Palin K, Tallman P, Marrs CF. Bacterial virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from first-time urinary tract infection. *J Infect Dis*. 1995;171(6):1514-21.
98. Jantunen ME, Saxen H, Salo E, Siitonen A. Recurrent urinary tract infections in infancy: relapses or reinfections? *J Infect Dis*. 2002;185(3):375-9.
99. Russo TA, Stapleton A, Wenderoth S, Hooton TM, Stamm WE. Chromosomal restriction fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli* strains causing recurrent urinary tract infections in young women. *J Infect Dis*. 1995;172(2):440-5.
100. Czaja CA, Stamm WE, Stapleton AE, Roberts PL, Hawn TR, Scholes D, et al. Prospective cohort study of microbial and inflammatory events immediately preceding *Escherichia coli* recurrent urinary tract infection in women. *J Infect Dis*. 2009;200(4):528-36.
101. Balachandran AA, Wildman SS, Strutt M, Duckett J. Is chronic urinary infection a cause of overactive bladder? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2016;201:108-12.
102. Contreras-Sanz A, Krska L, Balachandran AA, Curtiss NL, Khasriya R, Kelley S, et al. Altered urothelial ATP signaling in a major subset of human overactive bladder patients with pyuria. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;311(4):F805-F16.
103. Hvidberg H, Struve C, Kroghfelt KA, Christensen N, Rasmussen SN, Frimodt-Moller N. Development of a long-term ascending urinary tract infection mouse model for antibiotic treatment studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(1):156-63.
104. Kern MB, Struve C, Blom J, Frimodt-Moller N, Kroghfelt KA. Intracellular persistence of *Escherichia coli* in urinary bladders from mecillinam-treated mice. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(3):383-6.
105. Mysorekar IU, Hultgren SJ. Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(38):14170-5.

106. Bergsten G, Wullt B, Svanborg C. Escherichia coli, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract. *Int J Med Microbiol.* 2005;295(6-7):487-502.
107. Bergsten G, Wullt B, Schembri MA, Leijonhufvud I, Svanborg C. Do type 1 fimbriae promote inflammation in the human urinary tract? *Cell Microbiol.* 2007;9(7):1766-81.
108. Koves B, Salvador E, Gronberg-Hernandez J, Zdziarski J, Wullt B, Svanborg C, et al. Rare emergence of symptoms during long-term asymptomatic Escherichia coli 83972 carriage without an altered virulence factor repertoire. *J Urol.* 2014;191(2):519-28.
109. Gill K, Khasriya R, Kupelian A, Brackenridge L, Horsley H, Sathiananthamoorthy S, et al., editors. Treating OAB with antibiotics. 41st Annual Meeting of the International Continence-Society (ICS); 2011; Glasgow, SCOTLAND.
110. Lunawat R, Khasriya R, Bishara S, Maraj B, Falzon M, Malone-Lee J, editors. Histological evidence of ubiquitous occurrence of chronic cystitis in urothelial biopsies from patients with symptoms of overactive bladder and normal urinalysis International Continence Society; 2009; London
111. Darouiche RO, Thornby JL, Cerra-Stewart C, Donovan WH, Hull RA. Bacterial interference for prevention of urinary tract infection: a prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind pilot trial. *Clin Infect Dis.* 2005;41(10):1531-4.
112. Sunden F, Hakansson L, Ljunggren E, Wullt B. Bacterial interference--is deliberate colonization with Escherichia coli 83972 an alternative treatment for patients with recurrent urinary tract infection? *Int J Antimicrob Agents.* 2006;28 Suppl 1:S26-9.
113. Langermann S, Mollby R, Burlein JE, Palaszynski SR, Auguste CG, DeFusco A, et al. Vaccination with FimH adhesin protects cynomolgus monkeys from colonization and infection by uropathogenic Escherichia coli. *J Infect Dis.* 2000;181(2):774-8.
114. Langermann S, Palaszynski S, Barnhart M, Auguste G, Pinkner JS, Burlein J, et al. Prevention of mucosal Escherichia coli infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science.* 1997;276(5312):607-11.
115. Poggio TV, La Torre JL, Scodeller EA. Intranasal immunization with a recombinant truncated FimH adhesin adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotides protects mice against uropathogenic Escherichia coli challenge. *Can J Microbiol.* 2006;52(11):1093-102.
116. Wieser A, Romann E, Magistro G, Hoffmann C, Norenberg D, Weinert K, et al. A multiepitope subunit vaccine conveys protection against extraintestinal pathogenic Escherichia coli in mice. *Infect Immun.* 2010;78(8):3432-42.
117. Totsika M, Kostakioti M, Hannan TJ, Upton M, Beatson SA, Janetka JW, et al. A FimH inhibitor prevents acute bladder infection and treats chronic cystitis caused by multidrug-resistant uropathogenic Escherichia coli ST131. *J Infect Dis.* 2013;208(6):921-8.
118. Cusumano CK, Pinkner JS, Han Z, Greene SE, Ford BA, Crowley JR, et al. Treatment and prevention of urinary tract infection with orally active FimH inhibitors. *Sci Transl Med.* 2011;3(109):109ra15.
119. Guiton PS, Cusumano CK, Kline KA, Dodson KW, Han Z, Janetka JW, et al. Combinatorial small-molecule therapy prevents uropathogenic Escherichia coli catheter-associated urinary tract infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(9):4738-45.
120. Shoaf K, Mulvey GL, Armstrong GD, Hutkins RW. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic Escherichia coli to tissue culture cells. *Infect Immun.* 2006;74(12):6920-8.
121. Bruyere F. [Use of cranberry in chronic urinary tract infections]. *Med Mal Infect.* 2006;36(7):358-63.

122. Kontiokari T, Sundqvist K, Nuutinen M, Pokka T, Koskela M, Uhari M. Randomised trial of cranberry-lingonberry juice and Lactobacillus GG drink for the prevention of urinary tract infections in women. *BMJ*. 2001;322(7302):1571.
123. Raz R, Chazan B, Dan M. Cranberry juice and urinary tract infection. *Clin Infect Dis*. 2004;38(10):1413-9.
124. Jepson RG, Craig JC. A systematic review of the evidence for cranberries and blueberries in UTI prevention. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(6):738-45.
125. Jungfer E, Zimmermann BF, Ruttkat A, Galensa R. Comparing procyanidins in selected *Vaccinium* species by UHPLC-MS(2) with regard to authenticity and health effects. *J Agric Food Chem*. 2012;60(38):9688-96.
126. Avorn J, Monane M, Gurwitz JH, Glynn RJ, Choodnovskiy I, Lipsitz LA. Reduction of bacteriuria and pyuria after ingestion of cranberry juice. *JAMA*. 1994;271(10):751-4.
127. Ahuja S, Kaack B, Roberts J. Loss of fimbrial adhesion with the addition of *Vaccinium macrocarpon* to the growth medium of P-fimbriated *Escherichia coli*. *J Urol*. 1998;159(2):559-62.
128. Liu Y, Gallardo-Moreno AM, Pinzon-Arango PA, Reynolds Y, Rodriguez G, Camesano TA. Cranberry changes the physicochemical surface properties of *E. coli* and adhesion with uroepithelial cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008;65(1):35-42.
129. Stapleton AE, Dziura J, Hooton TM, Cox ME, Yarova-Yarovaya Y, Chen S, et al. Recurrent urinary tract infection and urinary *Escherichia coli* in women ingesting cranberry juice daily: a randomized controlled trial. *Mayo Clin Proc*. 2012;87(2):143-50.
130. Howell AB. Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2002;42(3 Suppl):273-8.
131. Howell AB, Foxman B. Cranberry juice and adhesion of antibiotic-resistant uropathogens. *JAMA*. 2002;287(23):3082-3.
132. Howell AB, Reed JD, Krueger CG, Winterbottom R, Cunningham DG, Leahy M. A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. *Phytochemistry*. 2005;66(18):2281-91.
133. Howell AB. Bioactive compounds in cranberries and their role in prevention of urinary tract infections. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(6):732-7.
134. Weiss EI, Kozlovsky A, Steinberg D, Lev-Dor R, Bar Ness Greenstein R, Feldman M, et al. A high molecular mass cranberry constituent reduces mutans streptococci level in saliva and inhibits in vitro adhesion to hydroxyapatite. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;232(1):89-92.
135. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Anti-inflammatory activity of a high-molecular-weight cranberry fraction on macrophages stimulated by lipopolysaccharides from periodontopathogens. *J Dent Res*. 2006;85(3):235-9.
136. Blumberg JB, Basu A, Krueger CG, Lila MA, Neto CC, Novotny JA, .., et al., editors. Impact of cranberries on gut microbiota and cardiometabolic health : proceedings of the cranberry health research conference 2015. cranberry health research conference 2015; 2015 2016.
137. Deprez S, Brezillon C, Rabot S, Philippe C, Mila I, Lapiere C, et al. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J Nutr*. 2000;130(11):2733-8.
138. Deprez S, Mila I, Huneau JF, Tome D, Scalbert A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxid Redox Signal*. 2001;3(6):957-67.
139. Hisano M, Bruschini H, Nicodemo AC, Srougi M. Cranberries and lower urinary tract infection prevention. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(6):661-8.
140. Valentova K, Stejskal D, Bednar P, Vostalova J, Cihalik C, Vecerova R, et al. Biosafety, antioxidant status, and metabolites in urine after consumption of dried cranberry

juice in healthy women: a pilot double-blind placebo-controlled trial. *J Agric Food Chem.* 2007;55(8):3217-24.

141. Wang Y, Singh AP, Nelson HN, Kaiser AJ, Reker NC, Hooks TL, et al. Urinary Clearance of Cranberry Flavonol Glycosides in Humans. *J Agric Food Chem.* 2016.

142. Milbury PE, Vita JA, Blumberg JB. Anthocyanins are bioavailable in humans following an acute dose of cranberry juice. *J Nutr.* 2010;140(6):1099-104.

143. Bruyere F, Boiteux JP, Sotto A, Karsenty G, Bastide C, Guy L, et al. [Anti-infective treatments in urology]. *Prog Urol.* 2013;23(15):1357-64.

144. Tao Y, Pinzon-Arango PA, Howell AB, Camesano TA. Oral consumption of cranberry juice cocktail inhibits molecular-scale adhesion of clinical uropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Food.* 2011;14(7-8):739-45.

145. Chen CS, Ho DR, Chang PJ, Lin WY, Huang YC. Urine post equivalent daily cranberry juice consumption may opsonize uropathogenicity of *Escherichia coli*. *J Infect Chemother.* 2013;19(5):812-7.

146. Wojnicz D, Sycz Z, Walkowski S, Gabrielska J, Aleksandra W, Alicja K, et al. Study on the influence of cranberry extract Zuravit S.O.S((R)) on the properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains, their ability to form biofilm and its antioxidant properties. *Phytomedicine.* 2012;19(6):506-14.

147. Lee YL, Najm WI, Owens J, Thrupp L, Baron S, Shanbrom E, et al. Anti-microbial Activity of Urine after Ingestion of Cranberry: A Pilot Study. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2010;7(2):227-32.

148. Pinzon-Arango PA, Liu Y, Camesano TA. Role of cranberry on bacterial adhesion forces and implications for *Escherichia coli*-uroepithelial cell attachment. *J Med Food.* 2009;12(2):259-70.

149. Di Martino P, Agniel R, David K, Templer C, Gaillard JL, Denys P, et al. Reduction of *Escherichia coli* adherence to uroepithelial bladder cells after consumption of cranberry juice: a double-blind randomized placebo-controlled cross-over trial. *World J Urol.* 2006;24(1):21-7.

150. Bruce AW, Chan RC, Pinkerton D, Morales A, Chadwick P. Adherence of gram-negative uropathogens to human uroepithelial cells. *J Urol.* 1983;130(2):293-8.

151. Dean EA, Kessler RE. Quantitation of effects of subinhibitory concentrations of trimethoprim on P fimbria expression and in vitro adhesiveness of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 1988;26(1):25-30.

152. Hong H, Chun J, Lee Y. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing, multidrug-resistant environmental isolates of *Escherichia coli* that bind to human bladder cells. *Microb Drug Resist.* 2004;10(2):184-9.

153. Vardi Y, Meshulam T, Obedeau N, Merzbach D, Levin DR. *Escherichia coli* adherence to human transitional cell tumors: a simple research model of bacterial attachment to the lower urinary tract. *Eur Urol.* 1986;12(6):432-7.

154. Hopkins WJ, Reznikoff CA, Oberley TD, Uehling DT. Adherence of uropathogenic *E. coli* to differentiated human uroepithelial cells grown in vitro. *J Urol.* 1990;143(1):146-9.

155. Rosenstein IJ, Grady D, Hamilton-Miller JM, Brumfitt W. Relationship between adhesion of *Escherichia coli* to uro-epithelial cells and the pathogenesis of urinary infection: problems in methodology and analysis. *J Med Microbiol.* 1985;20(3):335-44.

156. Mathison BD, Kimble LL, Kaspar KL, Khoo C, Chew BP. Development and validation of a sensitive, high-throughput bioassay for the adhesion of radiolabeled *E. coli* to uroepithelial cells in vitro. *J Nat Prod.* 2013;76(9):1605-11.

157. Eden CS, Eriksson B, Hanson LA. Adhesion of *Escherichia coli* to human uroepithelial cells in vitro. *Infect Immun.* 1977;18(3):767-74.

158. Schaeffer AJ, Jones JM, Duncan JL, Chmiel JS, Plotkin BJ, Falkowski WS. Adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells from women with recurrent urinary tract infection. *Infection*. 1982;10(3):186-91.
159. Ishikawa K, Sundelin B, Mollby R, Normark S, Winberg J. Receptors for *Escherichia coli* adhesins in the genitourinary tract in a non-human primate. *Scand J Urol Nephrol*. 2004;38(1):3-14.
160. Meiland R, Geerlings SE, Langermann S, Brouwer EC, Coenjaerts FE, Hoepelman AI. Fimch antiserum inhibits the adherence of *Escherichia coli* to cells collected by voided urine specimens of diabetic women. *J Urol*. 2004;171(4):1589-93.
161. Mobley HL, Chippendale GR, Tenney JH, Hull RA, Warren JW. Expression of type 1 fimbriae may be required for persistence of *Escherichia coli* in the catheterized urinary tract. *J Clin Microbiol*. 1987;25(12):2253-7.
162. Connell I, Agace W, Klemm P, Schembri M, Marild S, Svanborg C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(18):9827-32.
163. Klemm P, Roos V, Ulett GC, Svanborg C, Schembri MA. Molecular characterization of the *Escherichia coli* asymptomatic bacteriuria strain 83972: the taming of a pathogen. *Infect Immun*. 2006;74(1):781-5.
164. Roos V, Schembri MA, Ulett GC, Klemm P. Asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 carries mutations in the foc locus and is unable to express F1C fimbriae. *Microbiology*. 2006;152(Pt 6):1799-806.
165. Lavigne JP, Boutet-Dubois A, Laouini D, Combescure C, Bouziges N, Mares P, et al. Virulence potential of *Escherichia coli* strains causing asymptomatic bacteriuria during pregnancy. *J Clin Microbiol*. 2011;49(11):3950-3.
166. Ferry SA, Holm SE, Stenlund H, Lundholm R, Monsen TJ. The natural course of uncomplicated lower urinary tract infection in women illustrated by a randomized placebo controlled study. *Scand J Infect Dis*. 2004;36(4):296-301.
167. Conway PH, Cnaan A, Zaoutis T, Henry BV, Grundmeier RW, Keren R. Recurrent urinary tract infections in children: risk factors and association with prophylactic antimicrobials. *JAMA*. 2007;298(2):179-86.
168. Barbosa-Cesnik C, Brown MB, Buxton M, Zhang L, DeBusscher J, Foxman B. Cranberry juice fails to prevent recurrent urinary tract infection: results from a randomized placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis*. 2011;52(1):23-30.
169. Bianco L, Perrelli E, Towle V, Van Ness PH, Juthani-Mehta M. Pilot randomized controlled dosing study of cranberry capsules for reduction of bacteriuria plus pyuria in female nursing home residents. *J Am Geriatr Soc*. 2012;60(6):1180-1.
170. Maki KC, Kaspar KL, Khoo C, Derrig LH, Schild AL, Gupta K. Consumption of a cranberry juice beverage lowered the number of clinical urinary tract infection episodes in women with a recent history of urinary tract infection. *Am J Clin Nutr*. 2016;103(6):1434-42.
171. Juthani-Mehta M, Van Ness PH, Bianco L, Rink A, Rubeck S, Ginter S, et al. Effect of Cranberry Capsules on Bacteriuria Plus Pyuria Among Older Women in Nursing Homes: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016;316(18):1879-87.
172. Ledda A, Belcaro G, Dugall M, Feragalli B, Riva A, Togni S, et al. Supplementation with high titer cranberry extract (Anthocran(R)) for the prevention of recurrent urinary tract infections in elderly men suffering from moderate prostatic hyperplasia: a pilot study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(24):5205-9.
173. Hung CS, Dodson KW, Hultgren SJ. A murine model of urinary tract infection. *Nat Protoc*. 2009;4(8):1230-43.

174. Hopkins WJ, Hall JA, Conway BP, Uehling DT. Induction of urinary tract infection by intraurethral inoculation with *Escherichia coli*: refining the murine model. *J Infect Dis*. 1995;171(2):462-5.
175. Hopkins WJ, Gendron-Fitzpatrick A, Balish E, Uehling DT. Time course and host responses to *Escherichia coli* urinary tract infection in genetically distinct mouse strains. *Infect Immun*. 1998;66(6):2798-802.
176. Lavigne JP, Blanc-Potard AB, Bourg G, O'Callaghan D, Sotto A. [Caenorhabditis elegans: in vivo study model of bacterial virulence]. *Pathol Biol (Paris)*. 2006;54(8-9):439-46.
177. Lavigne JP, Vitrac X, Bernard L, Bruyere F, Sotto A. Propolis can potentialise the anti-adhesion activity of proanthocyanidins on uropathogenic *Escherichia coli* in the prevention of recurrent urinary tract infections. *BMC Res Notes*. 2011;4:522.
178. Guay DR. Cranberry and urinary tract infections. *Drugs*. 2009;69(7):775-807.
179. Jepson RG, Craig JC. Cranberries for preventing urinary tract infections. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008(1):CD001321.
180. Lorenzo AJ, Braga LH. Use of cranberry products does not appear to be associated with a significant reduction in incidence of recurrent urinary tract infections. *Evid Based Med*. 2013;18(5):181-2.
181. Beerepoot M, Geerlings S. Non-Antibiotic Prophylaxis for Urinary Tract Infections. *Pathogens*. 2016;5(2).
182. Wang CH, Fang CC, Chen NC, Liu SS, Yu PH, Wu TY, et al. Cranberry-containing products for prevention of urinary tract infections in susceptible populations: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med*. 2012;172(13):988-96.
183. Howell AB. Updated systematic review suggests that cranberry juice is not effective at preventing urinary tract infection. *Evid Based Nurs*. 2013;16(4):113-4.
184. McMurdo ME, Argo I, Phillips G, Daly F, Davey P. Cranberry or trimethoprim for the prevention of recurrent urinary tract infections? A randomized controlled trial in older women. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(2):389-95.
185. Beerepoot MA, ter Riet G, Nys S, van der Wal WM, de Borgie CA, de Reijke TM, et al. Cranberries vs antibiotics to prevent urinary tract infections: a randomized double-blind noninferiority trial in premenopausal women. *Arch Intern Med*. 2011;171(14):1270-8.
186. Occhipinti A, Germano A, Maffei ME. Prevention of Urinary Tract Infection with Oximacro, A Cranberry Extract with a High Content of A-Type Proanthocyanidins: A Pre-Clinical Double-Blind Controlled Study. *Urol J*. 2016;13(2):2640-9.
187. de Llano DG, Esteban-Fernandez A, Sanchez-Patan F, Martinlvarez PJ, Moreno-Arribas MV, Bartolome B. Anti-Adhesive Activity of Cranberry Phenolic Compounds and Their Microbial-Derived Metabolites against Uropathogenic *Escherichia coli* in Bladder Epithelial Cell Cultures. *Int J Mol Sci*. 2015;16(6):12119-30.
188. Kimble LL, Mathison BD, Kaspar KL, Khoo C, Chew BP. Development of a fluorometric microplate antiadhesion assay using uropathogenic *Escherichia coli* and human uroepithelial cells. *J Nat Prod*. 2014;77(5):1102-10.
189. Porter LJH, L.N.; Chan, B.G. The conversion of procyanidins and prodelfinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*. 1985;25(1):223-30.
190. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods*. 1991;142(2):257-65.
191. Boudier A, Castagnos P, Soussan E, Beaune G, Belkhelfa H, Menager C, et al. Polyvalent cationic vesicles: exploring the drug delivery mechanisms. *Int J Pharm*. 2011;403(1-2):230-6.

192. Grimoud J, Durand H, de Souza S, Monsan P, Ouarne F, Theodorou V, et al. In vitro screening of probiotics and synbiotics according to anti-inflammatory and anti-proliferative effects. *Int J Food Microbiol.* 2010;144(1):42-50.
193. Rousseau V, Lepargneur JP, Roques C, Remaud-Simeon M, Paul F. Prebiotic effects of oligosaccharides on selected vaginal lactobacilli and pathogenic microorganisms. *Anaerobe.* 2005;11(3):145-53.
194. Gonzalez-Aspajo G, Belkhelda H, Haddioui-Hbabi L, Bourdy G, Deharo E. Sacha Inchi Oil (*Plukenetia volubilis* L.), effect on adherence of *Staphylococcus aureus* to human skin explant and keratinocytes in vitro. *J Ethnopharmacol.* 2015;171:330-4.
195. Brian-Jaisson F. Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines [Ph.D.]. Toulon: Toulon; 2014.
196. Hidalgo G, Chan M, Tufenkji N. Inhibition of *Escherichia coli* CFT073 *fliC* expression and motility by cranberry materials. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(19):6852-7.
197. Game X, Allard J, Escourrou G, Gourdy P, Tack I, Rischmann P, et al. Estradiol increases urethral tone through the local inhibition of neuronal nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;294(3):R851-7.
198. Blomfield IC, McClain MS, Princ JA, Calie PJ, Eisenstein BI. Type 1 fimbriation and *fimE* mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 1991;173(17):5298-307.
199. Nataro JP, Deng Y, Cookson S, Cravioto A, Savarino SJ, Guers LD, et al. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J Infect Dis.* 1995;171(2):465-8.
200. Welch RA, Burland V, Plunkett G, 3rd, Redford P, Roesch P, Rasko D, et al. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(26):17020-4.
201. Liu Y, Black MA, Caron L, Camesano TA. Role of cranberry juice on molecular-scale surface characteristics and adhesion behavior of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 2006;93(2):297-305.
202. Goller CC, Arshad M, Noah JW, Ananthan S, Evans CW, Nebane NM, et al. Lifting the mask: identification of new small molecule inhibitors of uropathogenic *Escherichia coli* group 2 capsule biogenesis. *PLoS One.* 2014;9(7):e96054.
203. Lavigne JP, Bourg G, Botto H, Sotto A. [Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) and urinary tract infections: study model and review of literature]. *Pathol Biol (Paris).* 2007;55(8-9):460-4.
204. Stothers L. A randomized trial to evaluate effectiveness and cost effectiveness of naturopathic cranberry products as prophylaxis against urinary tract infection in women. *Can J Urol.* 2002;9(3):1558-62.
205. Foxman B, Cronenwett AE, Spino C, Berger MB, Morgan DM. Cranberry juice capsules and urinary tract infection after surgery: results of a randomized trial. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(2):194 e1-8.
206. Raditic DM. Complementary and integrative therapies for lower urinary tract diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2015;45(4):857-78.
207. Chou HI, Chen KS, Wang HC, Lee WM. Effects of cranberry extract on prevention of urinary tract infection in dogs and on adhesion of *Escherichia coli* to Madin-Darby canine kidney cells. *Am J Vet Res.* 2016;77(4):421-7.
208. Barber AE, Norton JP, Wiles TJ, Mulvey MA. Strengths and Limitations of Model Systems for the Study of Urinary Tract Infections and Related Pathologies. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016;80(2):351-67.
209. Carey AJ, Tan CK, Ipe DS, Sullivan MJ, Cripps AW, Schembri MA, et al. Urinary tract infection of mice to model human disease: Practicalities, implications and limitations. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42(5):780-99.

210. Goneau LW, Hannan TJ, MacPhee RA, Schwartz DJ, Macklaim JM, Gloor GB, et al. Subinhibitory antibiotic therapy alters recurrent urinary tract infection pathogenesis through modulation of bacterial virulence and host immunity. *MBio*. 2015;6(2).
211. Conover MS, Flores-Mireles AL, Hibbing ME, Dodson K, Hultgren SJ. Establishment and Characterization of UTI and CAUTI in a Mouse Model. *J Vis Exp*. 2015(100):e52892.
212. Walters MS, Lane MC, Vigil PD, Smith SN, Walk ST, Mobley HL. Kinetics of uropathogenic *Escherichia coli* metapopulation movement during urinary tract infection. *MBio*. 2012;3(1).
213. Staerk K, Khandige S, Kolmos HJ, Moller-Jensen J, Andersen TE. Uropathogenic *Escherichia coli* Express Type 1 Fimbriae Only in Surface Adherent Populations Under Physiological Growth Conditions. *J Infect Dis*. 2016;213(3):386-94.
214. Hagan EC, Lloyd AL, Rasko DA, Faerber GJ, Mobley HL. *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. *PLoS Pathog*. 2010;6(11):e1001187.
215. Eydelnant IA, Tufenkji N. Cranberry derived proanthocyanidins reduce bacterial adhesion to selected biomaterials. *Langmuir*. 2008;24(18):10273-81.
216. Johnson BJ, Lin B, Dinderman MA, Rubin RA, Malanoski AP, Ligler FS. Impact of cranberry on *Escherichia coli* cellular surface characteristics. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377(3):992-4.
217. Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N. A-Type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*. *J Nat Prod*. 2000;63(9):1225-8.
218. Hagberg L, Jodal U, Korhonen TK, Lidin-Janson G, Lindberg U, Svanborg Eden C. Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Infect Immun*. 1981;31(2):564-70.
219. Thomas WE, Trintchina E, Forero M, Vogel V, Sokurenko EV. Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell*. 2002;109(7):913-23.
220. Andersen TE, Khandige S, Madelung M, Brewer J, Kolmos HJ, Moller-Jensen J. *Escherichia coli* uropathogenesis in vitro: invasion, cellular escape, and secondary infection analyzed in a human bladder cell infection model. *Infect Immun*. 2012;80(5):1858-67.
221. Nicolosi D, Tempera G, Genovese C, Furneri PM. Anti-Adhesion Activity of A2-type Proanthocyanidins (a Cranberry Major Component) on Uropathogenic *E. coli* and *P. mirabilis* Strains. *Antibiotics (Basel)*. 2014;3(2):143-54.
222. Martin MA, Ramos S, Mateos R, Marais JP, Bravo-Clemente L, Khoo C, et al. Chemical characterization and chemo-protective activity of cranberry phenolic powders in a model cell culture. Response of the antioxidant defenses and regulation of signaling pathways. *Food research International*. 2015;71:68-82.
223. Delehanty JB, Johnson BJ, Hickey TE, Pons T, Ligler FS. Binding and neutralization of lipopolysaccharides by plant proanthocyanidins. *J Nat Prod*. 2007;70(11):1718-24.
224. Snyder JA, Haugen BJ, Buckles EL, Lockatell CV, Johnson DE, Donnenberg MS, et al. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect Immun*. 2004;72(11):6373-81.
225. Subashchandrabose S, Mobley HL. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2015;3(4).
226. Khandige S, Kronborg T, Uhlin BE, Moller-Jensen J. sRNA-Mediated Regulation of P-Fimbriae Phase Variation in Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog*. 2015;11(8):e1005109.
227. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Cusumano CK, Hannan TJ, Janetka JW, Hultgren SJ. Distinguishing the contribution of type 1 pili from that of other QseB-misregulated factors when QseC is absent during urinary tract infection. *Infect Immun*. 2012;80(8):2826-34.

228. Otto K, Norbeck J, Larsson T, Karlsson KA, Hermansson M. Adhesion of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins. *J Bacteriol.* 2001;183(8):2445-53.
229. Simms AN, Mobley HL. Multiple genes repress motility in uropathogenic *Escherichia coli* constitutively expressing type 1 fimbriae. *J Bacteriol.* 2008;190(10):3747-56.
230. Burkart M, Toguchi A, Harshey RM. The chemotaxis system, but not chemotaxis, is essential for swarming motility in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(5):2568-73.
231. Fitzgerald DM, Bonocora RP, Wade JT. Comprehensive mapping of the *Escherichia coli* flagellar regulatory network. *PLoS Genet.* 2014;10(10):e1004649.
232. Friedlander RS, Vogel N, Aizenberg J. Role of Flagella in Adhesion of *Escherichia coli* to Abiotic Surfaces. *Langmuir.* 2015;31(22):6137-44.
233. Zhou M, Yang Y, Chen P, Hu H, Hardwidge PR, Zhu G. More than a locomotive organelle: flagella in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(21):8883-90.
234. Terashima H, Kojima S, Homma M. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2008;270:39-85.
235. Dusane DH, Hosseinidoust Z, Asadishad B, Tufenkji N. Alkaloids modulate motility, biofilm formation and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2014;9(11):e112093.
236. Belas R, Suvanasuthi R. The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein. *J Bacteriol.* 2005;187(19):6789-803.
237. Attmannspacher U, Scharf BE, Harshey RM. FliL is essential for swarming: motor rotation in absence of FliL fractures the flagellar rod in swarmer cells of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* 2008;68(2):328-41.
238. Holden N, Totsika M, Dixon L, Catherwood K, Gally DL. Regulation of P-fimbrial phase variation frequencies in *Escherichia coli* CFT073. *Infect Immun.* 2007;75(7):3325-34.
239. Alteri CJ, Mobley HL. Quantitative profile of the uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteome during growth in human urine. *Infect Immun.* 2007;75(6):2679-88.
240. Feldman M, Weiss EI, Ofek I, Steinberg D. Interference of cranberry constituents in cell-cell signaling system of *Vibrio harveyi*. *Curr Microbiol.* 2009;59(4):469-74.
241. Jones BV, Young R, Mahenthalingam E, Stickler DJ. Ultrastructure of *Proteus mirabilis* swarmer cell rafts and role of swarming in catheter-associated urinary tract infection. *Infect Immun.* 2004;72(7):3941-50.
242. Cai T, Caola I, Tessarolo F, Piccoli F, D'Elia C, Caciagli P, et al. Solidago, orthosiphon, birch and cranberry extracts can decrease microbial colonization and biofilm development in indwelling urinary catheter: a microbiologic and ultrastructural pilot study. *World J Urol.* 2014;32(4):1007-14.
243. O'May C, Tufenkji N. The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(9):3061-7.
244. McCall J, Hidalgo G, Asadishad B, Tufenkji N. Cranberry impairs selected behaviors essential for virulence in *Proteus mirabilis* HI4320. *Can J Microbiol.* 2013;59(6):430-6.
245. O'May C, Amzallag O, Bechir K, Tufenkji N. Cranberry derivatives enhance biofilm formation and transiently impair swarming motility of the uropathogen *Proteus mirabilis* HI4320. *Can J Microbiol.* 2016;62(6):464-74.
246. Chan M, Hidalgo G, Asadishad B, Almeida S, Muja N, Mohammadi MS, et al. Inhibition of bacterial motility and spreading via release of cranberry derived materials from silicone substrates. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;110:275-80.

Title: *Escherichia coli* and cranberry : *in vitro* and animal activity assessment

Abstract

V.macrocarpon (cranberry) is traditionally associated with the prevention of urinary tract infections although the mechanisms of action remaining poorly elucidated. Preincubation of *E.coli* UTI89 strain with commercial extracts of *V.macrocarpon* inhibited adhesion to T24 human urothelial cell line in a dose-dependent and reversible manner. Transcriptomic assay (*E.coli* Gene expression microarray, Agilent Technologies) highlighted a strong impact on most genes related to adhesion, but P fimbriae, chemotactism and flagella. Electron microscopy study confirmed *V.macrocarpon*-induced alterations on UTI89 size and surface structures (fimbriae, flagella). In keeping, broad field microscopy (ImarisTrack) evidenced alterations in *E.coli* motility (track displacement length, duration, speed & straightness).

In C57BL/6 mice, pre-incubation of UTI89 with *V.macrocarpon* extracts failed to impact bladder colonization after intravesical instillations and adhesion to T24 cells of bacteria recovered 3days after instillation.

A simple, *in vitro* model based on adhesion and swarming assays and broad field microscopy is described to evaluate cranberry activity.

Key words: *E.coli*, cranberry, adhesion, motility, chemotactism, flagella, transcriptome

Auteur : Sandra Peckre Figueira Ferraz MALAVAUD

Titre : *Escherichia coli* et canneberge : évaluation de l'activité *in vitro* et chez l'animal

Directeurs de thèse : Christine ROQUES-CESCHIN, Bernard MALAVAUD

Soutenue à Toulouse, le mars 2017

Résumé :

V. macrocarpon (canneberge) est traditionnellement associé à la prévention des IU, les mécanismes restant mal élucidés. L'effet d'une préparation commerciale de canneberge sur l'adhésion d'*E.coli* UTI89 aux cellules urothéliales T24, a montré l'importance de pré-incuber les bactéries avec le composé pour obtenir une inhibition dose-dépendante et réversible de l'adhésion. L'étude du transcriptome (*E.coli Gene expression microarray*, AgilentTechnologies) montre un effet puissant portant sur de nombreux gènes liés aux adhésines (sauf les fimbriae P), au chémotactisme et au flagelle. L'étude en microscopie électronique confirme un effet sur la taille et les structures de surface (adhésines, flagelles), l'étude de la mobilité en microscopie à champ large montre de moindres capacités de déplacement (distances, linéarité).

Chez la souris C57BL/6, la pré-incubation n'a pas d'effet significatif sur la colonisation des vessies, ni sur l'adhésion *ex vivo* aux cellules T24, des bactéries récupérées dans les vessies.

Un modèle intégratif d'étude de *V.macrocarpon*, basé sur des tests simples *in vitro* (adhésion, swarming, microscopie à champ large) est défini.

Mots clés : *E.coli*, canneberge, adhésion, mobilité, chémotactisme, flagelle, transcriptome

Discipline : Microbiologie

Thèse préparée dans le Laboratoire de Génie Chimique, Faculté de Pharmacie, UMR 5503, Toulouse III.