

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE 2021

2020/TOU3/2100

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Obtenu après soutenance

DU MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Présentée et soutenue publiquement

Le 22 Janvier 2021 à Toulouse par

Cécile GUYONNET

Née le 14 Décembre 1993 à Toulouse

IMPACT DE LA DISPONIBILITE EN OXYGENE SUR LA GENOTOXICITE

DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUISANT LA COLIBACTINE

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Éric OSWALD

JURY

Président :	Madame le Professeur Christine ROQUES-CESCHIN
1 ^{er} assesseur :	Monsieur le Professeur Éric OSWALD
2 ^{ème} assesseur :	Madame le Docteur Pauline FLOCH
3 ^{ème} assesseur :	Monsieur le Docteur Jean-Philippe NOUGAYREDE

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} octobre 2020

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. GAIRIN J.E.	Pharmacologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C.	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
Mme DERA EVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S.	Biochimie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme LARGEAUD L.	Immunologie
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT AS.	Biophysique
Mme TRIBAUDEAU L.	Droit pharmaceutique

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)

M. François-Xavier TOUBLET	Chimie Thérapeutique
----------------------------	----------------------

Remerciements

Aux membres du jury

A Madame le Professeur Christine Roques-Ceschin,

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à mon travail. Vos enseignements à la faculté de Pharmacie de Toulouse et mon semestre dans le laboratoire de Bactériologie-Hygiène du CHU de Purpan ont conforté mon envie de me spécialiser dans ce domaine de la Biologie Médicale. Veuillez recevoir toute ma gratitude et mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Éric Oswald,

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre équipe de recherche pour réaliser mon Master 2 Recherche et d'avoir accepté de diriger ma thèse d'exercice. Merci également pour tous vos précieux conseils, votre disponibilité et pour votre confiance dans mon travail. Soyez assuré de toute ma gratitude et de ma reconnaissance.

A Madame le Docteur Pauline Floch,

Je te remercie d'avoir accepté avec enthousiasme de prendre part à mon jury de thèse. A Bordeaux puis à Toulouse, tu as été une AHU exemplaire pour moi, rigoureuse et passionnée mais aussi humaine et solidaire avec tes internes ! Merci pour ta disponibilité et ton implication dans ma formation de future biologiste. Je tiens à t'exprimer ma reconnaissance et mon admiration.

A Monsieur le Docteur Jean-Philippe Nougayrède,

Je te remercie d'avoir accepté de me co-encadrer durant la valorisation de ce travail sous forme de thèse d'exercice. Je te suis extrêmement reconnaissante pour tes conseils, tes relectures, ta disponibilité et ta patience durant cette année de recherche. Merci également de m'avoir accordé ta confiance pour la réalisation des expériences en cette période exceptionnelle de crise épidémique. Reçois ici la marque de mon plus grand respect et toute ma gratitude.

Aux personnes ayant permis la réalisation de ce travail

Je tiens à remercier toute l'équipe 2 de l'IRSD pour m'avoir aussi bien accueillie et intégrée dans votre laboratoire de recherche. En particulier, je remercie chaleureusement :

Nadège, tu m'as permis de faire mes premiers pas dans la station hypoxie qui grâce à toi, n'a plus de secret pour moi. Je te remercie de m'avoir transmis ton savoir et ta maîtrise des techniques. J'ai eu plaisir à travailler avec toi. Merci pour ton professionnalisme mais également ta gentillesse et ton humour. Cette thèse n'aurait jamais vu le jour sans toi, j'espère que tu poursuivras nos découvertes pour ta thèse de Sciences à venir !

Camille, un grand merci pour tes conseils, tes relectures et ton soutien depuis le début de cette aventure de M2R, puis pour ma thèse d'exercice. Merci pour le temps que tu m'as accordé durant ces longues journées d'extractions lipidiques et plasmidiques, qui ont toujours porté leur fruit. J'admire ton dynamisme, ta générosité et ton rayonnement positif. Tu es une perle !

Priscilla, merci d'avoir partagé ton expérience sur la qRT-PCR et m'avoir encouragé à aller au bout de cette manip ! J'espère que ton mutant FNR apportera de nouvelles réponses à ce projet. Merci pour la patience que tu as eu pour répondre à mes questions scientifiques, mais aussi personnelles ... Ce fut une chance et un plaisir de travailler avec toi !

Min, merci pour ton aide et ton soutien dans mes expériences. Merci d'avoir partagé avec moi tes souches bactériennes et tes plasmides. J'ai pu aussi, grâce à toi, pratiquer mon anglais et muscler mes zygomatiques ! J'espère que tu continueras tes expériences sur la régulation de la synthèse de la colibactine par l'oxygène avec ArcA/B !

Marie, merci pour ton aide dans l'extraction des ARNm (on n'oubliera jamais cette première tentative qui fut un échec total, mais si drôle) et tous tes conseils sur la qRT-PCR. J'ai eu de la chance de partager le même bureau que toi. Merci pour ta gentillesse et ton rire communicatif !

Marion, merci pour ton aide dans mes premières expériences *in cellulo*. Merci aussi pour tes astuces sur Graphpad et sur Word. C'était un vrai plaisir de te connaître et de travailler avec toi durant toute cette année recherche !

Delphine, Christine, Matteo, Corentin, Jean-Paul et tous les autres, merci pour tous nos échanges et pour m'avoir apporté votre soutien !

Aux biologistes du laboratoire de Bactériologie de Bordeaux et du laboratoire de Bactériologie-Hygiène de Toulouse. Je garde de très bons souvenirs de ma formation d'interne !

Aux biologistes du laboratoire du CHIC de Marmande, j'ai passé un excellent stage grâce à vous. Merci Tanguy de m'avoir enseigné avec bienveillance la Bactériologie !

Enfin, merci aux biologistes du laboratoire du CH de Bigorre pour votre accueil et votre soutien. Merci Alain Le Coustumier pour le savoir et votre passion que vous m'avez transmis !

A mes proches

A tous mes amis bordelais grâce auxquels j'ai réellement apprécié mon internat : Marine, Justine, Thibault, Maxime, Julie, Mehdi, et aussi Tania et Ghanou. J'espère que malgré la distance et le travail nous resterons soudés pour partager encore pleins d'évènements ensemble !

A Mickael, tu m'as tellement apporté durant ces années d'internat ! Je garde tous ces bons souvenirs en tête, continue de briller comme un rayon de soleil de la Réunion !

A mes amis et co-internes toulousains, Emilie, Pierre et Tom. Merci pour votre gentillesse !

A Marie et Alexia, mes amies Marmandaises. J'ai eu tellement de chance de vous rencontrer pour partager nos fous rires et nos séances de sport ! Merci pour votre gentillesse et votre joie de vivre communicative !

A mes amies de la fac de Pharma, et qui le sont restées ! Julie ma binôme de toujours, Oriane et Marie-Lou ma libanaise préférée !

A mon amie d'enfance, Marjorie, je suis heureuse qu'on soit toujours en contact depuis presque 25 ans ! C'est un signe si je soutiens ma thèse de Pharmacie un 22 Janvier !

A toutes mes cousines et mes cousins, merci d'être là pour moi ! Magali, merci d'avoir pris soin de moi, c'est aussi grâce à toi que j'ai fait ce long chemin. Marie-Claire, on se suit depuis toutes petites, et bientôt de nouvelles aventures à Paris !

A mes tantes et mes oncles. Tatie Béatrice, merci pour tes conseils et ta bienveillance !

A mes grands-parents et ma mamie Joséphine, vous êtes toujours si fiers de moi. Merci pour votre amour inconditionnel et vos conseils si précieux ! Je vous aime.

A mon petit frère que j'aime. Je suis très fière de toi et j'espère qu'on restera toujours proche malgré la distance ! Et à Margaux, je suis heureuse que tu fasses partie de la famille. Prends bien soin de ce petit !

A mes parents, à chaque instant vous souhaitez mon bonheur et me soutenez. C'est aussi grâce à vous que j'ai autant réussi (et que je suis la voie des bactéries) ! Je vous remercie infiniment. Promis je reviens vous voir à Toulouse dès que je le peux ! Je vous aime.

A Jacques, mon amour, merci de m'apporter ton soutien, ton réconfort et mon bonheur quotidien. Tu as teinté de belles couleurs mon internat à Bordeaux et depuis nous avons tenu le cap malgré la distance. Nous allons vivre une grande aventure à Paris, et j'espère que notre voyage ensemble durera pour toujours !

Table des matières

Liste des annexes	9
Liste des tableaux	10
Liste des figures.....	11
Liste des abréviations.....	12
Introduction.....	14
Partie I Synthèse bibliographique	15
I. Le rôle de l'oxygène dans la virulence des entérobactéries.....	15
A. Les principales entérobactéries chez l'Homme.....	15
1. Définition	15
2. Habitat.....	16
B. Pathogénicité des entérobactéries	16
1. Pathologies	16
2. Facteurs de virulence	20
C. L'oxygène chez les entérobactéries	23
1. La respiration des entérobactéries	23
2. Répartition des entérobactéries selon les gradients d'oxygène dans le tube digestif humain	23
3. Effet de l'inflammation chronique sur les entérobactéries.....	25
4. L'oxygène dans la virulence des entérobactéries	26
II. La colibactine, un facteur de virulence carcinogène.....	29
A. L'îlot <i>pks</i>	29
1. Un îlot de pathogénicité.....	29
2. Organisation génomique.....	30
3. Epidémiologie	30
4. Rôle pléiotrope de l'îlot <i>pks</i> dans la virulence et la pathogénicité des bactéries.....	31
B. La colibactine	32
1. Biosynthèse	32
2. Structure de la colibactine et liaison avec l'ADN double-brin.....	36
3. Génotoxicité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	37
C. Colibactine & cancer	39
1. Le cancer colorectal.....	39
2. La colibactine dans le cancer colorectal.....	39
3. Colibactine et inflammation dans la promotion du cancer colorectal.....	40
III. Conclusion.....	41

Partie II : Etude expérimentale	42
I. Contexte : colibactine & oxygène	42
A. Connaissances	42
1. Inflammation aigue et hypoxie	42
2. Cancer et stress hypoxiant	42
3. Importance de l'oxygène sur la colibactine	43
B. Résultats préliminaires : les conditions de culture modulent l'autotoxicité de la colibactine	43
C. Hypothèse	44
D. Objectif de l'étude	45
E. Souche bactérienne et plasmide utilisés	45
F. Démarche expérimentale	46
1. Paramétrage de la station hypoxie et obtention de l'anoxie	46
2. Préparation des cultures bactériennes	47
II. Impact de l'oxygène sur la synthèse et la génotoxicité de la colibactine	48
A. L'oxygène module l'autotoxicité de la colibactine	48
B. L'oxygène inhibe la production ou la génotoxicité de la colibactine	49
C. La génotoxicité de la colibactine pourrait dépendre de l'oxygène	51
D. Variations de l'expression du gène de synthèse <i>clbB</i> en fonction de l'oxygène	52
1. Approche <i>via</i> un système rapporteur par bioluminescence	52
2. Approche <i>via</i> une méthode de qRT-PCR	54
E. La production de la colibactine dépend de l'oxygène	55
III. Discussion et perspectives	56
A. Bilan sur les résultats expérimentaux de l'étude	56
B. Confirmation des résultats <i>in cellulo</i>	58
C. Régulation de la production de colibactine par les régulateurs transcriptionnels oxygène-dépendants	58
D. Perspectives thérapeutiques contre <i>E. coli pks+</i> dans l'inflammation chronique et le cancer colorectal	59
IV. Conclusion	61
Bibliographie	62
Annexes	69
Serment de Galien	76
Abstract	77

Liste des annexes

Annexe 1 : Liste des souches de <i>E. coli</i> utilisées lors de cette étude	69
Annexe 2 : Données de matériel et méthodes supplémentaires	70
A. Conditions de culture des souches de <i>E. coli</i> DH10B.....	70
B. Dénombrement des bactéries.....	70
C. Mesure de l'activité de la colibactine	70
1. Test du pontage inter-brins de l'ADN <i>in vitro</i>	70
2. Purification de l'ADN	70
3. Electrophorèse d'ADN sur gel dénaturant	71
D. Mesure de la bioluminescence	71
E. qRT-PCR.....	71
1. Recueil des culots bactériens	71
2. Extraction des ARNm totaux.....	71
3. Transcription inverse des ARNm	72
4. PCR quantitative en temps réel	72
F. Extraction et dosage des métabolites lipidiques	73
1. Recueil des surnageants	73
2. Extraction des lipides	73
3. Dosage des lipides.....	74
G. Analyse statistique	74
Annexe 3 : Calculs des concentrations en oxygène en pourcentage.....	75

Liste des tableaux

Tableau 1 : Prévalence des principaux groupes de <i>E. coli</i> chez l'Homme.....	31
Tableau 2 : Souches bactériennes utilisées lors de cette étude et antibiotiques associés.....	69
Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour la qRT-PCR.....	73
Tableau 4 : Calculs des pourcentages en oxygène selon la distribution des pressions partielles en oxygène le long de l'axe transversal intestinal chez l'Homme	75

Liste des figures

Figure 1 : Sites d'infection des différents pathovars de <i>Escherichia coli</i>	19
Figure 2 : Schéma des principaux facteurs de virulences des entérobactéries	21
Figure 3 : Représentation schématique des gradients d'oxygène, de pH et de charge bactérienne dans le tube digestif humain	25
Figure 4 : Modèle de régulation des gènes de virulence en fonction de l'oxygène chez les ETEC	27
Figure 5 : Modèle de régulation du T3SS en fonction de l'oxygène chez <i>Shigella flexneri</i>	28
Figure 6 : Effet de la colibactine sur les cellules eucaryotes	29
Figure 7 : Schéma de l'organisation génomique de l'îlot <i>pks</i>	30
Figure 8 : Modèle de biosynthèse de la colibactine	33
Figure 9 : Proposition de biosynthèse moléculaire de la (pré)colibactine	35
Figure 10 : Structure moléculaire des pharmacophores de la colibactine responsables de la mutagenèse de l'ADN	36
Figure 11 : Modélisation de l'insertion de la colibactine dans le sillon de l'ADN double-brin.....	37
Figure 12 : Conséquences cellulaires des dommages à l'ADN.....	38
Figure 13 : Modulation de l'autotoxicité de la colibactine par les conditions de culture chez <i>E. coli pks+</i>	44
Figure 14 : Schéma illustrant l'hypothèse de l'étude	45
Figure 15 : Schéma du système rapporteur de l'activité du promoteur <i>clbB</i> dans <i>E. coli</i> SP15....	46
Figure 16 : Schéma représentant la démarche expérimentale suivie au cours de cette étude	47
Figure 17 : L'oxygène module l'autotoxicité de la colibactine chez <i>E. coli pks+</i>	48
Figure 18 : Analyse du pontage inter-brins de l'ADN plasmidique en fonction des concentrations en oxygène avec <i>E. coli</i> SP15	49
Figure 19 : Croissance de <i>E. coli</i> SP15 en fonction des concentrations en oxygène	50
Figure 20 : Analyse du pontage inter-brins de l'ADN plasmidique avec <i>E. coli</i> SP15 avec variation de l'oxygène	51
Figure 21 : Bioluminescence en fonction des concentrations en oxygène chez <i>E. coli</i> SP15 portant pCM17 modifié avec le promoteur du gène <i>clbB</i>	53
Figure 22 : qRT-PCR du gène <i>clbB</i> en fonction des concentrations en oxygène chez <i>E. coli</i> SP15	54
Figure 23 : Concentration de C14-Asn en fonction des concentrations en oxygène chez <i>E. coli</i> SP15.....	55

Liste des abréviations

ACP	Acyl Carrier Protéine
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AINS	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
ANOVA	Analysis Of Variance
AOM	Azoxyméthane
APC	Adenomatous Polyposis Coli
Arc	Anoxic respiratory control
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3-related kinase
C12-Asn-GABA	C12-Asparagine- γ -amino-butyrique
C14-Asn	N-myristoyl-D-Asparagine ou C14-Asparagine
CDK	Cyclines Dépendantes des Kinases
CHK	Check-point Kinase
COX	Cyclooxygénase
CRC	Cancer Colorectal
DAEC	<i>Escherichia coli</i> à Adhésion Diffuse
DO	Densité Optique
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DSS	Dextran Sulfate de Sodium
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Entéroaggrégatives
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Entérohémorragiques
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Entéroinvasives
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Entéropathogène
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Entérotoxinogène
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> Pathogènes Extra-intestinaux
FANCD2	Protéine D2 de l'Anémie de Fanconi
FNR	Fumarate and Nitrate Reductase
GABA	Acide γ -Amino-Butyrique
Hly	Hémolysine
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
IL10	Interleukine-10
InPEC	<i>Escherichia coli</i> Pathogènes Intestinaux
Ipa	Antigène du plasmide d'invasion

LB	Lysogeny Broth
LC-MS/MS	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem
LPS	Lipopolysaccharide
MATE	Multidrug And Toxic compound Extrusion
MeOH	Méthanol
MICI	Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
MOI	Multiplicity Of Infection
MRM	Multiple Reaction Monitoring
NFκB	Facteur Nucléaire-κB
NMEC	<i>Escherichia coli</i> Méningitiques Néonatales
NRPS	Non Ribosomal Peptide Synthétase
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCP	Peptidyl Carrier Protéine
PCR	Polymerase Chain Reaction
PK-NRP	Polykétide-peptide Non Ribosomal
PKS	Polykétide Synthase
PPTase	Phosphopantéthéinyl Transférerase
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SASP	Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence
SHU	Syndrome Hémolytique et Urémique
SVF	Sérum de Veau Fœtal
T3SS	Système de Sécrétion de Type 3
TMAO	Triméthylamine-N-oxyde
TNF	Tumor Necrosis Factor
UFC	Unité Formant Colonie
UPEC	<i>Escherichia coli</i> Uropathogènes
WT	Wild Type

Introduction

Escherichia coli (*E. coli*) est une espèce bactérienne à la fois commensale du tube digestif de l'Homme et pathogène, responsable de diverses infections. La diversité phénotypique de cette souche s'explique par l'acquisition de nombreux facteurs d'adaptation et de virulence portés par des éléments génétiques mobiles, dont les îlots génomiques. Notre équipe de recherche a identifié en 2006 un îlot génomique, l'îlot *pks*, qui code pour une machinerie enzymatique complexe synthétisant la colibactine, une génotoxine produite par certaines souches d'entérobactéries dont *E. coli*. Cette génotoxine induit des cassures double-brins de l'ADN sur les cellules eucaryotes *in vitro* et *in vivo*.

L'objectif de ma thèse est d'apporter une meilleure compréhension de la régulation de la colibactine par le dioxygène (plus simplement appelé oxygène dans ce manuscrit), en particulier chez *E. coli*. En effet, des résultats préliminaires de l'équipe semblaient indiquer que l'oxygène modulerait la production de colibactine chez cette bactérie.

Ma thèse s'articule en deux grandes parties : une première partie de synthèse bibliographique dans laquelle je m'applique à définir le rôle de l'oxygène dans la virulence des entérobactéries ainsi que l'importance de la colibactine dans le cancer colorectal. Dans la deuxième partie, intitulée étude expérimentale, je présente mes résultats expérimentaux obtenus au cours de mon année de recherche à l'Institut de Recherche en Santé Digestive au CHU de Toulouse, au sein de l'équipe du Pr Éric Oswald (UMR INSERM 1220). Au cours de mes travaux de recherche, j'ai testé l'hypothèse selon laquelle l'oxygène pourrait impacter la production, c'est-à-dire la biosynthèse de la colibactine, et/ou la bioactivité de la génotoxine chez *E. coli*.

Ces résultats apportent des informations permettant de mieux appréhender la pathogénèse des souches d'entérobactéries productrices de colibactine génotoxique.

Partie I : Synthèse bibliographique

I. Le rôle de l'oxygène dans la virulence des entérobactéries

A. Les principales entérobactéries chez l'Homme

1. Définition

Les entérobactéries constituent un vaste groupe de bactéries présentant de fortes similitudes. En 1937, Rahn propose de rassembler les genres bactériens déjà décrits tels que *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Klebsiella* au sein d'une seule grande famille : les *Enterobacteriaceae*. L'évolution constante des techniques d'études génomiques a profondément bouleversé la taxonomie des bactéries, et celle des entérobactéries en particulier. L'ère de la génomique associant les techniques d'hybridation ADN/ADN, le séquençage des gènes des ARN ribosomiaux 5S, 16S, du *rpoB* (codant l'ARN polymérase B) et le séquençage complet, permettent une identification précise des espèces bactériennes. On dénombre ainsi 53 genres et plus de 170 espèces d'entérobactéries. Certains genres comme *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* et *Yersinia* sont plus fréquemment isolés en bactériologie clinique. Les entérobactéries sont définies par un ensemble de caractères généraux communs, morphologiques, culturels, biochimiques et antigéniques. Leur sensibilité aux β -lactamines est utilisée en pratique courante pour les classer dans différents groupes (1).

Les entérobactéries sont polymorphes avec des tailles variant de 2 à 6 μm de long sur 0,4 à 0,6 μm de large. Ce sont des bacilles à Gram négatif présentant une coloration bipolaire, droits, non sporulés, le plus souvent mobiles grâce à une ciliature péritriche. Certains genres comme *Klebsiella* et *Shigella* sont immobiles (2). Quelques-unes possèdent une capsule visible au microscope et la plupart des espèces pathogènes pour l'Homme possèdent des *fimbriae* ou *pili* qui sont des facteurs d'adhésion.

Elles possèdent toutes des antigènes de paroi ou antigènes somatiques O. L'antigène O est l'endotoxine des bactéries à Gram négatif. Il est composé de lipopolysaccharides (LPS) complexes et antigéniques. En raison de sa toxicité, celui-ci entraîne un certain nombre d'effets physiopathologiques pouvant être mortels. Les bactéries mobiles possèdent en plus des antigènes flagellaires ou antigènes H. Enfin, certaines possèdent un antigène d'enveloppe ou antigène K. C'est un antigène capsulaire qui entoure la paroi des *Klebsiella* et de certaines souches de *E. coli*, *Shigella*, *Citrobacter* et *Salmonella* (antigène Vi). Ces différents antigènes peuvent être utilisés pour le typage des bactéries.

Ces bactéries sont peu exigeantes et se développent facilement sur les milieux ordinaires en aérobie et en anaérobie en 24 h à 37°C, à l'exception des *Yersinia* à 30°C (1). Leur temps de division est d'environ 20 min. Elles fermentent le glucose et sont catalase positive, oxydase négative et réduisent les nitrates NO_3^- en nitrites NO_2^- . Elles possèdent de nombreuses

enzymes (β -galactosidase, décarboxylases de la lysine et de l'ornithine, dihydrolase de l'arginine etc.); qui peuvent être utilisées dans les géloses chromogéniques et dans les galeries d'identification de type API 20E® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) pour l'identification bactérienne.

2. Habitat

Les entérobactéries sont très ubiquitaires, c'est-à-dire qu'on peut les retrouver dans de nombreux écosystèmes. Certaines espèces telles que les *Serratia* ou les *Enterobacter* sont seulement saprophytes. Elles se multiplient dans les milieux humides au niveau des sols, des eaux, des végétaux ou des produits alimentaires. La plupart des espèces sont commensales, isolées dans l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud, d'où le nom d'entérobactéries. On peut également les retrouver dans la cavité buccale, les régions humides de la peau en particulier le périnée, les fosses nasales et les voies génitales féminines dans lesquelles elles peuvent constituer une flore transitoire (3).

Les entérobactéries font partie des premières bactéries à coloniser l'intestin humain dès la naissance (4). Le microbiote intestinal de l'adulte contient 10^{14} bactéries par gramme de fèces ce qui représente en moyenne dix fois le nombre total de cellules du corps humain. Il est composé de plus de 500 espèces de bactéries dont plus de 90% sont des anaérobies strictes (5). Les entérobactéries représentent une fraction importante de bactéries aéro-anaérobies facultatives. Elles se retrouvent en grand nombre au niveau du côlon (du cæcum au rectum) où elles constituent une barrière de protection indispensable pour l'hôte contre les agents pathogènes. En outre elles utilisent des nutriments apportés par l'alimentation tout en favorisant la digestion des acides gras et la production de vitamine K (6).

E. coli est l'entérobactérie la plus prédominante du microbiote intestinal humain. En effet, plus de 90% de la population est colonisée par *E. coli*. Sa concentration par gramme de selles varie entre les individus de 10^7 à 10^9 unités formant des colonies (UFC). Elle peut transiter dans l'eau et les sédiments où elle est utilisée comme un indicateur de la contamination fécale de l'eau (colimétrie). *E. coli*, et plus largement les coliformes thermo-tolérants, sont également recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale (1).

B. Pathogénicité des entérobactéries

1. Pathologies

Les entérobactéries commensales interagissent avec leur hôte dans une relation mutualiste. Cependant, elles peuvent devenir des pathogènes opportunistes ou des pathogènes obligatoires du fait de l'expression de facteurs de virulence spécifiques et de la sensibilité de l'hôte. Les souches pathogènes opportunistes ou obligatoires ont développé différents modes d'interaction avec leur hôte se traduisant par des signes cliniques variés.

a. Les entérobactéries pathogènes opportunistes

Les entérobactéries opportunistes ne disposent généralement pas d'un pouvoir pathogène suffisant pour déclencher une pathologie chez un hôte sain. Elles sont en revanche susceptibles de provoquer une infection chez un sujet immunodéprimé ainsi que chez les jeunes enfants et les personnes âgées. Parmi ces bactéries on retrouve en tête *E. coli*, *Proteus* et *Klebsiella* puis *Citrobacter*, *Hafnia*, *Providencia*, *Enterobacter* et *Serratia*. On distingue classiquement deux types d'infections opportunistes :

▪ Les infections nosocomiales :

Elles représentent des infections contractées dans un établissement de soins et touchent en moyenne 5% des patients. Une infection est considérée comme telle lorsqu'elle était absente à l'admission du patient et se manifeste après 48h. Les entérobactéries sont actuellement à l'origine de 29 % des infections nosocomiales. *E. coli* est le premier agent pathogène nosocomial. Par ordre de fréquence décroissante, les entérobactéries sont responsables de 46 % des infections urinaires, 30 % des pneumonies, 24 % des infections sur sites chirurgicaux et 17 % des bactériémies (7).

▪ Les infections acquises dans la communauté :

Parmi ces infections, *E. coli* est la principale cause d'infections urinaires, notamment de prostatites et de pyélonéphrites (8). Les espèces *Proteus*, *Klebsiella* et *Enterobacter* sont également des agents pathogènes courants des voies urinaires. *Proteus mirabilis* est le premier agent responsable de calculs rénaux liés à des infections (9). Enfin *Klebsiella pneumoniae* est fréquemment impliqué dans des infections broncho-pulmonaires et peut être responsable de pneumonies graves (10).

b. Les entérobactéries pathogènes strictes

Leur présence dans l'organisme est anormale quel que soit leur nombre et entraînent souvent une infection dont la gravité dépend de leur point d'entrée. Elles provoquent principalement des troubles intestinaux après adhésion sur la muqueuse intestinale puis passage de la barrière entérocytaire. Les symptômes se caractérisent majoritairement par des diarrhées entraînant une déshydratation qui peut être grave chez le nourrisson et la personne âgée.

▪ *Escherichia coli* :

Ce colibacille fut isolé dans des fèces de nouveau-nés sains par le pédiatre Theodor Escherich en 1885. L'espèce fut rebaptisée *Escherichia* en 1919 en l'honneur de son découvreur (11). *E. coli* est une espèce bactérienne très polymorphe. La grande plasticité de son génome résulte de l'acquisition d'éléments génétiques mobiles (plasmides, îlots génomiques, phages, intégrons), dont certains portent des facteurs de virulence (12). Outre les souches commensales, on distingue classiquement deux groupes de *E. coli* pathogènes pour l'Homme : les *E. coli* pathogènes intestinaux (InPEC) responsables de gastro-entérites et les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) responsables d'infections urinaires et materno-fœtales, de péritonites, de pneumonies nosocomiales, de méningites ou encore de sepsis (**Figure 1**).

Les InPEC sont à l'origine de syndromes diarrhéiques sévères, notamment chez l'enfant dans les pays en développement. Ils sont responsables de deux millions de morts par an dans le monde (13). L'identification de ces différentes souches peut être réalisée par biologie moléculaire. Actuellement, les InPEC sont classés en six pathotypes selon les mécanismes de pathogénicité qui leurs sont propres :

- *E. coli* entéropathogènes (EPEC) est le premier pathotype décrit historiquement. Les EPEC adhèrent aux entérocytes de l'intestin grêle, puis détruisent l'architecture normale des microvillosités créant des lésions qui s'accompagnent d'une réaction inflammatoire et de diarrhées aqueuses.
- *E. coli* entérohémorragiques (EHEC). Ils produisent une toxine clé de la physiopathologie de l'infection, la Shigatoxine-like (Stx), dont l'absorption systémique est à l'origine de colites hémorragiques parfois compliquées de syndrome hémolytique et urémique (SHU), première cause d'insuffisance rénale chez l'enfant de moins de 3 ans. Le sérotype O157 : H7 est le plus fréquent.
- *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC). Ils adhèrent aux entérocytes de l'intestin grêle et provoquent une diarrhée aqueuse en sécrétant deux types d'entérotoxines de nature protéique, l'une est thermosensible (LT) et l'autre est thermostable (ST). Les ETEC sont une des causes les plus fréquentes des diarrhées de l'enfant dans les pays en voie de développement. La moitié des cas de diarrhées du voyageur sont causés par des ETEC.
- *E. coli* entéroinvasives (EIEC). Ils entraînent un syndrome dysentérique proche de celui des *Shigella* spp, avec présence de mucus, sang et leucocytes dans les selles.
- *E. coli* entéroaggrégatives (EAEC). Ils peuvent adhérer sur toute portion de l'épithélium intestinal, protégés dans un épais biofilm, et élaborent des entérotoxines et des cytotoxines responsables de diarrhées persistantes.
- *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC). Ils entraînent également des diarrhées aqueuses persistantes. Ils adhèrent aux cellules en culture avec un phénotype d'adhésion diffus.

Le terme ExPEC regroupe les pathovars responsables d'infections extra-intestinales : les NMEC pour *E. coli* méningitiques néonatales et les UPEC pour *E. coli* uropathogènes. Les NMEC sont responsables de 80 % des cas de méningites néonatales. Ils sont protégés du système immunitaire de l'hôte par une capsule de type K1 (14). Les UPEC sont les principales étiologies des infections du tractus urinaire, à la fois en milieu communautaire et en milieu hospitalier (8). Ils sont responsables de 75% des infections urinaires simples et 65% des infections urinaires compliquées (obstruction des voies urinaires, immunodépression, rétention d'urines causée par une maladie neurologique, grossesse, présence d'une sonde à demeure, exposition récente aux antibiotiques) (15).

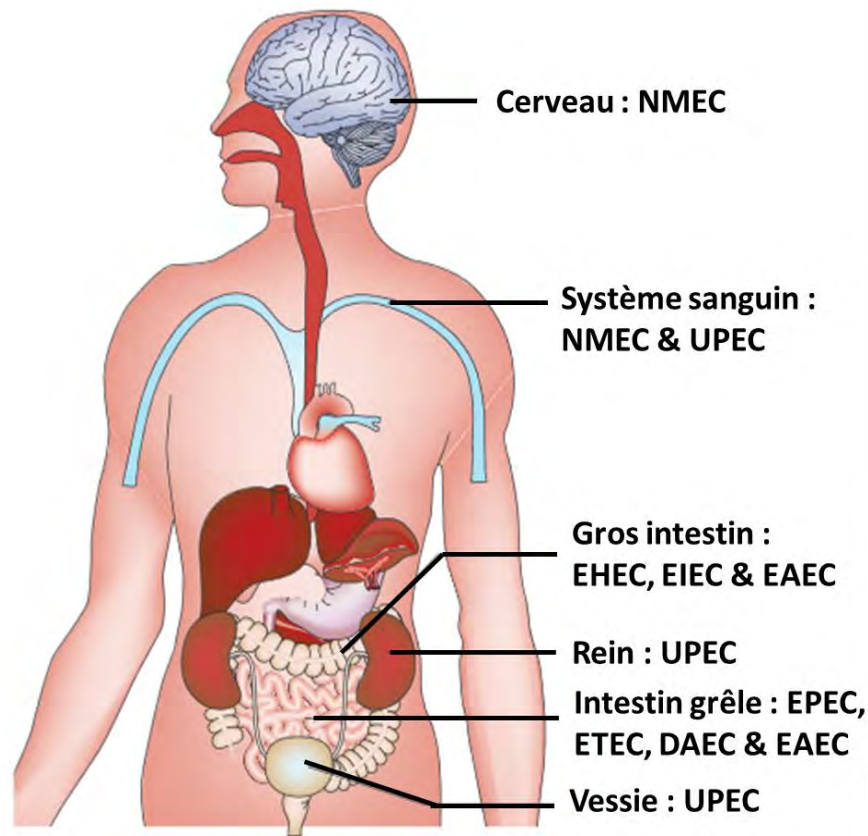


Figure 1 : Sites d'infection des différents pathovars de *Escherichia coli*.

Le site de l'adhésion dans le tractus intestinal diffère en fonction des souches. Chaque pathotype possède un mécanisme de pathogénicité (adhésion, invasion, production d'entérotoxines) qui lui est propre et engendre un syndrome spécifique. D'après (16).

- ***Shigella spp.***

Shigella est un pathovar de *E. coli*. Leurs génomes sont extrêmement proches. En revanche ce sont des entérobactéries immobiles qui ne fermentent pas le lactose. Elles sont parasites de l'Homme et sont des pathogènes très virulents et contagieux. Au cours d'une transmission par voie fécale-orale, 10^2 bactéries suffisent pour atteindre la dose infectieuse (17). Elles entraînent une colite infectieuse endémo-épidémique, la dysenterie bacillaire ou shigellose, cause majeure de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans dans les pays en voie de développement. Les *Shigella* sont classées en 4 espèces elles-mêmes divisées en sérotypes selon leurs caractères antigéniques. Parmi elles, *S. dysenteriae* produit la Shigatoxine (Stx), une exotoxine protéique à activité entérotoxique et neurotoxique, responsable du SHU.

- ***Salmonella spp.***

Le genre *Salmonella* comporte 3 espèces : *enterica*, *bongorii* et *subterranea*, cette dernière espèce ayant été reconnue récemment (18). Le principal mode de contamination chez l'Homme se fait à partir de l'eau ou d'aliments contaminés ou d'animaux familiers porteurs. La dose infectante serait de l'ordre de 10^5 bactéries.

Les sérotypes de *Salmonella* dites mineures telles que *Salmonella* Typhimurium, Enteritidis et Dublin, sont ubiquitaires. Elles provoquent des infections purement digestives de type gastro-entérite d'évolution bénigne en général. Certains sujets restent porteurs sains de

Salmonella dans leur tube digestif et peuvent disséminer leur souche. La consommation simultanée par plusieurs personnes d'un aliment massivement contaminé par des *Salmonella* mineures entraîne un tableau de gastro-entérite, appelé toxi-infection alimentaire collective (TIAC), qui sont des maladies à déclaration obligatoire (19).

Les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes peuvent être fatales en l'absence de traitement. Elles sont provoquées par des sérotypes de *Salmonella* dits majeurs strictement adaptés à l'homme, majoritairement *S. Typhi* et *S. Paratyphi*. Ils entraînent une septicémie à point de départ lymphatique par envahissement des ganglions mésentériques. Ces fièvres frappent principalement les pays en développement en Asie, en Afrique ou en Amérique Latine dans des zones où l'hygiène est précaire. Elles sont également à déclaration obligatoire (19).

▪ *Yersinia spp.*

Ce genre est actuellement composé de 11 espèces, dont 3 sont pathogènes pour l'homme et l'animal : *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. pestis*. Ces bactéries ont un développement optimal vers 30°C mais une virulence ne s'exprimant qu'à 37°C (1).

Y. pestis est un parasite des animaux et de l'Homme, agent de la peste. En plus de la peste bubonique, les formes septicémiques et pulmonaires peuvent être rapidement mortelles. La peste est une maladie à déclaration obligatoire et fait l'objet d'une surveillance du bioterrorisme (19). La culture pour le diagnostic bactériologique s'effectue dans une unité de haute sécurité (laboratoire P3 ou P4).

Y. enterocolitica et *Y.pseudotuberculosis*, retrouvées chez l'animal et dans l'environnement, sont rarement à l'origine d'infections humaines. Néanmoins ces bactéries sont systématiquement recherchées dans l'examen bactériologique au laboratoire. La forme la plus habituelle est l'adénite mésentérique à *Y.pseudotuberculosis* du sujet jeune. *Y.enterocolitica* est responsable d'entérocolite chez le jeune enfant. Les formes septicémiques sont plus rares et surviennent sur un terrain fragilisé.

2. Facteurs de virulence

Les facteurs de virulence aident les bactéries à envahir l'hôte, provoquer des maladies et échapper aux défenses de l'hôte (2). Les facteurs de virulence bactériens peuvent être codés sur de l'ADN chromosomique ou plasmidique. Les gènes des facteurs de virulence sur des transposons ou sur de l'ADN de bactériophages peuvent s'intégrer dans le chromosome bactérien. L'acquisition de facteurs de virulence portés par des éléments génétiques mobiles et la délétion de fragments d'ADN appelés "trous noirs" constituent des mécanismes complémentaires pour l'évolution des pathogènes (20) (**Figure 2**). Les facteurs de virulence peuvent être classés en grandes catégories fonctionnelles :

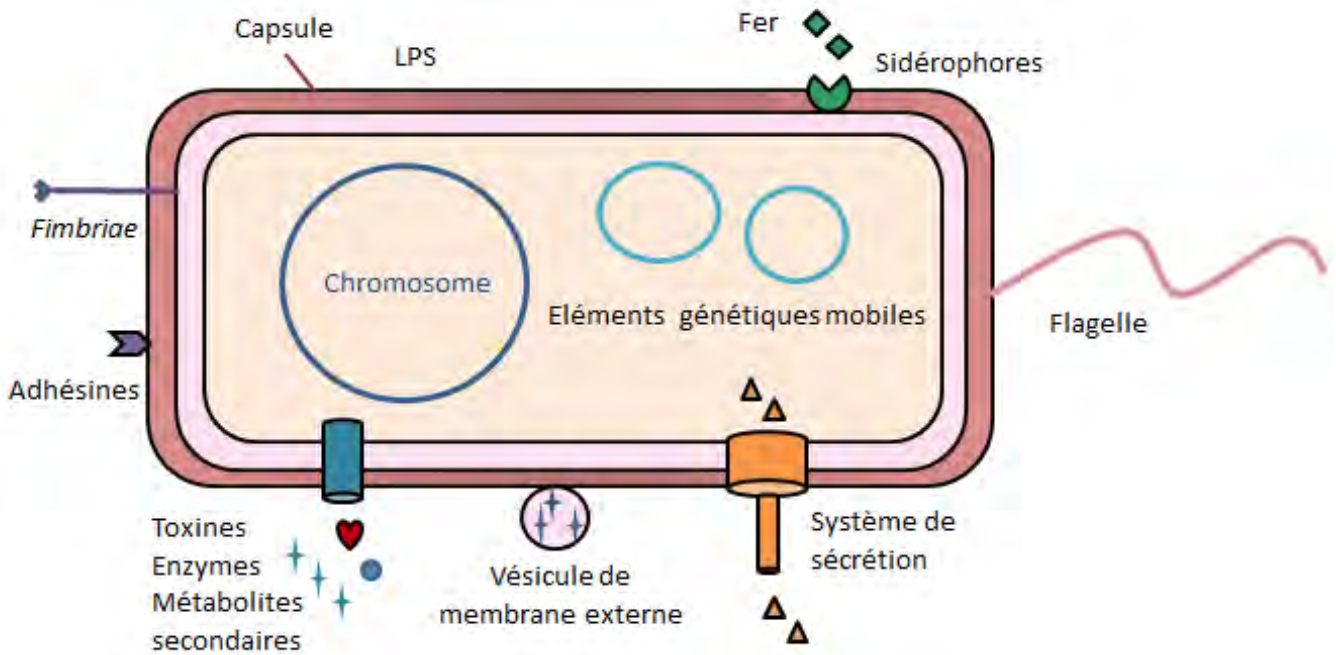


Figure 2 : Schéma des principaux facteurs de virulence des entérobactéries.

a. Facteurs d'adhérence

Pour provoquer une infection, de nombreuses bactéries doivent d'abord adhérer à une surface muqueuse. La muqueuse du tube digestif est nettoyée en continu par la libération de mucus et par le flux péristaltique du contenu de l'intestin sur l'épithélium. La monocouche de cellules épithéliales intestinales est renouvelée et les cellules sont poussées des cryptes vers les extrémités des villosités en 48h environ. Pour établir une infection à ce niveau, les bactéries doivent adhérer à l'épithélium et se multiplier avant que le mucus et les cellules épithéliales exudées ne soient balayés. Les bactéries ont développé des mécanismes de fixation comme les *pili (fimbriae)*, qui reconnaissent et fixent les cellules. Les EHEC et les EPEC se lient étroitement à la membrane épithéliale par l'intermédiaire de la protéine d'adhésion intimine qui entraîne l'effacement des microvillosités et une forte adhérence entre la bactérie et la membrane cellulaire épithéliale (21). Les *pili* de type 1 sont des facteurs de virulence établis chez les UPEC (22). Ils permettent l'adhésion des bactéries à des résidus mannoses à la surface des cellules épithéliales de la vessie et constituent ainsi des réservoirs de bactéries internalisées qui échappent à l'élimination par traitement antibiotique et par les défenses immunitaires de l'hôte (23).

b. Facteurs d'invasion cellulaire

Les mécanismes qui permettent à une bactérie d'envahir les cellules eucaryotes facilitent l'entrée à la surface des muqueuses. Les composants de surface qui permettent l'invasion des cellules hôtes peuvent être codés sur des plasmides, mais le plus souvent, ils se trouvent sur le chromosome. Certains facteurs d'invasion de *Shigella* sont codés sur un plasmide de 140 mégadaltons, qui lorsqu'il est conjugué à *E. coli*, donne à ces bactéries non invasives la capacité d'envahir les cellules (24). D'autres gènes d'invasion ont également été identifiés dans *Salmonella* et *Yersinia pseudotuberculosis* (25).

c. Capsule

La formation de capsules est depuis longtemps reconnue comme un mécanisme de protection des bactéries. Les souches encapsulées, telles que *Klebsiella* et *E. coli* K1, sont plus virulentes et plus résistantes à la phagocytose et à la destruction intracellulaire. *Salmonella* Typhi et certaines bactéries paratyphoïdes sont porteuses d'un antigène de surface, l'antigène Vi. Cette particularité augmente la résistance à la phagocytose, au pouvoir bactéricide et inhibe la maturation du phagolysosome.

d. Endotoxines

L'endotoxine est un composant structural de la membrane externe de toutes les bactéries à Gram négatif, constituée de composants lipopolysaccharidiques (LPS) toxiques et antigéniques. Le complexe moléculaire peut être divisé en trois régions : les chaînes spécifiques O, le polysaccharide central et le lipide A, composé généralement d'un disaccharide glucosamine auquel sont attachés des acides gras à longue chaîne et du phosphate. Les parties polysaccharidiques sont responsables de la diversité antigénique, tandis que la partie lipidique A confère la toxicité. Les effets toxiques les plus pertinents comprennent une pyrogénicité, une leucopénie suivie d'une leucocytose, l'activation du complément, une dépression de la pression sanguine, une mitogénicité, l'induction de la synthèse des prostaglandines et une hypothermie. Ces événements peuvent aboutir à une septicémie et à un choc mortel.

e. Exotoxines

Les exotoxines sont des toxines libérées par des bactéries viables. Elles forment une classe de poisons qui est parmi les plus puissantes, par unité de poids, de toutes les substances toxiques. Elles sont produites par certains membres des genres d'entérobactéries. Les fonctions de ces exotoxines sont généralement inconnues, et les gènes de la plupart d'entre elles peuvent être supprimés sans effet notable sur la croissance bactérienne. Contrairement aux effets systémiques et immunitaires étendus de l'endotoxine sur l'hôte, le site d'action de la plupart des exotoxines est localisé et se limite à des types de cellules ou à des récepteurs cellulaires particuliers. En général, les exotoxines sont d'excellents antigènes qui suscitent des anticorps spécifiques appelés antitoxines. Tous les anticorps contre les exotoxines ne sont pas protecteurs, mais certains réagissent avec des sites de liaison importants ou des sites enzymatiques sur l'exotoxine, ce qui entraîne une neutralisation c'est à dire une inhibition complète de l'activité toxique (2).

Les principales catégories d'exotoxines produites par les entérobactéries comprennent les cytotoxines, les neurotoxines et les entérotoxines. Ces dernières stimulent l'hypersécrétion d'eau et d'électrolytes de l'épithélium intestinal et produisent ainsi une diarrhée aqueuse. Certaines entérotoxines sont à la fois cytotoxiques et neurotoxiques, par exemple, la Shigatoxine de *Shigella* et les entérotoxines Stx1 et Stx2 des EHEC responsables du SHU. Les toxines LT et ST des ETEC sont cytotoniques et provoquent une sortie d'eau de la cellule sans altérer de manière irréversible la vitalité cellulaire. L'hémolysine est une toxine fréquente, présente chez les souches responsables de pyélonéphrites (26). Elle induit des lésions au niveau de l'épithélium

des tubules rénaux. La lyse des globules rouges augmente la quantité de fer disponible et favorise la multiplication bactérienne. L'hémolyse est mise en évidence sur gélose au sang où l'on observe une hémolyse totale de type β autour de la colonie bactérienne.

f. Sidérophores

Les sidérophores sont des chélateurs de fer ferrique Fe^{3+} de petites tailles entre 500 et 1500 daltons. Ces facteurs de fixation du fer permettent aux bactéries de concurrencer l'hôte pour le fer, qui est lié à l'hémoglobine, à la transferrine et à la lactoferrine (27). Les sidérophores exprimés par les entérobactéries sont l'entérobactine, l'aréobactine, les salmochélines et la yersinibactine. Ils ont une importance toute particulière dans la physiopathologie des infections urinaires car l'urine est un milieu très pauvre en fer (28).

g. Acquisition de résistance aux antibiotiques

Le transfert de gènes de résistance aux antibiotiques entre les bactéries est un problème médical important, bien qu'aucune de ces propriétés ne confère réellement une virulence accrue à la bactérie (29). Elles donnent plutôt la possibilité aux bactéries résistantes de proliférer et de produire d'autres facteurs de virulence chez les patients qui sont traités avec un antibiotique inapproprié.

C. L'oxygène chez les entérobactéries

1. La respiration des entérobactéries

Les entérobactéries sont des anaérobies facultatives capables de répondre aux variations de disponibilités en oxygène dans leur environnement. En l'absence d'oxygène, la respiration anaérobie leur permet d'obtenir de l'énergie par la fermentation. Elles utilisent alors par ordre de préférence le nitrate, le nitrite, le TMAO, le DMSO et le fumarate comme accepteurs d'électrons terminaux (30).

En condition aérobie, elles expriment des oxydases qui utilisent l'oxygène comme accepteur d'électrons terminal. Cette respiration oxydative leur est thermodynamiquement favorable. L'expression des oxydases terminales est contrôlée au niveau transcriptionnel *via* la détection de l'oxygène et du nitrate par différents régulateurs tels que FNR (Fumarate and Nitrate Reductase) et ArcA/B (Anoxic Respiratory Control). Les systèmes OxyRS et SoxRS contrôlent la réponse des bactéries respectivement au peroxyde d'hydrogène et au superoxyde (31). Ils régulent l'expression de nombreux gènes codant pour les protéines nécessaires à la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ERO).

2. Répartition des entérobactéries selon les gradients de l'oxygène dans le tube digestif humain

Le microbiote intestinal de l'Homme est un écosystème dynamique qui s'adapte constamment à son environnement.

Les concentrations en oxygène le long du tube digestif humain ont pu être obtenues grâce à l'association de différentes techniques de mesures *via* des électrodes polarographiques et des sondes fluorescentes (32). Une méthode plus récente, appelée oxymétrie par résonance paramagnétique électronique (RPE), est une technique d'imagerie qui permet de quantifier l'oxygène sur de plus grandes surfaces dans la lumière du côlon de manière répétée et non invasive. Plus récemment, une sonde intraluminaire spécialisée qui utilise l'extinction de la phosphorescence a permis une mesure très précise de la pression en oxygène (pO_2) intraluminaire (33).

Alors que l'air respirable au niveau de la mer a une pO_2 d'environ 145 mmHg ($\sim 21\% O_2$), les mesures de l'alvéole pulmonaire saine ont révélé une pO_2 autour de 100 mmHg ($\sim 14\% O_2$) (34). Par contraste, la lumière du côlon sain présente une pO_2 quasi nulle (32). De telles différences de pO_2 dans le corps humain sont dues à une combinaison de sources d'oxygène, de métabolisme local et d'anatomie du flux sanguin. Ainsi, la muqueuse intestinale est soumise à de profondes fluctuations d'oxygénation, même dans des conditions physiologiques d'équilibre. Par exemple après l'ingestion d'aliments, une augmentation marquée du flux sanguin intestinal modifie considérablement la pression partielle locale en oxygène.

Les gradients de pH et d'oxygène le long de l'axe longitudinal du tube digestif humain limitent la charge bactérienne dans les régions proximales de l'intestin grêle alors que le gros intestin supporte d'importantes quantités de bactéries (35) (**Figure 3**). Ainsi le côlon contient 10^9 à 10^{11} bactéries par gramme de fèces dont plus de 90% sont des anaérobies strictes. Les entérobactéries représentent une fraction limitée mais importante de bactéries aéro-anaérobies facultatives (5).

Le long de l'axe transversal de l'intestin, l'oxygène est distribué suivant un gradient luminal/épithélial (**Figure 3**). Les concentrations en oxygène se trouvent plus élevées à proximité de l'épithélium en raison de la respiration cellulaire. En suivant l'axe radial à partir de la sous-muqueuse intestinale, les concentrations d'oxygène diminuent brusquement jusqu'à la quasi-anoxie au niveau de la lumière intestinale. Les entérobactéries résident à proximité immédiate des muqueuses de l'épithélium grâce à leur capacité à utiliser l'oxygène dans la respiration (36).

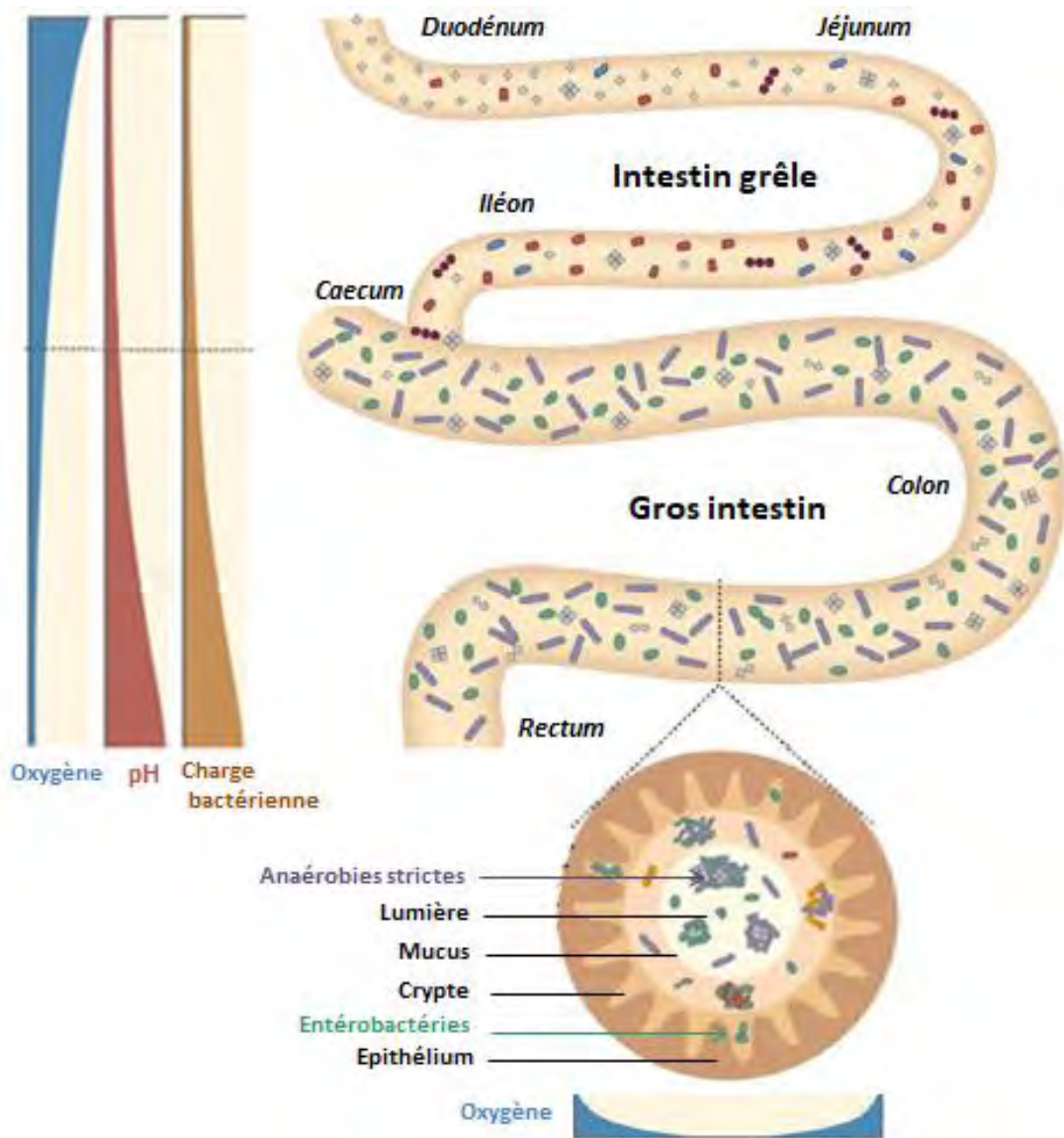


Figure 3 : Représentation schématique des gradients d'oxygène, de pH et de charge bactérienne dans le tube digestif humain. D'après (35).

3. Effet de l'inflammation chronique sur les entérobactéries

Les changements environnementaux et nutritionnels résultant de l'inflammation chronique dans l'intestin peuvent être à l'origine d'une modification du microbiote digestif, en conférant un avantage de croissance aux entérobactéries par rapport aux bactéries anaérobies strictes.

Dans des conditions inflammatoires chroniques, les niveaux d'oxygène luminal de l'intestin augmentent en partie à cause de l'afflux sanguin véhiculant l'hémoglobine qui transporte l'oxygène (5). La signalisation des cytokines pro-inflammatoires de l'hôte entraîne l'activation d'enzymes génératrices d'ERO au niveau de l'épithélium intestinal. Les neutrophiles transmigrent dans la lumière intestinale pour générer également de nombreuses ERO par l'intermédiaire de la NADPH oxydase (37). Les radicaux superoxyde et l'oxyde nitrique produits réagissent et génèrent du nitrate qui peut être réduit par les entérobactéries exprimant la nitrate réductase, contrairement aux bactéries anaérobies obligatoires (38).

De plus l'inflammation entraîne des modifications de l'organisation structurale de l'épithélium intestinal qui tendent à augmenter la quantité d'oxygène dans la lumière intestinale (39). En effet, les microlésions inflammatoires induisent une réponse de réparation épithéliale excessive qui conduit à une accumulation de cellules amplificatrices du transit en division et une réduction concomitante de cellules épithéliales différenciées (40). Ces dernières obtiennent de l'énergie par la dégradation des acides gras par β -oxydation et par la phosphorylation oxydative dans les mitochondries, responsable d'une forte consommation d'oxygène. En revanche, les cellules amplificatrices du transit convertissent le glucose en lactate même en présence d'oxygène, un métabolisme caractérisé par une faible consommation d'oxygène (41).

Ainsi l'inflammation dans le tractus intestinal favorise la croissance des entérobactéries ayant acquis des facteurs d'aptitude pour surmonter le stress environnemental et nutritionnel.

4. L'oxygène dans la virulence des entérobactéries

L'adaptabilité des entérobactéries à divers niveaux d'oxygène représente un avantage sélectif crucial pour induire une infection. En effet, la capacité des agents pathogènes entériques à détecter les fluctuations des niveaux d'oxygène et à y répondre est essentielle à leur survie. Elle dépend de diverses adaptations métaboliques et physiologiques chorégraphiées par une multitude de régulateurs transcriptionnels. FNR et ArcA/B sont toujours présents dans les pathogènes bactériens entériques et représentent des régulateurs transcriptionnels fortement impliqués dans les adaptations des niveaux d'oxygène fluctuants.

Chez *E. coli* le régulateur FNR contrôle 122 opérons en condition anaérobie, en particulier des gènes dont les produits fonctionnent dans le métabolisme énergétique anaérobie (42). Néanmoins il semblerait que le rôle de FNR ne se limite pas à réguler l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique de la bactérie. Par exemple, les souches ETEC utilisent des adhésines et sécrètent des entérotoxines pour infecter les cellules hôtes. FNR réprime l'expression de ces facteurs de virulence dans la lumière intestinale à faible teneur en oxygène. Cette répression par FNR est inhibée lorsque les ETEC détectent l'oxygène en bordure des cellules épithéliales, permettant ainsi la colonisation et l'infection bactérienne (43) (**Figure 4**).

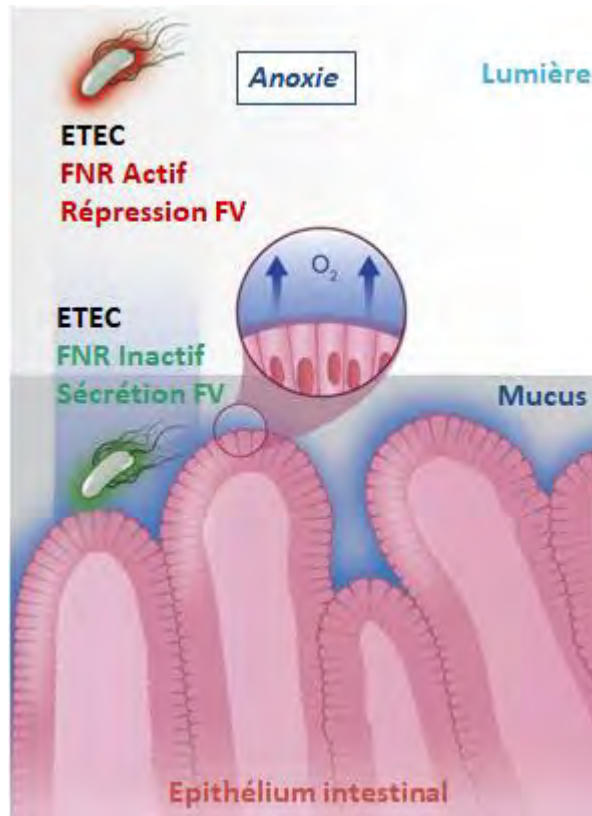


Figure 4 : Modèle de régulation des gènes de virulence en fonction de l'oxygène chez les ETEC.

Les ETEC détectent l'oxygène de l'environnement via FNR qui réprime l'expression des gènes de virulence dans les environnements à faible teneur en oxygène comme la lumière intestinale (en rouge). A proximité des cellules épithéliales intestinales, l'infiltration d'oxygène des cellules hôtes inactive FNR, ce qui inhibe la répression des gènes de virulence et permet l'invasion et la colonisation de l'hôte par les ETEC (en vert). D'après (43).

Chez *Shigella flexneri*, le système de sécrétion de type 3 (T3SS) est essentiel pour l'invasion des cellules. Dans la lumière du tractus gastro-intestinal, *Shigella* exprime des aiguilles T3SS étendues tout en réduisant la sécrétion de l'effecteur Ipa (antigène du plasmide d'invasion). Ce mécanisme est médié par FNR qui réprime la transcription de *spa32* et *spa33*, des gènes de virulence régulant la sécrétion des Ipa par le T3SS. Cette répression par FNR est inhibée lorsque *Shigella* entre au contact de la muqueuse du tractus gastro-intestinal. La diffusion de l'oxygène par le réseau capillaire aux extrémités des villosités permet l'activation du T3SS sur son site d'action et la sécrétion des Ipa, ce qui augmente l'invasion et la virulence de la bactérie (44) (**Figure 5**). Les EHEC régulent l'expression de leur T3SS de manière similaire à *S. flexneri* en fonction du gradient d'oxygène luminal/épithélial (45).

En outre, pendant l'infection, l'oxygène de la muqueuse colique est consommé par la respiration aérobie de *S. flexneri*, ce qui entraîne la formation de foyers d'infection hypoxiques. Ce processus induit l'inactivation du T3SS dans ces foyers et favorise la colonisation des bactéries au niveau de l'épithélium (46). Enfin l'oxygène joue également un rôle clé dans l'expression des systèmes d'acquisition du fer de *S. flexneri* médiée par les régulateurs FNR et ArcA/B (47).

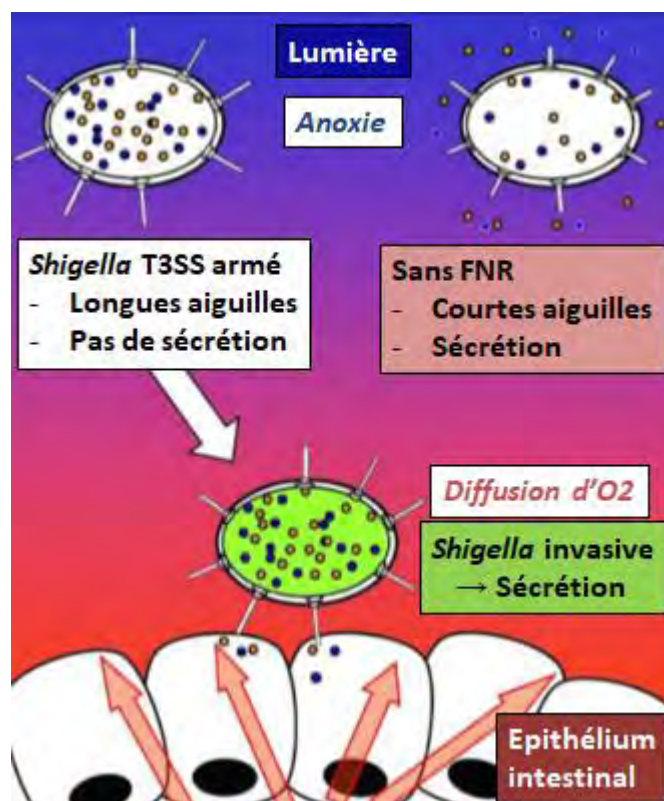


Figure 5 : Modèle de régulation du T3SS en fonction de l'oxygène chez *Shigella flexneri*.

Shigella flexneri arme son T3SS dans la lumière anaérobie du tractus gastro-intestinal. L'oxygène des capillaires crée un environnement permissif pour l'activation du T3SS, la sécrétion des *Ipa* et l'invasion de l'épithélium. D'après (44).

Le régulateur global FNR contrôle l'expression de plus de 36% des séquences codantes en réponse aux conditions anaérobies de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (48). Les gènes impliqués dans le métabolisme aérobie, la détoxification du NO, la biosynthèse des flagelles, la motilité, la chimiotaxie et l'utilisation anaérobie du carbone sont régulés par FNR d'une manière similaire à celle de *E. coli* (43). Les gènes régulés par FNR uniquement chez le sérovar Typhimurium comprennent ceux codant pour l'utilisation de l'éthanolamine, une protéine universelle de stress, une protéine de type ferritine et une phosphotransacétylase. Le régulateur ArcA/B module le métabolisme cellulaire, la biosynthèse et la motilité du *S. Typhimurium*. Il régule l'expression génétique et contrôle les niveaux de glutathion, de NADH et des ERO intracellulaires, ainsi que le complexe pyruvate déshydrogénase, modulant alors le potentiel redox de la cellule (49). Il favorise ainsi la survie et la multiplication intracellulaire de *S. Typhimurium* dans les macrophages et les neutrophiles, contribuant à l'infection systémique (50).

En plus d'apparaître comme un remarquable paramètre dans la virulence des entérobactéries, l'oxygène peut être un enjeu de compétition entre les bactéries pour établir une infection. Bäumler et son équipe ont montré que les entérobactéries endogènes, représentées majoritairement par *E. coli*, confèrent une protection contre l'infection à *S. Typhimurium*. En utilisant leur métabolisme aérobie, les entérobactéries commensales peuvent concurrencer les *Salmonella* pour les ressources en oxygène grâce à la cytochrome bd oxydase et également en fer *via* les sidérophores (51).

II. La colibactine, un facteur de virulence carcinogène

A. L'îlot *pks*

1. Un îlot de pathogénicité

Les gènes codant pour des facteurs d'adaptation ou de virulence des bactéries peuvent être portés par des éléments génétiques mobiles tels que les îlots génomiques. Certains de ces îlots portent des îlots de pathogénicité qui regroupent un cluster de gènes impliqués dans la virulence.

L'îlot *pks* a été initialement découvert en 2006 dans la souche IHE3034 de *E. coli* isolée d'une méningite bactérienne néonatale. Cet îlot de pathogénicité confère aux bactéries une activité génotoxique (52). L'infection transitoire des cellules eucaryotes par *E. coli* exprimant ce groupe de gènes entraîne un blocage du cycle cellulaire en phase G2 qui se traduit par un élargissement cellulaire appelé mégalytose (**Figure 6**). Les enzymes codées par les gènes de cet îlot correspondent à des enzymes impliquées dans une machinerie de biosynthèse de type Polykétide-Peptide Non Ribosomal Synthase (PK-NRPS), d'où le nom îlot *pks*. Les effets observés lors de cette découverte ont été reliés à une génotoxine, nommée la colibactine. Cette toxine est une cyclomoduline inhibitrice.

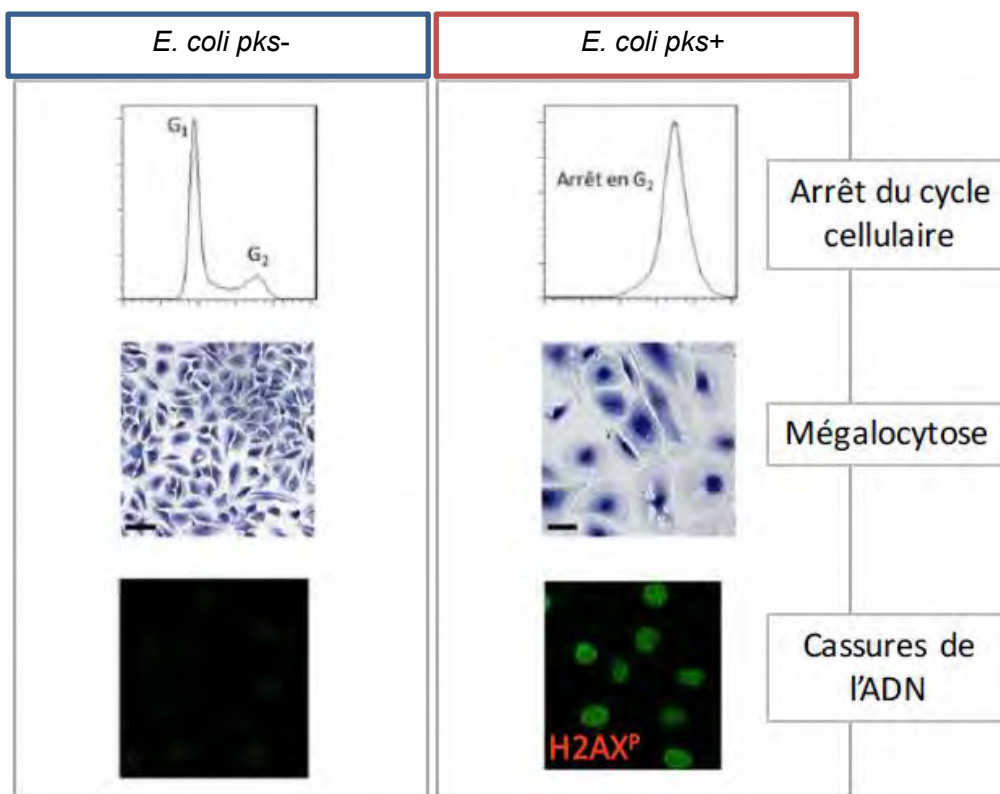


Figure 6 : Effet de la colibactine sur les cellules eucaryotes.

Effets observés suite à une infection de cellules eucaryotes avec des *E. coli pks-* ou *pks+*. Les cellules eucaryotes infectées avec des *E. coli pks+* présentent un arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M associé à une mégalytose et à la présence de cassures de l'ADN (mises en évidence par la phosphorylation de l'histone H2AX). Barre d'échelle de 100 μ m. D'après (52).

2. Organisation génomique

L'îlot *pks* est un îlot de pathogénicité de 54kb. Il comporte 19 gènes (de *clbA* à *clbS*) qui codent pour 4 protéines Non Ribosomiques Peptides Synthétases (NRPS) (*ClbE*, *H*, *J*, *N*), 4 enzymes Polykétides Synthases (PKS) (*ClbC*, *G*, *I*, *O*), 2 enzymes hybrides NRPS-PKS (*ClbB* et *K*) ainsi qu'une phosphopantéthéinyl transférase (PPTase) (*ClbA*), une pompe à efflux (*ClbM*), une peptidase (*ClbP*), une protéine de résistance (*ClbS*), un régulateur (*ClbR*), et des protéines accessoires. Ces gènes sont organisés en au moins sept unités de transcription qui ont pu être déterminées par RT-PCR (53) (**Figure 7**).

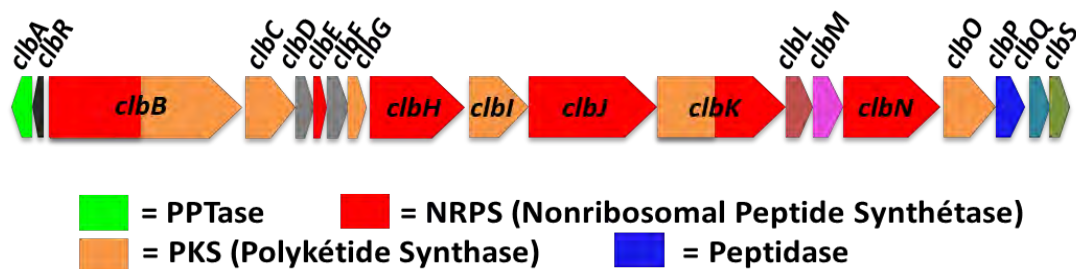


Figure 7 : Schéma de l'organisation génomique de l'îlot *pks*.

L'îlot génomique *pks* comprend 19 gènes. La légende associée représente les protéines codées par les gènes de l'îlot *pks*. D'après (53).

La machinerie codée par l'îlot *pks* permet de synthétiser des métabolites indépendamment des ribosomes. Les différents métabolites sont produits par élongation d'un oligomère avec ajout séquentiel et dans un ordre défini des monomères préalablement activés par les enzymes PKS et NRPS.

3. Epidémiologie

L'îlot *pks* est porté par des souches de *E. coli* pathogènes pour l'Homme, isolées de méningites et d'infections urinaires, mais aussi par des souches commensales du tube digestif. On le retrouve par exemple dans la souche Nissle 1917 (EcN), un probiotique utilisé dans la spécialité Mutaflor®. En revanche il est absent chez les souches de laboratoire K-12 et chez les pathogènes EPEC et EHEC (52). Les études épidémiologiques montrent qu'il est hébergé chez environ 25% des souches de *E. coli* isolées de selles d'adultes sains (54) et 15% des nouveau-nés sont colonisés par des souches *pks*+. En dehors de ce portage asymptomatique, 40% des souches de *E. coli* responsables d'infections extra-intestinales (ExPEC) possèdent l'îlot *pks* (55). La prévalence atteint 58% pour les souches responsables de bactériémies. Enfin, elle est de 59% pour les isolats d'urosepsis (56) et de 72% pour les souches ExPEC retrouvées dans les prostatites aiguës (55).

Ces souches de *E. coli* digestives et extra-intestinales porteuses de l'îlot de pathogénicité *pks*, appartiennent au groupe phylogénétique B2 dont la proportion dans la flore commensale est en constante augmentation depuis ces 30 dernières années en Europe et aux Etats-Unis (57) (**Tableau 1**). Les *E. coli* qui produisent la colibactine sont donc fortement prévalents dans les

flores intestinales humaines. Ils ont la capacité de coloniser le tube digestif dès la naissance puis de se maintenir durablement dans le côlon. L'îlot *pks* est hautement conservé chez les *E. coli* B2. Il est également présent et conservé chez d'autres entérobactéries telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes* ou *Citrobacter koseri* avec 98% d'identité de séquences nucléotidiques entre ces espèces (58). Il a également été identifié dans des symbiotes de coraux et d'abeilles (59,60)

Tableau 1 : Prévalence des principaux groupes de *E. coli* chez l'Homme.

La prévalence est donnée pour les 4 principaux groupes phylogénétiques (A, B1, B2 et D) de *E. coli* déterminés par PCR dans des échantillons de fèces humains des différentes populations indiquées. D'après (57).

Population	Phylogenetic group [†]				Ref.
	A	B1	D	B2	
France (1980)	61	12.5	16	10.5	93
Croatia	35	32	14	19	93
Mali	24	58	16	2	93
Benin	50	32.5	0	17.5	83
Pakistan	47	18	23	12	100
French Guiana (native populations)	63.5	20.5	13	3	83
Bolivia (native populations)	77	10	8	5	99
Colombia	57	3.5	14.5	25	83
France (2000)	25.5	21	24	29.5	83
Sweden	29	11	14	46	97
USA	20.5	12.5	19	48	94
Japan	28	0	28	44	95
Australia	19.5	12.5	23	45	98

4. Rôle pléiotrope de l'îlot *pks* dans la virulence et la pathogénicité des bactéries

A ce jour, le rôle de l'îlot *pks*, à la fois porté par des souches bactériennes commensales et pathogènes, n'est pas clairement élucidé. Ralentir le renouvellement de l'épithélium intestinal en bloquant le cycle cellulaire pourrait être une stratégie bactérienne visant à prolonger la colonisation de l'épithélium intestinal, ce qui pourrait avoir un impact sur la pathogénicité et le commensalisme des bactéries (54).

La présence de l'îlot *pks* est associée à la virulence des bactéries porteuses dans plusieurs modèles d'infection. Dans des modèles animaux, il a été montré que des souches mutées pour un gène de l'îlot et donc incapables de produire la colibactine ont une capacité de colonisation intestinale altérée. Leur probabilité de translocation dans le compartiment sanguin est également réduite (61). Or ces deux étapes de colonisation digestive et de translocation sont des prérequis dans le développement d'infections causées par *E. coli*. Dans un modèle murin de sepsis à *E. coli*, la présence de l'îlot *pks* diminue le taux de survie (62). Cet effet peut être lié

entre autres à la colibactine qui induirait des dommages à l'ADN des lymphocytes ce qui aboutit à leur apoptose et exacerberait la lymphopénie lors du sepsis. Le tropisme méningé et la virulence dans un modèle de méningite à *Klebsiella pneumoniae* sont également liés à l'îlot *pks*, de même que la capacité à induire une infection systémique à partir de l'intestin (63).

Chez la souche probiotique *E. coli* Nissle 1917 (EcN), des preuves expérimentales ont indiqué que la présence de l'îlot *pks* dans cette souche est liée à des activités anti-inflammatoires (64) et analgésiques (65). Un des lipopeptides synthétisé par l'îlot *pks*, le C12-Asparagine- γ -amino-butyrique (C12-Asn-GABA), est capable de traverser la barrière épithéliale et d'inhiber le flux de calcium induit par l'activation des nocicepteurs dans les neurones sensoriels *via* le récepteur GABA_B. Le C12-Asn-GABA inhibe l'hypersensibilité viscérale induite par l'activation des nocicepteurs chez la souris. Cet effet antalgique pourrait jouer un rôle dans la virulence bactérienne en masquant la douleur, premier signe d'alerte de l'hôte d'une infection en cours.

En outre, EcN produit deux sidérophores-microcines (Mcc), H47 (MccH47) et M (MccM), responsables d'une activité antagoniste contre d'autres entérobactéries (66). Le sidérophore-Mcc peut pénétrer et tuer la bactérie sensible par un stratagème de "cheval de Troie", en imitant les complexes fer-sidérophores des entérobactéries. Récemment, notre équipe a démontré que ClbP la peptidase codée par l'îlot *pks*, est nécessaire à l'activité antagoniste de l'EcN (67). Cette interaction entre les voies de biosynthèse de la colibactine et du sidérophore-Mcc suggère que ces îlots génomiques ont été co-sélectionnés et ont joué un rôle dans l'évolution de *E. coli* à partir du phylogroupe B2. Cette co-évolution observée dans la souche EcN illustre le lien étroit entre la pathogénicité et l'activité probiotique.

B. La colibactine

1. Biosynthèse

a. Machinerie de biosynthèse

La colibactine est un composé hybride Polykétide-peptide Non Ribosomal (PK-NRP) synthétisé grâce à des enzymes multimodulaires agencées comme une chaîne de montage sous forme de mégasynthase (**Figure 8**). La biosynthèse de la colibactine commence par l'activation des synthétases peptidiques non ribosomiques et des synthétases polykétidiques. La phosphopantéthéinyl transférase (PPTase) ClbA est responsable de la thiolation post traductionnelle des domaines (52). Elle est codée par le gène *clbA*. C'est au niveau de ces domaines de thiolation (Acyl Carrier Protein ACP et Peptidyl Carrier Protein PCP) que va être fixé l'oligomère en cours d'élongation *via* la fonction thioester apportée.

La NRPS ClbN est la première enzyme à intervenir dans la synthèse de la colibactine. Le premier élément de construction canalisé est une asparagine, et permet la synthèse du précurseur initial N-myristol-D-asparagine (ou C14-Asparagine ou C14-Asn) par acylation (68). Il est ensuite pris en charge par ClbB, la seconde mégasynthase active. L'élongation se poursuit avec les enzymes NRPS, PKS et PK-NRPS ClbC-H-I-J-K, incorporant une unité amino malonyle générée par les enzymes ClbD-E-F-G. Cet intermédiaire est complété par l'action de ClbO-L et

subit un processus d'édition médié par la thioestérase ClbQ (**Figure 9**). Un intermédiaire inactif de la colibactine est alors libéré dans le cytoplasme : la précolibactine.

La précolibactine est ensuite transportée vers le périplasma par l'activité du transporteur ClbM, une pompe d'efflux. Cette pompe appartient à la famille des transporteurs MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion). La mutation de *clbM* induit une réduction de l'activité génotoxique de la colibactine mais pas une perte. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que d'autres pompes à efflux complèmentent partiellement l'absence de ClbM (69).

Une fois dans le périplasma, la précolibactine est finalement maturée par l'activité peptidase de ClbP (70). Cette peptidase permet le clivage de la précolibactine et libère la colibactine et le C14-Asn formé à la toute première étape de biosynthèse (71). Le clivage par ClbP est nécessaire au remodelage de la molécule de colibactine mature pour lui donner sa forme active. En son absence, des cyclisations alternatives surviennent, notamment la formation de pyridones non génotoxiques ou de macrocycles (72).

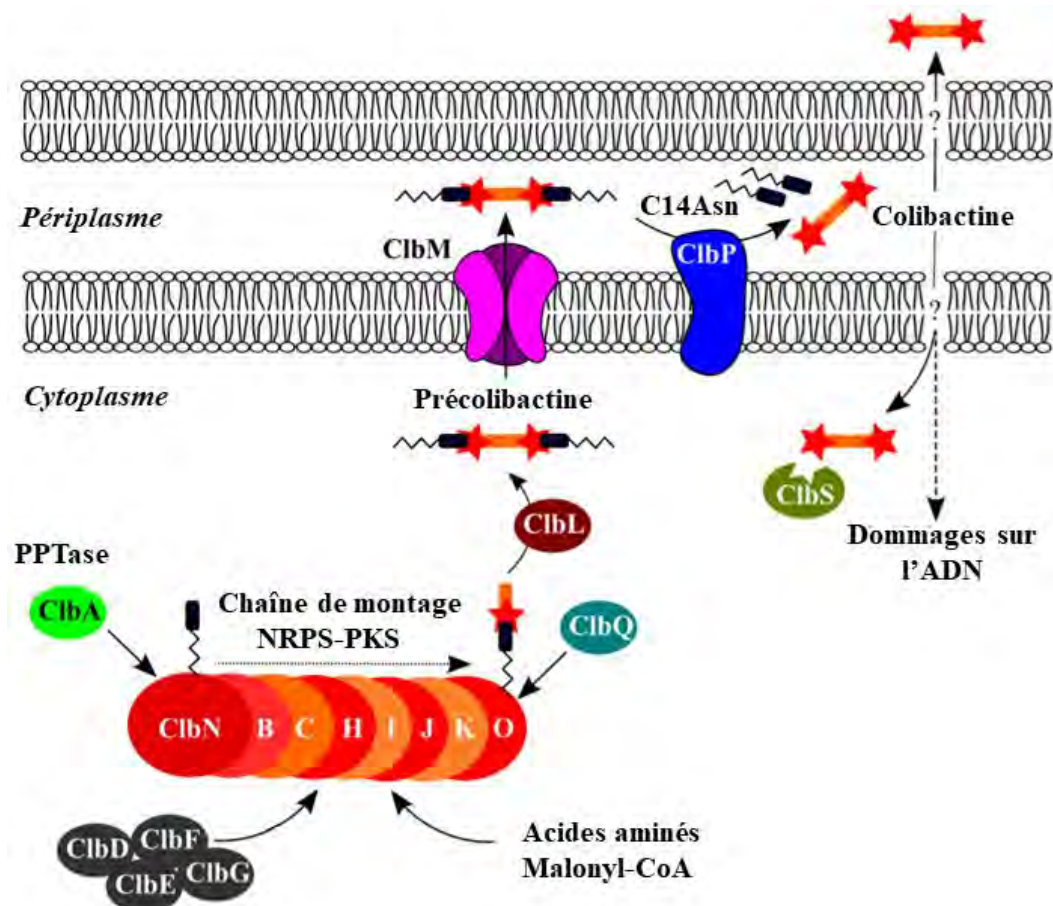


Figure 8 : Modèle de biosynthèse de la colibactine.

Les peptides et polykétide synthases (dont ClbN et ClbH), activés par la PPTase ClbA, synthétisent la précolibactine. Elle est ensuite déchargée de la chaîne de montage, dimérisée et effluée vers le périplasma par la pompe à efflux ClbM. La peptidase ClbP clive la précolibactine pour générer la colibactine active et le produit de clivage C14-Asn. La protéine ClbS est une hydrolase qui inhibe la colibactine, protégeant la bactérie contre les dommages sur son propre ADN. D'après (73).

b. Prise en charge et régulation :

La synthèse d'une prodrogue clivée par une peptidase est un mécanisme d'autoprotection des bactéries. En effet, l'activation de la précolibactine en colibactine au niveau du périplasme et non du cytoplasme bactérien pourrait être un des mécanismes de protection du propre ADN de la bactérie (74). L'îlot *pks* code également pour une protéine de résistance à la colibactine, ClbS. Les bactéries productrices de colibactine se protègent contre l'activité dommageable pour l'ADN de ce composé en exprimant la protéine ClbS, qui lie et désactive la colibactine (75). Cette protéine n'est pas nécessaire à l'activité génotoxique mais protège les bactéries productrices de génotoxine de l'autotoxicité induite par cette dernière grâce à une activité cyclopropane hydrolase (76). De manière intéressante, ClbS pourrait en plus assurer une protection supplémentaire de l'ADN en s'y fixant de manière non spécifique. L'ADN préincubé avec la protéine ClbS purifiée est également moins sensible à des nucléases comme la DNase I (77). L'équipe auteure de ces travaux envisage ainsi un rôle plus global à ClbS : la protéine pourrait conférer un avantage sélectif, par exemple en protégeant l'ADN bactérien contre les ERO produites lors d'une infection par les défenses immunitaires de l'hôte.

Une fois synthétisée, on ne sait pas si la colibactine se présente à la surface de la cellule bactérienne, si elle est libérée dans le milieu ou si elle est activement sécrétée dans les cellules hôtes. En revanche, le contact direct entre la bactérie et la cellule hôte est nécessaire pour l'internalisation de la colibactine dans les cellules hôtes, qui est limitée par la présence d'une membrane cellulaire intacte ou d'une couche de mucus (78,79).

Enfin la protéine ClbR possède un domaine de liaison à l'ADN et a été récemment identifiée comme étant le seul activateur transcriptionnel qui soit spécifique et essentiel pour une régulation efficace de la production de colibactine (80). La mutation du gène *clbR* entraîne la perte de l'activité génotoxique tandis que sa surexpression augmente la génotoxicité ou la production de métabolites comme le produit de clivage C14-Asn. La surexpression de ClbR induit également la surexpression de différents gènes de l'îlot *pks*, dont *clbR* lui-même. L'expression de *clbR* est donc autorégulée mais également influencée par l'environnement comme la concentration en fer ou la composition du milieu de culture sans que les mécanismes moléculaires en jeu ne soient connus (53,80).

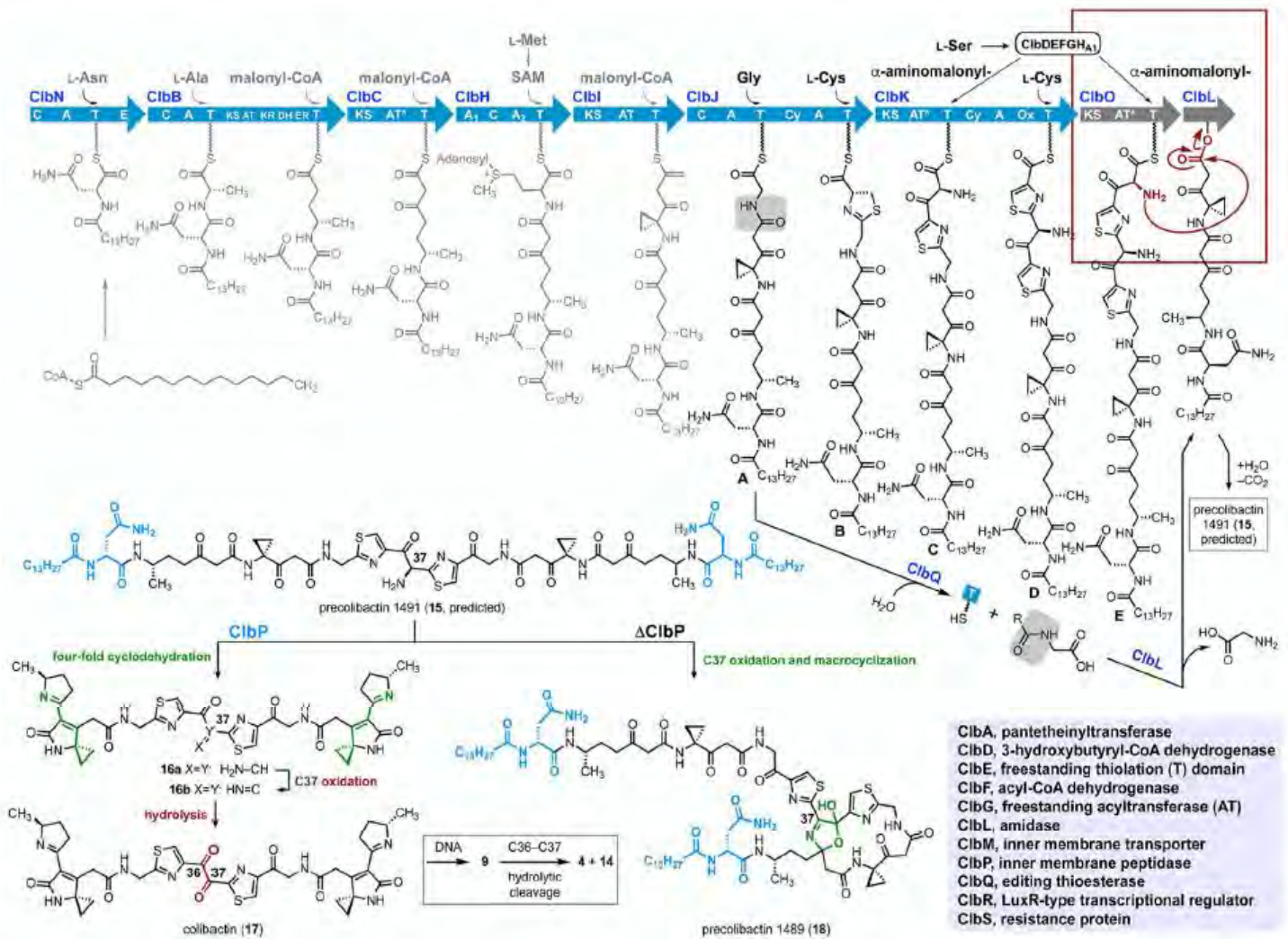


Figure 9 : Proposition de biosynthèse moléculaire de la (pré)colibactine.

Les premières étapes de la voie de biosynthèse sont grisées pour plus de clarté. L'oligomère est formé par l'intervention successive des différentes enzymes (voir texte pour détail). Pour obtenir une forme dimérique de la colibactine, selon eux ClbQ décroche l'intermédiaire issu de ClbJ (A), ClbL catalyse l'hydrolyse d'une glycine et le couplage de ce nouveau composé avec celui formé par ClbO pour obtenir la précolibactine 1491 (15), actuellement non isolée. Son clivage par ClbP est nécessaire au remaniement de la structure pour former les X avec activité génotoxique. Le substitut du carbone 37 serait initialement un groupement amine (prédiction) mais est rapidement oxydé en cétone (la structure exacte de la colibactine qui réagit avec l'ADN au niveau de carbones C36-C37 n'est pas complètement élucidée en raison de sa haute sensibilité à l'oxydation). Les acides aminés sont représentés à leurs sites d'entrée dans la chaîne. Les abréviations des domaines sont C, condensation ; A, adénylation ; E, épimérisation ; KS, cétyosynthase ; KR, cétyoréductase ; DH, déshydratase ; ER, énoylréductase ; AT*, acyltransférase (AT) inactivée ; Cy, double condensation/cyclisation ; et Ox, oxydase. D'après (81).

2. Structure de la colibactine et liaison avec l'ADN double-brin

La complexité de cette chaîne d'assemblage et l'instabilité de la molécule ont rendu difficile l'identification de sa structure. En effet, la colibactine est très réactive et probablement produite en faible quantité ce qui a tenu en échec toute tentative d'isolement de la molécule et son élucidation structurale pendant plus d'une décennie.

Récemment, des approches complémentaires de biologie moléculaire guidée par la spectrométrie de masse en tandem ont permis de déterminer une structure hétérodimérique de la colibactine, qui porte deux motifs cyclopropaniques électrophiles correspondant aux sites d'adduction de l'ADN (81) (**Figure 10**). Ces deux têtes réactives sont responsables de l'alkylation des résidus d'adénine de l'ADN des cellules infectées.

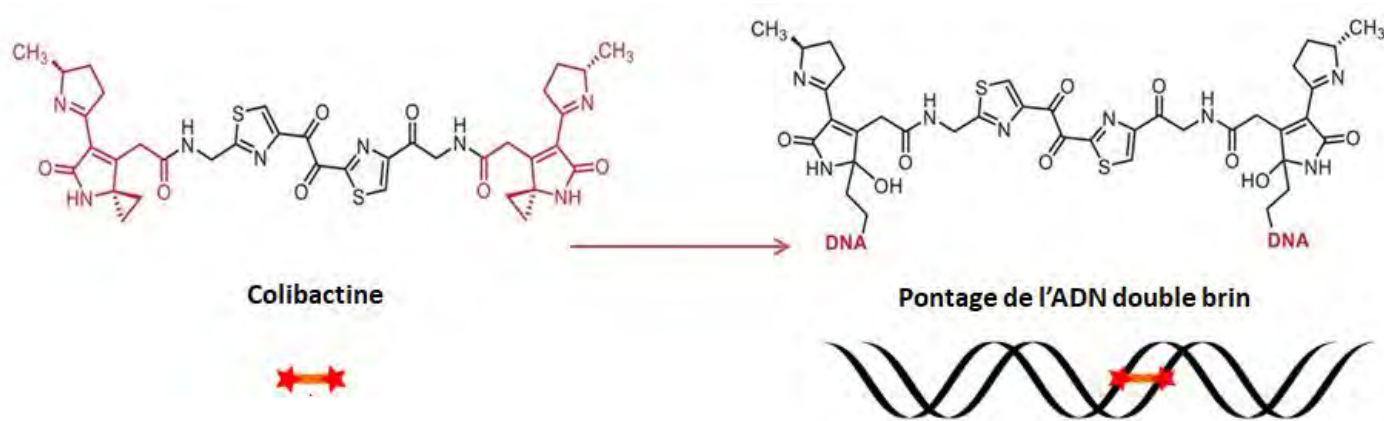


Figure 10 : Structure moléculaire des pharmacophores de la colibactine responsables de la mutagenèse de l'ADN.

Les éléments surlignés en rouge représentent les deux motifs cyclopropaniques électrophiles de la colibactine correspondant au site d'adduction de l'ADN. La "double tête" de la colibactine attaque les résidus d'adénine espacés de quelques bases sur les deux brins opposés de l'ADN entraînant un pontage covalent D'après (81).

Grâce aux calculs de mécanique quantique, Meyer et al. ont construit un modèle moléculaire permettant d'élucider la liaison entre l'ADN et la colibactine (82) (**Figure 11A**). La colibactine est apparue comme une molécule assez flexible avec une distance moyenne de bout en bout d'environ 13 Å (1,3 nm). L'élaboration d'un modèle putatif montre une liaison très stable de la colibactine dans le sillon mineur de l'ADN, avec une orientation des motifs de cyclopropane pointant vers les adénines sur les brins opposés. Le nombre de paires de bases impliquées dans la liaison peut fluctuer entre quatre et cinq, selon l'orientation du cyclopropane et du carbone qui alkyle l'atome d'azote en position 3 des adénines. La colibactine se lie et induit des dommages à l'ADN dans les régions riches en AT selon un motif de type AAWWTT (**Figure 11B**).

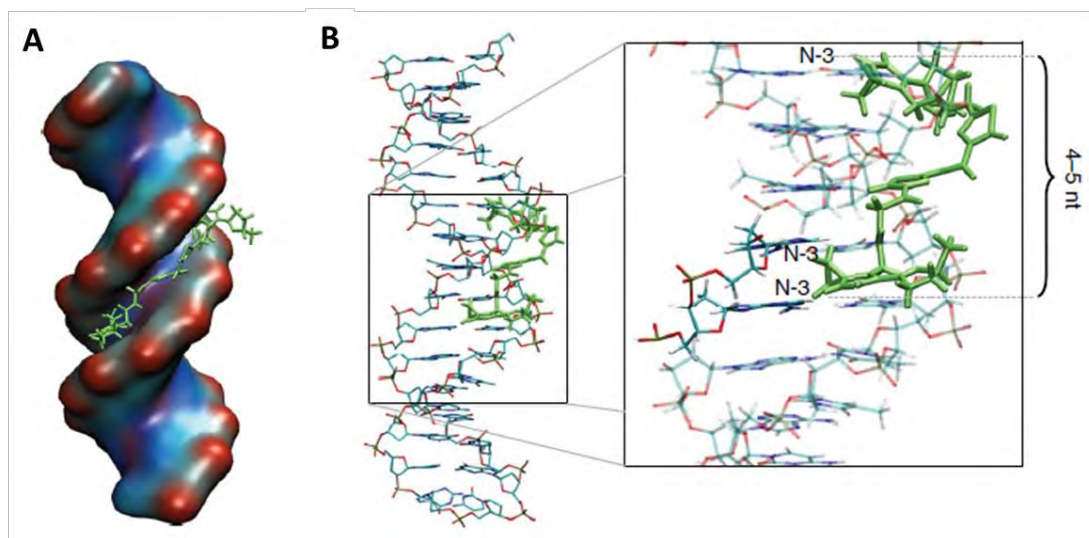


Figure 11 : Modélisation de l'insertion de la colibactine dans le sillon de l'ADN double-brin.

A. Représentation graphique de l'arrimage théorique de la colibactine dans son motif de séquence spécifique (séquence centrale AAATTT), montrant la liaison de la colibactine au niveau du sillon mineur de l'ADN double-brin en surface, correspondant aux valeurs extrêmes des paramètres de forme de l'ADN et au potentiel électrostatique.

B. Détails atomiques. L'agrandissement montre la proximité du cyclopropane avec l'un des atomes N-3 de l'adénine, ce qui met en évidence la possibilité d'alkyler la paire de base suivante, en fonction du carbone impliqué dans l'alkylation. D'après (82).

3. Génotoxicité *in vitro* et *in vivo*

La colibactine est une toxine qui induit la formation de dommages à l'ADN très mutagènes. Dans les cellules infectées par des bactéries *pks+*, il a d'abord été mis en évidence des cassures double-brins de l'ADN (52). Ce type de lésion n'est pas retrouvé sur de l'ADN extracellulaire purifié.

Plus récemment il a été montré que la colibactine induit également la formation de ponts inter-brins de l'ADN. Ce pontage a été initialement décrit lors d'essais *in vitro* à partir de précolibactine (83). Cette activité a été mise en évidence par l'équipe à partir de colibactine synthétisée directement par les bactéries : ADN cellulaire *in vivo* et ADN purifié *ex-cellulo* (84). Il y a alors activation de la voie ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related kinase) et recrutement de FANCD2 (protéine D2 de l'anémie de Fanconi), la protéine de réparation des ponts inter-brins de l'ADN. Les ponts inter-brins de l'ADN sont convertis en cassures double-brins lors de leur réparation, qui peuvent conduire à des mutations géniques et la transformation des cellules quand elles sont incorrectement réparées (85).

L'apparition de cassures double-brins chez les cellules eucaryotes entraîne la mise en place de voies de réparation de l'ADN (voie de signalisation ATM/CHK/CDC25) (**Figure 12**). Cette cascade de signalisation peut conduire à l'arrêt du cycle cellulaire. Il y a également phosphorylation de l'histone H2AX en γ -H2AX au niveau des cassures doubles-brins de l'ADN (73).

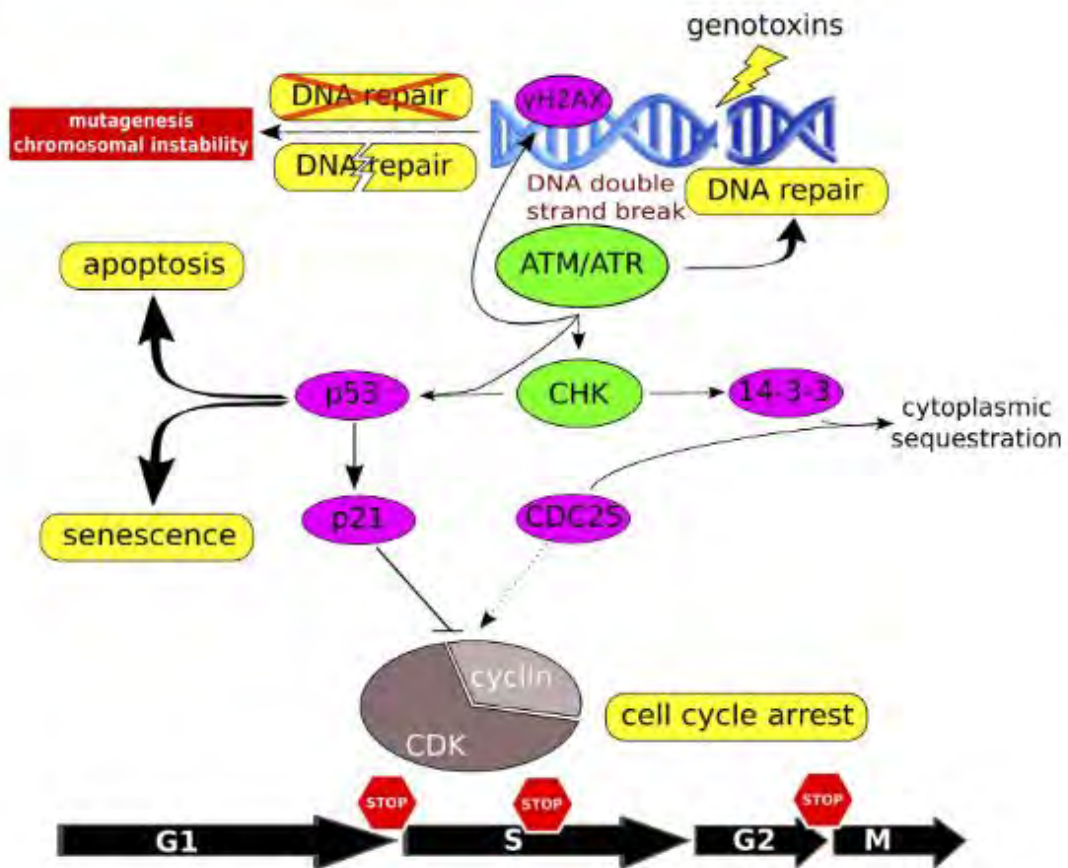


Figure 12 : Conséquences cellulaires des dommages à l'ADN.

Les cassures double-brins de l'ADN induites par la colibactine activent l'ATM/ATR, ce qui entraîne la phosphorylation de H2AX (en γ -H2AX), le recrutement de la protéine kinase de contrôle (CHK), l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN, et finalement l'apoptose et la sénescence cellulaire. L'arrêt du cycle cellulaire résulte de l'exclusion nucléaire de la phosphatase CDC25 et de l'accumulation de p21, inhibiteur des cyclines dépendantes des kinases (CDK) qui sont nécessaires à la progression du cycle cellulaire. Dans le cas d'une réparation incomplète de l'ADN suite à une exposition chronique ou à une faible dose de génotoxine, les cellules accumulent des mutations et développent une instabilité génomique. D'après (73).

En fonction de l'intensité des dommages à l'ADN les conséquences sont différentes. A forte dose infectieuse, si les dommages à l'ADN sont importants, l'apoptose cellulaire sera déclenchée. A plus faible dose, on observera la sénescence cellulaire avec un arrêt du cycle cellulaire marqué par le phénotype de mégaloctose. Les cellules peuvent alors synthétiser des médiateurs pro-inflammatoires, tels que des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissance, des EROs et des protéases. On parle de phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). Des données *in vitro* indiquent que cette sécrétion pourrait favoriser la croissance de cellules tumorales de manière paracrine (86). Enfin en cas de faible dose il peut y avoir réparation des dommages à l'ADN et poursuite du cycle cellulaire. Cependant des dommages résiduels peuvent persister et être à l'origine d'anomalies chromosomiques à l'origine de mutations génétiques (85).

C. Colibactine & cancer

Dans les pays industrialisés, le portage intestinal de souches hébergeant l'îlot *pks* s'élève à 25% (voir paragraphe II. A. 3.). Comme celles-ci peuvent causer une instabilité génétique suite aux dommages à l'ADN qu'elles induisent, la question d'un lien entre colibactine et cancer, en particulier le cancer colorectal, s'est rapidement posée.

1. Le cancer colorectal

Le cancer du côlon et du rectum ou cancer colorectal (CRC) est le 2^{ème} cancer diagnostiqué chez les femmes et le 3^{ème} chez les hommes. Il est une des principales causes de décès liées au cancer ce qui suscite de graves inquiétudes sur le plan démographique et économique dans le monde entier. En 2018 en France métropolitaine, on estime que 43 336 personnes ont été diagnostiquées avec un CRC, tandis que 17 117 patients sont décédés de cette maladie. Le taux de survie des patients atteints de CRC est de 63% à 5 ans (87).

Le CRC se caractérise par l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et l'activation de gènes oncogènes par le biais de mutations, entraînant la formation de polypes adénomateux, qui se forment dans la muqueuse, la couche la plus interne du côlon. Ces polypes peuvent évoluer et se développer en adénome avec une dysplasie de haut grade et se transforment en un cancer invasif (88).

Le pronostic du CRC dépend largement du stade de l'évolution au moment du diagnostic. Les chances de guérison sont meilleures si le cancer est découvert à un stade précoce notamment grâce à un dépistage par recherche de sang occulte dans les selles. Un programme de dépistage organisé est proposé en France à toutes les personnes âgées de 50 à 74 ans. Plusieurs facteurs de risque modifiables ayant trait au mode de vie tels que la consommation d'alcool, le tabagisme, la sédentarité, l'inactivité physique, le surpoids et l'obésité, l'alimentation avec une consommation faible en fibres, excessive de viande rouge ou de viandes transformées ont été identifiés et ce cancer est donc en partie évitable. En 2015, on estime qu'en France métropolitaine, environ 21% des CRC (hors cancers de l'anus) chez les plus de 30 ans étaient attribuables à la consommation d'alcool (89).

Les récents développements de la recherche sur le CRC promettent une amélioration significative des résultats des thérapies empiriques grâce à de nouvelles thérapies ciblées. Le ciblage des voies de signalisation cellulaire impliquées dans le CRC garantit la confiance dans des traitements évolutifs plus spécifiques et moins toxiques.

2. La colibactine dans le cancer colorectal

L'impact des bactéries productrices de colibactine dans le cancer a jusqu'à présent été essentiellement étudié au niveau digestif, le microbiote intestinal en étant le principal réservoir.

Seulement 20 % des cas de CRC peuvent être génétiquement attribués, ce qui suggère que les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans la promotion de ce cancer (90). Le microbiote intestinal est suspecté dans le CRC, et en particulier les *E. coli pks+*. En effet, dans une étude, des souches de *E. coli* produisant la colibactine sont retrouvées chez 69% des patients atteints de CRC contre 20% chez les témoins sains (91). Des patients atteints de polypose adénomateuse familiale présentent des polypes bénins recouverts de biofilms bactériens contenant des souches de *E. coli pks+* en grande proportion (92). De plus, il a été montré dans des modèles rongeurs que la colibactine est produite dans la lumière intestinale et induit des dommages à l'ADN des entérocytes (85).

Récemment, Hans Clevers et son équipe ont identifié une signature mutationnelle distincte dans le CRC qui résulte directement de l'exposition à des bactéries portant l'îlot *pks* producteur de colibactine (93). Des organoïdes intestinaux humains ont été exposés à des *E. coli pks+* génotoxiques par des injections répétées sur cinq mois. Le séquençage du génome entier des organoïdes avant et après cette exposition a révélé une signature mutationnelle caractérisée par des substitutions de base unique spécifiques à *pks* (SBS-*pks*) T > N, de préférence en ATA, ATT et TTT avec mutation de la base centrale, et des insertion/délétion T uniques au niveau des homopolymères T (ID-*pks*). Les organoïdes injectés avec des bactéries mutantes isogéniques ne produisant plus la colibactine n'ont présenté aucune perturbation génomique spécifique. Ces mutations préférentielles sont cohérentes avec le mode d'action proposé de la "double tête" de la colibactine pour attaquer les résidus d'adénine espacés de quelques bases des deux brins opposés de l'ADN (81,82) (**Figures 10 et 11**). La même signature mutationnelle a été détectée dans un sous-ensemble de 5 876 génomes de cancers humains issus de cohortes de patients, et principalement dans le CRC. Le gène codant pour la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli) est un initiateur clé dans le CRC et le plus fréquemment muté. Il contenait le plus grand nombre de mutations correspondant aux sites cibles SBS-*pks* ou ID-*pks*, avec 52 des 983 (soit 5,3%) mutations du gène driver correspondant au motif mutationnel (93). Ces études fournissent une preuve directe de l'implication de la colibactine dans le CRC chez l'Homme.

3. Colibactine et inflammation dans la promotion du cancer colorectal

Dans les modèles murins colonisés par *E. coli pks+*, une seule injection d'azoxyméthane cancérigène (AOM) entraîne la formation de nombreuses tumeurs coliques, lorsqu'elle est associée à l'induction d'une colite chronique par du dextran sulfate de sodium (DSS) (39). Par contre en l'absence d'inflammation, plusieurs injections du cancérigène sont nécessaires pour l'apparition des tumeurs qui mettent également plus de temps à se former. De même, lorsque des souris sensibles aux colites de par leur déficience en interleukine-10 (IL10(-/-)), sont mono-colonisées par des souches de *E. coli pks+* et traitées par de l'AOM, elles développent des carcinomes invasifs (91). La suppression de l'îlot génotoxique *pks* de *E. coli* diminue la multiplicité des tumeurs chez les souris AOM/IL10(-/-), sans modifier l'inflammation intestinale.

Ces observations cliniques et expérimentales montrent que l'association de la génotoxicité de la colibactine à un contexte inflammatoire chez l'hôte fonctionnent en synergie dans la promotion du CRC.

L'inflammation chronique par elle-même favorise l'apparition de lésions cancérigènes via les ERO produites par les cellules inflammatoires (94). Les ERO peuvent affecter la régulation des gènes codant des facteurs limitant la cancérogenèse tels que p53, des protéines de réparation des mésappariements d'ADN, et des protéines de réparation de l'excision des bases de l'ADN, ainsi que des facteurs de transcription tel que le NFκB, ou encore des protéines de signalisation telles que les cyclooxygénases. Ainsi, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) telles que la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique touchent 0,4% de la population dans les pays développés et constituent un des facteurs de risque identifié du CRC. La maladie de Crohn augmente le risque cumulé de CRC jusqu'à 8% après 30 ans de maladie, tandis que la rectocolite hémorragique peut atteindre 20%. L'augmentation exacte de la prévalence de CRC chez les patients atteints de MICI dépend de la gravité et de la durée de la maladie, de l'accessibilité aux coloscopies préventives et de l'efficacité des thérapies anti-inflammatoires. Par ailleurs les MICI sont associées à une dysbiose du microbiote intestinal caractérisée par une abondance d'entérobactéries et une disruption de l'anaérobiose (5).

III. Conclusion

L'inflammation chronique dans le tractus intestinal favorise la croissance des entérobactéries ayant acquis des facteurs d'aptitude pour surmonter le stress environnemental et nutritionnel. L'oxygène apparaît donc comme un paramètre important du tube digestif humain intervenant dans la composition du microbiote. Il agit également sur la virulence des bactéries pathogènes en régulant directement la production de toxines. La colibactine est une génotoxine cancérigène synthétisée par des entérobactéries porteuses de l'îlot de pathogénicité *pks* et en particulier par *E. coli*.

A l'image des facteurs de virulence, les gènes de l'îlot *pks* ne sont pas exprimés constitutivement, mais répondent à des signaux environnementaux, grâce à des régulateurs codés par l'îlot ou non. La machinerie *pks* nécessaire à la synthèse de la colibactine est métaboliquement très coûteuse, comparée à une synthèse de toxine protéique. On peut ainsi envisager que l'activation de cette machinerie bactérienne soit soumise à une régulation fine, par exemple liée à l'oxygène. La connaissance de ces mécanismes de régulation permettra de connaître les conditions environnementales influant la production de la colibactine génotoxique. Ainsi, nous pourrions appréhender les mécanismes généraux qui relient l'inflammation et la dysbiose intestinale, à l'origine de la formation de lésions du CRC.

Partie II : Etude expérimentale

I. Contexte : colibactine & oxygène

A. Connaissances :

1. Inflammation aigue et hypoxie

La muqueuse intestinale présente un profil métabolique unique et adaptatif qui est régulé par de nombreuses sources. Ainsi, le microbiote digestif, la perfusion sanguine intestinale et l'oxygénation des tissus sont soumis à de profondes fluctuations, même dans des conditions physiologiques. Ce profil métabolique est modifié dans des conditions d'inflammation chronique (voir paragraphe I. C. 3). Il peut évoluer différemment au cours d'une inflammation aigue.

Lors d'une infection bactérienne aigue, les lésions induites établissent un micro-environnement inflammatoire où des zones d'hypoxie se constituent. D'importants changements métaboliques se produisent sur le site d'inflammation de la muqueuse : les nutriments et l'oxygène local s'épuisent rapidement, ce qui entraîne une hypoglycémie, une accumulation de lactate, une acidose et une hypoxie (95). D'une part, la prolifération locale des lymphocytes T et B nécessite de grandes quantités de glucose, d'acides aminés, de lipides et d'oxygène pour alimenter la phosphorylation oxydative. D'autre part, les cellules myéloïdes immunitaires innées telles que les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques doivent être activement recrutées sur le site de l'infection. Les demandes en énergie et en oxygène des cellules recrutées augmentent pour faciliter la phagocytose et la destruction microbienne. Les fonctions phagocytaires sont contrôlées par des peptides antimicrobiens, des protéases et des ERO microbicides qui consomment localement l'oxygène disponible (96). En outre, lors d'infections intestinales induites par des bactéries capables d'utiliser l'oxygène dans la respiration telles que les entérobactéries, l'oxygène de la muqueuse colique est activement épuisé par la respiration aérobie des bactéries, ce qui favorise la formation de ces foyers d'infection hypoxiques (46).

2. Cancer et stress hypoxiant

Dans les tissus sains, l'apport en oxygène est nécessaire au métabolisme, mais dans les tumeurs, le taux de consommation d'oxygène des cellules néoplasiques augmente et entraîne une hypoxie dans certaines zones tissulaires. Des preuves accumulées montrent que 50 à 60 % des tumeurs solides sont composées de zones de tissus hypoxiques (97). L'hypoxie tissulaire est une condition dans laquelle les tissus ne sont pas suffisamment oxygénés en raison d'une diminution de leur vascularisation. Elle joue un rôle majeur dans le cancer en initiant des changements dans le microenvironnement, en altérant des gènes oncogènes et le métabolisme cellulaire. Ces modifications induisent la synthèse de néovaisseaux sanguins désorganisés et non fonctionnels, à l'origine de métastases (98). Cette caractéristique dans la tumeur est un facteur important puisqu'elle stimule la progression du cancer, le développement des métastases et la résistance aux chimiothérapies anti-cancéreuses.

3. Importance de l'oxygène sur la colibactine

La synthèse de la colibactine fait intervenir l'oxygène dans plusieurs étapes dans la machinerie de biosynthèse. Certains métabolites intermédiaires résultent de réactions d'oxydation ou encore d'oxydo-réduction (99). Li et al. rapportent qu'un macrocycle métabolite mature de la colibactine, induit des cassures double-brins de l'ADN *in vitro* et dans diverses cultures de cellules humaines *via* un mécanisme impliquant le cuivre dans une réaction d'oxydation (100). Les auteurs ont proposé un modèle de génotoxicité du macrocycle qui implique une complexation aux sels de cuivre(II), une réduction au cuivre(I) et la génération d'un chélate colibactine-cuivre actif qui forme des ERO à l'origine des cassures double-brins de l'ADN.

Par ailleurs, la colibactine elle-même est une molécule très réactive et instable, particulièrement sensible à l'oxydation (81). La structure de la colibactine contient deux cycles thiazole séparés par un lien à deux carbones qui existerait sous la forme d'une α -aminocétone. Des études sur la biosynthèse de la colibactine ont maintenant établi que cette α -aminocétone est instable à l'oxydation aérobie. Les produits d'oxydation qui en résultent sont à leurs tours instables au clivage nucléophile. Ainsi ces groupes fonctionnels réactifs confèrent une courte demi-vie à la colibactine. Ces données fournissent une explication simple, au niveau moléculaire, de l'instabilité de la colibactine et expliquent peut-être aussi la nécessité du contact de cellule à cellule pour provoquer les effets génotoxiques sur l'ADN (99).

B. Résultats préliminaires : les conditions de culture modulent l'autotoxicité de la colibactine

Lors d'un projet de recherche ayant pour objectif d'étudier l'autotoxicité de la colibactine sur les souches bactériennes *E. coli pks+*, l'équipe a obtenu un résultat interpellant au moment d'une répétition d'expérience.

Un mutant *clbS* construit par l'équipe montre une croissance plus faible que la souche *E. coli pks+*. Ce résultat est expliqué par le fait que le mutant ne produisant pas la protéine de résistance ClbS, il ne peut protéger son ADN contre la génotoxicité de la colibactine (**Figure 8**). La bactérie met alors en place des mécanismes d'auto-régulations qui limitent sa croissance, comme précédemment décrits (75). Ce phénotype d'auto-toxicité est abrogé dans la souche mutée *clbS* complémentée avec le gène *clbS*. De façon inattendue, ce résultat n'a pas été reproduit lors de la répétition de l'expérience. La seule différence entre les deux expériences était liée aux conditions pendant la culture bactérienne : les tubes étaient ouverts au moment de la répétition alors qu'ils étaient fermés dans la première expérience (**Figure 13**).

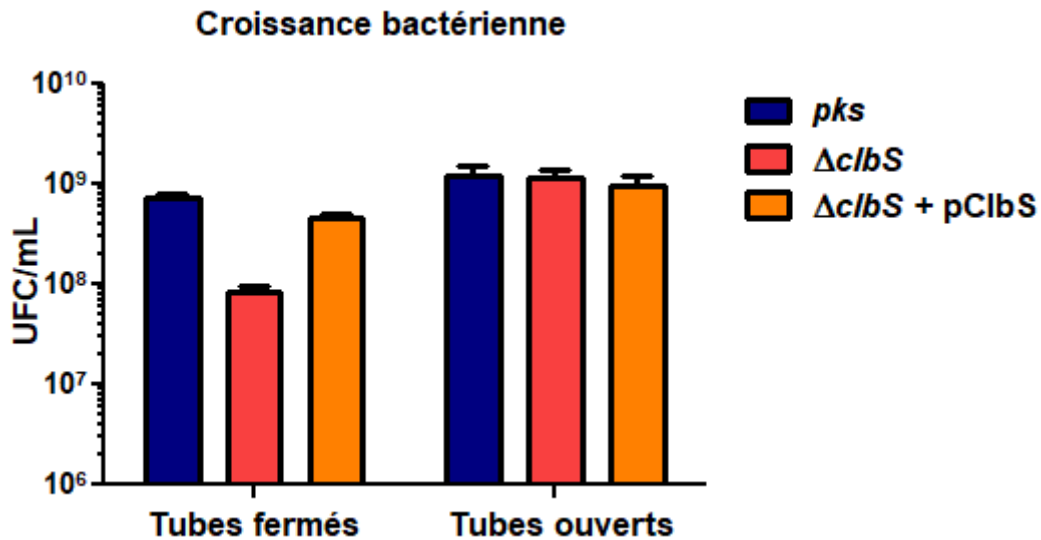


Figure 13 : Modulation de l'autotoxicité de la colibactine par les conditions de culture chez *E. coli pks+*.

Histogramme de la croissance bactérienne en UFC/mL de *E. coli pks+* (*pks*), d'un mutant *clbS* ($\Delta clbS$) et d'un mutant *clbS* complété ($\Delta clbS + pClbS$) selon deux conditions de cultures différentes : tubes fermés ou tubes ouverts.

Le phénomène observé peut être expliqué par la présence de l'oxygène en plus grande quantité dans le milieu de culture des tubes ouverts, alors qu'un gradient d'oxygène se crée dans les tubes fermés suite à la consommation d'oxygène par les bactéries. Les chercheurs de l'équipe ont alors suggéré que dans les tubes ouverts, l'oxygène en excès inhiberait la production et/ou l'activité de la colibactine, ce qui permettrait aux bactéries de se multiplier normalement malgré leur déficience en protéine de protection ClbS. Ces résultats préliminaires ont encouragé les chercheurs à émettre l'hypothèse selon laquelle la production de la colibactine et/ou sa génotoxicité, seraient impactées par l'oxygène.

C. Hypothèse

Alors qu'une infection bactérienne est à l'origine de lésions inflammatoires aiguës marquées par des zones d'hypoxie, l'inflammation chronique induit une augmentation de l'oxygène intestinal et favorise ainsi la croissance de *E. coli pks+*, pouvant provoquer des lésions cancérogènes du côlon. Une fois la tumeur établie, cette dernière peut générer un microenvironnement hypoxique stimulant la progression du cancer et le développement de métastases. En outre l'oxygène semble être indispensable à la biosynthèse de la colibactine tout en étant néfaste pour la molécule à forte dose.

Nous faisons l'hypothèse que l'oxygène pourrait impacter la production et la génotoxicité de la colibactine chez *E. coli pks+* selon les disponibilités en oxygène rencontrées au sein du tube digestif (**Figure 14**).

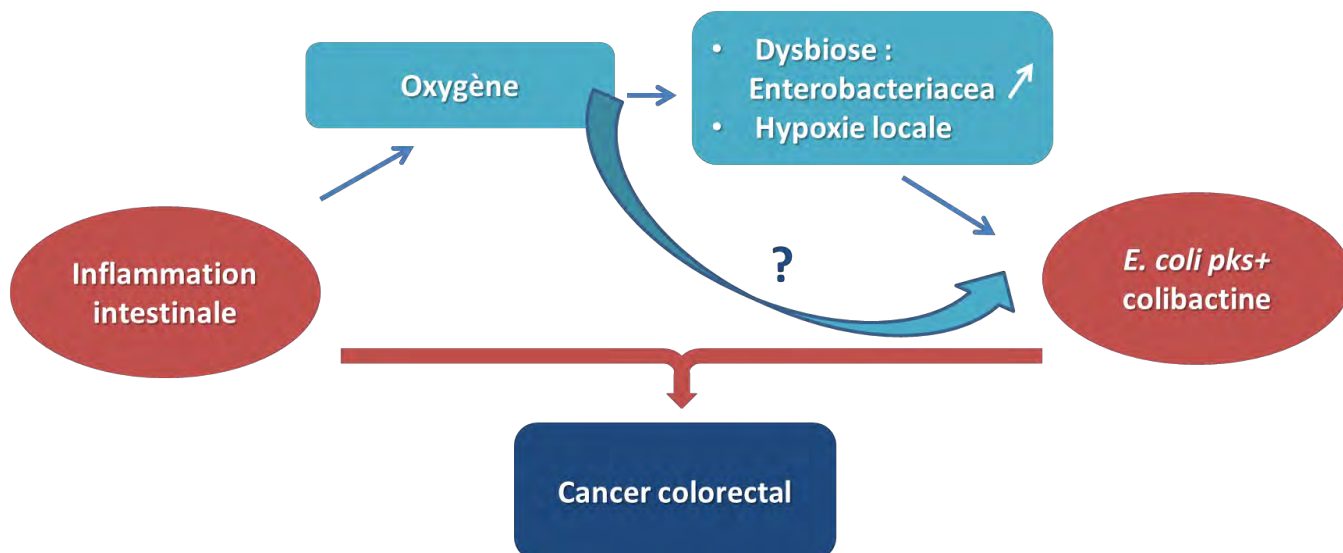


Figure 14 : Schéma illustrant l'hypothèse de l'étude.

D. Objectif de l'étude

La machinerie *pks* nécessaire à la synthèse de la colibactine est métaboliquement très coûteuse, comparée à une synthèse de toxine protéique (101). De ce fait, l'activation de cette machinerie bactérienne nécessite une régulation fine. Le principal objectif de mon étude consistait à déterminer si l'oxygène régule la production c'est-à-dire la biosynthèse de la colibactine et/ou sa bioactivité chez *Escherichia coli*.

La connaissance de ces mécanismes de régulation permettra ainsi de connaître les conditions environnementales régulant la production de la colibactine génotoxique afin de pouvoir les maîtriser pour moduler cette dernière, ici *in vitro*. Cette connaissance prend tout son sens pour envisager également les conditions *in vivo* propices à la synthèse de la génotoxine, qui pourront ouvrir la voie à la compréhension de son rôle physiopathologique et de ses conséquences.

E. Souches bactériennes et plasmide utilisés

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés lors de cette étude sont répertoriés dans l'**annexe 1, tableau 2**. La souche de laboratoire *E. coli* DH10B est transformée avec le plasmide pBAC-*pks* afin d'exprimer les gènes de l'îlot *pks*. Cette souche est mutée pour le gène *clbS* puis complétée après transformation avec le plasmide pASK75-*clbS*. Ce mutant est construit en utilisant le système de recombinaison λ red qui consiste à remplacer le gène cible à déléter par une cassette de résistance à un antibiotique (102). J'ai également travaillé avec la souche SP15 sauvage de *E. coli* « Wild Type » (WT). Cette souche est un pathogène isolé d'un nourrisson atteint de méningite néonatale. Elle appartient au groupe phylogénétique B2 et porte l'îlot *pks*.

Le plasmide pCM17 contient l'opéron *luxCDABE* sous le contrôle du promoteur *ompC*, qui code pour la Luciférase, une enzyme catalysant une réaction de bioluminescence (hétérodimère de LuxA et LuxB) et les enzymes produisant son substrat, la Luciférine (LuxC, LuxD et LuxE) (103). L'émission de lumière avec un spectre maximum à 590nm est utilisée comme marqueur de l'expression de gènes à l'échelle de la bactérie. Afin d'obtenir un système rapporteur de l'activité de synthèse de la colibactine, un plasmide pCM17 modifié a été préalablement construit par l'équipe. Ce plasmide contient le promoteur du gène *clbB* de l'îlot *pks* inséré à la place de la région du promoteur *ompC*. On appelle ainsi ce plasmide modifié pCM17-*lux-clbB*. J'ai transformé ce plasmide dans une souche SP15 de *E. coli*, par électroporation de 1µL de plasmide dans 40µL de bactéries rendues électrocompétentes par lavages successifs en glycérol froid (10%) (**Figure 15**). J'ai ensuite sélectionné les transformants sur des géloses LB additionnées des antibiotiques adaptés (**Annexe 1, Tableau 2**).

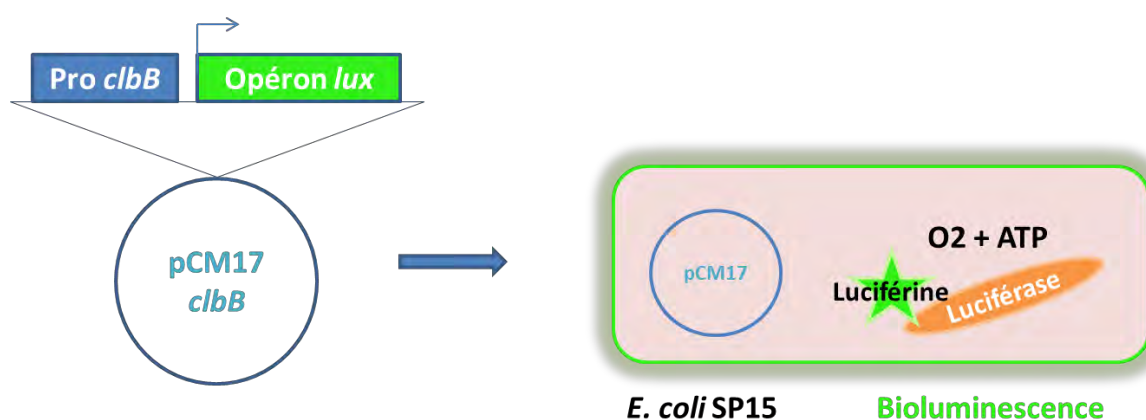


Figure 15 : Schéma du système rapporteur de l'activité du promoteur *clbB* dans *E. coli* SP15

F. Démarche expérimentale

Afin de tester l'impact de l'oxygène sur la régulation de la colibactine chez *E. coli*, j'ai utilisé une station hypoxie (Whitley H35 Hypoxystation). Les concentrations en oxygène de 0%, 0,1%, 1%, 4%, 13% et 21% ont été choisies d'après la distribution des pressions partielles retrouvées le long de l'axe transversal de l'intestin grêle (**Annexe 3, Tableau 4**).

1. Paramétrage de la station hypoxie et obtention de l'anoxie

La station hypoxie est équilibrée la veille de la manipulation à la concentration donnée en oxygène entre 0,1 et 13%. La chambre à hypoxie est maintenue à 37°C, avec un taux d'humidité de 70% et contient de l'oxygène, 5% de CO₂ et complétée avec de l'azote. Pour obtenir l'anoxie totale, j'ai utilisé une boîte anaérobie contenant un sachet capteur d'oxygène (Thermo Scientific™, réf. AG0025A) que j'ai manipulé sous la hotte à 0,1% d'oxygène. Pour les expérimentations à la concentration de 21% d'oxygène j'ai travaillé en condition atmosphérique sous PSM et j'ai utilisé un incubateur-agitateur à 37°C (5% CO₂).

2. Préparation des cultures bactériennes

Je préparais les cultures la veille à partir des souches bactériennes conservées à -80°C dans des tubes à bouchons fermés contenant 4mL de LB et la quantité d'antibiotique correspondant à la souche testée (**Annexe 1, Tableau 2**). J'incubais les tubes dans une étuve à 37°C en atmosphère ambiante, pour une croissance sur la nuit. Le milieu de culture DMEM Heps sans SVF était pré-équilibré la veille à la concentration en oxygène voulue dans la chambre à hypoxie ou en condition atmosphérique.

Le lendemain matin, j'effectuais une pré-culture en diluant au $1/20^{\text{ème}}$ le bouillon dans du DMEM Heps sans SVF en tubes Falcon 50mL en atmosphère ambiante, puis j'incubais sous agitation (240 rpm) à 37°C jusqu'à obtention de la $\text{DO}_{590\text{nm}} \approx 0,5\text{U}$ des suspensions bactériennes. La préparation des échantillons se déroule ensuite sous la hotte hypoxie pour les concentrations en oxygène entre 0% et 13%, contrairement à la condition atmosphérique. Je préparais les échantillons dans des tubes Falcon de 15mL à bouchons aérés, en introduisant $1,5 \cdot 10^7$ bactéries dans 1mL de DMEM préalablement équilibré à la concentration d'oxygène testée. Puis je plaçais les tubes sous agitation pendant 3h30 jusqu'à la phase exponentielle de croissance des bactéries.

A l'issue des 3h30 de culture bactérienne sous la concentration d'oxygène testée, j'ai réalisé différentes expériences complémentaires dans le but d'explorer l'impact de l'oxygène sur la production et la génotoxicité de la colibactine (**Figure 16**). L'ensemble des méthodologies est disponible en **annexe 2**.



Figure 16 : Schéma représentant la démarche expérimentale suivie au cours de cette étude.

II. Impact de l'oxygène sur la synthèse et la génotoxicité de la colibactine

A. L'oxygène module l'autotoxicité de la colibactine

Dans un premier temps nous avons souhaité confirmer les résultats préliminaires obtenus par l'équipe sur l'effet des conditions de culture sur l'autotoxicité des souches de *E. coli pks+*. Pour cela nous avons répété l'expérience de croissance bactérienne des mêmes souches préalablement testées : une souche *E. coli pks+*, un mutant *clbS* et un mutant *clbS* complété avec le gène *clbS* (**Figure 13**), en maîtrisant les concentrations en oxygène au moment de la culture. Nous avons donc comparé la concentration de quasi anoxie à 0,1% d'oxygène dans la station hypoxie avec la concentration à 21% d'oxygène en atmosphère ambiante en utilisant des tubes à bouchon aéré dans les deux conditions (**Figure 17**).

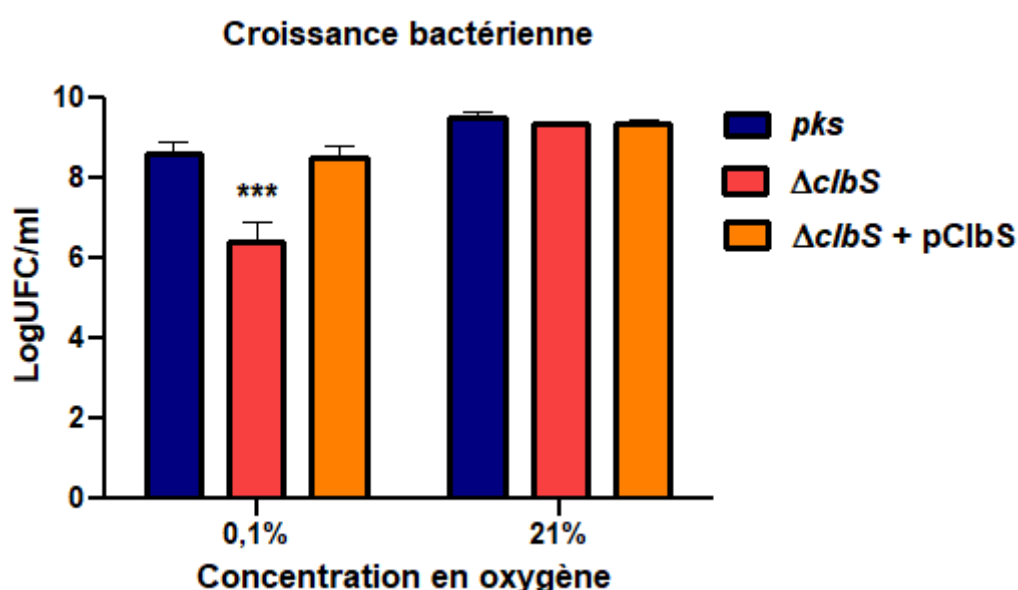


Figure 17 : L'oxygène module l'autotoxicité de la colibactine chez *E. coli pks+*.

Histogramme de la croissance bactérienne de *E. coli pks+* (*pks*), d'un mutant *clbS* ($\Delta clbS$) et d'un mutant *clbS* complété ($\Delta clbS + pClbS$) à 0,1% ou à 21% d'oxygène, dans des tubes à bouchons aérés. Les Log en UFC/mL de 3 répétitions indépendantes sont intégrés dans un test statistique ANOVA et post-test de Tukey avec $p < 0,0001$. (***) : $p < 0,001$.

Les croissances bactériennes sont identiques aux résultats préliminaires obtenus par l'équipe (**Figure 13**). Le mutant *clbS* inhibe significativement sa croissance à 0,1% d'oxygène alors qu'il se multiplie de la même façon que la souche *E. coli pks+* et que la souche complétée en atmosphère ambiante. Ces résultats montrent qu'en absence d'oxygène, la colibactine synthétisée par l'îlot *pks* de la bactérie, ralentit la croissance du mutant *clbS* déficient en protéine de résistance ClbS. En revanche, ils suggèrent qu'une quantité d'oxygène importante inhibe la génotoxicité de la colibactine, ce qui permettrait aux bactéries de se multiplier normalement malgré leur déficience en protéine ClbS. L'oxygène agit donc sur l'autotoxicité de la colibactine. Nous avons alors cherché à explorer l'impact de l'oxygène sur la colibactine, en analysant son effet sur la production et la génotoxicité de la colibactine.

B. L'oxygène inhibe la production ou la génotoxicité de la colibactine

Afin d'étudier la génotoxicité de la colibactine chez les souches de *E. coli*, l'équipe a adapté un test de pontage inter-brins de l'ADN plasmidique (84). Ce test permet d'observer et de comparer l'effet génotoxique de la colibactine entre plusieurs souches soumises à différentes conditions. Le principe repose sur la capacité démontrée de la colibactine d'induire des pontages covalents entre les deux brins de l'ADN. De l'ADN plasmidique linéarisé est exposé à la souche SP15 cultivée en présence de différentes concentrations en oxygène entre 0% et 21%. Pour mettre en évidence ces pontages inter-brins, l'ADN est soumis à migration par électrophorèse dans un gel d'agarose en conditions alcalines dénaturantes permettant la séparation des deux brins d'ADN. Cette séparation est rendue impossible par la présence du pontage covalent. Nous avons ainsi comparé les taux de pontage de l'ADN obtenus pour les différentes concentrations d'oxygène (Figure 18).

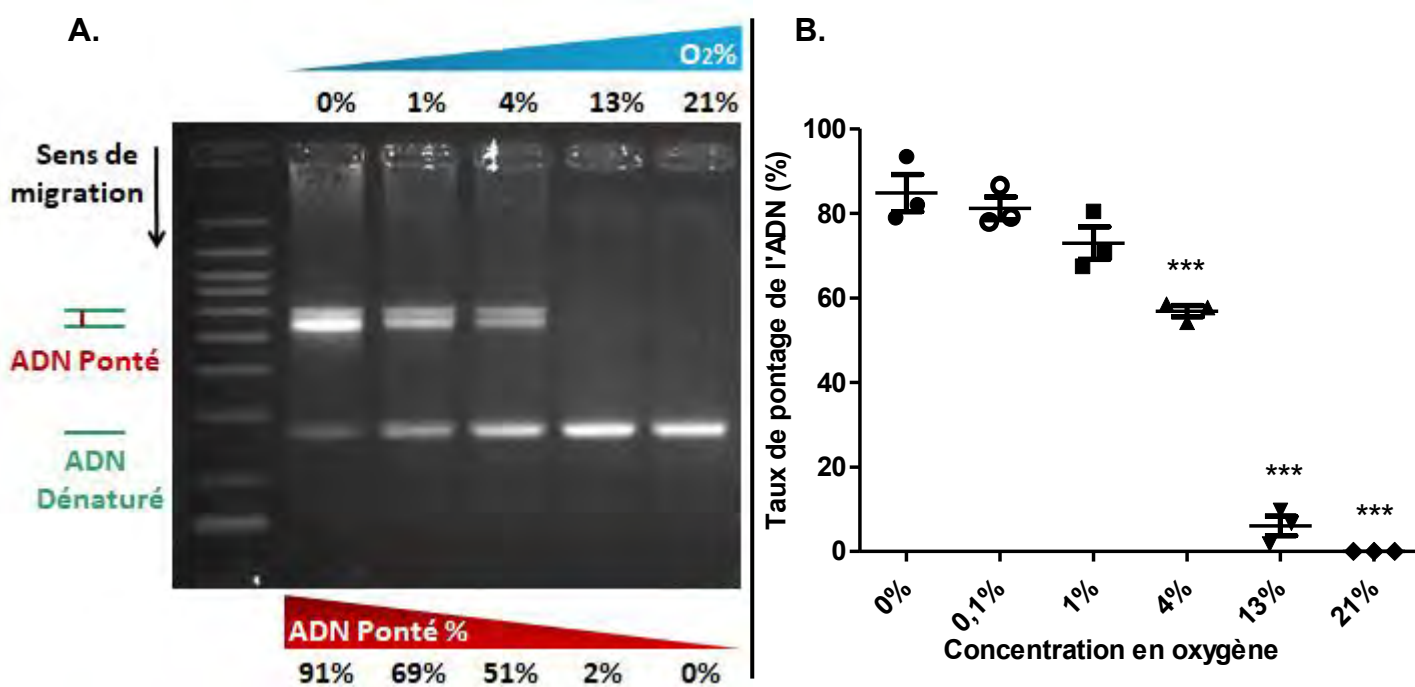


Figure 18 : Analyse du pontage inter-brins de l'ADN plasmidique en fonction des concentrations en oxygène avec *E. coli* SP15.

A. Les bandes sur le gel dénaturant correspondent à la migration de l'ADN plasmidique dénaturé et ponté par la colibactine en fonction des concentrations en oxygène testées. L'ADN ponté présente une migration retardée par rapport à l'ADN dénaturé. Ces images sont analysées pour quantification des bandes avec le logiciel ImageJ. Le pourcentage du pontage inter-brins est calculé pour chaque souche en faisant le rapport : $\text{ADN Ponté} / (\text{ADN Ponté} + \text{ADN Dénaturé})$.

B. Taux de pontage inter-brins de l'ADN plasmidique en fonction des différentes concentrations en oxygène testées après exposition de l'ADN avec la souche *pks+* SP15 de *E. coli*. Chaque concentration en oxygène a été testée sur 3 expériences indépendantes. Les taux de pontage sont intégrés dans un test statistique ANOVA et post-test de Tukey, en comparaison à la concentration à 0% d'oxygène avec $p < 0,0001$. (***) : $p < 0,001$.

Dans nos conditions de cultures *in vitro*, le taux de pontage inter-brins est proche de 100% pour une concentration en oxygène de 0% et diminue progressivement avec l'augmentation de la concentration en oxygène. On ne détecte plus de pontage à 21% d'oxygène.

En parallèle, nous avons dénombré les bactéries à l'issue des expériences afin de vérifier l'effet des différentes concentrations d'oxygène sur la croissance des bactéries (**Figure 19**).

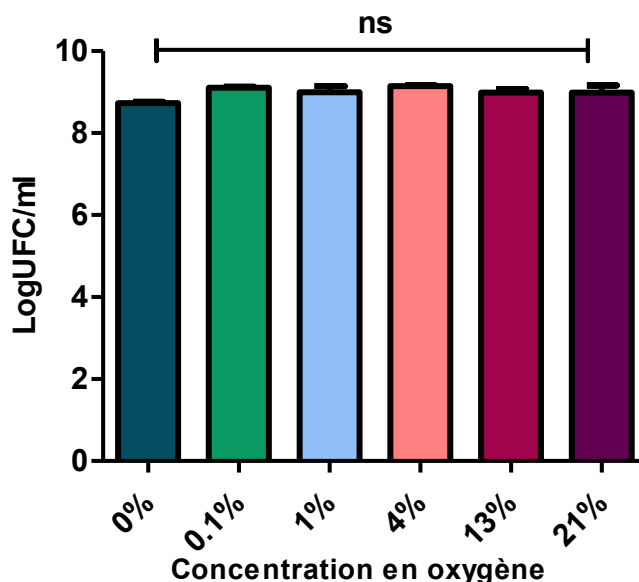


Figure 19 : Croissance de *E. coli* SP15 en fonction des concentrations en oxygène.

Histogramme du nombre de bactéries après 3h30 de culture *in vitro* aux différentes concentrations en oxygène testées. Les Log des UFC/mL de 3 expériences indépendantes sont intégrés dans un test statistique ANOVA et post-test de Tukey avec $p < 0,0001$. (ns : non significatif).

Aucune différence significative n'apparaît dans le dénombrement des UFC/mL. Cela indique que la croissance bactérienne n'est pas influencée par l'oxygène dans nos conditions de culture *in vitro* et donc que ce n'est pas un défaut de croissance qui explique la réduction d'activité de pontage en fonction de l'oxygène. Ces résultats, obtenus dans trois expériences indépendantes, révèlent que la production de la colibactine et/ou son activité génotoxique dépendent de l'oxygène.

C. La génotoxicité de la colibactine pourrait dépendre de l'oxygène

Afin d'observer si l'introduction d'oxygène pendant le contact des bactéries avec l'ADN plasmidique inactive la toxine, nous avons réalisé le test du pontage en effectuant des variations d'oxygène en cours d'expérience. Pour cela, nous avons effectué des cultures de *E. coli* SP15 à la concentration de 0,1% d'oxygène sous la station hypoxie pendant 3h30 selon le protocole. Afin d'exposer les bactéries à l'oxygène, des tubes ont été sortis de la station hypoxie puis placés dans l'incubateur à 37°C sous agitation pendant les 15 dernières minutes de la fin de la culture. Le test du pontage de l'ADN plasmidique a ensuite été réalisé, soit à 0,1% dans la station hypoxie, soit dans une étuve standard à 37°C en atmosphère ambiante. Ces résultats sont comparés avec une condition de culture et de test de pontage sans variation d'oxygène à 0,1% d'oxygène (**Figure 20**).

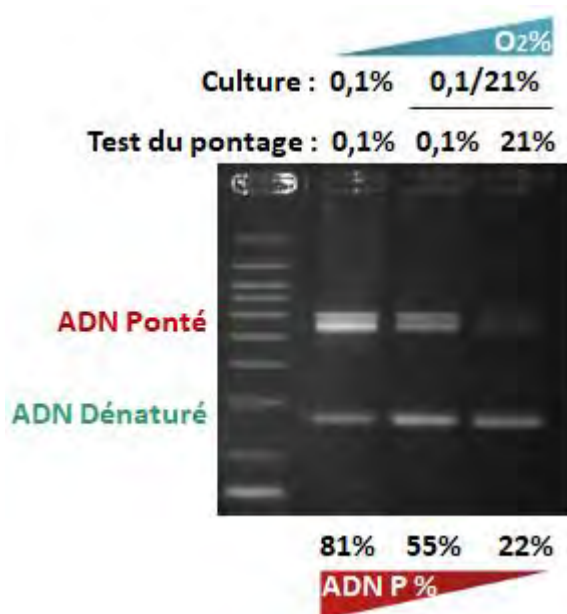


Figure 20 : Analyse du pontage inter-brins de l'ADN plasmidique avec *E. coli* SP15 avec variation de l'oxygène.

Les bandes sur le gel dénaturant correspondent à la migration de l'ADN plasmidique dénaturé et ponté par la colibactine (ADN P) soit à 0,1% d'oxygène soit après exposition à l'oxygène ambiant. L'ADN ponté présente une migration retardée par rapport à l'ADN dénaturé. Ces images sont analysées pour quantification des bandes avec le logiciel ImageJ. Le pourcentage du pontage inter-brins est calculé pour chaque souche en faisant le rapport : $ADN\ Ponté / (ADN\ Ponté + ADN\ Dénaturé)$.

Les résultats du gel de migration révèlent une diminution importante du taux de pontage inter-brins de l'ADN plasmidique lorsque les bactéries sont exposées à l'oxygène ambiant en fin de culture. Ce taux est encore plus abaissé durant la réalisation du test de pontage à 21% d'oxygène. Nous avons pu reproduire ces résultats sur différentes expériences indépendantes ce qui nous encourage à penser que l'oxygène pourrait avoir directement un effet sur la génotoxicité de la colibactine.

Néanmoins plusieurs paramètres ne sont pas maîtrisés au cours de ces manipulations. Cette expérience ne nous permet pas de conclure si la baisse du taux de pontage observée après exposition à l'oxygène est réellement liée à l'activité génotoxique de la colibactine elle-même. De ce fait, nous nous sommes intéressés à la production de la colibactine *via* l'oxygène.

D. Variations de l'expression du gène de synthèse *clbB* en fonction de l'oxygène

1. Approche *via* un système rapporteur par bioluminescence

Afin d'obtenir un système rapporteur de l'activité de synthèse de la colibactine, l'équipe a préalablement construit un plasmide pCM17 modifié, contenant le promoteur du gène *clbB* de l'îlot *pks* inséré à la place de la région du promoteur *ompC* (**Figure 15**). L'expression du gène *clbB* est obtenue par lecture de la bioluminescence délivrée par l'expression de l'opéron *lux* contrôlé par le promoteur de *clbB*. Après transformation de la souche SP15 de *E. coli* avec ce plasmide rapporteur modifié, nous avons pu mesurer l'expression du promoteur du gène *clbB* de l'îlot *pks*, codant pour une enzyme clé, une des premières à entrer en jeu dans la synthèse de colibactine (**Figure 7**).

La souche bactérienne transformée a été exposée aux concentrations en oxygène à tester pendant les 3h30 de culture. Une fois les échantillons bactériens déposés dans une microplaque, celle-ci est exposée rapidement à l'air ambiant afin de permettre l'action de la Luciférase puis acheminée au lecteur de bioluminescence. Nous avons ainsi obtenu le profil d'expression du gène de synthèse de la colibactine *clbB* exposé aux différentes concentrations en oxygène (**Figure 21**).

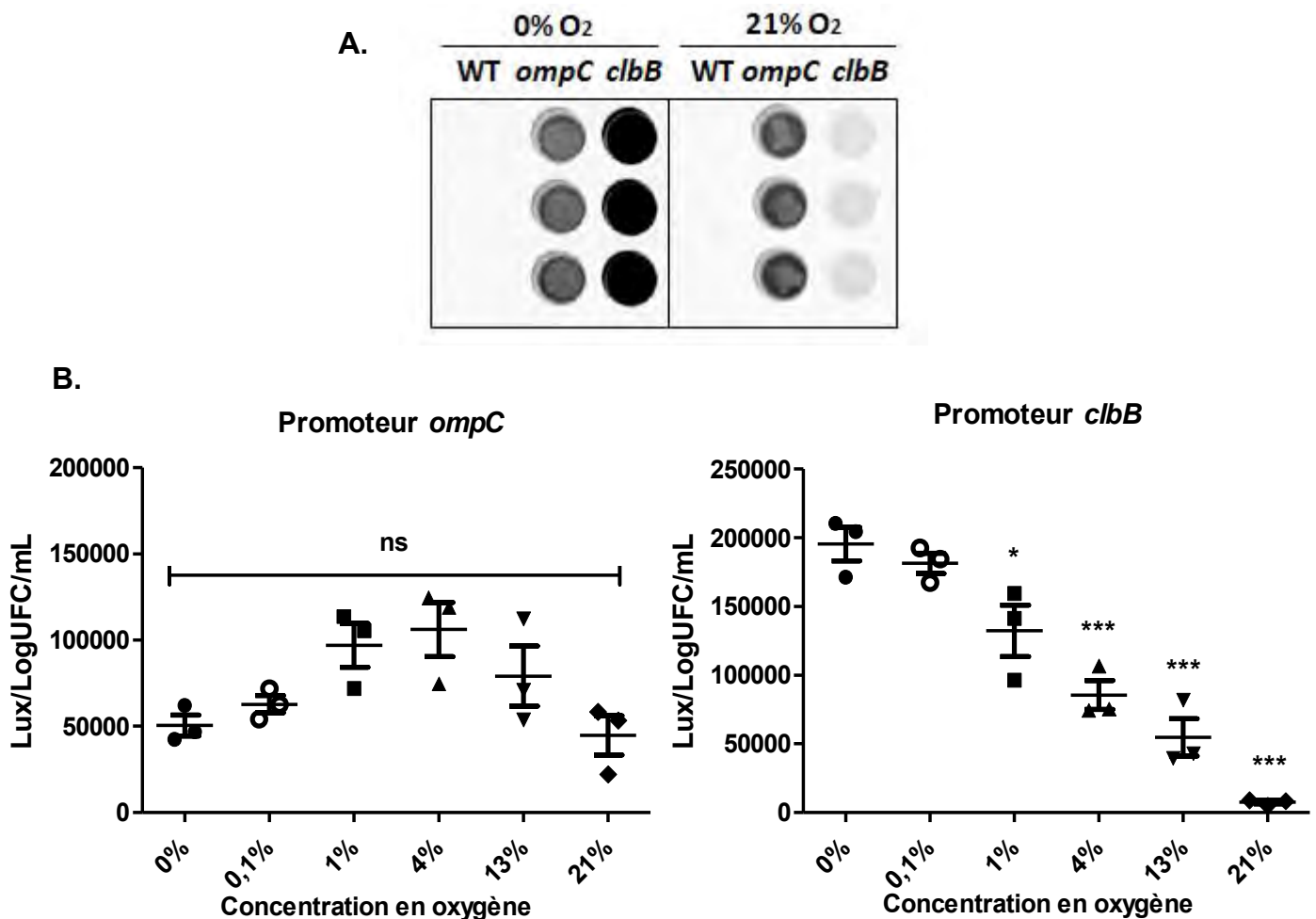


Figure 21 : Bioluminescence en fonction des concentrations en oxygène chez *E. coli* SP15 portant pCM17 modifié avec le promoteur du gène *clbB*.

A. Photographie par le Chemidoc de la bioluminescence émise à 0% ou 21% d'oxygène chez la souche SP15 de *E. coli* portant pCM17 modifié avec le promoteur du gène *clbB*. Pour chaque souche testée l'expérience a été réalisée en triplicat. La souche SP15 sans plasmide (WT) est utilisée comme contrôle négatif et la souche portant un plasmide pCM17 non modifié (*ompC*) comme contrôle de l'expression de bioluminescence.

B. Expression du gène *ompC* chez la souche portant un plasmide pCM17 non modifié (Gauche) et du gène *clbB* chez la souche SP15 de *E. coli* portant pCM17 modifié avec le promoteur *clbB* (Droite) en fonction des différentes concentrations en oxygène testées. La lecture de la bioluminescence est effectuée par le Tecan Infinite Pro microplate reader puis est rapportée sur le LogUFC/mL obtenu après dénombrement des bactéries. Chaque concentration en oxygène a été testée sur 3 expériences indépendantes. Les résultats sont intégrés dans un test statistique ANOVA et post-test de Tukey, en comparaison à la concentration à 0% d'oxygène avec $p < 0,0001$. (* : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$; ns : non significatif)

La bioluminescence du promoteur du gène *clbB* diminue proportionnellement avec le taux d'oxygène, contrairement à la souche SP15 portant un plasmide pCM17 sous contrôle du promoteur *ompC*, qui ne présente pas de variation significative de la bioluminescence aux différentes concentrations en oxygène. Ces résultats suggèrent que l'oxygène aurait un impact sur l'expression du gène *clbB*, nécessaire à la synthèse de la colibactine.

2. Approche via une méthode de qRT-PCR

Afin de confirmer cette première approche par rapporteur de l'activité du promoteur de *clbB* en bioluminescence et d'explorer davantage la biosynthèse de la colibactine en fonction de l'oxygène, nous avons quantifié les transcrits du gène *clbB*. Pour cela nous avons effectué des qRT-PCR à partir des ARNm extraits de l'ensemble des culots de cultures bactériennes de *E. coli* SP15 exposées aux différentes concentrations en oxygène pendant 3h30 (**Figure 22**). Pour les conditions de culture que nous avons utilisé, nous avons analysé l'expression du gène de ménage *cysG* qui code pour une ferrocélatase impliquée dans la synthèse de sirohème chez *E. coli* et déjà décrit comme gène de référence exprimé de façon constitutive (104). L'expression du gène *clbB* à différentes concentrations d'oxygène est calculée par le rapport *clbB/cysG* du nombre de copies avec normalisation à 100% pour la moyenne à la condition 0% d'oxygène. Les résultats de qRT-PCR proviennent de trois expériences indépendantes et chaque qPCR est effectuée en triplicat.

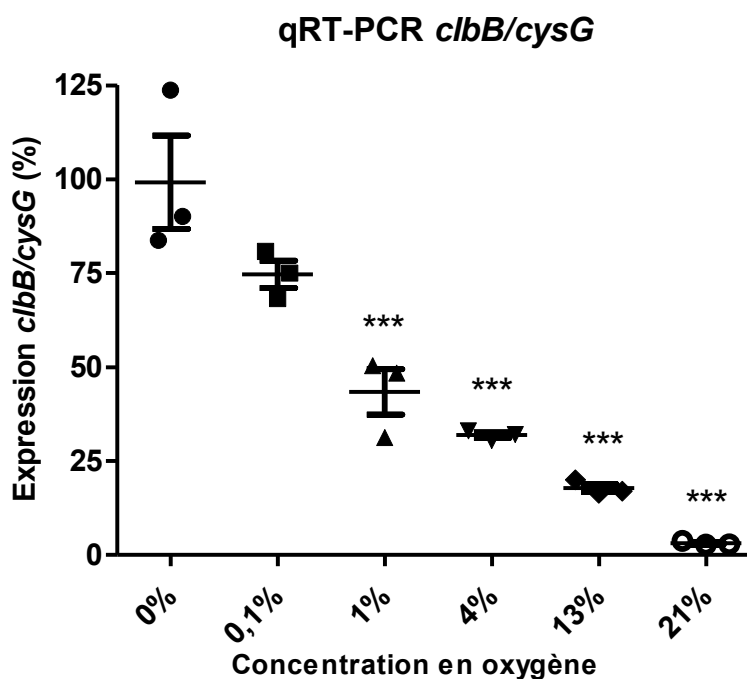


Figure 22 : qRT-PCR du gène *clbB* en fonction des concentrations en oxygène chez *E. coli* SP15.

L'expression du gène *clbB* est quantifiée par qRT-PCR à partir de l'extraction des ARNm de l'ensemble des culots de cultures bactériennes de *E. coli* SP15 exposées aux différentes concentrations en oxygène. Le nombre de copies d'ARNm du gène *clbB* obtenu est rapporté au nombre de copies de l'ARNm du gène de ménage *cysG*. Chaque concentration en oxygène a été testée sur 3 expériences indépendantes. Chaque mesure de qPCR a été réalisée en triplicat. Les résultats sont intégrés dans un test statistique ANOVA avec un post-test de Tukey en comparaison avec la concentration à 0% d'oxygène avec normalisation à 100% de la moyenne avec $p < 0,0001$. (***) : $p < 0,001$).

Les analyses de qRT-PCR montrent que l'expression du gène de synthèse *clbB* diminue proportionnellement avec le taux d'oxygène. Ces résultats confirment que l'oxygène agit sur l'expression du gène *clbB* codant une megasynthase nécessaire à la synthèse de la colibactine.

E. La production de colibactine dépend de l'oxygène

Afin de confirmer que la biosynthèse de colibactine est dépendante de l'oxygène, nous avons quantifié sa production en fonction de l'oxygène. Etant donné que la colibactine elle-même est une molécule instable et non quantifiable directement, nous avons quantifié le C14-Asn libéré lors du clivage de la précolibactine en colibactine (**Figure 8**). Le C14-Asn est un métabolite lipidique stable est dosable qui reflète la production de colibactine. Après extraction des lipides des surnageants de cultures bactériennes pendant 3h30 avec les différentes concentrations en oxygène, le C14-Asn a été quantifié par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) par la plateforme de lipidomique de Toulouse, comme déjà décrit (65) (**Figure 23**).

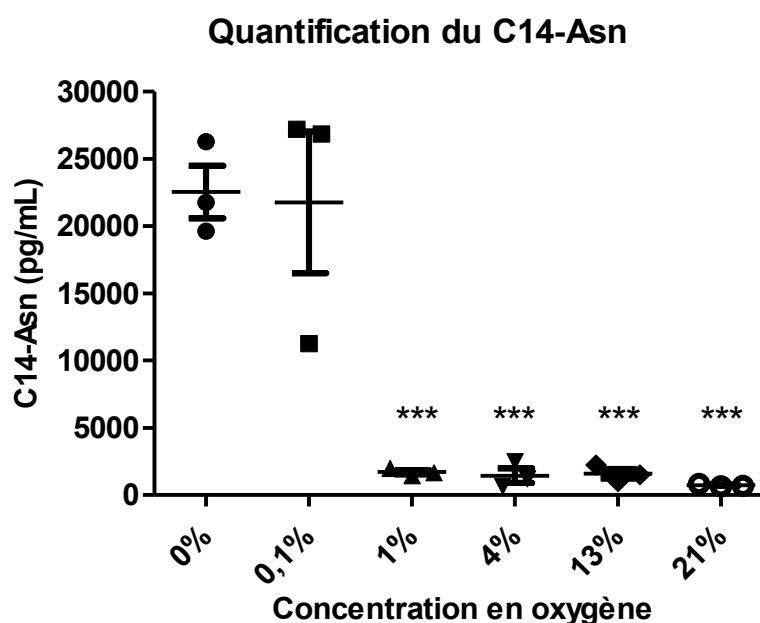


Figure 23 : Concentration de C14-Asn en fonction des concentrations en oxygène chez *E. coli* SP15.

Après extraction de l'ensemble des lipides des surnageants de cultures bactériennes de *E. coli* SP15 exposées à différentes concentrations en oxygène, le C14-Asn est dosé par LC-MS/MS. La quantité est exprimée en pg/mL. Chaque concentration en oxygène a été testée sur 3 expériences indépendantes. Les résultats sont intégrés dans un test statistique ANOVA avec un post-test de Tukey en comparaison avec la concentration à 0% d'oxygène avec $p < 0,0001$. (***) : $p < 0,001$).

La concentration en C14-Asn présente dans les cultures de *E. coli* SP15 exposées à de faibles quantités d'oxygène est significativement supérieure à celle quantifiée dans les cultures aux fortes concentrations en oxygène. Ces résultats reflètent une production de colibactine plus importante en conditions anaérobies ou très hypoxiques par rapport aux conditions avec un fort taux d'oxygène. Ils sont compatibles avec les résultats de bioluminescence et de qRT-PCR de l'expression du gène *clbB* en fonction des concentrations en oxygène.

III. Discussion et perspectives

A. Bilan des résultats expérimentaux de l'étude

Les premières données de mes travaux révèlent un impact de l'oxygène sur la génotoxicité des *E. coli pks+*. En effet, la génotoxicité est élevée en condition d'anoxie puis s'abaisse avec le pourcentage d'oxygène jusqu'à devenir nulle en atmosphère ambiante. Grâce à différentes approches expérimentales, j'ai pu examiner la régulation de la biosynthèse de la colibactine par l'oxygène. J'ai d'abord utilisé un système rapporteur par bioluminescence contrôlé par le promoteur du gène de synthèse *clbB* inséré dans un plasmide. La variation de la bioluminescence avec l'oxygène du promoteur du gène *clbB* suggère une régulation de la synthèse de la colibactine *via* l'oxygène. Ce résultat est cohérent avec la quantification de l'ARNm du gène *clbB* par qRT-PCR en fonction de l'oxygène. Enfin, le dosage du produit de clivage C14-Asn reflète l'activité des enzymes de biosynthèse et la maturation de la colibactine. Sa production dépend de l'oxygène de manière corrélée avec mes résultats précédents : elle est élevée en condition d'anoxie puis s'abaisse avec l'augmentation du pourcentage d'oxygène.

Toutefois, le test de génotoxicité que j'ai employé ne permet pas de distinguer si c'est la production et/ou l'activité de la toxine qui sont impactées. Afin d'observer si l'introduction d'oxygène pendant le contact des bactéries avec l'ADN inactive la toxine, j'ai réalisé le test de pontage en effectuant des variations d'oxygène en cours d'expérience. Cependant, plusieurs paramètres ne sont pas maîtrisés lors de ces manipulations. En effet, la colibactine est une molécule instable et sensible à l'oxydation, de même que l'ADN plasmidique nu. Il se pourrait que le pontage de l'ADN formé soit détruit par la suite. En outre, on ne peut exclure que la bactérie pourrait mettre en place un mécanisme de régulation de la production de colibactine au cours des dernières minutes de culture en atmosphère ambiante ou pendant la durée du test de pontage. Dans le but de s'affranchir de l'influence des bactéries, j'ai effectué le test de pontage de l'ADN plasmidique avec le surnageant des cultures bactériennes obtenu après centrifugation. Je n'ai trouvé aucun pontage de l'ADN à la concentration optimale du test à 0% d'oxygène. Ce résultat confirme que la colibactine n'est pas sécrétée par les bactéries dans le milieu de culture, ce qui ne permet pas de tester directement l'effet de l'oxygène sur la génotoxicité de la molécule.

La variation de la bioluminescence avec l'oxygène du promoteur du gène *clbB* suggère une régulation de la synthèse de la colibactine *via* l'oxygène. Afin d'explorer cette régulation sur les gènes de l'îlot *pks*, j'ai utilisé le système rapporteur par bioluminescence contrôlé par les promoteurs de différents gènes *clb* insérés dans un plasmide pCM17. J'ai choisi de mesurer l'expression des promoteurs des gènes de synthèse de la colibactine : *clbA* codant la PPTase, *clbR* codant un régulateur, *clbM* une pompe à efflux, *clbP* une peptidase et enfin *clbS* une hydrolase de protection propre à la bactérie (**Figure 8**). De cette façon, un profil d'expression représentatif du groupe de gènes de synthèse de la colibactine et de certaines de ses principales enzymes a été créé. J'ai ensuite transformé des bactéries SP15 de *E. coli* avec ces différents plasmides rapporteurs modifiés. J'ai ainsi obtenu les profils d'expression des promoteurs des

gènes de l'îlot *pks* exposés aux différentes concentrations en oxygène. Les profils d'expression des promoteurs des gènes *clbA* et *clbR* se sont révélés intéressants et relativement proches de celui du promoteur du gène *clbB*. En revanche, les promoteurs des gènes *clbM*, *clbP* et *clbS* ont présentés une faible expression, ce qui rend l'interprétation de ces profils difficile. L'expression plus faible de ce groupe de gènes a déjà été décrite après RT-PCR (53). J'ai également confirmé par bioluminescence que l'expression du gène de ménage *cysG* ne montrait pas de variation significative avec l'oxygène. Nous envisageons de poursuivre nos expériences et de compléter ces profils d'expression de gènes dans la souche Nissle 1917 de *E. coli* (EcN), un probiotique digestif également porteur de l'îlot *pks*. Trois souches portant respectivement les mutations chromosomiques *clbA-lux* ; *clbB-lux* et *clbR-lux*, où les promoteurs *clb* contrôlent l'expression de *lux*, sont disponibles au laboratoire. Nous pourrions ainsi comparer l'expression des gènes de synthèse de la colibactine en fonction de l'oxygène directement au niveau chromosomique afin d'obtenir un reflet de l'expression plus proche des conditions naturelles de la bactérie. Cependant, on ne peut exclure que la régulation de l'îlot *pks* pourrait être souche dépendante, d'autant plus que la souche EcN semble être moins génotoxique que les autres souches porteuses de l'îlot *pks* du groupe phylogénétique B2 (105).

Mes résultats de qRT-PCR du gène *clbB* en fonction de l'oxygène sont cohérents avec le profil d'expression du promoteur du gène *clbB* par bioluminescence. Ces résultats nous encouragent à quantifier les ARNm des autres gènes de l'îlot *pks* afin d'examiner la régulation de la voie de biosynthèse de la colibactine par l'oxygène *via* cette approche. On pourrait également envisager de doser les différentes protéines codées par l'îlot *pks* en fonction des concentrations en oxygène.

Enfin, le dosage du C14-Asn dépend de la concentration en oxygène. Ce métabolite stable et quantifiable par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, est généré à partir du clivage de la précolibactine et reflète donc l'activité des enzymes de biosynthèse et la maturation de la colibactine. En revanche sa quantité ne correspond pas forcément à la colibactine réellement active, car la voie de synthèse *pks* permet la production d'autres métabolites. De plus, nous observons une faible quantité de C14-Asn à la concentration de 1% d'oxygène alors que l'activité génotoxique de la colibactine est élevée à ce pourcentage. Cette différence peut être expliquée par un délai trop court au moment du dosage du produit de clivage, qui nécessiterait un temps supérieur à 3h30 de culture pour s'accumuler dans le milieu. Nous envisageons de quantifier le C14-Asn après une culture bactérienne de 8h afin de confirmer cette observation.

Ensemble, mes résultats indiquent que l'oxygène influence la production et/ou l'activité génotoxique de la colibactine. Elles sont optimales en condition anaérobie et au contraire minimales en condition atmosphérique. Les concentrations entre 1% et 4% d'oxygène semblent correspondre à une zone critique, qui pourrait provenir de la sensibilité de nos techniques expérimentales mais également d'une zone de régulation bactérienne de la colibactine. En outre, mes résultats sont exclusivement réalisés *in vitro* et nécessitent d'être confirmés *in vivo*.

B. Confirmation des résultats *in cellulo*

Dans le but de confirmer les résultats expérimentaux que j'ai obtenus *in vitro*, j'ai commencé à travailler sur un modèle *in cellulo*. Pour cela j'ai infecté des cellules intestinales de rats IEC6 par les souches de *E. coli* SP15 à la concentration en oxygène de 0% dans la station hypoxie ou dans un incubateur standard en atmosphère ambiante. Après une durée d'infection de 4h, j'ai observé les pontages de l'ADN des cellules par migration sur gel dénaturant. J'ai retrouvé de l'ADN ponté à la concentration de 0% d'oxygène mais également à celle de 21% d'oxygène. Pour expliquer ce pontage malgré une incubation en atmosphère ambiante, nous suggérons qu'un gradient d'oxygène se forme dans le milieu de culture en raison de la respiration cellulaire et bactérienne. Les cellules au fond du puit se trouvent en quasi-anoxie ce qui permet la génotoxicité de la colibactine sur l'ADN de ces cellules. Pour s'affranchir de ce gradient et favoriser l'oxygénation des cellules, j'ai réalisé l'expérience en agitant continuellement les cellules au cours des 4h d'infection avec les bactéries. Je n'ai alors retrouvé aucun pontage de l'ADN cellulaire aux deux concentrations en oxygène testées. Une possible explication à ce résultat serait que l'agitation continue et trop importante limiterait le contact cellule/bactérie nécessaire au transfert de la colibactine des bactéries vers la cellule épithéliale.

La maîtrise des conditions de cultures cellulaires et d'oxygénation pendant l'infection apparaît primordiale pour observer la génotoxicité de la colibactine. Il serait intéressant de reconstituer un gradient d'oxygène dans la station hypoxie comparable à celui de l'intestin humain suivant une coupe transversale. Le taux d'oxygène devrait être nul en haut de la chambre à hypoxie et augmenter progressivement pour atteindre environ 13% d'oxygène en bas de la station (**Annexe 3, Tableau 4**).

En outre, nous pourrions rechercher les dommages de l'ADN cellulaire en utilisant une autre approche que la détection du pontage de l'ADN sur gel dénaturant, plus difficile à réaliser sur cellules qu'avec de l'ADN plasmidique nu. Une des approches consiste à quantifier la phosphorylation de l'histone H2AX (en γ -H2AX), un marqueur sensible de la présence de cassures double-brins des cellules eucaryotes, en In-Cell Western. Cette technique est maîtrisée en routine au laboratoire.

C. Régulation de la production de colibactine par les régulateurs transcriptionnels oxygène-dépendants

L'adaptabilité de *E. coli* à divers niveaux d'oxygène représente un avantage sélectif crucial pour induire une infection. Chez les entérobactéries, les régulateurs transcriptionnels FNR et ArcA/B sont essentiels à l'adaptation à des niveaux d'oxygène fluctuants. De ce fait, ils pourraient être impliqués dans la voie de régulation de la production de la colibactine.

Une analyse *in silico* de la région d'ADN en amont du gène *clbB* permet de trouver des séquences consensus du site de fixation de FNR. Nous souhaitons confirmer ces observations au laboratoire. L'équipe travaille actuellement sur la construction d'un mutant *fnr* dans l'optique

de réaliser le test du pontage inter-brins de l'ADN plasmidique aux différentes concentrations en oxygène. Si le régulateur FNR est impliqué dans la production de colibactine en anaérobiose, avec ce mutant nous n'observerions plus de pontage de l'ADN à 0% d'oxygène, concentration en oxygène où le gène *fnr* est actif. Nous pourrions de ce fait déterminer le seuil d'oxygène nécessaire à l'activation de FNR pour la régulation de la colibactine dans nos conditions de culture. Nous devrions ensuite restaurer le phénotype obtenu avec la souche sauvage de *E. coli* SP15 avec un mutant *fnr* complémenté. Si ce test est concluant, nous pourrions par la suite utiliser une technique de retard sur gel (EMSA ou *Electrophoretic Mobility Shift Assay*), permettant de détecter *in vitro* l'interaction entre la protéine FNR et l'ADN en amont du gène *clbB*. Grâce à des résultats préliminaires obtenus par l'équipe nous pensons notamment que le régulateur ArcA/B pourrait intervenir dans l'activité de la colibactine en relai de FNR en condition aérobie. Ces résultats *in vitro* n'ont pas encore été confirmés dans la station hypoxie sous une concentration en oxygène contrôlée. Nous pourrions donc construire un mutant *arcA/B* ainsi qu'un double mutant *fnr/arc* afin d'explorer ce mécanisme de régulation.

Toutefois, les régulateurs transcriptionnels FNR et ArcA/B détiennent un rôle pléiotrope dans la régulation des gènes du métabolisme oxygène-dépendants et ont donc une large influence sur la physiologie cellulaire. Par conséquent, il est possible qu'ils modifient l'expression des gènes de l'îlot *pks* en influençant d'autres facteurs de régulation connus ou inconnus à ce jour. Par ailleurs, mes premières expériences exclusivement *in vitro* ne tiennent pas compte de l'environnement complexe *in vivo*. Ainsi, d'autres facteurs environnementaux peuvent également influencer sur l'expression des gènes de la colibactine.

D. Perspectives thérapeutiques contre *E. coli pks+* dans l'inflammation chronique et le cancer colorectal

Bien qu'une approche thérapeutique par le contrôle de l'oxygène digestif soit difficilement envisageable, le ciblage du mécanisme de synthèse de la colibactine ou de la colonisation par *E. coli* pourrait protéger contre le CRC provoqué par *E. coli pks+*. Actuellement, il existe peu d'approches expérimentales qui tentent de limiter la colonisation par les entérobactéries productrices de génotoxines. La thérapie antimicrobienne orale avec des antibiotiques à large spectre est appropriée pour réduire temporairement l'abondance de certaines espèces de bactéries pro-tumorales. Cependant, cette antibiothérapie élimine également les germes bénéfiques du microbiote et augmente le risque d'expansion de l'agent pathogène (106).

Pour surmonter les limites des antibiotiques à large spectre dans ce contexte, l'équipe de Winter a récemment élaboré une stratégie qui cible les capacités métaboliques uniques des entérobactéries (107). L'équipe a démontré que l'administration orale de tungstate, un sel de tungstène hydrosoluble, améliore la dysbiose et l'inflammation intestinale dans les modèles murins de colite aiguë. Le tungstate inhibe les molybdoenzymes des entérobactéries, des métalloenzymes avec un cofacteur de molybdène (MoCo) dans leur site actif, et réduit sélectivement la colonisation intestinale par les entérobactéries productrices de génotoxines. La

restriction de la prolifération de ces entérobactéries induit une réduction importante de l'inflammation intestinale et également l'incidence des tumeurs du côlon dans des modèles murins de CRC (108). Parallèlement, Robin et al. ont mis en évidence sur des modèles murins que de petits composés à base de bore inhibent l'activité de la peptidase ClbP, indispensable à la synthèse de la colibactine, réduisant ainsi les effets génotoxiques et pro-tumorigènes des *E. coli pks+* (109). Ces traitements donnent des résultats prometteurs sur des modèles murins et doivent encore être validés avant d'être utilisés dans un cadre clinique humain.

Étant donné l'impact de l'inflammation sur le développement du CRC, les agents anti-inflammatoires tels que ceux utilisés pour traiter les MICI pourraient être chimiopréventifs. En effet, l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), en particulier de l'aspirine, un inhibiteur de la COX (cyclooxygénase), a été associée à une réduction du risque de différents types de cancer (110). Des études épidémiologiques suggèrent que le traitement anti-TNF (Tumor Necrosis Factor) est associé à une réduction de la fréquence de la maladie de Crohn (111,112), mais cette association n'est pas toujours significative. Cette divergence se concilie avec l'observation clinique selon laquelle jusqu'à 40% des patients ne répondent pas au traitement anti-TNF initial (113). Jobin et al. ont montré que le blocage du TNF modifiait la composition et les activités du microbiote, un processus soumis à l'influence de l'environnement et essentiel pour prévenir la cancérogenèse colorectale (114). Ainsi, l'état inflammatoire pourrait affecter non seulement *E. coli pks+* mais aussi d'autres membres du microbiote ainsi que les interactions microbiennes au sein de l'écosystème intestinal. L'influence réciproque entre l'état de la maladie et le microbiote, qui est également soumis à la pression de l'environnement, souligne la nature multifactorielle de l'étiologie des MICI et du CRC. Pour la prévention et la thérapie des maladies, une approche holistique conçue pour traiter l'interaction tripartite hôte-microbiote-environnement serait probablement la plus efficace.

IV. Conclusion

Les résultats de mon étude sont exclusivement réalisés *in vitro* et nécessitent d'être confirmés *in vivo*. Néanmoins ils indiquent que l'oxygène influence la production et/ou l'activité génotoxique de la colibactine. En effet, la génotoxine est produite et activée de façon importante en condition d'anoxie. Cette condition est retrouvée physiopathologiquement au cours d'infections intestinales et également dans certaines zones tumorales hypoxiques. Ainsi la toxicité de la colibactine au niveau de ces zones d'hypoxie pourrait déployer la virulence des *E. coli pks+*, favorisant l'infection digestive et le développement de tumeurs colorectales.

Mes résultats soulignent l'importance de l'oxygène dans les conditions de culture des entérobactéries. Ils remettent en question l'analyse de nombreux gènes du métabolisme bactérien qui sont étudiés sous les conditions de cultures de routine actuelles au laboratoire, dans des incubateurs en atmosphère ambiante où le taux d'oxygène n'est pas maîtrisé. Pour travailler dans des conditions optimales, il serait intéressant de développer des enceintes avec un gradient d'oxygène reconstituant le gradient transversal du tube digestif humain.

Cette étude nous encourage à poursuivre nos recherches. En effet, une meilleure compréhension de la régulation de la colibactine chez *E. coli pks+* permettra de mieux appréhender les mécanismes généraux qui relient l'inflammation et la dysbiose intestinale, à l'origine de la formation de lésions du CRC. L'objectif à long terme sera de développer de nouvelles cibles thérapeutiques épargnant le microbiote intestinal, telles que la piste des inhibiteurs des enzymes de synthèse de la colibactine.

Bibliographie

1. Denis François. Bactériologie médicale: techniques usuelles. Issy-les-Moulineaux: Elsevier-Masson; 2011.
2. Baron S, éditeur. Medical Microbiology [Internet]. 4th éd. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [cité 7 juill 2020]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/>
3. Redondo-Lopez V, Cook RL, Sobel JD. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis.* oct 1990;12(5):856-72.
4. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992 Suppl. sept 2003;91(441):48-55.
5. Rigottier-Gois L. Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis. *ISME J.* juill 2013;7(7):1256-61.
6. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* nov 1996;4(11):430-5.
7. Incidence and attributable mortality of healthcare-associated infections in intensive care units in Europe, 2008-2012 [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. 2018 [cité 21 sept 2020]. Disponible sur: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/incidence-and-attributable-mortality-healthcare-associated-infections-intensive>
8. Ulett GC, Totsika M, Schaale K, Carey AJ, Sweet MJ, Schembri MA. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Curr Opin Microbiol.* févr 2013;16(1):100-7.
9. Schaffer JN, Pearson MM. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. *Microbiol Spectr* [Internet]. oct 2015 [cité 7 août 2020];3(5). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4638163/>
10. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. *N Engl J Med.* 27 mars 2014;370(13):1198-208.
11. Shulman ST, Friedmann HC, Sims RH. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 oct 2007;45(8):1025-9.
12. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* févr 2004;2(2):123-40.
13. Clarke SC, Haigh RD, Freestone PPE, Williams PH. Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a Global Pathogen. *Clin Microbiol Rev.* juill 2003;16(3):365-78.
14. Robbins JB, McCracken GH, Gotschlich EC, Ørskov F, Ørskov I, Hanson LA. *Escherichia coli* K1 Capsular Polysaccharide Associated with Neonatal Meningitis. *N Engl J Med.* 30 mai 1974;290(22):1216-20.
15. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* mai 2015;13(5):269-84.
16. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* janv 2010;8(1):26-38.
17. DuPont HL, Levine MM, Hornick RB, Formal SB. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J Infect Dis.* juin 1989;159(6):1126-8.

18. Shelobolina ES, Sullivan SA, O'Neill KR, Nevin KP, Lovley DR. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Appl Environ Microbiol.* mai 2004;70(5):2959-65.
19. Liste des maladies à déclaration obligatoire [Internet]. Santé publique France. [cité 4 août 2020]. Disponible sur: /maladies-a-declaration-obligatoire/liste-des-maladies-a-declaration-obligatoire
20. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature.* 18 mai 2000;405(6784):299-304.
21. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* janv 1998;11(1):142-201.
22. Lüthje P, Brauner A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Adv Microb Physiol.* 2014;65:337-72.
23. Barber AE, Norton JP, Spivak AM, Mulvey MA. Urinary tract infections: current and emerging management strategies. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* sept 2013;57(5):719-24.
24. Yang F, Yang J, Zhang X, Chen L, Jiang Y, Yan Y, et al. Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(19):6445-58.
25. Erhardt M, Dersch P. Regulatory principles governing *Salmonella* and *Yersinia* virulence. *Front Microbiol* [Internet]. 9 sept 2015 [cité 6 août 2020];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4563271/>
26. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev.* janv 1991;4(1):80-128.
27. Holden VI, Bachman MA. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics.* 2015;7(6):986-95.
28. Subashchandrabose S, Mobley HLT. Back to the metal age: battle for metals at the host-pathogen interface during urinary tract infection. *Met Integr Biometal Sci.* juin 2015;7(6):935-42.
29. CDC. What Exactly is Antibiotic Resistance? [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2020 [cité 10 août 2020]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
30. Uden G, Bongaerts J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta.* 4 juill 1997;1320(3):217-34.
31. Loui C, Chang AC, Lu S. Role of the ArcAB two-component system in the resistance of *Escherichia coli* to reactive oxygen stress. *BMC Microbiol.* 28 août 2009;9:183.
32. Espey MG. Role of oxygen gradients in shaping redox relationships between the human intestine and its microbiota. *Free Radic Biol Med.* févr 2013;55:130-40.
33. Albenberg L, Esipova T, Judge C, Bittinger K, Chen J, Laughlin A, et al. Correlation Between Intraluminal Oxygen Gradient and Radial Partitioning of Intestinal Microbiota in Humans and Mice. *Gastroenterology.* nov 2014;147(5):1055-1063.e8.
34. Schaible B, Schaffer K, Taylor CT. Hypoxia, innate immunity and infection in the lung. *Respir Physiol Neurobiol.* 31 déc 2010;174(3):235-43.

35. Pereira FC, Berry D. Microbial nutrient niches in the gut. *Environ Microbiol.* 2017;19(4):1366-78.
36. Zeng M, Inohara N, Nuñez G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol.* janv 2017;10(1):18-26.
37. Chin AC, Parkos CA. Neutrophil transepithelial migration and epithelial barrier function in IBD: potential targets for inhibiting neutrophil trafficking. *Ann N Y Acad Sci.* août 2006;1072:276-87.
38. Winter SE, Winter MG, Xavier MN, Thiennimitr P, Poon V, Keestra AM, et al. Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut. *Science.* 8 févr 2013;339(6120):708-11.
39. Cevallos SA, Lee J-Y, Tiffany CR, Byndloss AJ, Johnston L, Byndloss MX, et al. Increased Epithelial Oxygenation Links Colitis to an Expansion of Tumorigenic Bacteria. *Ehrt S, éditeur. mBio.* 1 oct 2019;10(5):e02244-19, /mbio/10/5/mBio.02244-19.atom.
40. Strugala V, Dettmar PW, Pearson JP. Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int J Clin Pract.* mai 2008;62(5):762-9.
41. Fan Y-Y, Davidson LA, Callaway ES, Wright GA, Safe S, Chapkin RS. A bioassay to measure energy metabolism in mouse colonic crypts, organoids, and sorted stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1 juill 2015;309(1):G1-9.
42. Myers KS, Yan H, Ong IM, Chung D, Liang K, Tran F, et al. Genome-scale Analysis of *Escherichia coli* FNR Reveals Complex Features of Transcription Factor Binding. *Burkholder WF, éditeur. PLoS Genet.* 20 juin 2013;9(6):e1003565.
43. Crofts AA, Giovanetti SM, Rubin EJ, Poly FM, Gutiérrez RL, Talaat KR, et al. Enterotoxigenic *E. coli* virulence gene regulation in human infections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18 sept 2018;115(38):E8968-76.
44. Marteyn B, West NP, Browning DF, Cole JA, Shaw JG, Palm F, et al. Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen in vivo. *Nature.* 20 mai 2010;465(7296):355-8.
45. Carlson-Banning KM, Sperandio V. Catabolite and Oxygen Regulation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Virulence. *mBio.* 22 2016;7(6).
46. Tinevez J-Y, Arena ET, Anderson MC, Nigro G, Injarabian L, André AC, et al. *Shigella*-mediated oxygen depletion is essential for intestinal mucosa colonization. *Nat Microbiol.* 8 juill 2019;4(11):2001-9.
47. Boulette ML, Payne SM. Anaerobic Regulation of *Shigella flexneri* Virulence: ArcA Regulates fur and Iron Acquisition Genes. *J Bacteriol.* oct 2007;189(19):6957-67.
48. Fink RC, Evans MR, Porwollik S, Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Troxell B, et al. FNR Is a Global Regulator of Virulence and Anaerobic Metabolism in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (ATCC 14028s). *J Bacteriol.* mars 2007;189(6):2262-73.
49. Morales EH, Collao B, Desai PT, Calderón IL, Gil F, Luraschi R, et al. Probing the ArcA regulon under aerobic/ROS conditions in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Genomics.* 17 sept 2013;14:626.
50. Pardo-Esté C, Hidalgo AA, Aguirre C, Briones AC, Cabezas CE, Castro-Severyn J, et al. The ArcAB two-component regulatory system promotes resistance to reactive oxygen species and systemic infection by *Salmonella* Typhimurium. *PLoS One.* 2018;13(9):e0203497.

51. Velazquez EM, Nguyen H, Heasley KT, Saechao CH, Gil LM, Rogers AWL, et al. Endogenous Enterobacteriaceae underlie variation in susceptibility to Salmonella infection. *Nat Microbiol.* 2019;4(6):1057-64.
52. Nougayrède J-P, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science.* 11 août 2006;313(5788):848-51.
53. Homburg S, Oswald E, Hacker J, Dobrindt U. Expression analysis of the colibactin gene cluster coding for a novel polyketide in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* oct 2007;275(2):255-62.
54. Nowrouzian FL, Wold AE, Adlerberth I. *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *J Infect Dis.* 1 avr 2005;191(7):1078-83.
55. Krieger JN, Dobrindt U, Riley DE, Oswald E. Acute *Escherichia coli* prostatitis in previously health young men: bacterial virulence factors, antimicrobial resistance, and clinical outcomes. *Urology.* juin 2011;77(6):1420-5.
56. Dubois D, Delmas J, Cady A, Robin F, Sivignon A, Oswald E, et al. Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* juin 2010;48(6):2122-9.
57. Tenailon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* mars 2010;8(3):207-17.
58. Putze J, Hennequin C, Nougayrède J-P, Zhang W, Homburg S, Karch H, et al. Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family Enterobacteriaceae. *Infect Immun.* nov 2009;77(11):4696-703.
59. Bondarev V, Richter M, Romano S, Piel J, Schwedt A, Schulz-Vogt HN. The genus *Pseudovibrio* contains metabolically versatile bacteria adapted for symbiosis. *Environ Microbiol.* juill 2013;15(7):2095-113.
60. Engel P, Vizcaino MI, Crawford JM. Gut symbionts from distinct hosts exhibit genotoxic activity via divergent colibactin biosynthesis pathways. *Appl Environ Microbiol.* févr 2015;81(4):1502-12.
61. Secher T, Payros D, Brehin C, Boury M, Watrin C, Gillet M, et al. Oral tolerance failure upon neonatal gut colonization with *Escherichia coli* producing the genotoxin colibactin. *Infect Immun.* juin 2015;83(6):2420-9.
62. Marcq I, Martin P, Payros D, Cuevas-Ramos G, Boury M, Watrin C, et al. The genotoxin colibactin exacerbates lymphopenia and decreases survival rate in mice infected with septicemic *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 15 juill 2014;210(2):285-94.
63. Lu M-C, Chen Y-T, Chiang M-K, Wang Y-C, Hsiao P-Y, Huang Y-J, et al. Colibactin Contributes to the Hypervirulence of pks+ K1 CC23 *Klebsiella pneumoniae* in Mouse Meningitis Infections. *Front Cell Infect Microbiol.* 31 mars 2017;7.
64. Olier M, Marcq I, Salvador-Cartier C, Secher T, Dobrindt U, Boury M, et al. Genotoxicity of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microbes.* 1 nov 2012;3(6):501-9.
65. Pérez-Berezo T, Pujo J, Martin P, Le Faouder P, Galano J-M, Guy A, et al. Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Nat Commun.* 03 2017;8(1):1314.
66. Vassiliadis G, Destoumieux-Garzón D, Lombard C, Rebuffat S, Peduzzi J. Isolation and Characterization of Two Members of the Siderophore-Microcin Family, Microcins M and H47. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2010;54(1):288-97.

67. Massip C, Branchu P, Bossuet-Greif N, Chagneau CV, Gaillard D, Martin P, et al. Deciphering the interplay between the genotoxic and probiotic activities of *Escherichia coli* Nissle 1917. Coombes BK, éditeur. *PLOS Pathog.* 23 sept 2019;15(9):e1008029.
68. Brotherton CA, Balskus EP. A Prodrug Resistance Mechanism Is Involved in Colibactin Biosynthesis and Cytotoxicity. *J Am Chem Soc.* 6 mars 2013;135(9):3359-62.
69. Mousa JJ, Newsome RC, Yang Y, Jobin C, Bruner SD. ClbM is a versatile, cation-promiscuous MATE transporter found in the colibactin biosynthetic gene cluster. *Biochem Biophys Res Commun.* 22 janv 2017;482(4):1233-9.
70. Cougnoux A, Gibold L, Robin F, Dubois D, Pradel N, Darfeuille-Michaud A, et al. Analysis of structure-function relationships in the colibactin-maturing enzyme ClbP. *J Mol Biol.* 7 déc 2012;424(3-4):203-14.
71. Bian X, Fu J, Plaza A, Herrmann J, Pistorius D, Stewart AF, et al. In vivo evidence for a prodrug activation mechanism during colibactin maturation. *Chembiochem Eur J Chem Biol.* 8 juill 2013;14(10):1194-7.
72. Healy AR, Herzon SB. Molecular Basis of Gut Microbiome-Associated Colorectal Cancer: A Synthetic Perspective. *J Am Chem Soc.* 25 2017;139(42):14817-24.
73. Taieb F, Petit C, Nougayrède J-P, Oswald E. The Enterobacterial Genotoxins: Cytotoxic Distending Toxin and Colibactin. *EcoSal Plus.* 2016;7(1).
74. Faïs T, Delmas J, Barnich N, Bonnet R, Dalmasso G. Colibactin: More Than a New Bacterial Toxin. *Toxins.* 10 2018;10(4).
75. Bossuet-Greif N, Dubois D, Petit C, Tronnet S, Martin P, Bonnet R, et al. *Escherichia coli* ClbS is a colibactin resistance protein. *Mol Microbiol.* mars 2016;99(5):897-908.
76. Molan K, Podlesek Z, Hodnik V, Butala M, Oswald E, Žgur Bertok D. The *Escherichia coli* colibactin resistance protein ClbS is a novel DNA binding protein that protects DNA from nucleolytic degradation. *DNA Repair.* 2019;79:50-4.
77. Molan K, Podlesek Z, Hodnik V, Butala M, Oswald E, Žgur Bertok D. The *Escherichia coli* colibactin resistance protein ClbS is a novel DNA binding protein that protects DNA from nucleolytic degradation. *DNA Repair.* 1 juill 2019;79:50-4.
78. Shine EE, Xue M, Patel JR, Healy AR, Surovtseva YV, Herzon SB, et al. Model Colibactins Exhibit Human Cell Genotoxicity in the Absence of Host Bacteria. *ACS Chem Biol.* 21 déc 2018;13(12):3286-93.
79. Reuter C, Alzheimer M, Walles H, Oelschlaeger TA. An adherent mucus layer attenuates the genotoxic effect of colibactin. *Cell Microbiol.* 2018;20(2):e12812.
80. Wallenstein A, Rehm N, Brinkmann M, Selle M, Bossuet-Greif N, Sauer D, et al. ClbR Is the Key Transcriptional Activator of Colibactin Gene Expression in *Escherichia coli*. Ellermeier CD, éditeur. *mSphere.* 26 août 2020;5(4):mSphere.00591-20, e00591-20.
81. Xue M, Kim CS, Healy AR, Wernke KM, Wang Z, Frischling MC, et al. Structure elucidation of colibactin and its DNA cross-links. *Science.* 6 sept 2019;365(6457):eaax2685.
82. Dziubańska-Kusibab PJ, Berger H, Battistini F, Bouwman BAM, Iftekhar A, Katainen R, et al. Colibactin DNA-damage signature indicates mutational impact in colorectal cancer. *Nat Med.* juill 2020;26(7):1063-9.
83. Vizcaino MI, Crawford JM. The colibactin warhead crosslinks DNA. *Nat Chem.* mai 2015;7(5):411-7.

84. Bossuet-Greif N, Vignard J, Taieb F, Mirey G, Dubois D, Petit C, et al. The Colibactin Genotoxin Generates DNA Interstrand Cross-Links in Infected Cells. *mBio*. 20 2018;9(2).
85. Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède J-P. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 juin 2010;107(25):11537-42.
86. Secher T, Samba-Louaka A, Oswald E, Nougayrède J-P. *Escherichia coli* Producing Colibactin Triggers Premature and Transmissible Senescence in Mammalian Cells. Sherman M, éditeur. *PLoS ONE*. 8 oct 2013;8(10):e77157.
87. Santé publique France - Cancer colorectal [Internet]. Santé publique France. [cité 8 sept 2020]. Disponible sur: /maladies-et-traumatismes/cancers/cancer-du-colon-rectum
88. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 17 déc 2009;361(25):2449-60.
89. OMS | Centre international de recherche sur le cancer [Internet]. WHO. World Health Organization; [cité 8 sept 2020]. Disponible sur: <http://www.who.int/about/iarc/fr/>
90. Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol*. mars 2013;35(2):229-44.
91. Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, Fan T-J, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*. 5 oct 2012;338(6103):120-3.
92. Dejea CM, Fathi P, Craig JM, Boleij A, Taddese R, Geis AL, et al. Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science*. 02 2018;359(6375):592-7.
93. Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, Rosendahl Huber A, van Hoeck A, Wood HM, Nomburg J, et al. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+ *E. coli*. *Nature*. 2020;580(7802):269-73.
94. Ullman TA, Itzkowitz SH. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*. mai 2011;140(6):1807-16.
95. Taylor CT, Colgan SP. Hypoxia and gastrointestinal disease. *J Mol Med Berl Ger*. déc 2007;85(12):1295-300.
96. Glover LE, Colgan SP. Hypoxia and Metabolic Factors that Influence IBD Pathogenesis. *Gastroenterology*. mai 2011;140(6):1748-55.
97. Vaupel P, Mayer A, Höckel M. Tumor Hypoxia and Malignant Progression. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2004 [cité 8 sept 2020]. p. 335-54. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687904810231>
98. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. janv 2002;2(1):38-47.
99. Wernke KM, Xue M, Tirla A, Kim CS, Crawford JM, Herzon SB. Structure and bioactivity of colibactin. *Bioorg Med Chem Lett*. 1 août 2020;30(15):127280.
100. Li Z-R, Li J, Cai W, Lai JYH, McKinnie SMK, Zhang W-P, et al. Macrocyclic colibactin induces DNA double-strand breaks via copper-mediated oxidative cleavage. *Nat Chem*. oct 2019;11(10):880-9.
101. Amoutzias GD, Chaliotis A, Mossialos D. Discovery Strategies of Bioactive Compounds Synthesized by Nonribosomal Peptide Synthetases and Type-I Polyketide Synthases Derived from Marine Microbiomes. *Mar Drugs*. 16 avr 2016;14(4).

102. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6 juin 2000;97(12):6640-5.
103. Brodl E, Winkler A, Macheroux P. Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence. *Comput Struct Biotechnol J*. 2018;16:551-64.
104. Zhou K, Zhou L, Lim Q 'En, Zou R, Stephanopoulos G, Too H-P. Novel reference genes for quantifying transcriptional responses of *Escherichia coli* to protein overexpression by quantitative PCR. *BMC Mol Biol*. 23 avr 2011;12(1):18.
105. Dubbert S, Klinkert B, Schimiczek M, Wassenaar TM, von Büнау R. No Genotoxicity Is Detectable for *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 by Standard In Vitro and In Vivo Tests. *Eur J Microbiol Immunol*. 7 avr 2020;10(1):11-9.
106. Collins S, Verdu E, Denou E, Bercik P. The role of pathogenic microbes and commensal bacteria in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Basel Switz*. 2009;27 Suppl 1:85-9.
107. Zhu W, Winter MG, Byndloss MX, Spiga L, Duerkop BA, Hughes ER, et al. Precision editing of the gut microbiota ameliorates colitis. *Nature*. 11 janv 2018;553(7687):208-11.
108. Zhu W, Miyata N, Winter MG, Arenales A, Hughes ER, Spiga L, et al. Editing of the gut microbiota reduces carcinogenesis in mouse models of colitis-associated colorectal cancer. *J Exp Med*. 07 2019;216(10):2378-93.
109. Cougnoux A, Delmas J, Gibold L, Faïs T, Romagnoli C, Robin F, et al. Small-molecule inhibitors prevent the genotoxic and protumoural effects induced by colibactin-producing bacteria. *Gut*. févr 2016;65(2):278-85.
110. Zhang Z, Chen F, Shang L. Advances in antitumor effects of NSAIDs. *Cancer Manag Res*. 2018;10:4631-40.
111. Biancone L, Petruzzello C, Calabrese E, Zorzi F, Naccarato P, Onali S, et al. Long-term safety of Infliximab for the treatment of inflammatory bowel disease: does blocking TNFalpha reduce colitis-associated colorectal carcinogenesis? *Gut*. déc 2009;58(12):1703.
112. Baars JE, Looman CWN, Steyerberg EW, Beukers R, Tan ACITL, Weusten BLAM, et al. The risk of inflammatory bowel disease-related colorectal carcinoma is limited: results from a nationwide nested case-control study. *Am J Gastroenterol*. févr 2011;106(2):319-28.
113. Roda G, Jharap B, Neeraj N, Colombel J-F. Loss of Response to Anti-TNFs: Definition, Epidemiology, and Management. *Clin Transl Gastroenterol*. 7 janv 2016;7:e135.
114. Yang Y, Gharaibeh RZ, Newsome RC, Jobin C. Amending microbiota by targeting intestinal inflammation with TNF blockade attenuates development of colorectal cancer. *Nat Cancer*. juill 2020;1(7):723-34.
115. Murase K, Martin P, Porcheron G, Houle S, Helloin E, Pénary M, et al. HlyF Produced by Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Is a Virulence Factor That Regulates Outer Membrane Vesicle Biogenesis. *J Infect Dis*. 1 mars 2016;213(5):856-65.

Annexes

Annexe 1 : Liste des souches de *E. coli* utilisées lors de cette étude

Tableau 2 : Souches bactériennes utilisées lors de cette étude et antibiotiques associés

Cm : Chloramphénicol ; *Cb* : Carbéniciline ; *St* : Streptomycine ; *Km* : Kanamycine

Souche bactérienne	Caractéristiques	Antibiotiques ajoutés	Source
<i>E. coli</i> DH10B- <i>pks</i>	DH10B transformée avec pBAC- <i>pks</i>	Cm 25 µg/mL	(52)
<i>E. coli</i> DH10B- <i>pks</i> Δ <i>clbS</i>	Mutant <i>clbS</i> DH10B pBAC- <i>pks</i>	Cm 25 µg/mL	(75)
<i>E. coli</i> DH10B- <i>pks</i> Δ <i>clbS</i> + pClbS	Mutant <i>clbS</i> transformé avec pASK75- <i>clbS</i>	Cm 25 µg/mL et Cb 50 µg/mL	(75)
<i>E. coli</i> SP15	Souche isolée de méningite néonatale, <i>pks</i> ⁺ sauvage	St 50 µg/mL	(115)
<i>E. coli</i> SP15 <i>lux</i>	SP15 transformée avec pCM17	St et Km 50 µg/mL	L'équipe
<i>E. coli</i> SP15 <i>lux-clbB</i>	SP15 transformée avec pCM17- <i>lux-clbB</i>	St et Km 50 µg/mL	Cette étude

Annexe 2 : Données de matériel et méthodes supplémentaires

A. Conditions de culture des souches de *E. coli* DH10B

Les souches de *E. coli* DH10B ont été cultivées en routine à 37°C avec une agitation à 240 rpm dans 4mL de bouillon LB (Lysogeny Broth-Lennox, Invitrogen) à partir d'un stock de glycérol à -80°C. Les antibiotiques associés ont été ajoutés au milieu selon les besoins (**Tableau1**).

Chaque souche DH10B a été cultivée en LB pour atteindre une croissance exponentielle ($DO_{600} = 0,4$), puis inoculée à $2 \cdot 10^6$ bactéries/mL selon les expériences. Pour les expérimentations non maîtrisées en oxygène, les bactéries ont été cultivées pendant 17h soit dans 5mL dans des tubes fermés de 10mL (Kima) soit dans des tubes ouverts de 50mL (Falcon). Pour les expérimentations maîtrisées en oxygène, les bactéries ont été cultivées pendant 17h dans 3mL de LB dans des tubes à bouchons aérés de 14mL (Falcon) soit à 0,1% d'oxygène (sous station hypoxie) soit à 21% (agitation classique).

B. Dénombrement des bactéries

Des géloses LB contenant les antibiotiques correspondant aux souches testées sont préparées (**Tableau 1**). 50µL d'échantillons bactériens obtenus après culture sont dilués au $1/10^{\text{ème}}$ dans des microtubes de dénombrement préremplis de PBS. De nouvelles dilutions au $1/10^{\text{ème}}$ sont effectuées dans du PBS jusqu'à la dilution finale de 10^{-6} . 3 dépôts de 10µL des dilutions au 10^{-5} et 10^{-6} sont ensemencés sur la gélose et incubés à 37°C. Au bout de 16h d'incubation, les colonies bactériennes sont dénombrées et une moyenne est calculée.

C. Mesure de l'activité de la colibactine

Les ponts inter-brins de l'ADN sont mis en évidence par migration de l'ADN en conditions dénaturantes (84).

1. Test du pontage inter-brins de l'ADN *in vitro*

L'ADN du plasmide pUC19 est linéarisé après digestion par l'enzyme de restriction BamHI (NEB) et purifié avec un kit de PCR QIAquick de Qiagen puis conservé à -20°C. L'ADN plasmidique est exposé aux bactéries produisant la colibactine dans des microtubes de 0,5mL. 500ng d'ADN sont inoculés avec 100µl de bactéries après les 3h30h de culture. Un inhibiteur de nucléase, l'EDTA (1mM) est ajouté puis le mélange est incubé pendant 40min à 37°C sous la station hypoxie ou sous PSM en atmosphère ambiante pour la condition à 21% d'oxygène.

2. Purification de l'ADN

Après l'interaction ADN/bactéries, les microtubes sont centrifugés puis le surnageant est prélevé dans de nouveaux microtubes de 2mL. L'ADN est purifié avec le kit « PCR purification Kit» de Qiagen et élué dans 37µl avec le tampon EB. L'ADN est dosé au Tecan Infinite Pro microplate reader et conservé à -20°C.

3. Electrophorèse d'ADN sur gel dénaturant

Des gels d'agarose à 1 % sont préparés dans une solution de 2mM NaCl, 100mM EDTA (pH 8). Après dépôt des échantillons, l'ADN est soumis à migration par électrophorèse (45min à 25V puis 2h à 50V) en conditions alcalines dénaturantes de 1mM NaOH, 40mM EDTA, permettant la séparation des deux brins d'ADN. Après neutralisation pendant 1h dans 100mM NaCl, 150mM Tris (pH 7,4), l'ADN est coloré pendant 20min dans une solution de GelRed (Biotium) et visualisé en évitant la saturation des pixels du dispositif à couplage de charge (CCD) dans un système Bio-Rad Chemidoc XRS. Ces images sont analysées pour quantification de l'intensité des pixels des bandes du gel avec le logiciel ImageJ et le pourcentage d'ADN non dénaturé, c'est-à-dire ayant subi le pontage inter-brins, est calculé.

D. Mesure de la bioluminescence

La Luciférase catalyse la réaction de bioluminescence en oxydant la Luciférine en OxyLuciférine en présence d'oxygène, d'ATP et de magnésium. Ceci provoque l'émission de photons à la longueur d'onde de 590nm (103). L'expression du gène *clbB* de l'îlot *pks* est obtenue par mesure de la bioluminescence délivrée par l'expression de l'opéron *lux* contrôlé par le promoteur du gène *clbB* inséré dans pCM17. 100µl d'échantillons bactériens, obtenus après les 3h30 de culture à différentes concentrations en oxygène, sont déposés dans une microplaque 96 puits à fond transparent. La lecture de la bioluminescence est effectuée par le Tecan Infinite Pro microplate reader après acheminement rapide de la microplaque afin de limiter l'échange avec l'oxygène ambiant. La visualisation de la bioluminescence est obtenue avec un système Bio-Rad Chemidoc XRS.

E. qRT-PCR

1. Recueil des culots bactériens

A l'issue des 3h30 de culture sous le taux d'oxygène testé, 800µL de culture sont transférés dans un microtube de 1,5mL puis centrifugé à 5000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est aspiré en totalité afin d'obtenir un culot sec de bactéries. Les échantillons sont conservés à -80°C en attendant leur utilisation.

2. Extraction des ARNm totaux

Les ARNm totaux sont extraits des culots bactériens à l'aide du kit RNeasy Plus (Qiagen) selon le protocole du fabricant. Les bactéries sont lysées par ajout de lysozyme pendant 5 min à température ambiante. Après ajout du chloroforme, les échantillons sont vortexés vigoureusement puis centrifugés pendant 30 s à 10000 rpm. La partie aqueuse contenant les ARNm est prélevée et mise en présence de 450µL d'éthanol à 70% pour la précipitation. Les échantillons sont transférés dans des colonnes RNeasy pour centrifugations. Les ARNm sont élués dans 30µL d'eau sans RNase. Après extraction, j'ai vérifié l'intégrité des ARNm 23S et 16S par migration de 2µL sur gel d'agarose 1%. Ils sont enfin dosés au Tecan Infinite Pro microplate reader puis conservés à -80°C.

3. Transcription inverse des ARNm

Pour obtenir de l'ADNc, des échantillons de 2µg d'ARNm sont utilisés pour effectuer la transcription inverse avec le kit de synthèse d'ADNc I-script (Bio-Rad) dans un volume total de 40µL. La réaction démarre à 25°C pour l'amorçage pendant 5 min puis se déroule à 46°C pendant 20 min, enfin l'enzyme est inactivé à 95°C pendant 1 min. Les échantillons d'ADNc sont conservés à -20°C.

4. PCR quantitative en temps réel

L'analyse de l'expression du gène *clbB* a été effectuée par PCR quantitative. Pour les conditions de culture utilisées, l'expression du gène de ménage *cysG* codant pour une ferrocélatase impliquée dans la synthèse de sirohème chez *E. coli* et déjà décrit comme gène de référence a été utilisée (104).

Une gamme étalon pour chacun des gènes a été utilisée comme matrice pour les qPCR afin d'établir des courbes standards. Pour obtenir la gamme de *clbB* et de *cysG*, des PCR classiques ont été réalisées à l'aide d'amorces amplifiant un fragment d'environ 500pb. La PCR est effectuée à partir du génome SP15 avec les amorces NG49/NG50 et NG53/NG54 respectivement (**Tableau 3**). Après purification et dosage de l'ADN, on en déduit la concentration en ADN qui est transformée en nombre de molécules d'ADN (N) par µL selon la formule : $N = 6,01 \cdot 10^{23} \times [\text{ADN}](\text{g}/\mu\text{L}) / (660 (\text{g}/\text{mol ADN double brin}) \times \text{taille de l'amplicon (bp)})$. Le produit d'amplification est ensuite dilué dans un volume d'eau approprié pour obtenir $5 \cdot 10^9$ molécules d'ADN/µL. A partir de cette solution mère, des dilutions en série décimales sont réalisées jusqu'à $5 \cdot 10^1$ copies/µL pour constituer les échantillons de la gamme étalon.

Les ADNc sont quantifiés en même temps que les gammes étalons. Les qPCR sont effectuées avec le supermix iQ SYBR Green (Bio-Rad) dans l'appareil Thermalcycler (Bio-rad) à partir de 2µl d'échantillons d'ADNc ou de chaque concentration des gammes standards et 187,5nM des amorces NG61/NG62 (*clbB*) ou NG55/NG56 (*cysG*) (**Tableau 3**). Pour chaque Ct obtenu avec des échantillons d'ADNc, nous déduisons une quantité de nombre de copies/µl pour *clbB* et *cysG* en utilisant les courbes des gammes étalons correspondantes. Des contrôles sont effectués sur les échantillons d'ADN avant leur rétro-transcription afin de s'assurer qu'il ne persiste pas d'ADN. Des contrôles négatifs avec 2µl d'eau à la place de l'ADNc sont également réalisés.

L'expression du gène *clbB* à différentes concentrations d'oxygène est calculée par le rapport *clbB/cysG* du nombre de copies/µl d'ARNm avec la normalisation à 100% pour la moyenne à la condition 0% d'oxygène. Les résultats de la qPCR proviennent de trois expériences indépendantes et chaque qPCR est effectuée en triplicat.

Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour la qRT-PCR

Amorce	Séquence	Cible	Source
NG49	AAACAACAAGGGGCTGACAC	Gamme <i>clbB</i>	Cette étude
NG50	CAGTCAGCGCCACATGTAAG		Cette étude
NG53	CGCCAGCTTTATTATGCCGT	Gamme <i>cysG</i>	Cette étude
NG54	GTAGACCACCACATCTGCCT		Cette étude
NG61	ACCGAATCAGTATGAAAACCAG	qPCR <i>clbB</i>	Cette étude
NG62	GCACACTATCACTCCTCCAAC		Cette étude
NG55	TGGGCCAGGTAGCGAA	qPCR <i>cysG</i>	Cette étude
NG56	GGACCTGCACCAACCA		Cette étude

F. Extraction et dosage des métabolites lipidiques

Les extractions lipidiques réalisées en collaboration avec Nicolas CENAC (Equipe 3 de l'Institut de Recherche en Santé Digestive) nous ont permis de doser le C14-Asn dans nos cultures bactériennes.

1. Recueil des surnageants

A l'issue des 3h30 de culture sous le taux d'oxygène testé, 1,5mL de culture sont transférés dans un microtube puis centrifugé à 5000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est transféré dans un microtube de 1,5mL propre après passage dans un filtre PVDF avec des pores 0,22µm (Millipore). Les échantillons sont conservés à -80°C avant extraction des lipides.

2. Extraction des lipides

Les surnageants obtenus ont été soumis à une extraction lipidique sur phase solide en utilisant une plaque HLB (OASIS HLB 2mg, 96 well plate, Waters, Ireland). Pour cela la plaque HLB a été conditionnée par 500 µL de MeOH puis par 500 µL de MeOH/H₂O (10%/90%). 1mL d'échantillon a été mélangé avec 5µL de mélange standard interne (composés marqués au deutérium, 400 ng/mL), 300µL de méthanol froid et 700µL d'eau milliQ. Les échantillons ont été chargés sur la plaque à un débit de flux d'environ une goutte par 2 secondes. Après passage complet, les colonnes ont été lavées par 500 µL de MeOH 10% et séchées par aspiration à la pression de 0,6 bar pendant 1 minute. Par la suite les extraits lipidiques ont été élués avec 1 mL de MeOH. L'éluat est évaporé à sec sous azote puis repris dans 2x70 µL de MeOH. Après nouvelle évaporation à sec dans un vial contenant un insert, les extraits sont resuspendus dans 10 µL de MeOH et conservés à -80°C avant l'analyse chromatographique.

3. Dosage des lipides

Le dosage a été réalisé par la plateforme Métatoul-Lipidomique, I2MC, Toulouse, France. Les lipides contenus dans les échantillons ont été identifiés et quantifiés par un couplage de la chromatographie en phase liquide (HPLC, Agilent LC1290 infinity) avec la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS ; Agilent G6460 triple quadripôle MS, Agilent Technologies) (LC-MS/MS). Les données ont été acquises en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) dans des conditions optimales. La détection des pics, l'intégration et l'analyse quantitative ont été réalisées en utilisant le logiciel Mass Hunter Quantitative analysis (Agilent Technologies).

G. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée sur le logiciel GraphPad Prism 8. La moyenne +/- l'écart type de la moyenne sont représentés sur les figures. Pour les comparaisons de moyennes, un test d'analyse de variance à un facteur contrôlé (One Way-ANOVA) est utilisé avec un post-test de Tukey en comparaison avec la concentration à 0% d'oxygène. Les UFC/mL ont été transformés en logarithme pour les analyses statistiques. Les données de bioluminescence Lux sont normalisées par le log des UFC. Une p-valeur est considérée significative si inférieure à 0,05 et notée * ; $p < 0,01$ est notée **, $p < 0,001$ est notée ***.

Annexe 3 : Calculs des concentrations en oxygène en pourcentage

Tableau 4 : Calculs des pourcentages en oxygène selon la distribution des pressions partielles en oxygène le long de l'axe transversal intestinal chez l'Homme D'après (32).

Localisation	pO₂ (mmHg)	O₂ (%)
Lumière intestinale	0,1	0%
Mucus	1	1%
Cellules épithéliales	30	4%
Creux de la crypte	90	13%
Atmosphère ambiant	159	21%

SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances

- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement

- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité

- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession

- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens

- De coopérer avec les autres professionnels de santé

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Abstract

Impact of oxygen availability on genotoxicity of *Escherichia coli* producing colibactin

Escherichia coli is a facultative aero-anaerobic bacterium, commensal of the digestive tract of humans and warm-blooded animals. Some strains harbor virulence factors, such as the *pks* pathogenicity island. This island encodes for a multienzymatic machinery that synthesizes the colibactin, a genotoxin capable of inducing highly mutagenic DNA damage. Chronic intestinal inflammation is an identified risk factor for colorectal cancer. It leads to an increase in intestinal oxygenation and thus promotes the growth of endogenous enterobacteria, including *E. coli pks+*, which can cause carcinogenic lesions of the colon. It leads to an increase in intestinal oxygenation and thus promotes growth of *E. coli pks+*, which can cause cancerous lesions of the colon. At the same time, areas of hypoxia are present during intestinal infections and also in certain tumor areas.

The objective of my study was to determine whether oxygen impacts on the production and genotoxicity of colibactin in *E. coli*. Using different experimental approaches, I was able to confirm this hypothesis *in vitro*. Indeed, genotoxin is produced and activated significantly in anoxic conditions. Thus, colibactin toxicity in hypoxic intestinal areas could favor the genotoxicity of *E. coli pks+*, and ultimately the development of colorectal tumors.

This study is a step towards a better understanding of colibactin regulation in *E. coli pks+*, to provide information to better understand the pathogenesis of *E. coli* strains producing genotoxic colibactin, as well as the identification of new therapeutic targets.

KEY WORDS : *Escherichia coli*, colibactin, oxygen, inflammation, colorectal cancer

GUYONNET Cécile

**IMPACT DE LA DISPONIBILITE EN OXYGENE SUR LA GENOTOXICITE
DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUISANT LA COLIBACTINE**

RESUME :

Escherichia coli est une bactérie aéro-anaérobie facultative, commensale du tube digestif de l'Homme et des animaux à sang chaud. Certaines souches sont porteuses de facteurs de virulence, tel que l'îlot de pathogénicité *pks*. Cet îlot code pour une machinerie multienzymatique qui synthétise une génotoxine, la colibactine, capable d'induire des lésions très mutagènes de l'ADN. L'inflammation intestinale chronique est un facteur de risque identifié du cancer colorectal. Elle entraîne une augmentation de l'oxygène intestinal et favorise ainsi la croissance des entérobactéries endogènes dont les *E. coli pks+* pouvant provoquer des lésions cancérogènes du côlon. Dans un même temps, des zones d'hypoxies sont présentes lors d'infections intestinales et également au sein des tissus tumoraux.

L'objectif de mon étude consistait à déterminer si l'oxygène impacte directement sur la production et la génotoxicité de la colibactine chez *E. coli*. Grâce à différentes approches expérimentales, j'ai pu confirmer cette hypothèse *in vitro*. En effet, la génotoxine est produite et activée de façon importante en condition d'anoxie. Ainsi, la génotoxicité de la colibactine au niveau de zones hypoxiques intestinales pourrait favoriser le développement de tumeurs colorectales.

Cette étude encourage à poursuivre nos recherches *in vivo*. En effet, une meilleure compréhension de la régulation de la colibactine chez *E. coli pks+* apportera des informations permettant de mieux appréhender la pathogénèse des souches de *E. coli* productrices de colibactine génotoxique ainsi que l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Titre et résumé en anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative : Biologie Médicale

MOTS-CLES : *Escherichia coli*, colibactine, oxygène, inflammation, cancer colorectal

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Institut de Recherche en Santé Digestive
Inserm UMR1220, IRSD – UMR1220
CHU de Toulouse – Hôpital Purpan – BP3028
Place du Docteur Baylac
31024 Toulouse Cedex 3, France

Directeur de thèse : Monsieur le Pr Eric OSWALD