



HAL
open science

Des Escherichia coli génotoxiques qui attaquent le génomme de l'hôte

Jean-Philippe Nougayrède

► **To cite this version:**

Jean-Philippe Nougayrède. Des Escherichia coli génotoxiques qui attaquent le génomme de l'hôte. Bactériologie. Univ. Toulouse 3, 2020. tel-03117084

HAL Id: tel-03117084

<https://hal.inrae.fr/tel-03117084>

Submitted on 20 Jan 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Mémoire pour l'obtention d'une Habilitation à Diriger des Recherches

sur le thème

Des *Escherichia coli* génotoxiques qui attaquent le génome de l'hôte

par **Jean-Philippe Nougayrède**
chercheur à l' INRAE

Equipe Pathogénie et commensalisme des entérobactéries
Institut de recherche en santé digestive
Inserm UMR 1220, INRAE UMR 1416, ENVT, UPS
Toulouse

HDR soutenue en visioconférence
le 28 octobre 2020
devant le jury :

Dr. Isabelle Schalk
Dr. Philippe Langella
Pr. Olivier Tenaillon
Pr. Guy Tran-Van-Nhieu
Pr. Eric Oswald



« Tout vient à point a qui sait attendre » ou « tout ça pour ça », le lecteur choisira le sous-titre le plus adapté à ce mémoire. Peu conscient de l'(in)utilité du diplôme d'HDR¹ je n'ai eu de cesse d'en repousser la rédaction depuis 2011. *Mea culpa*, mes collègues de l'INRAE ! Je prends pour excuse d'avoir consacré le maximum de mon temps diurne à la recherche (y compris de financement) pour construire le cheminement scientifique présenté ici.

¹ J'invite le lecteur à lire le chapitre consacré à l'HDR dans le rapport « Priorité à la recherche, Quelle recherche pour demain, 60 propositions pour améliorer la synergie entre recherche et enseignement supérieur, l'autonomie des jeunes, l'évaluation, la mobilité et les échanges » par Pierre COHEN et Jean-Yves LE DÉAUT (1999)

Remerciements

Mon chemin de chercheur n'aurait pas été le même sans des rencontres décisives, avec par ordre chronologique :

Jean De Rycke, Eric Oswald, Alain Milon, Michèle Boury, Claude Watrin, Mike Donnenberg, Frédéric Taieb, Ascel Samba-Louaka, Ulrich Dobrindt, Jorg Hacker, Isabelle Oswald, Claude Petit, Gabriel Cuevas-Ramos, Damien Dubois, Patricia Martin, Ingrid Marcq, Nadège Bossuet-Greif, Priscilla Branchu, Camille Chagneau...

Je pense à l'ensemble de mes collaborateurs/trices avec qui j'ai eu, ai, aurais encore plaisir à échanger :

Alain Milon, Ascel Samba-Louaka, Ayaka Shima, Camille Chagneau, Cécile Guyonnet, Christian Tasca, Christine Peres, Christophe Garcie, Claude Petit, Claude Watrin, Clémence Massip, Damien Dubois, Delphine Payros, Emilie Cloup, Emilie Deshayes, Emmanuelle Helloin, Eric Oswald, France Daigle, Frédéric Auvray, Frédéric Hérault, Frédéric Taieb, Gabriel Cuevas-Ramos, Gladys Mirey, Grégory Jubelin, Hubert Brugère, Ingrid Marcq, Isabelle Oswald, Jean De Rycke, Jean-Paul Motta, Jörg Hacker, Jörn Piel, Julien Vignard, Katsunori Murase, Laure David, Laurent Cavalié, Maiwenn Olier, Marcy Belloy, Marie Penary, Marion Garofalo, Mélanie Duplan, Michèle Boury, Mike Donnenberg, Min Tang, Muriel Thomas, Nadège Bossuet-Greif, Olga Revelles, Olivier Baron, Olivier Marchès, Patricia Martin, Pauline Floch, Philippe Langella, Philippe Pinton, Pierre Millard, Priscilla Branchu, Richard Bonnet, Rika Nobe, Sophie Tronnet, Sylvie Pérès, Thomas Secher, Ulrich Dobrindt, Xavier Mas-Orea

A mes proches Peggy, Marion, Thomas, Anne, Jo & Jean, pour leur soutien de toujours.

Merci à Isabelle Schalk, Philippe Langella, Olivier Tenailon et Guy Tran-Van-Nhieu de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail.

Table des matières

<i>Curriculum vitae</i>	4
<i>Avant-propos : contexte général de mes travaux</i>	15
<i>1- Escherichia coli, un commensal, un organisme modèle et un agent pathogène majeur</i>	18
<i>2- Des toxines classiques, du cytosquelette au cycle cellulaire</i>	23
<i>3- La seringue moléculaire des E. coli entéropathogènes: rôle dans la pathogenèse in vivo</i>	26
<i>4- Un pirate multifonctionnel des jonctions serrées et des mitochondries : l'effecteur EspF des EPEC</i>	29
<i>5- Cif, un nouvel effecteur des EPEC qui module le cycle cellulaire eucaryote</i>	34
<i>6- L'ennemi de l'intérieur ? Des E. coli bloquent le cycle cellulaire en endommageant l'ADN des cellules eucaryotes</i>	40
<i>7- La voie de synthèse de la colibactine : un rôle dans la virulence</i>	47
<i>8- Une toxine mutagène produite dans l'intestin</i>	49
<i>9- Un probiotique... génotoxique !</i>	54
<i>10- Comment produire une génotoxine sans s'intoxiquer soi-même ?</i>	56
<i>11- Interactions fonctionnelles entre les voies de biosynthèse de la colibactine et des sidérophores</i>	59
<i>12- Elucidation du mode d'action de la colibactine : un pont dans l'hélice d'ADN</i>	63
<i>Un petit bilan et quelques perspectives</i>	68
<i>Bibliographie</i>	82

Curriculum vitae

Jean-Philippe Nougayrède

Né 7 octobre 1969, marié, deux enfants

Equipe "Pathogénèse et commensalisme des entérobactéries"
Institut de Recherche en Santé Digestive (IRSD)
INSERM U1220, INRA UMR1416, ENVT, UT3
Bat B, CHU Purpan, CS 60039, 31024 Toulouse
Mèl : jean-philippe.nougayrede@inserm.fr ou jean-philippe.nougayrede@inrae.fr
Web : <http://www.irsd.fr/>
Tel : 05 62 74 45 25

I – FORMATION UNIVERSITAIRE

1991-1994 **DEUG B** Sciences de la Vie, option Biométrie et Informatique,
LICENCE de Biologie Cellulaire et Physiologie,
MAITRISE de Microbiologie (Université Paul Sabatier, Toulouse).

09/1994 – 07/1996 **DESU** puis **DEA**, au laboratoire de Microbiologie Moléculaire INRA-ENV
Toulouse. Travaux sur les toxines bactériennes CNF et CDT dans un modèle d'interaction in vitro
E. coli pathogènes et cellules en culture. Diplôme de DEA d'Ecologie Microbienne (Université
Claude Bernard, Lyon 1) obtenu avec la mention bien.
Rang: 1^{er}.

09/1996 – 05/2000 **DOCTORAT** au laboratoire de Microbiologie Moléculaire, INRA-ENV
Toulouse. Rôle de EspA –B –D, de l'intimine et de son récepteur Tir dans le pouvoir pathogène
des E. coli entéropathogènes O103. Financement DGER/Société Biové. Diplôme de DOCTORAT
de Microbiologie obtenu le 16 Mai 2000 (Université Claude Bernard, Lyon 1) avec la mention
très honorable.

II – PARCOURS PROFESSIONNEL (après le doctorat)

07/2000 – 07/2003 **Research associate** (laboratoire du Pr. Donnenberg, University of
Maryland, Baltimore, USA). Travaux sur la caractérisation de l'effecteur EspF dans le pouvoir
pathogène des E. coli entéropathogènes et mise en évidence de sa cible eucaryote. Financement
NIH.

08/2003 – 05/2006 **Chercheur contractuel** (UMR1225, INRA-ENV Toulouse).
Travaux sur les nouveaux effecteurs et toxines de E. coli interférant avec le cycle cellulaire et le
génomme de l'hôte. Financement UE/ANR.

08/2006 – 07/2010 **Chargé de recherche INRA 2nd classe** (INRA UMR1225, ENV
Toulouse).

08/2010 – 12/2015 **Chargé de recherche INRA 1^{ère} classe** (INRA USC1360, centre de
physiopathologie de Toulouse-Purpan).

01/2016 – **Chargé de recherche INRA 1^{ère} classe, CRCN** (INSERM UMR1220, Institut de recherche en santé digestive, Toulouse).

Travaux sur la modulation du cycle cellulaire et l'endommagement du génome des cellules de la barrière intestinale par les entérobactéries.

III – ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT (nature et niveaux des enseignements)

Outre l'encadrement d'étudiants et de thésards, je participe ponctuellement à l'enseignement (séminaires, TD d'analyse d'articles, cours magistraux) en M1 et M2R, quelques heures par an : M1 « Physiopathologie des Infections » (2007-2012), M2R « Immunologie et maladies infectieuses » de l'Université de Toulouse (2010-), M1 et M2R « Santé digestive et Nutrition » (2016-)

IV – ACTIVITES DE RECHERCHE

Thématique de recherche :

Ma thématique de recherche concerne l'examen du dialogue entre le microbiote commensal/pathogène et l'hôte, ainsi que son impact sur sa physiologie et son développement. Mes travaux sont axés sur l'analyse du mode d'action des facteurs de virulence des E. coli avec un focus sur les génotoxines produites par des souches pathogènes mais aussi commensales. J'étudie comment E. coli produit ces génotoxines, et leur impact sur l'homéostasie cellulaire et tissulaire au sein de la crypte intestinale.

Liste des publications internationales et nationales, des proceedings, de brevets, des brevets, des chapitres d'ouvrages et d'ouvrages (titres et noms de tous les auteurs)

Publications dans des journaux à comité de lecture

47 publications, h=30, 3351 citations (Web of Science 26/06/2020)

- 1- De Rycke J, Mazars P, Nougayrède JP, Tasca C, Boury M, Hérault F, Valette A, Oswald E. (1996) Mitotic block and delayed lethality in HeLa cells exposed to Escherichia coli BM2-1 producing cytotoxic necrotizing factor type 1. **Infection and Immunity**. 64:1694.
- 2- De Rycke J, Nougayrède JP, Oswald E Mazars P. (1997) Interaction of Escherichia coli producing cytotoxic necrotizing factor with HeLa epithelial cells. **Advances in experimental medicine and biology**. 412:363.
- 3- Pérès, S, Marchès O, Daigle F, Nougayrède JP, Hérault F, Tasca C, De Rycke J, Oswald E. (1997) A new cytolethal distending toxin from Escherichia coli producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. **Molecular Microbiology**. 24:1095.
- 4- Nougayrède JP, Marchès O, Boury M, Mainil J, Charlier G, Pohl P, De Rycke J, Milon A, Oswald E. (1999) The long-term cytoskeletal rearrangement induced by rabbit enteropathogenic Escherichia coli is Esp-dependent but intimin-independent. **Molecular Microbiology**. 31:19.
- 5- Marchès O, Nougayrède JP, Boullier S, Mainil J, Charlier G, Raymond I, Pohl P, Boury M, De Rycke J, Milon A and Oswald E. (2000) Role of tir and intimin in the virulence of rabbit enteropathogenic Escherichia coli serotype O103:H2. **Infection and Immunity**. 68:2171.

- 6- Nougayrède JP, M. Boury, C. Tasca, O. Marchès, A. Milon, E. Oswald and J. De Rycke. (2001) A type III secretion dependent cell cycle block caused in HeLa cells by enteropathogenic *Escherichia coli* O103. **Infection and Immunity**. 69:6785.
- 7- McNamara BP., Koutsouris A, O'Connell CB, Nougayrède JP, Donnenberg MS Hecht G. (2001) Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. **Journal of Clinical Investigation**. 107:621.
- 8- Boullier S, Nougayrède JP, Marchès O, Tasca C, Boury M, Oswald E, De Rycke J, Milon A. (2003) Genetically engineered enteropathogenic *Escherichia coli* strain elicits a specific immune response and protects against a virulent challenge. **Microbes and Infection**. 5:857.
- 9- Nougayrède JP, Fernandes P, Donnenberg MS. (2003) Adhesion of Enteropathogenic *E. coli* to host cells. **Cellular Microbiology**. 5:359. Revue.
- 10- Nougayrède JP, Donnenberg MS. (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. **Cellular Microbiology***. 6:1097.
- 11- Oswald E, Nougayrède JP, Taieb F, De Sugai M. (2005) Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. **Current Opinion in Microbiology**. 8:83. Revue.
- 12- Nougayrède JP, Taieb F, De Rycke J, Oswald E. (2005) Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. **Trends in Microbiology**. 13:103. Revue.
- 13- Nougayrède JP, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Buchrieser C, Hacker J, Dobrindt U, Oswald E. (2006) *Escherichia coli* induces DNA double strand breaks in eukaryotic cells. **Science**. 313:848.
- 14- Taieb F, Nougayrède JP, Watrin C, Samba A, Oswald E. (2006) *Escherichia coli* cyclomodulin Cif induces G2 host cell cycle arrest without activation of the proximal DNA damage checkpoint signalling pathway. **Cellular Microbiology**. 8:1910.
- 15- Nougayrède JP, Foster G, Donnenberg MS. (2007) Enteropathogenic *Escherichia coli* effector EspF interacts with host protein Abcf2. **Cellular Microbiology**. 9:680.
- 16- Ogura Y, Ooka T, Asadulghani, Terajima J, Nougayrède JP, Kurokawa K, Tashiro K, Tobe T, Nakayama K, Kuhara S, Oswald E, Watanabe H, Hayashi T. (2007) Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. **Genome Biology**. 8:R138.
- 17- Peralta-Ramírez J, Hernandez JM, Manning-Cela R, Luna-Muñoz J, Garcia-Tovar C, Nougayrède JP, Oswald E, Navarro-Garcia F. (2008) EspF interacts with nucleation-promoting factors to recruit junctional proteins into pedestals for their maturation and disruption of the paracellular permeability. **Infection and Immunity**. 76:3854.
- 18- Samba-Louaka A, Nougayrède JP, Watrin C, Jubelin G, Oswald E, Taieb F. (2008) Bacterial cyclomodulin Cif blocks the host cell cycle by stabilizing the cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27. **Cellular Microbiology**. 10:2496.

- 19- Hsu Y, Jubelin G, Taieb F, Nougayrède JP, Oswald E, Stebbins CE. (2008) Structure of the cyclomodulin Cif from pathogenic Escherichia coli. **Journal of Molecular Biology**. 12;384(2):465.
- 20- Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA, Nougayrède JP, Oswald E. (2008) Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the Escherichia coli pks genomic island. **Journal of Clinical Microbiology**. 46:3906.
- 21- Tóth I, Nougayrède JP, Dobrindt U, Ledger TN, Boury M, Morabito S, Fujiwara T, Sugai M, Hacker J, Oswald E. (2009) Cytolethal distending toxin type I and type IV genes are framed with lambdoid prophage genes in extraintestinal pathogenic Escherichia coli. **Infection and Immunity**. 77:492.
- 22- Pinton P, Nougayrède JP, Del Rio JC, Moreno C, Marin DE, Ferrier L, Bracarense AP, Kolf-Clauw M, Oswald IP. (2009) The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 237:41.
- 23- Jubelin G, Chavez CV, Taieb F, Banfield MJ, Samba-Louaka A, Nobe R, Nougayrède JP, Zumbihl R, Givaudan A, Escoubas JM, Oswald E. (2009) Cycle inhibiting factors (CIFs) are a growing family of functional cyclomodulins present in invertebrate and mammal bacterial pathogens. **PLoS ONE**. 4(3):e4855.
- 24- Nobe R, Nougayrède JP, Taieb F, Bardiau M, Cassart D, Navarro-Garcia F, Mainil J, Hayashi T, Oswald E. (2009) Enterohaemorrhagic Escherichia coli serogroup O111 inhibits NF- κ B-dependent innate responses in a manner independent of a type III secreted OspG orthologue. **Microbiology**. 155:3214
- 25- Putze J, Hennequin C, Nougayrède JP, Zhang W, Karch H, Bringer MA, Fayolle C, Carniel E, Rabsch W, Oelschlaeger TA, Oswald E, Forestier C, Hacker J, Dobrindt U (2009) Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among Enterobacteriaceae. **Infection and Immunity**. 77:4696.
- 26- Samba-Louaka A, Taieb F, Nougayrède JP, Oswald E. (2009) Cif type III effector protein : a smart hijacker of the host cell cycle. **Future Microbiology**. 4:867. Revue.
- 27- Samba-Louaka A, Nougayrède JP, Watrin C, Oswald E, Taieb F. (2009) The enteropathogenic Escherichia coli effector Cif induces delayed apoptosis in epithelial cells. **Infection and Immunity**. 77:5471.
- 28- Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède JP. (2010) Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. 107:11537.
- 29- Pinton P, Braicu C, Nougayrède JP, Laffitte J, Taranu I, Oswald IP. (2010) Deoxynivalenol impairs porcine intestinal barrier function and decreases the protein expression of claudin-4 through a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. **Journal of Nutrition**. 140:1956.
- 30- Jubelin G, Taieb F, Duda DM, Hsu Y, Samba-Louaka A, Nobe R, Penary M, Watrin C, Nougayrède JP, Schulman BA, Stebbins CE, Oswald E. (2010) Pathogenic bacteria target

NEDD8-conjugated cullins to hijack host-cell signaling pathways. **PLoS Pathogens**. 6(9) pii: e1001128.

31- Dubois D, Baron O, Cougnoux A, Delmas J, Pradel N, Boury M, Bouchon B, Bringer MA, Nougayrède JP, Oswald E, Bonnet R. (2011) ClbP is a prototype of a peptidase subgroup involved in biosynthesis of nonribosomal peptides. **Journal of Biological Chemistry**. 286(41):35562-70.

32- Taieb F, Nougayrède JP, Oswald E. (2011) Cycle inhibiting factors (cifs): cyclomodulins that usurp the ubiquitin-dependent degradation pathway of host cells. **Toxins** (Basel). 3(4):356-68. Revue.

33- Nougayrède JP, Oswald E. (2011) Microbiota and colorectal cancer: genotoxic bacteria in the intestinal tract. **Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine**. 195(6):1295-304; discussion 1304-5. Revue, en français.

34- Olier M, Marcq I, Salvador-Cartier C, Secher T, Dobrindt U, Boury M, Bacquié V, Pénary M, Gaultier E, Nougayrède JP, Fioramonti J, Oswald E. (2012) Genotoxicity of Escherichia coli Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. **Gut Microbes**. 3(6):501-9.

35- Revelles O, Millard P, Nougayrède JP, Dobrindt U, Oswald E, Létisse F, Portais JC. (2013) The carbon storage regulator (Csr) system exerts a nutrient-specific control over central metabolism in Escherichia coli strain Nissle 1917. **PLoS One**. 8(6):e66386.

36- Martin P, Marcq I, Magistro G, Penary M, Garcie C, Payros D, Boury M, Olier M, Nougayrède JP, Audebert M, Chalut C, Schubert S, Oswald E. (2013) Interplay between Siderophores and Colibactin Genotoxin Biosynthetic Pathways in Escherichia coli. **PLoS Pathogens**. 9(7):e1003437.

37- Nisa S, Hazen TH, Assatourian L, Nougayrède JP, Rasko DA, Donnenberg MS. (2013) In Vitro Evolution of an Archetypal Enteropathogenic Escherichia coli Strain. **Journal of Bacteriology**. 195(19):4476-83

38- Secher T, Samba-Louaka A, Oswald E, Nougayrède JP. (2013) Escherichia coli producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. **PLoS One**. 8(10):e77157.

39- Marcq I, Martin P, Payros D, Cuevas-Ramos G, Boury M, Watrin C, Nougayrède JP, Olier M, Oswald E. (2014) The Genotoxin Colibactin Exacerbates Lymphopenia and Decreases Survival Rate in Mice Infected With Septicemic Escherichia coli. **Journal of Infectious Diseases**. 210(2):285-94

40- Payros D, Secher T, Boury M, Brehin C, Ménard S, Salvador-Cartier C, Cuevas-Ramos G, Watrin C, Marcq I, Nougayrède JP, Dubois D, Bedu A, Garnier F, Clermont O, Denamur E, Plaisancié P, Theodorou V, Fioramonti J, Olier M, Oswald E. (2014) Maternally acquired genotoxic Escherichia coli alters offspring's intestinal homeostasis. **Gut Microbes**. 5(3):313-25

41- Murase K, Martin P, Porcheron G, Houle S, Helloin E, Pénary M, Nougayrède JP, Dozois CM, Hayashi T, Oswald E. (2015) HlyF Produced by Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli Is a Virulence Factor That Regulates Outer Membrane Vesicle Biogenesis. **Journal of Infectious Diseases**. 213(5):856-65

- 42- Bossuet-Greif N, Dubois D, Petit C, Tronnet S, Martin P, Bonnet R, Oswald E, Nougayrède JP. (2016) Escherichia coli ClbS is a colibactin resistance protein. **Molecular Microbiology**. 99(5):897-908
- 43- Garcie C, Tronnet S, Garénaux A, McCarthy AJ, Brachmann AO, Pénary M, Houle S, Nougayrède JP, Piel J, Taylor PW, Dozois CM, Genevaux P, Oswald E, Martin P. (2016) The Bacterial Stress-Responsive Hsp90 Chaperone (HtpG) Is Required for the Production of the Genotoxin Colibactin and the Siderophore Yersiniabactin in Escherichia coli. **Journal of Infectious Diseases**. 214(6):916-24
- 44- Taieb F, Petit C, Nougayrède JP, Oswald E. (2016) The Enterobacterial Genotoxins: Cytotoxic Distending Toxin and Colibactin. **EcoSal Plus**. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0008-2016. Review.
- 45- Bossuet-Greif N, Vignard J, Taieb F, Mirey G, Dubois D, Petit C, Oswald E, Nougayrède JP. (2018) The colibactin genotoxin generates DNA interstrand cross-links in infected cells. **mBio**. 9(2):e02393-17.
- 46- Massip C, Branchu P, Bossuet-Greif N, Chagneau CV, Gaillard D, Martin P, Boury M, Sécher T, Dubois D, Nougayrède JP, Oswald E. (2019) Deciphering the interplay between the genotoxic and probiotic activities of Escherichia coli Nissle 1917. **PLoS Pathogens**. 15(9):e1008029.
- 47- Chagneau CV, Garcie C, Bossuet-Greif N, Tronnet S, Brachmann AO, Piel J, Nougayrède JP, Martin P, Oswald E. (2019) The Polyamine Spermidine Modulates the Production of the Bacterial Genotoxin Colibactin. **mSphere** 4(5):e00414-19
- 48- Wallenstein A, Rehm N, Brinkmann M, Selle M, Bossuet-Greif N, Sauer D, Bunk B, Spröer C, Wami HT, Homburg S, von Büнау R, König S, Nougayrède JP, Overmann J, Oswald E, Müller R, Dobrindt U (2020) ClbR Is the Key Transcriptional Activator of Colibactin Gene Expression in Escherichia coli. **mSphere**. 5(4):e00591-20

Brevets

Nougayrède JP, Dobrindt U, Hacker J, Oswald E. (INRA et Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg). Titre: Use of cells containing a specific DNA molecule as cytopathic agents to inhibit the proliferation of cells. Brevet N° 06 290 742.3 déposé le 10 Mai 2006. Extension mondiale le 10 Mai 2007.

Clémence Massip, Patricia Martin, Priscilla Branchu, Jean-Philippe Nougayrède, Eric Oswald. (Inserm Transfert), Brevet EP19184867 déposé le 8 Juillet 2019. Titre : MODIFIED ESCHERICHIA COLI STRAIN NISSLE AND TREATMENT OF GASTROINTESTINAL DISORDER

Chapitre de livre

Blanck E, Nougayrède JP, Sonnenberg MS. (2002) Enteropathogenic E. coli. In Escherichia coli: Virulence mechanisms of a versatile pathogen. Elsevier Science USA. pp 81-118.

Liste des conférences, séminaires et communications orales ou par affiche

Communications orales (liste non exhaustive)

Nougayrède JP, Marchès O, Boury M, De Rycke J, Milon A, Oswald E. (1998) « Rôle de l'intimine et des protéines sécrétées par les EPEC dans le déclenchement d'un nouvel effet cytopathique ». Congrès de la Société Française de Microbiologie, Lille.

Nougayrède JP, Donnenberg MS. (2002) "EPEC EspF biochemical characterization and search for host cells targets". Center for Vaccine Development, University of Maryland, Baltimore, USA.

Nougayrède JP, Oswald E (1^{er} septembre 2006) « Colibactin, a hybrid peptide-polyketide genotoxin produced by Escherichia coli ». Institut Pasteur, Paris.

Nougayrède JP (18 avril 2007) « Escherichia coli induces DNA double strand breaks in eukaryotic cells ». Séminaire aux rencontres des microbiologistes Toulousains (Microbiotoul 2007).

Nougayrède JP (3 décembre 2007) Attack of the host cell cycle by E. coli. Séminaire sur invitation à l'institut Karolinska, Stockholm, Suède.

Nougayrède JP (14 septembre 2010) "Escherichia coli genotoxin Colibactin induces DNA double strand breaks and chromosomal instability in gut cells". Séminaire sur invitation à l'institut Karolinska, Stockholm, Suède.

Nougayrède JP (14 juin 2011) « Microbiote et cancer colorectal: Des bactéries génotoxiques dans le tractus intestinal ». Présentation et discussion, sur invitation, devant l'Académie Nationale de Médecine, Paris.

Nougayrède JP (3 octobre 2011) "Genotoxic Escherichia coli in the intestinal tract : a role in colorectal cancer ?" ESF Exploratory Workshop on Bacterial Infection as a Cause of Cancer, Londres, 2-4 octobre 2011

Nougayrède JP (7 juin 2012) « Des Escherichia coli génotoxiques dans le tractus intestinal ». Séminaire sur invitation à Bichat, Paris.

Nougayrède JP (10 décembre 2014) « The genotoxin colibactin ». 22nd Meeting of the French Society of Toxinology (SFET), Institut Pasteur, Paris.

Nougayrède JP (11 mars 2015) « La génotoxine colibactine ». Séminaire sur invitation à l'INRA de Jouy-en-Josas

Nougayrède JP (29 juin 2017) « Genotoxins and cancer ». ETOX18, European workshop on bacterial protein toxins, Institut Pasteur, Paris.

Nougayrède JP (14 novembre 2017) "Towards the mode of action of the genotoxin colibactin". **Invited lecture** at the Max Planck Institute for Infection Biology

Nougayrède JP (27 octobre 2019) "Host DNA damage upon infection with colibactin-producing E. coli". **Invited speaker** at the EMBO Workshop "The impact of bacterial infections on human cancer", 26 – 29 October 2019, Berlin.

Posters (liste non exhaustive)

Nougayrède JP, Hérault F, Jacquemin E, De Rycke J, Mainil M, and Oswald E. (1996) Pathogenicity islands of Escherichia coli strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1. 96th Meeting of the American Society for Microbiology, New Orleans, USA.

Marchès O, Nougayrède JP, Boury M, Mainil J, Charlier G, Boullier S, De Rycke J, Milon A, Oswald E. (1999) Role of Tir and Intimin in the pathogenesis of rabbit enteropathogenic Escherichia coli. 99th Meeting of the American Society for Microbiology, Chicago, USA.

Nougayrède JP and Donnenberg MS. (2002) EspF biochemical characterization and search for host cells targets. 3rd International EPEC Symposium. Puerto Vallarta, Mexico.

Nougayrède JP and Donnenberg MS. (2004) Enteropathogenic Escherichia coli EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. 104th Meeting of the American Society for Microbiology, New Orleans, USA.

Sanchez G, Nougayrède JP, Charpentier X, Marches O, Boury M, Watrin C, Taieb F, Oswald E. (2004) Cif: a new family of effector molecules that block the eukaryotic cell cycle and reorganize the actin cytoskeleton. 155th Meeting of the Society for General Microbiology, Dublin, Ireland.

Taieb F, Nougayrède JP, Watrin C, Oswald E. (2005) Escherichia coli cyclomodulin Cif triggers a G2 host cell cycle arrest without inducing DNA damage. 12th ETOX Conference, Canterbury, UK.

Samba-Louaka A, Nougayrède JP, Watrin C, Jubelin G, Oswald E, Taieb F (2008) Bacterial toxin Cif induces host cell cycle arrest by stabilizing cyclin dependant kinase inhibitors p21 and p27. Conférence Cell Cycle and Cancer 2008, Toulouse, France.

Oswald E, Taieb F, Nougayrède JP. (2008) Cell cycle and cancer: lessons learned from bacterial toxins. Conférence Cell Cycle and Cancer 2008, Toulouse, France.

Samba-Louaka A, Nougayrède JP, Watrin C, Oswald E, Taieb F. (2009) The bacterial effector Cif blocks the host eukaryotic cell cycle and induces delayed apoptosis in epithelial cells. 14th ETOX Conference, Obernai, France.

Taieb F, Samba-Louaka A, Mokdad MA, Watrin C, Nougayrède JP, Oswald E. (2009) Bacterial cyclomoduline Cif hijacks host cell cycle functions. 14th ETOX Conference, Obernai, France.

Cuevas-Ramos C, Petit C, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède JP. (2009) Escherichia coli producing the genotoxin Colibactin induces genomic instability in colonic epithelial cells. 14th ETOX Conference, Obernai, France.

Cuevas-Ramos C, Petit C, Marcq I, Pierre F, Boury M, Oswald E, Nougayrède JP. (2010) Escherichia coli induces DNA double strand breaks in gut cells and triggers genomic instability. Digestive Disease Week 2010, New Orleans, USA

Cuevas-Ramos C, Petit C, Marcq I, Pierre F, Boury M, Oswald E, Nougayrède JP. (2010) Escherichia coli induces DNA double strand breaks in gut cells and triggers genomic instability. EMBO workshop “Emerging Themes in Infection Biology”, La Colle-sur-Loup, France.

Bossuet-Greif N, Vignard J, Taieb F, Mirey G, Dubois D, Petit C, Oswald E, Nougayrède J-P (2017). The natural genotoxin colibactin generates DNA interstrand cross-links in cellulose. ETOX18, Paris.

V – ACTIVITES D’ENCADREMENT : liste nominative des personnes encadrées ou co-encadrées (préciser la part d’encadrement, la durée de l’encadrement et la nature du diplôme préparé par l’étudiant)

Trois rotating students niveau M1-2R, stages de 3 mois (Baltimore USA, 2000-03).

Etudiante BTS, encadrée à 50%, Laury Lescat (2010)

Etudiants M1, encadrés à 100% :

2000 Saad Mechiche Alami (a poursuivi en M2R puis en thèse)

2017 Magalie Cospolite (a poursuivi en M2R puis en thèse)

2017 Mélanie Duplan (a continué ses études de médecine)

2018 Xavier Mas-Orea (a poursuivi en M2R puis en thèse)

Etudiants M2R, encadrés à 100% :

2003-04 Guillaume Sanchez (classement 1er, a choisi une école de commerce)

2006-07 Kevin Hollande (classement dernier, s’est réorienté en politique)

2006-07 Gabriel Cuevas (classement 1er, a poursuivi en thèse sous ma co-direction puis MCU)

2012-13 Emilie Cloup (a poursuivi ses études en histopathologie puis CDI)

2012-13 Sophie Tronnet (poursuite en thèse puis postdoc)

2017-18 Emilie Deshayes (thèse de Pharmacie puis CDI dans une biotech)

2019-20 Cécile Guyonnet (poursuite en thèse de Pharmacie sous ma co-direction)

Doctorants :

2007-10 Gabriel Cuevas-Ramos (co-direction 50%, encadrement 100%, publication : Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède JP. (2010) Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Science USA.** 107:11537.

2008-09 Olivier Baron (encadrement 50%). Décédé accidentellement.

2009-12 Pierre Millard (co-direction 50%, contrat INRA CJS, publication : Revelles O, Millard P, Nougayrède JP, Dobrindt U, Oswald E, Létisse F, Portais JC. (2013) The carbon storage regulator (Csr) system exerts a nutrient-specific control over central metabolism in Escherichia coli strain Nissle 1917. **PLoS One.** 8(6):e66386

2018- Camille Chagneau (co-direction 50%). Publication majeure soumise à Plos Pathog, preprint publié dans Bioarxiv doi.org/10.1101/2020.05.07.080291

2019- Marion Garofalo (co-direction 50%). Première année de thèse sur la synergie deoxynivalenol - colibactine

2019- Nadège Bossuet-Greif (co-direction 50%). AI titulaire dans l'équipe, inscrite en thèse.
Publications : Bossuet-Greif N, Dubois D, Petit C, Tronnet S, Martin P, Bonnet R, Oswald E, Nougayrède JP. (2016) Escherichia coli ClbS is a colibactin resistance protein. **Molecular Microbiology**. 99(5):897-908 et - Bossuet-Greif N, Vignard J, Taieb F, Mirey G, Dubois D, Petit C, Oswald E, Nougayrède JP. (2018) The colibactin genotoxin generates DNA interstrand cross-links in infected cells. **mBio**. 9(2). pii: e02393-17.

VI - AUTRES

Responsabilités éditoriales (relecteur d'articles, etc.)

- Depuis 2001, reviewer (environ 5 articles/an) pour des journaux de ma spécialité.
- 2010-18 Associate Faculty Member de F1000 (communauté d'évaluation a posteriori des articles publiés).

Participation à des instances (conseil scientifique, conseil de gestion, etc.)

Membre élu au conseil scientifique du centre INRA de Toulouse (2010-2015)

Responsabilité d'équipe :

Jusqu'à la création de la nouvelle UMR (IRSD), j'ai secondé mon DU (Eric Oswald) en tant que DUA pour la gestion de l'USC/équipe (tâches administratives diverses, participations aux réunions MICA, aux réunions de DUs du centre INRA de Toulouse...)

Activité de gestion de la recherche

- Invité dans la commission pour la réflexion sur la création de l'IRSD et l'écriture de son règlement intérieur.
- Membre du comité de préparation au concours de recrutement de chargé de recherche à l'IRSD.
- Participation au comité d'utilisateurs de la plateforme de cytométrie (CPTP, Toulouse).
- Participation au comité d'utilisateurs de l'animalerie de Toulouse-Purpan.
- Sélection pour le recrutement de CDD sur contrats de recherche.

Évaluation des personnes et des compétences (jury de recrutement, de thèse, etc.)

- Examineur dans un jury de recrutement d'un AERC, ENVT Toulouse, 20 novembre 2007.
- Examineur dans un jury pour l'Ecole pratique des hautes études, Toulouse, 22 novembre 2007.
- Participation à un jury de recrutement CR2 INRA, Paris, 24 avril et 5-6 juin 2014.
- Examineur dans le jury de thèse de Priscilla Branchu, université de Clermont, 10 décembre 2012.
- Examineur dans le jury de thèse de Julie Tomas, AgroParisTech, 36 novembre 2013.
- Examineur dans le jury de thèse de Aurore Rossignol, université de Tours, 30 novembre 2014.
- Participation au comité de thèse de Mme Natalia Nunez, 2015-16, Jouy-en-Josas.
- Participation au comité de thèse de Mr Jacques Augenstein, 2015-16, Toulouse
- Participation au comité de thèse de Mohamed Ghalayini, 2017, Paris.

Produits, documents et publications destinés à des utilisateurs de la recherche (professionnels, pouvoirs publics...)

- Présentation et discussion, sur invitation, devant l'Académie Nationale de Médecine Paris (14 juin 2011). Un article de revue à été également publié dans le Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine.

- Un article de revue, sur invitation, pour un dossier scientifique dans la Revue Francophone des Laboratoires : Claude Petit, Eric Oswald, Jean-Philippe Nougayrède*, « Rôle des génotoxines produites par des bactéries du microbiote dans le cancer colorectal », Novembre 2013 - n°456 page 39-44

- Un article technique dans la revue « Bio-Protocol » (avec revue par les pairs) : « Protocol for HeLa Cells Infection with Escherichia coli Strains Producing Colibactin and Quantification of the Induced DNA-damage » (2017) Nadège Bossuet-Greif, Marcy Belloy, Michèle Boury, Eric Oswald and Jean-Philippe Nougayrède*

Avant-propos : contexte général de mes travaux

Universitaire de formation, j'ai découvert le monde de la microbiologie à l'université Paul Sabatier de Toulouse, puis celui de la recherche sur le pouvoir pathogène des bactéries, à l'occasion d'un stage de fin d'étude en 1994 dans le laboratoire de Microbiologie Moléculaire à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. J'ai continué dans cette voie par une thèse dans ce même laboratoire, puis trois ans à l'aventure en post-doctorat dans le laboratoire de Michael Donnenberg, à Baltimore « *the Greatest City in America* » (sic). Je suis revenu en France en 2003, dans l'équipe « Pathogénie moléculaire et cellulaire des *E. coli* » pour continuer des travaux initiés en 1994 et qui ont abouti à la découverte d'une nouvelle génotoxine, la colibactine. J'ai été recruté comme chargé de recherche à l'Inra(e) en 2006 et continue depuis mes travaux. Cela fait donc un quart de siècle consacré à l'étude moléculaire et cellulaire du pouvoir pathogène de *Escherichia coli* - et ce faisant j'ai un peu tardé à écrire ce mémoire, comme le lecteur l'aura déjà deviné.

L'objectif de mes recherches est d'évaluer et comprendre les mécanismes de pathogénicité de *Escherichia coli*, afin de proposer des clefs pour prévenir le risque d'infection, tant chez l'Homme que chez l'Animal. Pour ce faire, nous avons développé les outils de génétiques microbienne, puis de microbiologie cellulaire, afin d'identifier les modes d'action des toxines bactériennes et élucider comment elles piratent des fonctions cellulaires essentielles. Nous avons ainsi été pionniers dans les notions du piratage par les bactéries du cycle cellulaire, et dans la découverte des génotoxines bactériennes qui endommagent le génome de l'hôte. Notamment, nous avons découvert la colibactine, une génotoxine qui affecte le cycle cellulaire en alkylant l'ADN, produite par des *E. coli* et d'autres entérobactéries pathogènes, mais aussi par de nombreuses souches commensales et même la souche de *E. coli* probiotique Nissle 1917. Ceci nous a conduit à opérer une évolution thématique pour utiliser *E. coli* comme espèce modèle afin d'étudier le continuum entre

bactéries commensales, probiotiques et pathogènes. Au-delà de la notion classique d'effet de barrière, il apparaît que le « colibiote » participe au développement, à la différenciation et à l'homéostasie des muqueuses et vraisemblablement au développement de certains cancers.

“À une époque où la recherche microbiologique nous a valu tant de lauriers en suivant les méthodes de recherche de Koch dans les régions de l'étiologie et de la pathologie des maladies infectieuses, il semblerait être un exercice inutile et douteux d'examiner et de démêler l'apparence apparente aléatoire des bactéries dans les selles normales et le tractus intestinal, une situation qui semble contrôlée par mille coïncidences. Si je me suis néanmoins consacré depuis un an pratiquement exclusivement à cette étude spéciale, c'est avec la conviction que la connaissance précise de ces conditions est essentielle, pour la compréhension non seulement de la physiologie de la digestion, dans laquelle les processus de décomposition dans les intestins sont encore une quantité inconnue, mais aussi la pathologie et la thérapie des maladies microbiennes intestinales. ”

Traduit de l'allemand, Escherich, 1885 (Th. Escherich and K. S. Bettelheim, 1988)

“I advised him to use a bacterium able to grow in a synthetic medium, for example *Escherichia coli*. “Is it pathogenic?” asked Jacques. The answer being satisfactory, Monod began, in 1937, to play with *E. coli* and this was the origin of everything...”

Lwoff AM, 1979, in Lwoff A, Ullmann A (ed) *Origins of Molecular Biology, a Tribute to Jacques Monod*. Academic Press, New York

“Tout ce qui est vrai pour le Colibacille est vrai pour l'éléphant”

Jacques Monod, 1954

“Although not everyone is mindful of it, all cell biologists have two cells of interest, the one they are studying and *E. coli*.”

Fred Neidhardt, 1996

1- Escherichia coli, un commensal, un organisme modèle et un agent pathogène majeur

E. coli est un hôte commun du microbiote intestinal des mammifères. On le retrouve aussi, quoique moins fréquemment, dans le microbiote intestinal des oiseaux, des reptiles et des poissons d'eau chaude. Chez l'Homme, on le retrouve chez une large majorité (plus de 90%) des individus (Finegold et al., 1983; Mitsuoka and Hayakawa, 1973). *E. coli* est typiquement le microorganisme aérobic le plus commun dans l'intestin distal chez l'hôte adulte, avec une densité de population de 10^6 - 10^9 cellules par gramme de matière fécale. Il a été estimé que la population humaine mondiale héberge 10^{21} cellules² de *E. coli* (Conway and Cohen, 2015). Mais l'intestin (adulte) est essentiellement un environnement anoxique et le microbiote intestinal est largement dominé par les bactéries anaérobies strictes : la population microbienne intestinale est constituée pour environ 90% de Bacteroides et de Firmicutes (Eckburg et al., 2005). *E. coli* représente seulement 0.1 à 5% du microbiote intestinal, ce qui reflète sa niche écologique relativement restreinte, dans la couche de mucus à la surface de l'épithélium intestinal. Dans cette couche de mucus, *E. coli* s'établit dans un biofilm multi-espèce complexe dans lequel il est en concurrence pour la large gamme de nutriments présents dans l'intestin (Beloin et al., 2008; Chang et al., 2004). La population intestinale de *E. coli* comprend typiquement un petit nombre de souches résidentes, ainsi que des souches transitoires, qui peuvent varier avec le régime alimentaire, la santé de l'hôte et la prise d'antibiotiques (Savageau, 1983). Cette population de *E. coli* est dynamique, avec une variation dans le temps de l'ordre du mois ou de l'année (Johnson et al., 2008a; Sears et al., 1950).

² Ce compte astronomique est du même ordre de grandeur que le nombre de grains de sable sur l'ensemble des plages de la planète Terre (estimé entre 10^{17} et 10^{24} selon le mode de calcul), ou du nombre d'étoiles dans l'ensemble des galaxies de l'univers observable (estimé entre 10^{22} et 10^{24}).

E. coli entretient essentiellement une relation de commensalisme, voire de mutualisme³ avec son hôte – il profite de l’environnement de la niche intestinale et bénéficie en retour à son hôte. En effet *E. coli* produit de la vitamine K essentielle à la nutrition de l’hôte. Ceci a été joliment documenté dans une étude où des rats axéniques nourris avec une nourriture déficiente en vitamine K souffraient de saignements consécutifs à la carence, saignements qui étaient abrogés par la monocolonisation avec une souche commensale de *E. coli* (Gustafsson et al., 1962). De plus, *E. coli* participe à la résistance contre la colonisation par des bactéries pathogènes, en accaparant des nutriments essentiels (le fer en particulier) tout en produisant des facteurs antibactériens, ou encore en stimulant l’immunité de l’hôte (Sassone-Corsi and Raffatellu, 2015). La relation commensale de *E. coli* et de l’hôte commence typiquement dès la naissance, avec l’inoculation du nouveau-né par les *E. coli* issus du microbiote fécal de la mère ou ceux de l’environnement de la maternité (Nowrouzian et al., 2003). Cette population primo-colonisatrice de *E. coli* s’établit rapidement dans la niche intestinale, et pourrait exercer un effet profond de maturation de l’épithélium colique, et préparer l’environnement intestinal à la colonisation massive par le microbiote intestinal (Tomas et al., 2015).

La niche écologique primaire de *E. coli* est l’intestin, mais il est aussi inévitablement excrété dans l’environnement via la matière fécale et les stations d’épuration. La deuxième niche écologique de *E. coli* est donc l’environnement. On peut en effet le retrouver dans l’eau, les sédiments, le sol et sur les plantes. *E. coli* peut survivre et même se multiplier dans des milieux terrestre ou aquatiques en zone tempérée ou (sub)tropicale (Ishii and Sadowsky, 2008). Ceci est possible de par son hétérotrophie (il ne requière que des sources simples de carbone et azote, du phosphore et soufre, et quelques autres éléments traces), sa versatilité dans l’acquisition d’énergie et sa faculté d’adaptation a des environnements fluctuants. *E. coli* est ainsi un indicateur de contamination fécale témoignant de la qualité de l’eau.

E. coli est aussi ubiquitaire dans la littérature : Pubmed fait état de plus de 375 000 publications le mentionnant depuis 1932. On peut affirmer qu’avec *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus*

³ Commensalisme = cum (avec) mensa (table)= qui mange à la même table. Une association entre la bactérie et son hôte sans conséquence pour chacun. Mutualisme = relation entre deux organismes qui bénéficie aux deux.

et *Homo sapiens*, il fait partie des organismes vivants les mieux étudiés et compris. En effet, depuis sa découverte en 1884 par le pédiatre microbiologiste Allemand Theodor Escherich, *E. coli* est un organisme modèle. Utilisé depuis les années 1920, il a acquis son statut de *rock star* avec la révolution de la biologie moléculaire dans les années 50. Les processus biologiques les plus basiques ont été ainsi découverts chez *E. coli* (Blount, 2015) : le code génétique, la transcription, la traduction, la réplication, la régulation, l'ATP synthase, la nature aléatoire des mutations, les transferts horizontaux de gènes... *E. coli* est devenu un cheval de labour incontournable pour la biologie moléculaire (découverte des enzymes de restrictions et développement des techniques de génétique et de clonage, utilisation du phage lambda), dans les biotechnologies (production de biocarburants, phénol, éthanol...) et dans l'industrie pharmaceutique (synthèse de protéines recombinantes thérapeutiques comme l'insuline, l'érythropoïétine, l'hormone de croissance, des facteurs de coagulation, le taxol)...

Mais *E. coli* a aussi un côté obscur, car il est aussi un agent pathogène redoutable, responsable de l'ordre de deux millions de morts par an dans le monde (Russo and Johnson, 2003). *E. coli* est en effet impliqué dans des infections intestinales et extra-intestinales (Kaper et al., 2004). Son pouvoir pathogène extra-intestinal est varié, avec des infections localisées (infections urinaires basses et hautes, suppurations profondes, pneumonies) ou encore généralisées (septicémies avec un point de départ urinaire ou digestif, méningite néonatale). *E. coli* est aussi responsable de sévères diarrhées infantiles et de toxi-infections alimentaires (on pense à l'infâme O157:H7 du hamburger mortel). Le potentiel évolutif et la versatilité de ce taxon sont considérables. Cette notion est illustrée par le fait que différentes souches de *E. coli* pathogènes et la souche de laboratoire K-12 MG1655⁴ ne présentent pas les mêmes tailles de génomes (entre 4 et 5,5 millions de paires de bases). Différentes souches ne présentent qu'environ 2000 gènes en commun, soit 46% de leur génome⁵ – ce que l'on peut mettre en perspective avec les 98% d'ADN partagés par *Homo sapiens* et *Pan troglodytes verus* ... L'étude de l'histoire évolutive de *E. coli* à

⁴ La souche K-12 MG1655, isolée originellement d'un patient convalescent de la diphtérie à Palo Alto en 1922, a été sous-cultivée de nombreuses fois pendant les premières décennies de sa vie dans les laboratoires, et a subi des traitements délibérés de mutagenèse; elle ne peut donc absolument pas représenter l'archétype de *Escherichia coli*, même si elle est la plus étudiée (Hobman et al, *Molecular Microbiology* (2007) 64(4), 881–885)

⁵ "What diverse beings, with scarcely anything in common, and yet all belonging to the same species!" (Charles Darwin)

travers le polymorphisme nucléotidique du « génome cœur » commun à toutes les souches indique que l'espèce peut être classée en 8 grands groupes phylogénétiques majeurs (A, B1, C, E, D, F, G, B2). L'examen des gènes non-orthologues (donc du pangénome) fait apparaître une diversité considérable du contenu en gène dans l'espèce (l'espèce *E. coli* possède de l'ordre de 20 000 gènes dans son pangénome, soit autant de gènes qu'*Homo sapiens* !). Cette phylogénie et diversité fait apparaître comment des souches de *E. coli* ont acquis au cours de l'évolution un répertoire de gènes de virulence. Ces gènes de virulence sont le plus souvent localisés dans des îlot génomiques (ou *pathogenicity island*, PAI)(Hacker et al., 2003). Ils appartiennent à 4 grandes classes fonctionnelles ; les systèmes d'adhésion, les systèmes de capture du fer, les toxines, et les systèmes de protection de la bactérie (figure 1).

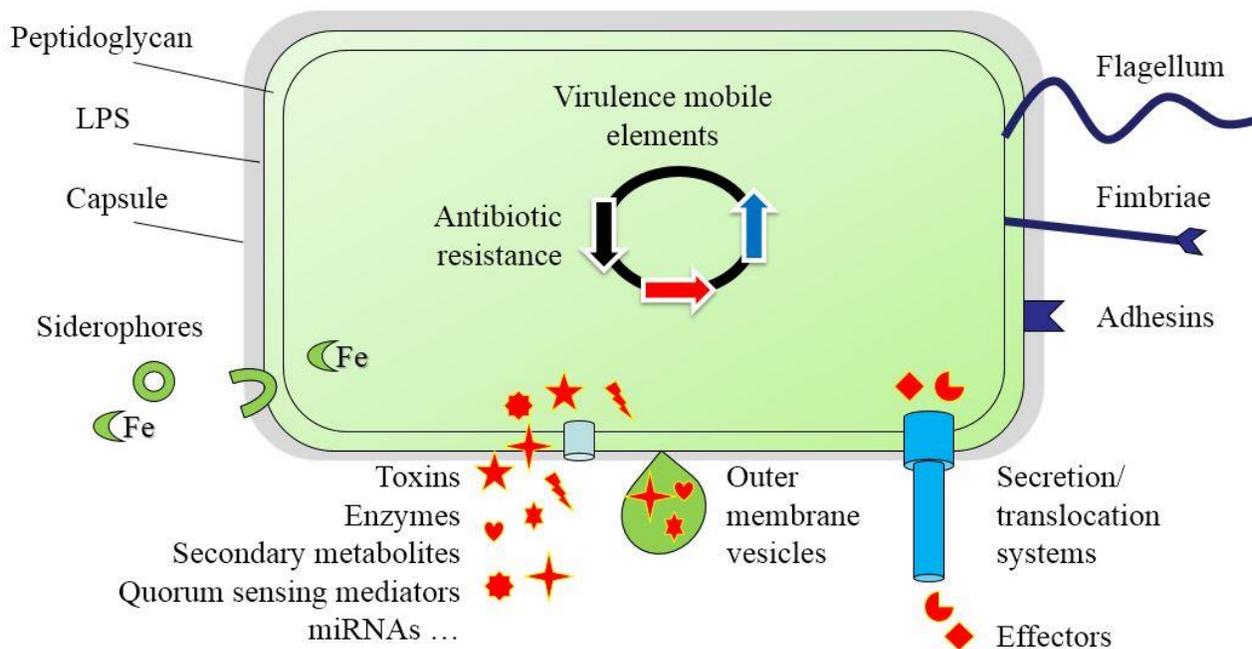


Figure 1: *E. coli* déploie un arsenal de facteurs de virulence

Ces facteurs de virulence leur permettent de coloniser de nouvelles niches écologiques en piratant ou contournant les mécanismes de défense de l'hôte. L'expression d'un répertoire donné de facteurs de virulence est corrélée à une pathologie particulière et permet de définir différents pathovars, comme les EPEC (*E. coli* entéro-pathogènes), les EHEC (entérohémorragiques) et les ExPEC (pathogènes extra-intestinaux) (Kaper et al., 2004).

L'étude des *E. coli* pathogènes (et commensales) a grandement bénéficié pendant les trois décennies passées du développement de la génétique microbienne. En effet, une des pierres angulaires de leur étude est l'utilisation des postulats de Robert Koch, qui définissent quand une bactérie est responsable d'une maladie, étendus dans les années 1980 par Stanley Falkow, qui a développé les « postulats moléculaire de Koch » (Falkow, 2004). Ces outils méthodologiques sont très puissants pour étudier et définir la virulence bactérienne à l'échelle moléculaire – en inactivant des gènes spécifiques pour altérer la pathogénicité ou encore en transférant ces gènes à des bactéries non pathogènes. La « microbiologie cellulaire » est une autre pierre angulaire dans l'étude de la pathogénicité bactérienne. Cette discipline qui a émergé dans les années 90s rapproche la microbiologie de la biologie cellulaire pour disséquer les processus cellulaires en étudiant les interactions intimes entre les bactéries et les cellules. La puissance de la microbiologie cellulaire réside dans le fait que ces interactions sont le fruit de millions d'années de coévolution. Les modes d'actions des facteurs de virulence sont extrêmement adaptés à la cellule hôte, et donc à l'étude de la biologie de ces dernières (Cossart et al., 1996). L'âge d'or de la microbiologie cellulaire est maintenant passé, suppléé par l'avènement de nouvelles techniques *-omics* et le boom des métagénomomes, et depuis peu les techniques *single cells*. Enfin, l'étude de la pathogénicité bactérienne se complète par l'approche physiopathologique qui examine la virulence et la réponse de l'hôte à l'échelle du tissu infecté et de l'organisme. Dès les années 1990-2000 quand je commençais mes travaux il est apparu que les *E. coli*, comme d'autres bactéries pathogènes, ont développé au cours de l'évolution une variété de mécanismes très sophistiqués, non pas pour détruire les cellules hôte, mais pour les pirater et les manipuler, afin de coloniser de nouvelles niches écologiques. Tout au long de mon parcours de chercheur, j'ai développé cet éventail d'outils méthodologiques pour étudier les toxines colibacillaires capables de moduler des processus fondamentaux des cellules épithéliales, tels que la régulation du cytosquelette, de l'apoptose, du cycle cellulaire, et finalement l'intégrité de l'ADN génomique. Ce faisant, j'ai eu la chance d'encadrer un certain nombre d'étudiants en master et en thèse. Ci-après nous allons dérouler le cheminement des découvertes et surprises dans l'étude de quelques toxines de *E. coli*, et je ferais ressortir les travaux de mes étudiants.

2- Des toxines classiques, du cytosquelette au cycle cellulaire

Mes premiers travaux ont porté sur l'étude de souches pathogènes de *E. coli* impliquées dans des affections extra-intestinales (ExPEC) (De Rycke et al., 1996, 1997; Pérès et al., 1997). Certaines de ces souches pathogènes produisent les toxines CNF (*Cytotoxic Necrotizing Factors*), qui modifient de manière covalente (déamidation) les petites GTPases de la famille Rho. Cette modification les active de manière irréversible, ce qui confère aux bactéries productrices de ces toxines la capacité d'altérer l'architecture des cellules de l'hôte (Ho et al., 2018), promouvant ainsi la colonisation bactérienne et la formation de réservoirs intracellulaires de bactéries persistantes. Le traitement de cellules eucaryotes en culture par les toxines CNF purifiées provoque la formation d'un réseau de fibres d'actine. L'objet de mes premiers travaux était d'évaluer le rôle de ces toxines dans un processus infectieux. Nous avons utilisé une approche originale qui s'est avérée féconde ; plutôt que d'utiliser l'approche classique avec des toxines purifiées, nous avons mis en contact les bactéries vivantes produisant ces toxines avec des cellules épithéliales en culture (Figure 2). De plus, nous avons observé les effets à long terme, ce qui permettait de mettre en évidence des phénotypes tardifs comme des réponses cellulaires graduelles.

En effectuant des infections transitoires de cellules en culture, nous avons découvert que de nombreuses souches *cnf+* induisaient un effet « cytopathique » original, qui n'était visible qu'après une incubation prolongée des cellules. Cet effet était notamment distinct de l'effet produit par les toxines CNF purifiées ; outre la multiplication des fibres d'actine, on observait la formation progressive de cellules

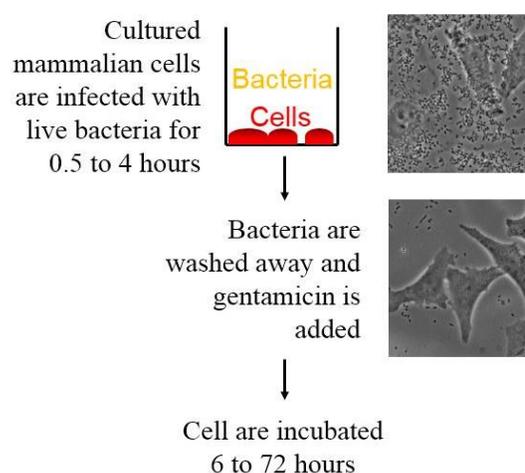


Figure 2: Un modèle d'infection bactérienne de cellules en culture et d'examen à long terme des effets sur les cellules

géantes, associé à un arrêt irréversible de la prolifération avec blocage du cycle cellulaire en phase G2 et finalement la mort des cellules (Figure 3). Une souche mutée par insertion d'un transposon dans le gène *cnf* ne produisait plus ces effets. Toutefois, la complémentation de ce mutant par l'allèle *cnf* sauvage ne restaurait pas l'effet

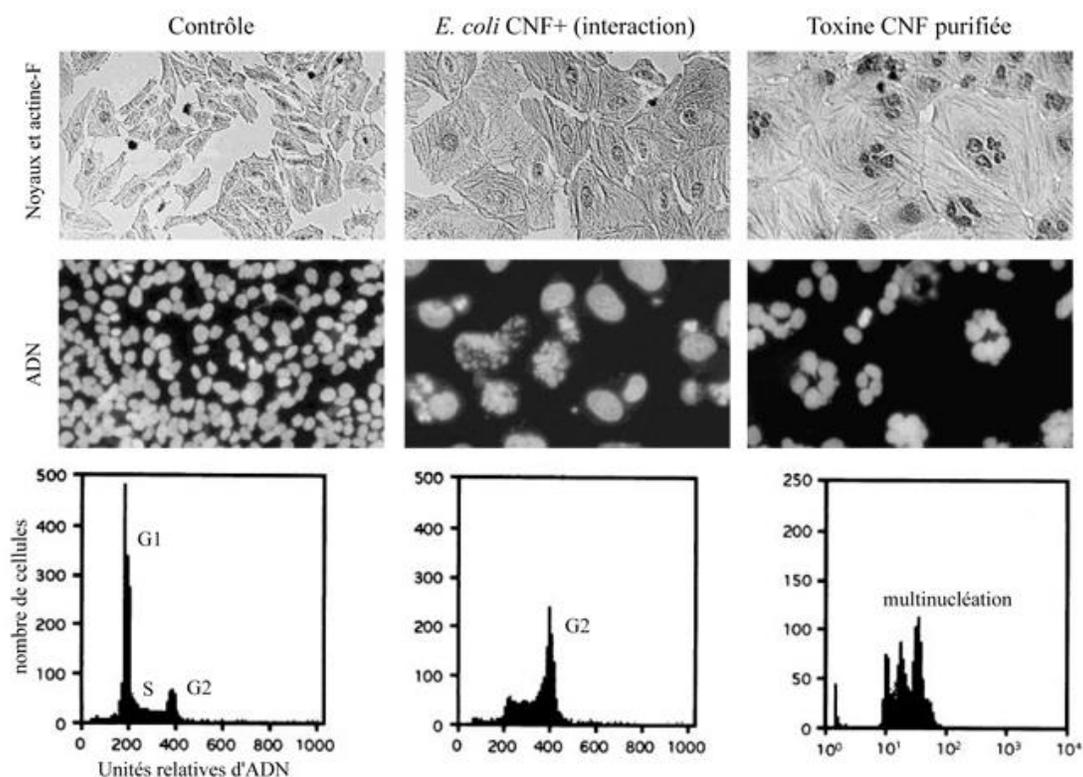


Figure 3: effets sur le cytosquelette et le cycle cellulaire suite à l'infection avec une *E. coli* *cnf*⁺ ou suite au traitement avec la toxine CNF1 purifiée.

cytopathique. La souche mutante *cnf* devait donc nécessairement être altéré sur un autre caractère toxique (on le découvrira plus tard !). Par contre, la surexpression de CNF provoquait une mortalité cellulaire significativement accrue. Nous avons fait l'hypothèse qu'une autre toxine déclenchait spécifiquement le bloc du cycle cellulaire en G2. Chez certaines souches, ce phénotype a pu être associé à la présence d'un plasmide de virulence. Le locus responsable a été cloné en criblant une banque d'ADN de ce plasmide. Ce locus codait pour une variante de toxines bactériennes déjà identifiées mais dont l'action sur le cycle cellulaire n'avait pas été rapportée auparavant : les toxines CDT (*Cytolethal Distending Toxin*) (Figure 4).

Ces premières expériences dans un système d'interaction bactéries-cellules en culture ont ainsi permis de développer une approche qui est depuis toujours utilisée dans nos travaux. De plus, ces études fournissaient une première description d'une toxine bactérienne dont le mode d'action implique un arrêt du cycle des cellules cibles. Ceci ouvrait la porte à un nouveau concept, celui que des toxines bactériennes peuvent moduler le cycle cellulaire, et pose l'hypothèse selon laquelle le piratage des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire constitue une stratégie de virulence ou d'adaptation des bactéries à l'hôte. Sur la base de ce concept, le laboratoire a découvert par la suite deux autres toxines ayant la capacité de bloquer le cycle cellulaire eucaryote, Cif, et la colibactine, comme on le verra plus loin. Nous avons proposé de classer ces toxines dans la nouvelle famille des « cyclomodulines » (Nougayrède et al., 2005; Oswald et al., 2005).

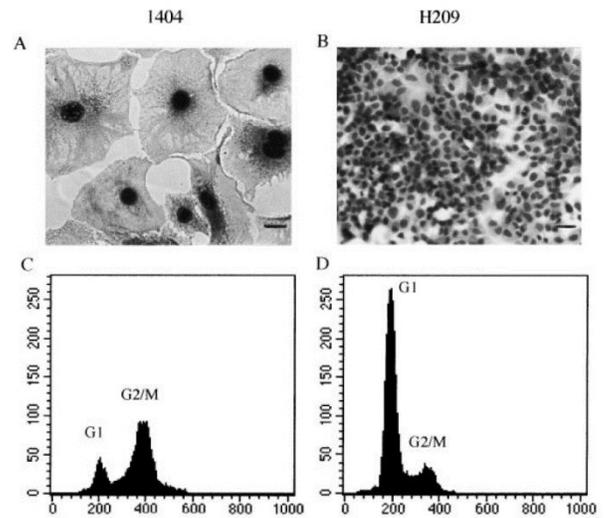
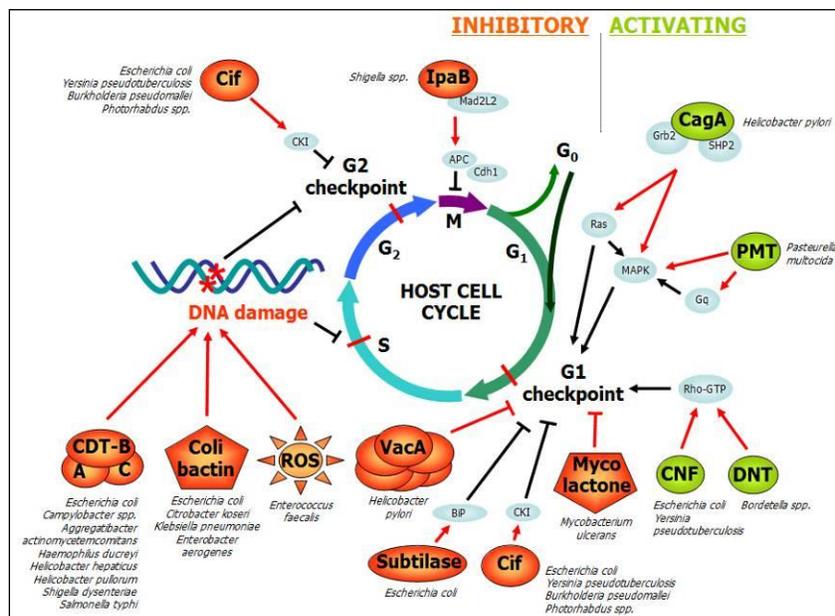


Figure 4: distension des cellules et blocage du cycle cellulaire suite au traitement avec un lysat de la souche 1404 cdt+



3- La seringue moléculaire des *E. coli* entéropathogènes: rôle dans la pathogenèse *in vivo*

Mes travaux de thèse ont porté sur les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) (Boullier et al., 2003; Marchès et al., 2000; Nougayrède et al., 1999). Les EPEC sont des agents majeurs de diarrhées chez les jeunes enfants dans les pays en voie de développement, et également une cause d'entérite grave chez le lapin d'élevage. Je me suis intéressé à l'identification des gènes impliqués dans la pathogénicité des EPEC et à la conception d'une souche vaccinale destinée aux élevages intensifs de lapins.

Les EPEC sont caractérisées par la formation de lésions histopathologiques typiques dite d'attachement/effacement (A/E) sur les entérocytes du tractus digestif (Figure 5). L'induction de ces lésions est sous la dépendance de gènes regroupés sur un

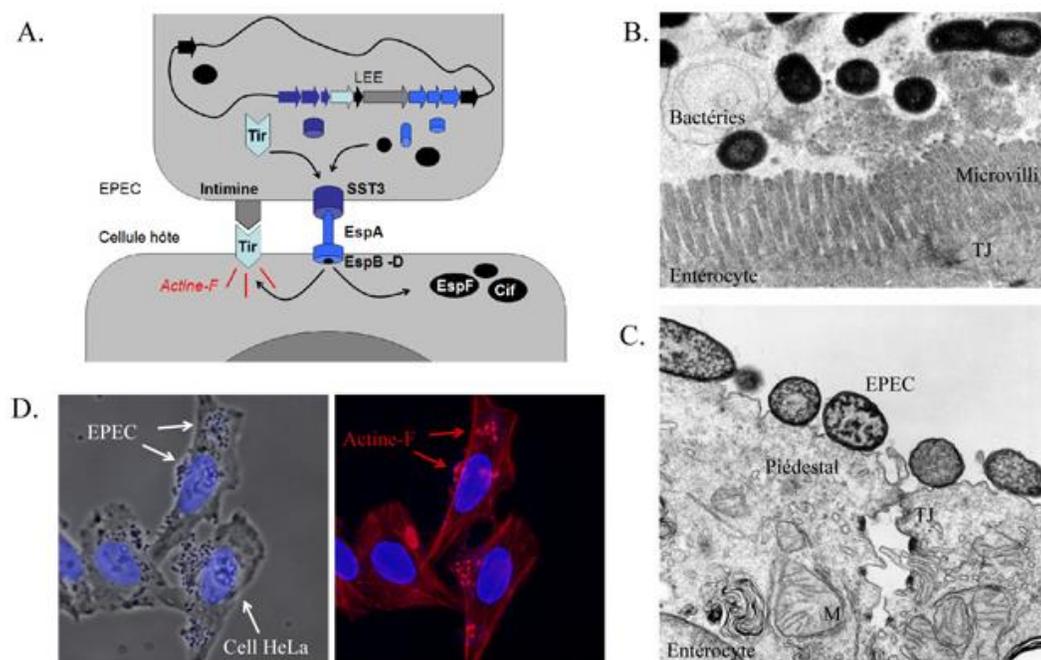


Figure 5: La seringue moléculaire des EPEC permet l'injection d'effecteurs et la formation d'un piédestal d'actine au site d'adhésion

îlot génétique appelé *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE). Le LEE code pour une adhésine (l'intimine, Eae) pour son récepteur transloqué dans les cellules hôtes (Tir), pour des protéines sécrétées (Esp), ainsi que pour un système de sécrétion de type III permettant la sécrétion des Esps. La protéine sécrétée EspA polymérise pour former une extension filamenteuse du système de sécrétion de type III enchâssé dans la paroi bactérienne. A l'extrémité de ce filament, les protéines sécrétées EspB et EspD s'insèrent dans la membrane plasmique des cellules hôtes pour former un pore permettant l'injection des effecteurs bactériens, tels EspF, Cif et Tir, dans le cytoplasme de la cellule hôte. Ainsi, la machinerie de sécrétion de type III prolongée par les EspA –B –D joue le rôle d'une seringue moléculaire (Revue dans (Nougayrède et al., 2003)).

Quand j'ai commencé mes travaux de thèse, la notion de seringue moléculaire et d'effecteurs transloqués n'avait pas été établie. La communauté scientifique s'intéressant aux EPEC pensait que l'intimine interagissait avec une protéine « Hp90 » de la cellule hôte. Posant la question du rôle des protéines sécrétées et de l'intimine dans le pouvoir pathogène des EPEC, j'ai utilisé les postulats moléculaires de Koch, qui permettent d'examiner le rôle d'un gène bactérien dans la pathogénicité (Falkow, 2004). Nous avons construit des mutants isogéniques pour les gènes *eae*, *espA*, *-B* et *-D* dans une souche EPEC hautement pathogène chez le lapin. Dès la publication en 1997 que le récepteur Hp90 de l'intimine était en fait l'effecteur transloqué Tir, nous avons rajouté le mutant *tir* à la collection. Les cinq mutants ne provoquaient plus de lésions d'A/E *in vitro* sur des cellules épithéliales en culture, ni *in vivo* dans un modèle d'infection d'anses ligaturées de lapin. Le phénotype A/E était restauré par complémentation avec l'allèle sauvage. Ces mutants ont été également étudiés dans le modèle d'infection *in vivo* de lapereaux : L'analyse de l'excrétion fécale des animaux montrait que les cinq mutants colonisaient bien le tube digestif, mais ne provoquaient plus de mortalité, de diarrhées ou de retard de croissance. Les postulats moléculaires de Koch étaient bien remplis, nous avons donc démontré le rôle essentiel des protéines EspA –B –D et du système adhésine/récepteur Eae/Tir dans l'expression clinique de la pathogénicité des EPEC. Cependant, les observations histologiques montraient que ces mutants n'étaient pas équivalents en termes d'induction des lésions. En effet, bien que n'occasionnant pas les lésions d'A/E, le mutant *eae* induisait une inflammation importante de l'iléon et du colon. Cette inflammation était moindre chez les animaux inoculés par le mutant *tir*.

Nous avons mis à profit ces connaissances acquises pour concevoir une souche EPEC candidate à la « vaccination » orale des lapins d'élevage. La souche devait être non pathogène tout en exprimant les déterminants de la colonisation du tube digestif et des antigènes nécessaires à l'induction d'une réponse immunitaire. Une EPEC de lapin a donc été muté sur les deux gènes *tir* et *espB*. Le double mutant conservait une bonne aptitude de colonisation, sans infliger de lésions d'A/E, et les animaux montraient une croissance normale. L'administration du double mutant par voie orale en une dose unique protégeait les lapins contre des épreuves virulentes réalisées avec l'EPEC parentale hautement pathogène. La souche pathogène ne parvenait pas à coloniser les lapereaux inoculés par le double mutant. Le double mutant était toujours présent dans le tractus digestif des lapins infectés, il semblait donc que le mécanisme de protection relevait plus d'un effet de compétition écologique (effet de barrière) que d'une réelle vaccination. Néanmoins, une administration unique de ce type de mutant pouvait suffire à protéger le lapin d'élevage contre la colibacillose pendant toute sa vie économique. Ce « vaccin » a été utilisé quelques années par le laboratoire Biové. A ce jour, il n'existe pas encore de vaccin humain ou vétérinaire contre les EPEC, mais il y a un regain d'intérêt ces dernières années (Larzabal et al., 2019).

4- Un pirate multifonctionnel des jonctions serrées et des mitochondries : l'effecteur *EspF* des EPEC

Au terme de ma thèse et des travaux sur les EPEC et leur injectisome, j'ai choisi de rejoindre l'équipe de Michael Donnenberg à Baltimore, qui venait de découvrir un nouvel effecteur chez les EPEC : *EspF*. Les premiers résultats indiquaient qu'il était injecté par la seringue moléculaire, mais qu'il n'était pas requis pour l'induction des lésions histopathologiques d'A/E, ni pour le déclenchement de l'effet cytopathique. *EspF* était donc le premier effecteur « orphelin » sans phénotype associé. Il y avait plus que le système adhésine/récepteur Tir/intimine pour expliquer la pathogénicité, et plus particulièrement le déclenchement de la diarrhée et l'altération de la barrière intestinale par les EPEC.

***EspF*, pirate des jonctions serrées**

Plusieurs travaux antérieurs avaient décrit que les EPEC semblaient altérer la fonction de barrière épithéliale, un phénomène mis en évidence par la baisse de la résistance transépithéliale (TER). En utilisant un modèle d'infection de tapis confluents de cellules intestinales polarisées, nous avons observé qu'un mutant *espF* ne provoquait plus la baisse de TER. L'infection par les EPEC induisait une altération morphologique des jonctions serrées, les structures cellulaires qui contribuent à la fonction de barrière (Figure 6).

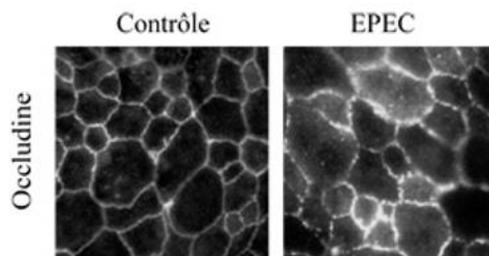


Figure 6: l'infection par les EPEC induit une altération de la distribution de l'occludine

L'occludine, constituant majeur des jonctions serrées, qui est normalement répartie de manière homogène le long des jonctions cellulaires, diffusait dans le cytoplasme des cellules infectées par les EPEC, tandis que le mutant *espF* ne provoquait plus cette redistribution. Donc EspF joue un rôle central dans l'augmentation de la perméabilité paracellulaire induite par les EPEC (McNamara et al., 2001).

A ce stade du travail, une autre équipe avait montré qu'EspF était aussi impliqué dans la mort cellulaire. Dans le but de fournir une relation moléculaire avec les phénotypes associés à EspF et ainsi expliquer son mode d'action, j'ai choisi de rechercher sa cible cellulaire.

EspF, pirate des mitochondries

En analysant *in silico* la séquence d'EspF, j'ai remarqué que son domaine N-terminal présentait probablement une structure en hélice amphiphile, caractéristique des protéines qui sont importées dans les mitochondries. Des expériences en microscopie confocale et par fractionnement m'ont permis de montrer que dans des cellules infectées, EspF co-localisait effectivement avec des marqueurs des mitochondries (Figure 7).

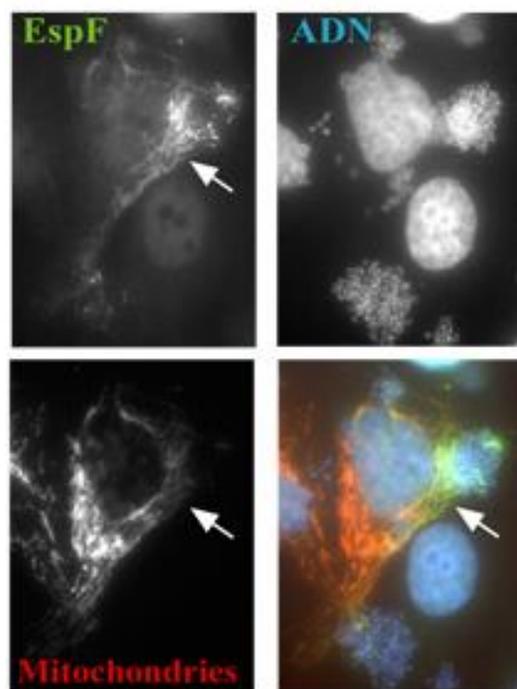


Figure 7: l'effecteur EspF des EPEC se localise dans les mitochondries

Faisant l'hypothèse qu'EspF pouvait altérer la fonction des mitochondries, j'ai mesuré leur potentiel transmembranaire et observé la dépolarisation des mitochondries dans les cellules infectées par les EPEC, un effet réduit dans les cellules infectées par un mutant *espF*. De plus, des expériences de fractionnement montraient que le cytochrome-c, une protéine mitochondriale de la chaîne respiratoire, était relargué dans le cytoplasme des cellules infectées par les EPEC. Le cytochrome-c cytosolique est hautement toxique pour les cellules car il se complexe avec des protéines effectrices de la cascade apoptotique et initie la mort cellulaire. En effet, la caspase-9 initiateur ainsi que la caspase-3 effectrice étaient activées dans les cellules infectées par une EPEC mais pas dans les cellules infectées par le mutant *espF* (Figure 8). Ainsi, EspF altère les mitochondries de l'hôte pour aboutir à l'initiation de la voie apoptotique mitochondriale (Nougayrède and Donnenberg, 2004).

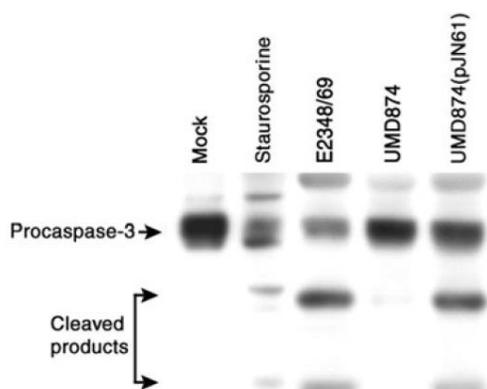


Figure 8: l'infection par l'EPEC E2348 induit l'apoptose mais pas un mutant *espF* (UMD874)

Peu de temps après, ces résultats ont été confirmés par l'équipe de Chihiro Sasakawa au Japon. De plus, les auteurs montraient l'importance de ce mécanisme pour le processus d'infectieux, car un mutant ponctuel *espF*(L16E) qui abroge l'import mitochondrial et le déclenchement de l'apoptose, montre une virulence réduite dans un modèle d'infection de souris avec *Citrobacter rodentium* (Nagai et al., 2005).

Des partenaire cellulaires pour EspF

Afin de pousser plus loin la dissection du mode d'action d'EspF, j'ai recherché une protéine eucaryote avec laquelle EspF pourrait interagir. J'ai utilisé une technique de *pull down* : EspF a été purifié sur colonne, et un lysat de cellules épithéliales a été appliqué afin de fixer les protéines eucaryotes ayant une affinité pour EspF, puis ces dernières ont été

identifiées par spectrométrie. Nous avons ainsi identifié la protéine eucaryote Abcf2, de fonction inconnue. Une interaction entre Abcf2 et EspF a pu être confirmée dans le système double hybride dans la levure (Figure 9), et par co-immunoprécipitation dans des lysats de cellules infectées par une EPEC.

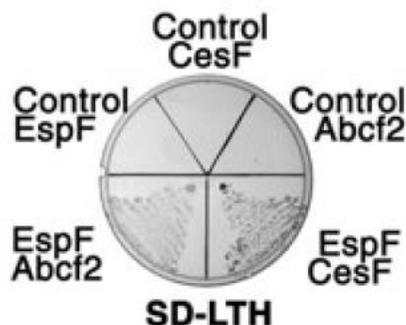


Figure 9: l'effecteur EspF des EPEC interagit avec la protéine Abcf2 dans le système double-hybride dans la levure. La chaperonne de EspF, CesF, était utilisée comme contrôlé positif.

Nous avons observé dans les cellules infectées par les EPEC une diminution rapide et dose-dépendante de la quantité d'Abcf2, mais pas dans les cellules infectées par un mutant *espF*. La diminution de la quantité d'Abcf2 allait de pair avec une augmentation de la caspase-9 clivée, et donc de l'apoptose mitochondriale (figure 10).

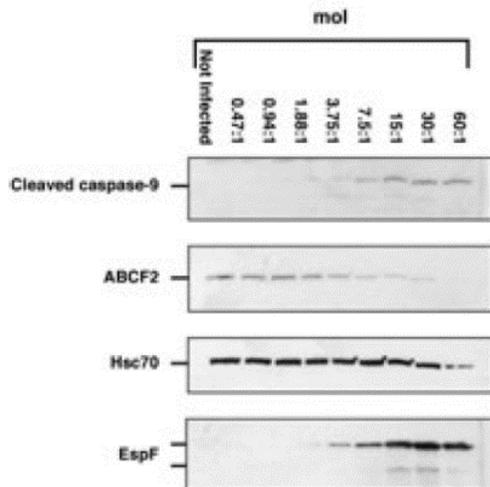


Figure 10: EspF induit la diminution de la quantité d'Abcf2 et le clivage de la caspase-9 qui signe le recrutement de la voie apoptotique mitochondriale

La réduction de l'expression d'Abcf2, par siRNA, dans des cellules épithéliales augmentait l'apoptose induite par l'infection. Au contraire, la surexpression ectopique d'Abcf2 réduisait le déclenchement de la voie apoptotique mitochondriale. Nous pouvons conclure qu'EspF cible la protéine hôte Abcf2 pour déclencher l'apoptose (Nougayrède et al., 2007).

L'équipe de Fernando Navarro-Garcia (Mexico) a montré par la suite, dans un travail sur lequel nous avons collaboré, que EspF pouvait interagir avec de nombreux autres partenaires cellulaires. EspF interagit avec l'actine, la profiline (un modulateur de la polymérisation d'actine), avec N-WASP et Arp2/3 (des régulateurs critiques de la polymérisation de l'actine), ainsi qu'avec les protéines des jonctions serrées, l'occludine, la claudine, ZO-1 et -2. De plus, ces protéines se relocalisaient dans les piédestaux sous les EPEC adhérentes aux cellules. Ceci suggérait un mécanisme par lequel EspF détourne le cytosquelette de la cellule pour maturer les piédestaux tout en provoquant l'ouverture des jonctions serrées et l'augmentation de la perméabilité paracellulaire (Peralta-Ramírez et al., 2008).

Ces travaux illustraient comment EspF est un effecteur « couteau suisse » multifonctionnel, qui peut interagir avec de nombreuses protéines de la cellule hôte via une série de motifs riches en proline et ainsi interférer avec différents processus cellulaires. Depuis ces travaux, d'autres partenaires ont été identifiés, et EspF a été impliqué dans la perturbation d'autres voies cellulaires, comme la perturbation des endosomes et l'inhibition de la phagocytose (Hua et al., 2018). L'effecteur EspF apparaît donc comme une arme sophistiquée de piratage multiple de la cellule infectée. On va voir maintenant que cette propriété n'est pas isolée chez les effecteurs des EPEC.

5- Cif, un nouvel effecteur des EPEC qui module le cycle cellulaire eucaryote

Lors des études des lésions d'A/E dans le modèle d'interaction EPEC – cellules en culture, certaines EPEC induisaient un phénotype original, qui n'était décelable que suite à l'incubation prolongée (>24 h) des cellules infectées. Ces EPEC « cytopathiques » induisaient une altération progressive du cytosquelette, avec une multiplication des plaques d'adhésions focales et des fibres d'actine, et un arrêt de la prolifération des cellules (figure 11). Il semblait donc que des EPEC, comme certaines ExPEC précédemment étudiées, pouvaient altérer le cycle des cellules hôtes.

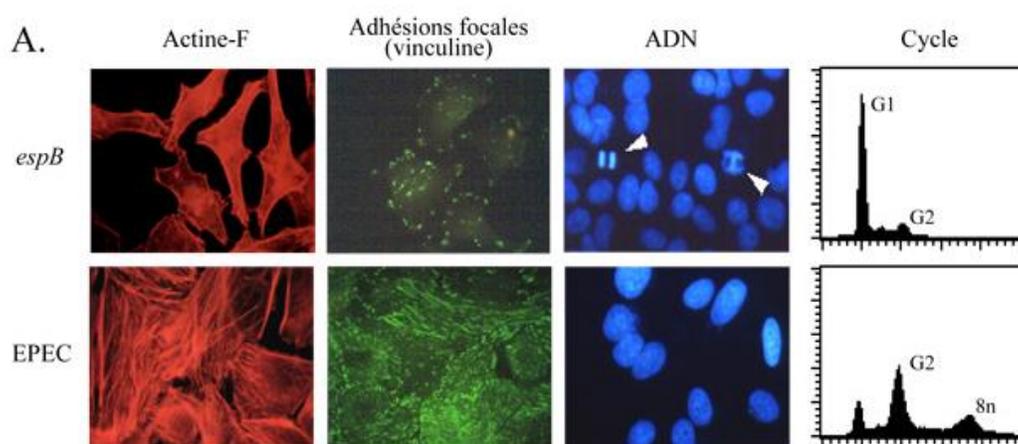


Figure 11: remodelage du cytosquelette et altération du cycle cellulaire 72 h après l'infection par une EPEC cytopathique.

Cet effet cytopathique était aboli chez les mutants *espA -B* et *-D*, ce qui indiquaient que les EPEC cytopathiques produisent un ou des effecteurs inconnus qui sont injectés dans la cellule cible via la seringue moléculaire (Nougayrède et al., 1999). L'étude du cycle cellulaire montrait que les cellules s'accumulaient en phase G2. Le marquage en *pulse chase* de la synthèse d'ADN montrait que la phase S n'était pas ralentie et que les cellules en phase G2 initiaient une nouvelle phase de synthèse d'ADN sans mitose, et rentraient

dans un cycle d'endoreduplication. Cette altération du cycle cellulaire n'était pas une conséquence fonctionnelle de l'altération du cytosquelette, car l'inhibition des GTPases Rho abrogeait la formation des fibres d'actine mais pas la perturbation du cycle cellulaire. L'arrêt du cycle et l'altération du cytosquelette étaient donc deux phénomènes fonctionnellement dissociables.

Chez les cellules eucaryotes, le cycle cellulaire est contrôlé par un réseau de circuits de surveillance et de détections de dommages, organisant des cascades de signalisation qui aboutissent aux complexes Cyclines/Cdk qui orchestrent la progression des cellules dans le cycle. La transition des cellules de la phase G2 vers la mitose est ainsi contrôlée par la Cycline B et la kinase Cdk1. Nous avons observé dans les cellules infectées par les EPEC que la kinase Cdk1 demeurait sous sa forme inactive (phosphorylée sur la tyrosine 15), ce qui rendait bien compte du blocage du cycle cellulaire en G2. Donc les EPEC cytopathiques induisent dans les cellules infectées un point de contrôle en G2 du cycle cellulaire (Nougayrède et al., 2001).

Par la suite, l'équipe a identifié l'effecteur des EPEC transloqué dans les cellules hôtes par le système de sécrétion de type III responsable de l'effet cytopathique, nommé Cif (pour *Cycle Inhibiting Factor*) (Marchès et al., 2003). Cif est aussi produit par d'autres bactéries pathogènes possédant un système de sécrétion de type III, comme *Burkholderia pseudomallei* (pathogène de classe 3 causant la Mélioiïdose, une infection respiratoire ou systémique avec un taux de mortalité élevé) et *Photorhabdus spp* (entérobactérie symbiotique de nématodes, et entomopathogène) (Jubelin et al., 2009). L'identification de Cif a permis d'étudier en détail son mode d'action. Nous avons pu démontrer que si l'arrêt du cycle cellulaire induit par Cif est corrélé au maintien de la phosphorylation inhibitrice de Cdk1, la voie de signalisation canonique qui implique la cascade ATM-Chk-Cdc25 n'est pas recrutée. En examinant les petites protéines qui sont connues pour moduler l'activité de Cdk1, nous avons mis en évidence une accumulation de p21 et p27, qui sont des protéines inhibitrices de Cdk1. Le mode d'action de Cif apparaît donc comme très original (Samba-Louaka et al., 2008; Taieb et al., 2006).

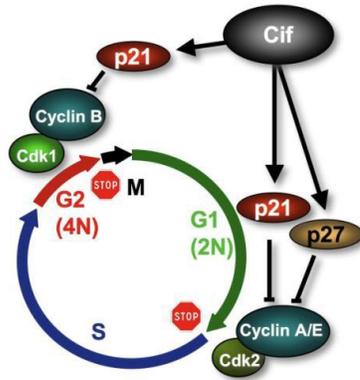


Figure 12: Cif induit l'accumulation de p21 et p27 qui inhibent les complexes Cycline/Cdk, ce qui conduit au blocage du cycle cellulaire.

Par la suite, en collaboration avec l'équipe d'Erec Stebbins au Rockefeller Institute (New York, USA), Cif a été purifié, cristallisé, et sa structure résolue. Il est ainsi apparu que Cif appartient à la superfamille des cystéines protéases/acétyl-transférases. Une triade catalytique (Cys-His-Asp) caractéristique de cette superfamille a été identifiée (Figure 13). La mutation des résidus de cette triade altère partiellement ou totalement (cas du mutant Cys) l'activité de Cif .

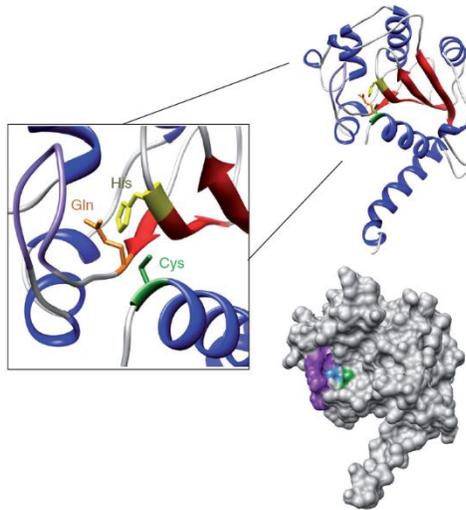


Figure 13: la structure de Cif met en lumière une poche catalytique de la superfamille des cystéines protéases

Afin d'élucider le mode d'action de Cif, nous avons poursuivi l'identification de ses cibles cellulaires. Un criblage par double hybride dans la levure a été effectué (avec la société Hybrigenics, Paris). Nous avons découvert que Cif interagit avec NEDD8, une petite protéine semblable à l'ubiquitine, qui est connue pour étiqueter des protéines telles que des cullines, afin d'en moduler leur activité. Nous avons vérifié la validité de ce partenaire par des approches en co-immuno-précipitation et de co-localisation

intracellulaire par microscopie. Il est ainsi apparu que Cif trafique jusqu'au noyau et co-compartmentalise avec NEDD8 (Figure 14).

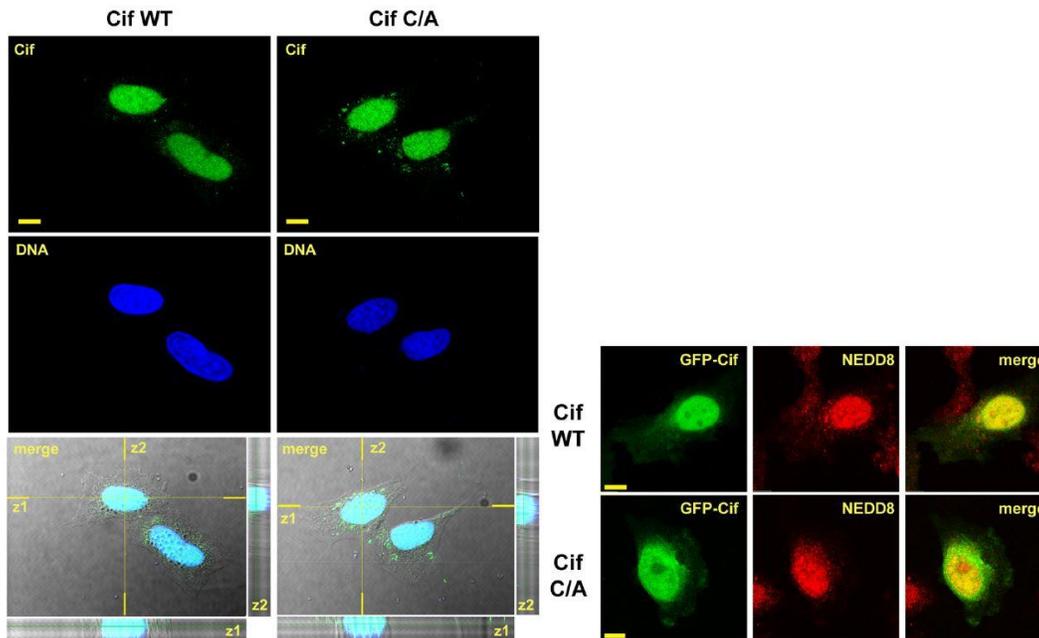


Figure 14: localisation de Cif (et d'un mutant catalytique) et de NEDD8 dans le noyau de la cellule hôte, vue en immunofluorescence et microscopie confocale.

L'équipe et en particulier Grégory Jubelin et Frédéric Taieb, en collaboration avec une équipe américaine spécialiste de ces voies de régulation via NEDD8, a ensuite démontré que Cif induit l'accumulation de cullines conjuguées à NEDD8, ce qui résulte en l'inhibition de l'activité du complexe culline-RING E3 ubiquitine ligase (CRL). Cette inhibition aboutie finalement à l'inhibition de l'ubiquitination et de la dégradation des substrats des CRL, dont RhoA (expliquant la formation des fibres de stress), p21 et p27 (résultant en l'arrêt du cycle cellulaire). Nous faisons ainsi la relation entre la voie de signalisation piratée par Cif, sa structure, et ses cibles cellulaires.

C'est à notre connaissance un mécanisme de piratage cellulaire unique dans le monde bactérien. Pendant la phase de révision de ce travail (Jubelin et al., 2010), nous avons été « scoopé » par l'équipe de Feng Shao qui publiait dans la revue *Science* le même résultat de l'interaction Cif-NEDD8. Ce dernier travail achevait d'élucider le mode d'action de Cif en montrant que c'est une deamidase qui altère la Glutamine 40 de NEDD8, inhibant ainsi l'activité des CRL (Cui et al., 2010).

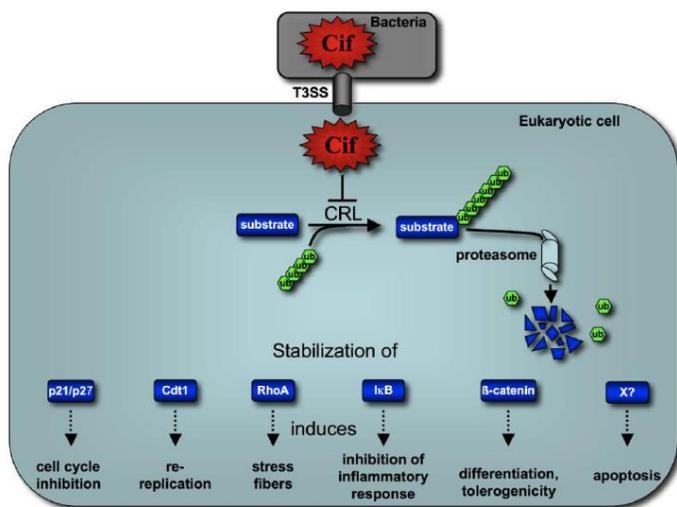


Figure 15: Cif inhibe les Cullines-RING ligases, ce qui inhibe la dégradation de nombreux substrats, altérant ainsi des voies de signalisation variées

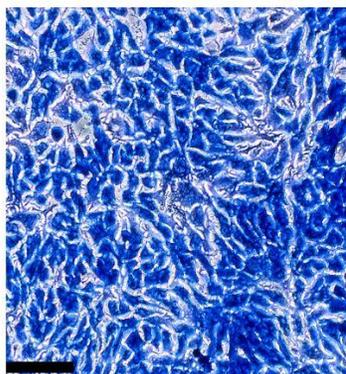
Ces travaux ont aussi mis en lumière que en inhibant l'activité des CRL, Cif touche un talon d'Achille de la cellule hôte, aboutissant au détournement d'une variété de voies de signalisation (figure 15). En effet il entraîne non seulement une stabilisation de p21 et p27 conduisant à une inhibition du cycle cellulaire, de RhoA induisant des fibres de stress d'actine, mais aussi de la protéine Cdt1 aboutissant à la reréplication de l'ADN que nous avons observé précédemment (Figure 11), et de IκB entraînant une altération de la réponse inflammatoire, ainsi que de la β-caténine favorisant la perturbation des processus de différenciation et la tolérogénicité (Taieb et al., 2011).

Ainsi, Cif est une autre arme sophistiquée qui, comme EspF, permet le détournement de divers processus cellulaires. Pourtant, Cif et EspF ne sont que deux effecteurs parmi la vingtaine de connus à ce jour qui sont injectés dans la cellule hôte par la seringue de type III des EPEC. L'étude de l'ensemble de ces effecteurs des EPEC fait apparaître qu'ils sont comme Cif et EspF, multifonctionnels, et agissent de manière complémentaire et redondante sur les grandes voies de la biologie de la cellule. Cette caractéristique est retrouvée chez d'autres bactéries pathogènes qui emploient un système

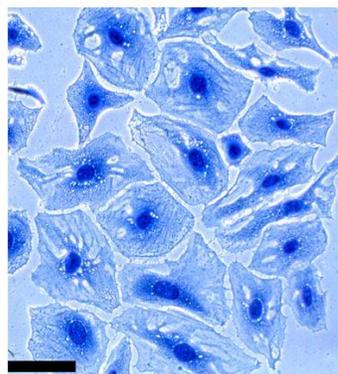
de sécrétion de type III, telles *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* et les EPEC/EHEC (Pinaud et al., 2018). Il est intéressant de constater que les grandes voies qui sont toujours ciblées par ces systèmes sont le cytosquelette & le trafic intra-cellulaire (tous deux aboutissant à l'altération de l'intégrité de la barrière épithéliale), la survie et l'apoptose cellulaire, et les voies NF-KB et MAPK qui régulent l'inflammation. Ainsi, tout comme ce qui est connu depuis longtemps pour les virus, les bactéries pathogènes ont aussi appris à pirater à leur avantage toutes les grandes voies essentielles de la cellule hôte.

6- *L'ennemi de l'intérieur ? Des E. coli bloquent le cycle cellulaire en endommageant l'ADN des cellules eucaryotes*

Nous savions depuis mes travaux pré-doctorat en 1996 qu'il existe de nombreuses souches ExPEC qui ne produisent pas CDT ou Cif, qui induisent pourtant la formation de cellules géantes (phénotype de « mégalocytose ») (figure 16).



HeLa cells 3 days
after a 1 h infection
with laboratory *E.*
coli strain



HeLa cells 3 days
after a 1 h infection
with an ExPEC

Figure 16: Une infection de 4 h avec une ExPEC induit la formation de grosses cellules, 3 jours après l'infection.

La famille des cyclomodulines semblait donc devoir encore s'agrandir. Au terme de mon postdoc à Baltimore et mes travaux sur EspF, j'ai donc rejoint l'équipe à Toulouse pour un second postdoc et identifier cette nouvelle cyclomoduline. Certaines souches ExPEC *cdt- cnf-* déclenchaient ce phénotype de mégalocytose associé à l'arrêt de la prolifération des cellules. Curieusement, cet effet exigeait un contact direct avec les bactéries vivantes, car aucune activité n'était détectable dans les surnageants, ni dans les lysats de bactéries, ni quand celles-ci étaient tuées avant contact avec les cellules (figure 17).

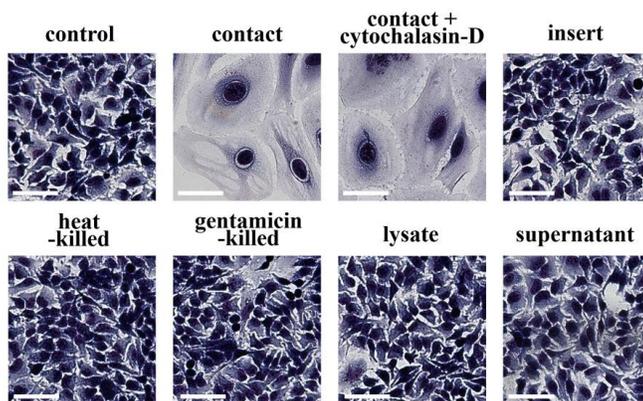


Figure 17: l'induction du phénotype de mégalocytose requière un contact direct avec des ExPEC vivantes

Dans le but d'identifier la toxine responsable de cet effet « contact dépendant », nous avons criblé deux bibliothèques de mutants de deux souches ExPEC obtenus par transposition. Les mutants qui n'induisaient plus la mégalocytose avaient leur transposon localisé dans une région de 54 kb du chromosome. Cette région avait toutes les caractéristiques d'un îlot génomique acquis par les bactéries par transfert horizontal. A notre surprise ⁶, les gènes portés par cet îlot génomique codaient pour de grosses enzymes (> 100 kDa) appartenant à la famille des polykétides synthases (PKS) et des peptides synthases (NRPS). Les PKS et NRPS sont des enzymes modulaires multifonctionnelles, qui effectuent des réactions de catalyse en chaîne, à partir d'acides aminés (protéino-gène ou non) et de malonyl co-A ou acetyl co-A, pour assembler des polykétides et des peptides non-ribosomiaux. Ces composés non-protéiques forment une large famille comprenant des toxines, des sidérophores, des pigments, et très nombreuses molécules d'importance

⁶ Nous étions encore guidés par le paradigme classique : un gène = une toxine protéique = un phénotype

médicale et agronomique : antibiotiques (par exemple l'érythromycine), antiparasitaires (avermectine), immunosuppresseurs (cyclosporine) et anti-tumoraux (bléomycine) (figure 18).

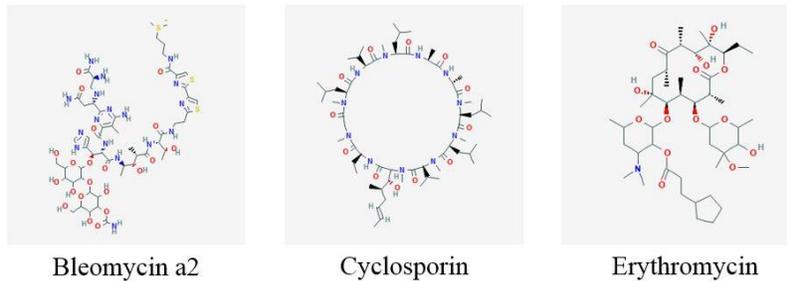


Figure 18 : exemples de polykétides et peptides non-ribosomaux produits par des NRPS et PKS chez des Streptomyces

Afin de prouver l'implication de l'îlot de 54 kb et de ses gènes codants pour la machinerie enzymatique PKS-NRPS dans le déclenchement de la mégalocytose, nous avons utilisé les postulats moléculaires de Koch et muté les différents gènes de l'îlot. Nous avons montré ainsi qu'ils étaient presque tous (sauf deux, les gènes *clbM* et *clbS*) nécessaires à l'expression du phénotype. Puis, nous avons montré que le transfert de l'îlot porté sur un BAC dans une *E. coli* de laboratoire conférait à cette souche la capacité de bloquer la prolifération des cellules eucaryotes (figure 19).

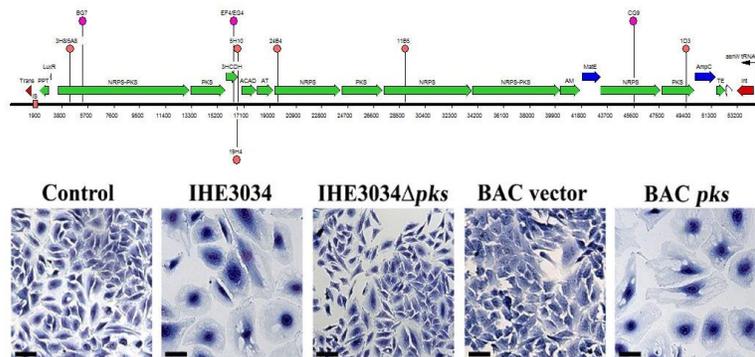


Figure 19: l'îlot pks permet l'expression du phénotype de mégalocytose.

Nous avons ainsi démontré que l'îlot génomique était nécessaire et suffisant pour produire cette nouvelle toxine, très probablement une molécule hybride polykétide-peptide non-ribosomal, que nous avons nommé « colibactine ».

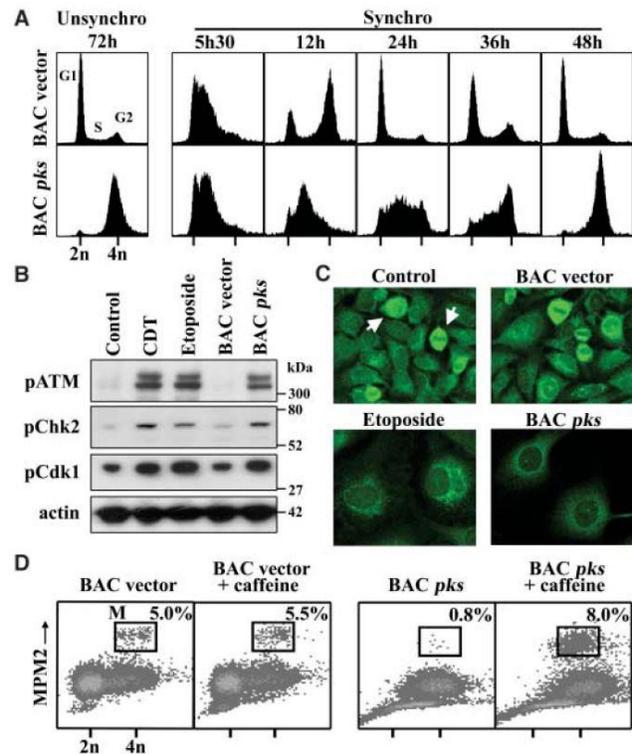
Nous avons ensuite effectué quelques tentatives de purification de la colibactine. Mais nous avons vite compris que son isolement et la détermination de sa structure

allaient constituer des défis de taille. En effet, la colibactine n'est pas une exo- ou endotoxine classique, car on a vu qu'aucun phénotype n'était détecté dans un surnageant ou un lysat de la bactérie. Le phénotype exigeait au contraire un contact direct des bactéries vivantes avec les cellules cibles. Ceci était cohérent avec la notion, connue, que les métabolites secondaires de la famille des polykétide-peptides sont synthétisés par les NRPS et PKS à des concentrations usuellement extrêmement faibles, et que ces molécules peuvent être aussi instables qu'elles sont bioactives. De plus, leur synthèse est typiquement inductible et très finement régulée par de multiples facteurs environnementaux – c'est pourquoi la majorité des PKS et NRPS que l'on trouve dans les génomes des *Streptomyces* sont cryptiques, demeurant silencieux en l'absence de stimuli adéquat (Scherlach and Hertweck, 2009). De fait, leur expression dans des conditions *in vitro* est souvent inappropriée et très restreinte. Il nous est ainsi rapidement apparu que la purification de la colibactine allait nécessiter un effort de longue haleine (on verra qu'il faudra 13 ans !), multidisciplinaire & collaboratif, qui devait passer aussi par la compréhension de sa synthèse *in bacterio* ainsi que de ses effets *in cellulo* chez la cellule hôte.

Nous avons donc ensuite cherché à comprendre comment la colibactine pouvait induire un arrêt de la prolifération cellulaire. Des cellules en culture infectées par des *E. coli* hébergeant l'îlot *pks* avaient leur phase de synthèse d'ADN fortement ralentie et s'accumulaient en phase G2. Ceci suggérait que le contact avec les bactéries induisait chez les cellules eucaryotes une réponse similaire à celle induite par un stress génotoxique. Nous avons donc testé si la voie de contrôle de dommages à l'ADN était activée (Figure 20). Nous avons observé que la kinase ATM, qui joue un rôle central dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN, était activée. De plus, la kinase Chk2, qui est phosphorylée par ATM pour relayer le signal était elle aussi activée. Un substrat de Chk2 est la phosphatase Cdc25C. Cette dernière, quand elle est phosphorylée, s'associe avec des protéines de la famille 14-3-3 ce qui provoque sa rétention cytoplasmique et abroge la déphosphorylation activatrice de Cdk1. Nous avons en effet bien observé que Cdc25C demeurait dans le cytoplasme des cellules transformées, ce qui conduisait bien au maintien de la phosphorylation inhibitrice de Cdk1 et au bloc du cycle en G2. De plus, un inhibiteur d'ATM (la caféine) permettait l'entrée des cellules en mitose. Ce résultat

confirmait un rôle d'ATM et du recrutement de la voie de contrôle des dommages à l'ADN dans la réponse cellulaire à l'intoxication par la colibactine.

Figure 20: blocage du cycle cellulaire avec perturbation de la progression dans la phase S (panel A), recrutement de la voie ATM-Chk2-Cdk1 (panel B), séquestration cytoplasmique de Cdc25C (panel C), et réentrée des cellules en mitoses par traitement à la caféine (panel D), chez les cellules infectées avec une *E. coli* de laboratoire portant l'ilot *pks*



Enfin, en examinant un marqueur cellulaire de dommage à l'ADN (phosphorylation de l'histone H2AX) et en utilisant le test « comète », qui permet de visualiser l'ADN fragmenté migrer par électrophorèse hors des noyaux cellulaires, nous avons démontré que le contact avec les bactéries produisant la colibactine induisait, des cassures double brin dans l'ADN des cellules hôtes (figure 21).

En conclusion, nous avons identifié une nouvelle toxine colibacillaire qui bloque la prolifération des cellules hôtes en induisant des cassures double brin de l'ADN. C'est la première fois qu'un système enzymatique NRPS-PKS produisant une molécule active sur des cellules eucaryotes est caractérisé chez *E. coli*. Comme c'est une espèce bactérienne pour laquelle le génie génétique est bien maîtrisé, cette découverte fournissait une nouvelle clé biotechnologique pour recombinaison des NRPS et PKS afin de produire de façon

rationnelle de nouvelles molécules d'intérêt (antibiotiques, antitumoraux...). Cette découverte posait aussi, surtout, une question de santé publique. En effet, les cassures double brin de l'ADN sont des lésions dangereuses pour les cellules eucaryotes car elles sont connues comme pouvant entraîner des mutations et des aberrations chromosomiques.

L'examen de la distribution de l'îlot *pks* codant pour la colibactine dans l'espèce *E. coli* a généré le résultat le plus surprenant de ce travail. L'îlot *pks* est non seulement présent chez près de 50% des ExPEC, mais aussi largement distribué chez des *E. coli* commensales : dans une première étude épidémiologique, 34% des souches du groupe phylogénétique B2 isolées d'individus asymptomatiques hébergeait l'îlot. Nous avons même retrouvé l'îlot *pks* (et l'activité toxique associée) chez la souche probiotique Nissle 1917 qui est utilisée en Allemagne sous le nom de Mutaflor pour traiter des affections intestinales (colite ulcéraire et maladie de Crohn). L'îlot *pks* est présent quasi exclusivement chez des *E. coli* du 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. La génotoxicité des *E. coli* portant l'îlot de synthèse de la colibactine et la forte prévalence dans de nombreuses souches pathogènes ou commensales (et même dans la souche probiotique Nissle 1917), posent donc la question de l'implication de ces souches dans des processus de cancérisation.

Cette découverte a été publiée dans *Science* (Nougayrede et al., 2006). Le papier a propulsé pendant quelques temps l'équipe sous les feux de la rampe (et généré quelques jalousies, curieusement), et a joué comme un accélérateur de carrière pour certains d'entre nous – j'ai passé avec succès le concours de recrutement de chargé de recherche à l'INRA(e) tandis que le papier était en « révision positive ». Quand je regarde rétrospectivement comment nous avons déroulé ce travail, je constate que nous avons eu de la chance. La chance de ne pas découvrir l'îlot *pks* dès 1996 lors de mes premiers

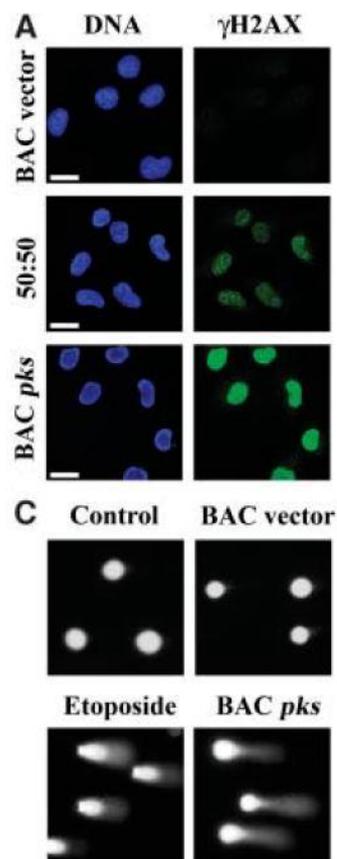


Figure 21: l'infection avec les *E. coli pks+* induit des cassures double brins de l'ADN des cellules. Panel A, phosphorylation de l'histone H2AX. Panel C, formation de comètes d'ADN par migration électrophorétique suite aux cassures de l'ADN.

travaux pré-doctoraux. J'avais alors construit une banque de mutants par transposition chez la souche ExPEC BM2-1, sans savoir qu'elle était « mutatrice » et semblait perdre « spontanément » le phénotype de mégalytose. Cela nous avait interdit d'identifier des mutants *pks*, et c'était une chance car en 1996 nous n'étions pas encore équipés avec le savoir-faire pour faire le lien entre le phénotype de mégalytose et les dommages à l'ADN. Ce savoir-faire a pu être construit patiemment dans l'équipe, avec les travaux pionniers de Jean De Rycke, Eric Oswald, Frédéric Taieb... en étudiant la toxine CDT. Ce sont ces travaux qui ont permis de mettre au point et affuter les techniques qui étaient alors utilisées en routine quand nous avons réexaminé le phénotype de mégalytose en 2003. Tous les outils étaient ainsi disponibles pour faire les preuves et imbriquer rapidement les pièces du puzzle. Enfin, nous avons eu la chance de pouvoir collaborer, juste au bon moment, avec l'équipe de Jörg Hacker et Uli Dobrindt à Würzburg, qui avait identifié et cloné l'îlot *pks*, sans avoir identifié de leur côté le phénotype associé. Enfin, cette histoire illustre comment le temps long (ici 10 ans entre la découverte de la mégalytose et la publication) est important dans notre travail.

7- La voie de synthèse de la colibactine : un rôle dans la virulence

Dans la continuité de la découverte de l'îlot *pks* nous avons effectué une étude épidémiologique en collaboration avec James Johnson (University of Minnesota, Minneapolis, USA). Nous avons cherché l'îlot *pks* dans une collection d'*E. coli* isolées chez des patients souffrants d'affections extra-intestinales ou chez des individus en bonne santé. Chez les souches du groupe phylogénétique B2, l'îlot *pks* était significativement associée au sous-groupe le plus virulent : la plus forte prévalence de l'îlot *pks* s'observe dans les isolats de bactériémies (Johnson et al., 2008b). Par ailleurs, en collaboration avec l'équipe d'Uli Dobrindt, nous avons observé que la colibactine est également produite par d'autres genres d'entérobactéries pathogènes telles que *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes* et *Klebsiella pneumoniae* (Putze et al., 2009). Ces données épidémiologiques suggéraient que la colibactine constituerait un facteur de virulence pour les bactéries la produisant. Avec Ingrid Marcq postdoctorante dans l'équipe, nous avons donc testé expérimentalement son rôle dans le pouvoir pathogène des ExPEC. Afin d'inactiver la production de colibactine dans une souche ExPEC, nous avons choisi non pas de déléter tout l'îlot *pks* du chromosome (une mutation pléiotrope par nature, difficile à valider par trans-complémentation), mais de muter le gène *clbA* qui code pour une phosphopantetheinyl transferases (PPTase) (Beld et al., 2014). L'activité de cette enzyme permet la maturation post-traductionnelle des huit NRPS et des PKS codées par l'îlot *pks*, par ajout d'un bras phosphopantetheinyl qui sert d'accepteur pour les réactions d'élongation des métabolites en cours d'élongation (figure 22).

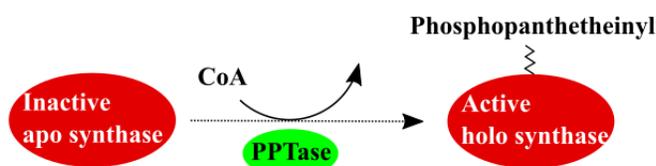


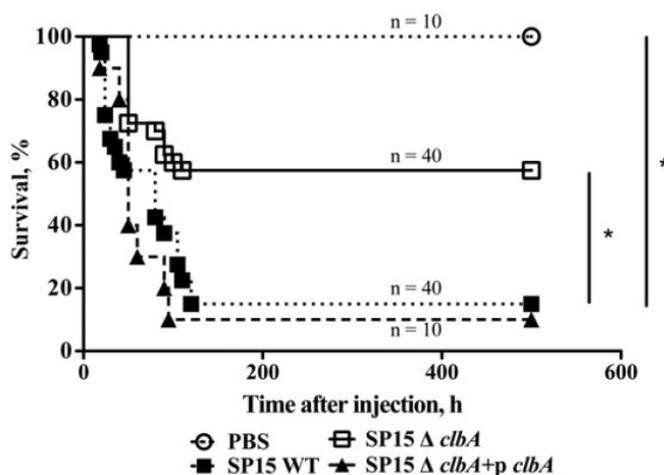
Figure 22: les NRPS et PKS nécessitent une modification post-traductionnelle par l'addition d'un groupe phosphopantetheinyl, via une phosphopantetheinyl transferase, pour synthétiser le polyketide-peptide

On garantissait ainsi l'inactivation complète de la machinerie de synthèse de la colibactine, et comme attendu la mutation *clbA* résulte en la perte complète de génotoxicité.

Un modèle de sepsis aiguë a été développé chez la souris, dans lesquels la souche ExPEC *pks+* SP15 produisant la colibactine, ou un mutant *clbA* ne produisant plus la colibactine, ou encore la souche mutée complémentée avec un plasmide p-*clbA*, sont injectés dans le coussinet plantaire. Les animaux étaient ensuite réhydratés et traités par injection d'un antibiotique. Il est apparu que la colibactine est un facteur aggravant de la lymphopénie (diminution du nombre des lymphocytes T et B dans la rate) lors du sepsis.

Des tests *in vitro* sur des lymphocytes T primaires isolés de souris ou sur des cellules de la lignée cancéreuse Jurkat ont montré que la colibactine leur inflige des dommages à l'ADN comme sur les cellules épithéliales, ce qui induit ensuite une mort par apoptose. La colibactine pourrait donc agir comme une lymphotoxine, active *in vivo*. De pair avec ce phénotype, nous avons observé une létalité significativement diminuée chez les animaux inoculés avec le mutant *clbA* ne produisant plus la colibactine par rapport à la souche sauvage ou le mutant complémenté.

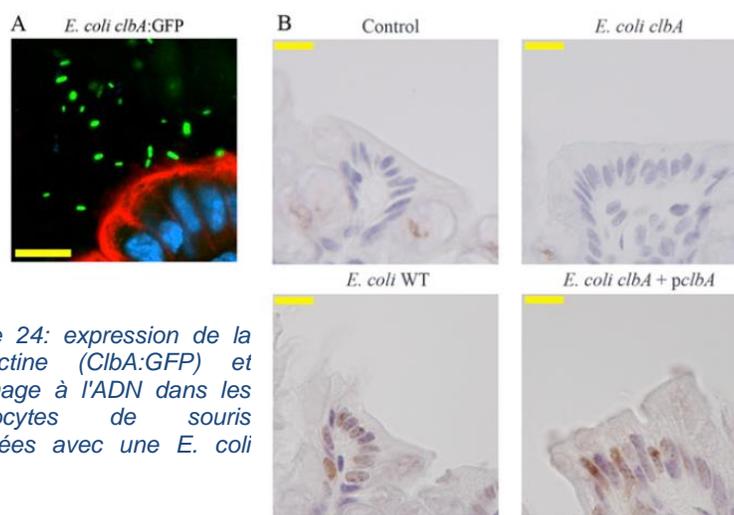
Figure 23: Une ExPEC mutée pour le gène *clbA* montre une virulence et une létalité diminuée dans un modèle de sepsis chez la souris



On démontre ainsi que la colibactine (ou tout du moins le gène *clbA*) est un facteur de virulence lors d'un sepsis.

8- Une toxine mutagène produite dans l'intestin

Dès la découverte de l'îlot *pks*, on avait observé qu'il n'était pas restreint aux seules souches pathogènes ExPECs, mais qu'on le retrouvait fréquemment dans des souches commensales dans les microbiotes intestinaux de sujets en bonne santé, jusqu'à 40% des isolats dans certaines études épidémiologiques (Nougayrede et al., 2006; Putze et al., 2009). Il était donc important de commencer à évaluer la dangerosité de sa présence dans les colibactines dans un contexte de portage et de commensalisme. Avec un doctorant que j'ai dirigé, Gabriel Cuevas-Ramos, nous avons donc dans un premier temps examiné si la colibactine était exprimée par les bactéries dans la lumière intestinale. Dans un modèle d'anse intestinale chez la souris, un système rapporteur GFP montrait que le promoteur du gène *clbA* de l'îlot *pks* était actif. De plus les noyaux des entérocytes des anses intestinales inoculées par une *E. coli pks+* montraient une phosphorylation de l'histone H2AX (on a vu ci-dessus, un marqueur des dommages à l'ADN). En revanche, aucun marquage n'était observé dans les anses intestinales inoculées par un mutant *clbA* qui ne produit plus la colibactine. Donc la colibactine est produite par les bactéries dans la niche intestinale et induit des dommages à l'ADN (Figure 24).



Ces dommages à l'ADN étaient détectables sous la forme de quelques *foci* nucléaires de H2AX phosphorylée, ce qui indiquait un niveau de dommage modéré. Nous avons donc ensuite examiné *in vitro* l'impact d'un tel niveau de dommage à l'ADN, dans des cellules intestinales en culture exposées à différentes quantités de *E. coli pks+*. Nous avons observé qu'en fonction du nombre de bactéries par cellule infectée, et donc de la dose de colibactine qui est délivrée, il était possible d'observer différentes réponses cellulaires. A haute dose, nous observions le phénotype irréversible de mégalocytose et mort cellulaire, tandis qu'à faible dose (de l'ordre de celles qu'on avait dans l'expérience *in vivo*), la plupart des cellules survivaient. Ces cellules montraient des dommages à l'ADN modérés, de pair avec un arrêt transitoire du cycle cellulaire, puis re-entraient dans le cycle cellulaire et se divisaient, ce qui indiquaient qu'elles avaient réparé les lésions. Toutefois, une fraction des cellules montrait des aberrations lors de la division, avec formation de ponts anaphasiques. Ces cellules montraient aussi des aberrations persistantes de la structure et du nombre des chromosomes (aneuploidie) (Figure 25).

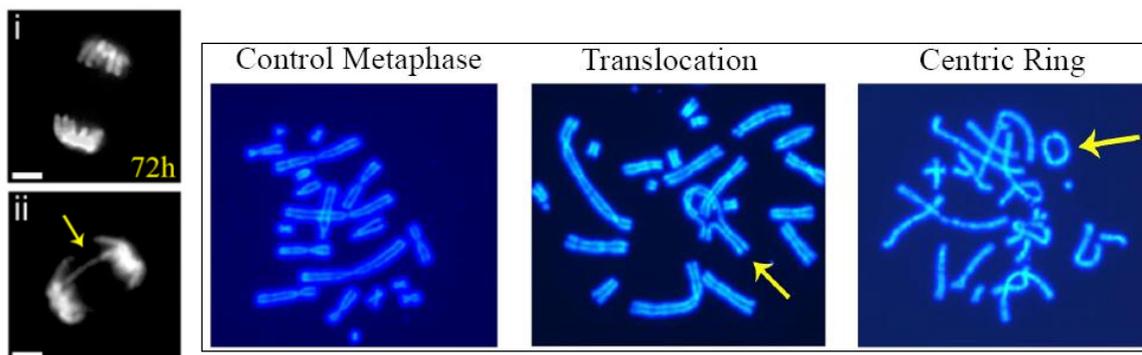


Figure 25: pont anaphasique et aberrations chromosomiques dans des cellules exposées à de faibles doses de *E. coli* produisant la colibactine.

Ces phénomènes d'aneuploïdie et d'aberrations mitotiques sont connus pour entretenir des dommages chromosomiques chroniques, un moteur de la transformation cellulaire. En effet, des tests quantitatifs de mutation dans des gènes marqueurs, ainsi qu'un test de croissance dans de l'agar mou (qui permet de tester la perte du phénotype de dépendance en l'adhésion) démontraient que la colibactine est mutagène, et qu'elle peut induire la transformation cellulaire. Les dommages à l'ADN induits par la colibactine sont donc mutagènes, probablement car ils sont difficiles à réparer avec fidélité. Ceci confirmait aussi le potentiel de la colibactine comme agent de transformation

néoplastique. Ce travail a été publié dans les *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* avec Gabriel Cuevas-Ramos qui avait conduit le travail lors de sa thèse en premier auteur, j'étais le dernier auteur correspondant (Cuevas-Ramos et al., 2010).

Des cellules géantes en sénescence

Nous avons aussi étudié les cellules exposées à de fortes doses infectieuses qui montrent donc le phénotype irréversible de mégalocytose. Avec Thomas Sécher, postdoctorant dans l'équipe, nous avons observé dans les noyaux des cellules survivantes des foyers de dommages à l'ADN persistants. Ces cellules exécutaient un programme de sénescence prématurée avec l'expression des inhibiteurs de CDK p16 et p21, ainsi que de la SA-beta-Galactosidase (figure 26). Ces cellules exprimaient aussi un phénotype sécrétoire associé à la sénescence, en sécrétant des médiateurs pro-inflammatoires (IL6, IL8, MMP3). De façon remarquable le surnageant conditionné de ces cellules induisait de façon paracrine des dommages à l'ADN et la sénescence dans des cellules naïves, et promouvait la croissance de cellules cancéreuses.

Ces résultats explicitent ainsi le phénotype de mégalocytose, qui est tout simplement une manifestation directe de la sénescence induite par la colibactine. Ils suggèrent aussi un nouveau mécanisme par lequel les dommages provoqués par la colibactine pourraient altérer le microenvironnement tissulaire et promouvoir la tumorigénèse. Nous avons publié ces résultats dans un article sur lequel j'étais le dernier auteur correspondant (Secher et al., 2013).

Des dommages à l'ADN dès le premier âge

On a vu ci-dessus que l'effet génotoxique de la colibactine dépend fortement du niveau d'exposition aux bactéries qui la produisent. Or, au cours de sa vie, l'hôte peut être exposé à *E. coli* à des niveaux qui varient sur plusieurs ordres de grandeur. En effet *E. coli* fait partie du « primobiotique », les bactéries qui colonisent l'intestin dans les premiers jours après la naissance (Secher et al., 2016). Sa densité peut alors dépasser 10^9 UFC/gramme de contenu. Puis chez l'enfant et l'adulte, avec l'arrivée des bactéries anaérobies strictes

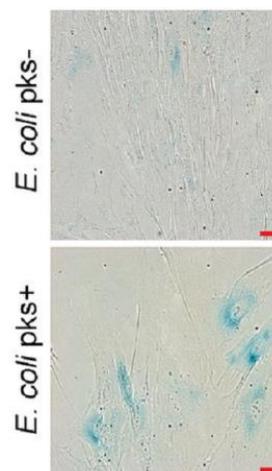


Figure 26: expression de la bêta-galactosidase associée à la sénescence dans les cellules exposées à de fortes doses de *E. coli pks+*

qui dominent le microbiote mature, *E. coli* est relégué à une place plus modeste, avec 10^3 - 10^7 unités / gramme de contenu. Ainsi, pour examiner l'impact de la colibactine dans le contexte de l'interaction bactérie-hôte dans toute sa dynamique, il nous fallait développer un modèle *in vivo* de portage et de commensalisme qui mime la primocolonisation du nouveau-né et la colonisation intestinale au long terme à l'âge adulte. Nous nous sommes inspiré de travaux séminaux de l'équipe de B Bret Finlay (Wickham et al., 2007) qui avaient montré que l'expression de facteurs de virulence (comme Tir ou EspF) par *Citrobacter rodentium* sont essentiels à la transmission des bactéries entre individus. Avec Delphine Payros, doctorante dans l'équipe et Maiwenn Olier, nous avons mis au point un modèle murin de transmission verticale de souches d'entérobactéries via le microbiote maternel. Dans ce modèle, la souche *E. coli* d'intérêt est inoculée à une souris ou une ratte gestante, traitée à la streptomycine afin de faciliter la colonisation. A la naissance, la bactérie excrétée dans l'environnement direct par la mère contamine les nouveau-nés qui sont ainsi colonisés « naturellement » (figure 27). Alternativement la souche de *E. coli* peut être dispersé dans la cage et sur les animaux au moment de la mise

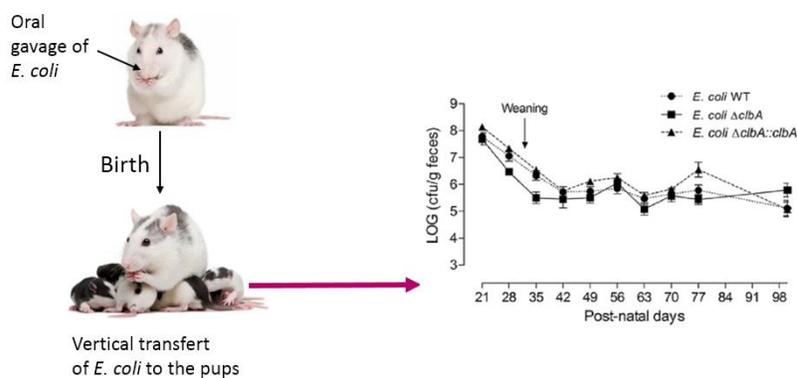


Figure 27: un modèle naturel de transmission du colibiote par colonisation verticale.

bas.

Nous avons montré dans ce modèle qu'un mutant *clbA* ne produisant pas la colibactine colonise les nouveau-nés puis les adultes comme la souche parentale sauvage. La *E. coli* commensales *pks+* produisant la colibactine induisait des dommages à l'ADN détectables dans les entérocytes chez les nouveau-nés.

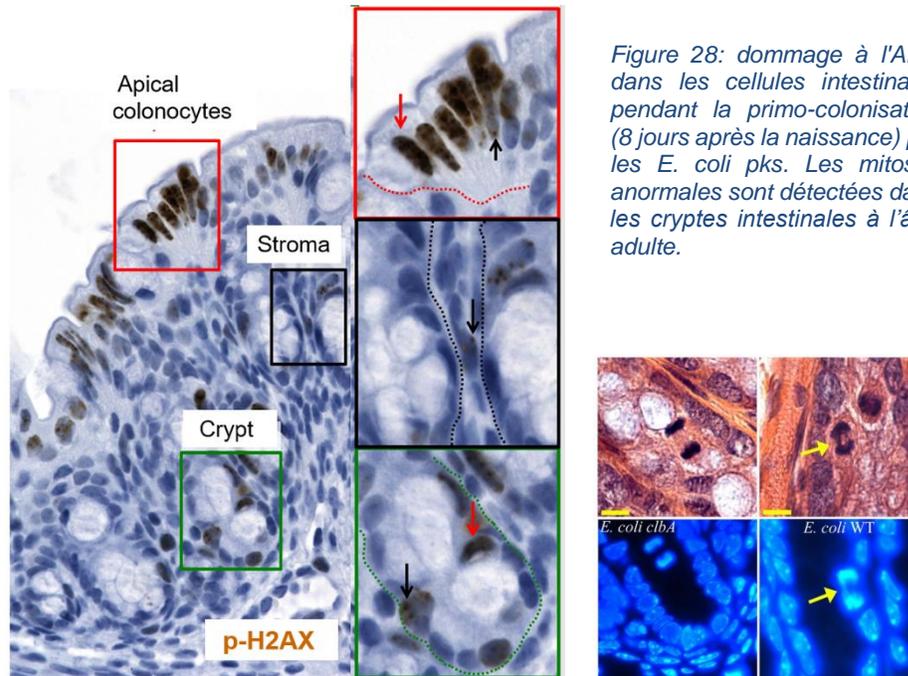


Figure 28: dommage à l'ADN dans les cellules intestinales pendant la primo-colonisation (8 jours après la naissance) par les *E. coli* pks. Les mitoses anormales sont détectées dans les cryptes intestinales à l'âge adulte.

De manière intéressante, ces dommages à l'ADN n'étaient plus détectables chez les souris adultes, mais des signes d'instabilité chromosomique (ponts anaphasiques) étaient détectés dans le compartiment prolifératif de l'épithélium, ainsi qu'une altération à long terme du programme développemental de la crypte intestinale. Ces résultats suggéraient que la colibactine pourrait imprimer un effet durable lors d'une fenêtre d'exposition pendant le jeune âge (Payros et al., 2014).

9- Un probiotique... génotoxique !

On avait observé dès la découverte de l'îlot *pks* qu'il est aussi présent chez la souche *E. coli* Nissle 1917, un probiotique utilisé dans certains pays européens comme traitement thérapeutique alternatif chez les patients souffrant de maladie inflammatoire intestinales chroniques. En collaboration avec l'équipe de Muriel Thomas & Philippe Langella (Micalis, Jouy-en-Josas) nous avons vérifié que Nissle 1917 produit bien la génotoxine dans la lumière intestinale, et qu'elle induit des dommages à l'ADN des entérocytes chez des souris monoxéniques (manuscrit en préparation). Un mutant *clbA* n'était plus génotoxique pour les cellules intestinales.

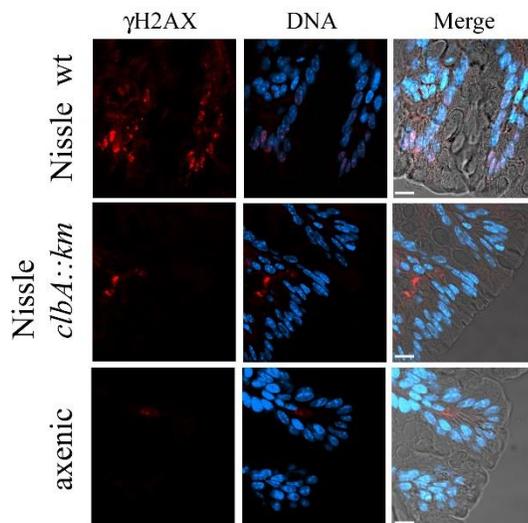


Figure 29: la bactérie probiotique Nissle 1917 induit des dommages à l'ADN des entérocytes de souris monocolonisées.

Ayant ainsi généré une souche Nissle 1917 $\Delta clbA$ non génotoxique, il restait à vérifier que ce mutant *clbA* conservait bien ses propriétés probiotiques. De façon surprenante, les propriétés anti-inflammatoires de Nissle 1917 observées dans différents modèles de colite induite chez le rat ou la souris, étaient altérées chez le mutant *clbA*. L'activité anti-inflammatoire de Nissle 1917 requière donc l'îlot *pks*, tout du moins son gène *clbA* (Olier et al., 2012).

Ceci nous a conduit naturellement à poser la question d'un rôle pléiotrope de *clbA*. Est-ce que la PPTase ClbA pouvait être impliquée dans la synthèse d'autres métabolites bactériens synthétisé par des NRPS-PKS avec un rôle dans les propriétés probiotiques de Nissle 1917 ? Il apparaissait que pour construire de manière raisonnée un mutant de Nissle 1917 non génotoxique mais pas altéré pour ses propriétés probiotiques, il fallait mieux comprendre la voie de biosynthèse codée sur l'îlot *pks*. Ce travail était aussi nécessaire pour répondre aux nombreuses questions qui restaient posées pour comprendre l'impact de la colibactine sur l'hôte et sa santé à long terme, ainsi que pour la purifier et élucider sa structure. En particulier, comment est-elle synthétisée, comment induit-elle des dommages à l'ADN et *in fine* quel est l'impact sur la santé de l'hôte ? Pour aborder ces questions, nous avons choisi d'étudier sa synthèse sous l'angle de la toxicité pour les bactéries la produisant.

10- Comment produire une génotoxine sans s'intoxiquer soi-même ?

La colibactine est produite sous forme d'une pré-drogue inactive.

Nous avons précédemment montré qu'un mutant du gène *clbP* sur l'îlot *pks* n'était plus toxique pour les cellules eucaryotes, suggérant que ClbP pourrait être une enzyme de maturation essentielle pour produire une colibactine active. Avec Olivier Baron (doctorant que je co-encadrait, d ec ed e cruellement au début de ses travaux), et en collaboration avec l'équipe de Richard Bonnet & Damien Dubois (CHU de Clermont-Ferrand), la structure de la protéine ClbP a été déterminée par cristallographie aux rayons X. Cette structure a fait apparaître une poche catalytique avec un site actif ⁹⁵SxxK qui indiquait une activité peptidase. La mutation dirigée des acides aminés du site catalytique résultait en l'abrogation des dommages à l'ADN (figure 30), indiquant que l'activité peptidase de ClbP est requise pour la maturation du ou des métabolites synth esiss es par les NRPS et PKS.

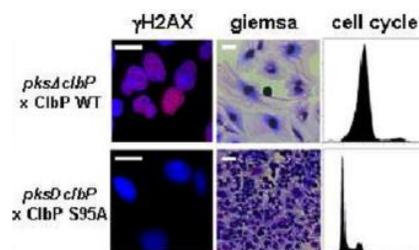


Figure 30: la mutation d'un seul acide aminé du site peptidase de ClbP abroge la génotoxicité.

De plus, ClbP est une protéine transmembranaire, et le site actif est localis e dans le périplasme. Ceci suggère le modèle dans lequel la colibactine est d'abord synth esiss ee sous forme d'un métabolite inactif, la « pré-colibactine », qui est exportée vers le périplasme par des pompes à efflux (dont la protéine transmembranaire ClbM codée sur l'îlot *pks*), où elle est clivée par l'activité peptidase de ClbP. Ce processus peut être consid er e comme un système d'autoprotection de la bactérie productrice, qui localise ainsi la toxine active loin de l'ADN cytoplasmique. Ces résultats ont été ensuite confirm es et compl et es par l'équipe d'Emily Balskus (Harvard), qui a démontré que les NRPS ClbN et ClbB effectuent les

premières étapes de synthèse de précolibactine en incorporant un acyl-asparagine (C14-Asn) qui sert de substrat à ClbP (Brotherton and Balskus, 2013).

Identification de la protéine de résistance à la colibactine.

Avec Nadège Bossuet-Greif, assistante ingénieure dans l'équipe, et récemment inscrite en doctorat sous ma co-direction, nous avons poursuivi l'examen des mécanismes d'autoprotection de la bactérie productrice de colibactine. Nous avons étudié le rôle du gène *clbS* de l'îlot *pks* pour lequel aucune fonction n'avait pu être attribuée. Un mutant *clbS* induisait toujours des dommages à l'ADN dans les cellules eucaryotes, mais ce mutant montrait une croissance altérée. Ce phénotype était abrogé chez les double mutant *clbS clbA* et *clbS clbP* qui ne produit pas, ou ne mature pas la (pré)colibactine. Le mutant *clbS* montrait une activation de la voie SOS, ce qui suggérait que la réponse aux dommages à l'ADN constituait la dernière couche de défense de la bactérie contre la toxine. En effet, la mutation de *uvrB* qui code pour le système de réparation de dommage par excision de nucléotide, dans un mutant *clbS*, montrait une croissance fortement altérée. Enfin, l'expression ectopique du gène *clbS* dans des cellules eucaryotes les protégeait de la génotoxicité de l'infection avec des bactéries produisant la colibactine (figure 31).

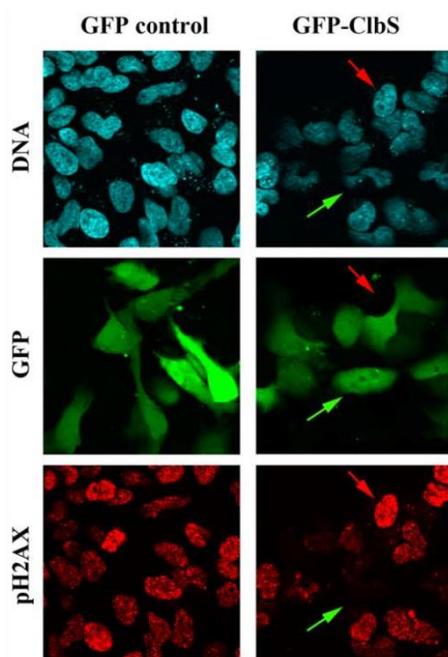


Figure 31: l'expression de ClbS-GFP protège les cellules épithéliales contre la génotoxicité de la colibactine.

ClbS est donc une protéine de résistance à colibactine, qui complète la stratégie d'efflux et d'activation périplasmique de la génotoxine pour protéger la bactérie productrice (figure 32). Nous avons publié ce travail avec Nadège Bossuet-Greif en premier auteur, j'étais dernier auteur correspondant (Bossuet-Greif et al., 2016).

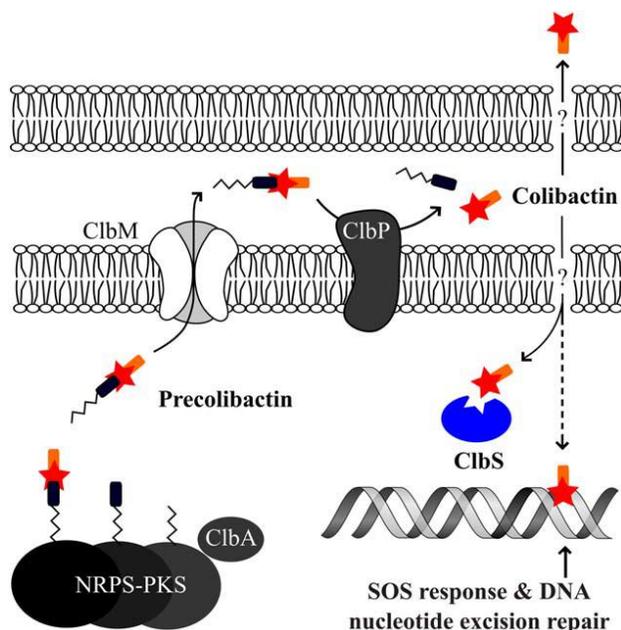


Figure 32: comment synthétiser une génotoxine sans s'intoxiquer soi-même ?

La découverte des fonctions de ClbP et ClbS ouvraient la voie à la purification et la caractérisation de la précolibactine par les chimistes, comme on le verra un peu plus loin. Nous avons aussi construit un mutant *clbP* chez la souche probiotique Nissle 1917, dans le but d'inhiber sa génotoxicité sans altérer la production de sidérophores comme dans le mutant *clbA*. Mais nous avons eu une nouvelle surprise quand nous avons vérifié si ce mutant conservait son pouvoir probiotique...

11- Interactions fonctionnelles entre les voies de biosynthèse de la colibactine et des sidérophores

Les séquences de génomes de souches *pks+* indiquent que l'îlot *pks* est toujours associé génétiquement à l'îlot génomique HPI (*High Pathogenicity Island*) qui code pour la synthèse d'un sidérophore, la Yersiniabactine. Ces souches produisent jusqu'à 2 autres sidérophores, l'entérobactine et la salmocheline (cette dernière étant un dérivé C-glycosylé de l'entérobactine). La biosynthèse des sidérophores et de la colibactine requière strictement une activité PPTase. Deux PPTases étaient connues chez *E. coli* : EntD (codée sur le « core » génome commun à l'espèce *E. coli*) et ClbA (codée sur l'îlot *pks*). La PPTase impliquée dans la synthèse de la Yersiniabactine n'était pas connue. Patricia Martin, postdoctorante dans l'équipe, a donc fait l'hypothèse que ClbA pouvait être la PPTase requise pour la synthèse de Yersiniabactine. En effet, ClbA contribue non seulement à la synthèse de la colibactine, mais aussi à la synthèse des sidérophores, et il existe une interchangeabilité fonctionnelle entre EntD et ClbA. Cette redondance suggère comment les îlots génomiques codants pour la colibactine et les sidérophores ont été co-sélectionnés et ont co-évolués (figure 33). Nous avons observé que la double mutation de *clbA* et *entD* abolissait la virulence dans le modèle murin de sepsis, et que seulement une des deux PPTase fonctionnelle suffisait à la pleine virulence de l'ExPEC *in vivo*. Ceci mettait en lumière l'importance de la captation du fer et de la redondance fonctionnelle des PPTase dans la virulence extra-intestinale (Martin et al., 2013).

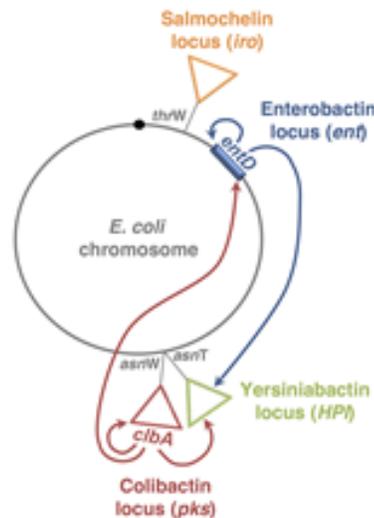


Figure 33: interaction fonctionnelle entre les îlots génomiques codant pour la colibactine et les sidérophores.

Une propriété importante de Nissle 1917 pour s'établir dans l'intestin et antagoniser efficacement les autres entérobactéries (y compris pathogènes tel que *Salmonella* Typhimurium), est la capacité de produire un large répertoire de sidérophores et d'autres systèmes d'acquisition du fer (Deriu et al., 2013). La découverte du rôle de ClbA dans la synthèse des sidérophores fourni donc une possible explication de la diminution de sa propriété anti-inflammatoire chez le mutant Nissle 1917 Δ clbA.

Outre les sidérophores, Nissle 1917 est connue pour produire des sidérophores-microcines. Les microcines sont de petites protéines sécrétées responsables d'une activité antibactérienne contre d'autres entérobactéries (Sassone-Corsi et al., 2016). En conditions limitées en fer, une fraction des microcines sont conjuguées à un sidérophore ; les sidérophores-microcines forment ainsi un cheval de Troie pour les entérobactéries en compétition pour le fer. La production de sidérophores et de sidérophores-microcines confère ainsi une activité anti-entérobactérienne dite « antagoniste ». Dans le but de dissocier l'activité antagoniste de Nissle 1917 de son activité génotoxique, nous avons donc examiné si des mutants des gènes *clb* altérait l'activité antagoniste de Nissle 1917 *in vitro* en coculture avec une entérobactérie colitogène (la souche AIEC LF82). Clémence Massip, doctorante dans l'équipe, a découvert que ClbP est requise pour l'activité antagoniste de Nissle 1917 (figure 34). L'étude d'une série de mutants de ClbP a révélé que cette activité était liée aux hélices transmembranaires de ClbP, et non au domaine peptidase périplasmique requis pour le clivage de la précolibactine. Donc, le domaine

transmembranaire de ClbP est impliqué dans la biosynthèse et/ou la sécrétion des sidérophores-microcines.

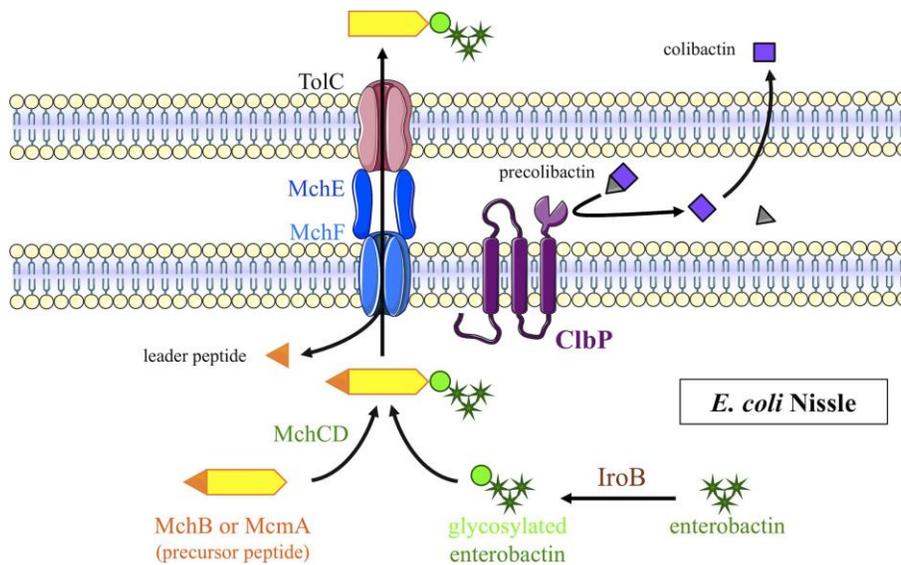


Figure 34: ClbP permet la maturation de la colibactine, et la production de sidérophores-microcines.

La seule substitution de l'acide aminé S95R du site catalytique peptidase dans ClbP abrogeait l'activité génotoxique tout en conservant l'activité antagoniste. Afin de vérifier que ce mutant conservait bien l'activité antagoniste clef dans une propriété probiotique de Nissle 1917, avec Priscilla Branchu nouvelle recrutée comme chercheuse dans l'équipe, nous avons utilisé un modèle murin de salmonellose. Des souris ont été inoculées avec une souche virulence de *Salmonella* Typhimurium et avec la souche Nissle 1917 ou ses différents mutants *clbP*. Le mutant ponctuel Nissle 1917 *clbPS95R* réduisait les signes cliniques et l'excrétion fécale de *Salmonella* de la même manière que la souche sauvage, tandis que le mutant délété pour tout le gène *clbP* ne pouvait ni protéger les animaux ni supplanter le pathogène (figure 35).

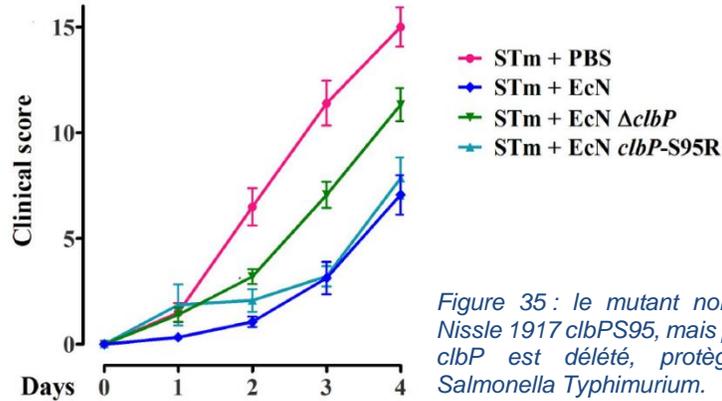


Figure 35 : le mutant non-génotoxique ponctuel Nissle 1917 *clbP*S95, mais pas le mutant ou le gène *clbP* est délété, protège les souris contre *Salmonella Typhimurium*.

L'effet antibactérien ClbP-dépendant a également été observé *in vitro* avec d'autres souches de *E. coli* qui portent à la fois l'îlot *pks* et une forme tronquée de l'îlot codant pour les microcines-sidérophores. Dans ces souches, la synthèse des microcines-sidérophores nécessitait la glucosyltransférase IroB impliquée dans la production de salmochéline. Il existe donc une interaction entre les voies de biosynthèse de la colibactine, de la salmochéline et des sidérophore-microcines, suggérant que ces îlots génomiques ont été co-sélectionnés dans l'évolution des souches de *E. coli* du phylogroupe B2. Cette co-évolution illustre le continuum entre pathogénicité, commensalisme et activité probiotique, ainsi que la nécessité d'étudier l'efficacité et la sécurité des bactéries probiotiques. Le découplage des activités antagoniste et génotoxique en inactivant le domaine peptidase de ClbP ouvre la voie à l'ingénierie raisonnée de ce probiotique afin de le rendre plus sûr. Un brevet a été déposé conjointement à la publication des résultats (Massip et al., 2019).

12- Elucidation du mode d'action de la colibactine : un pont dans l'hélice d'ADN

L'ensemble des travaux sur la colibactine et sa génotoxicité présentés à ce point a été effectué sans que la colibactine n'ait pu être isolée et caractérisée. Une difficulté à sa caractérisation était qu'aucune activité toxique n'est présente dans les surnageants ou lysats de culture bactériens (figure 17). La toxicité n'est détectée que dans des cellules épithéliales au contact des bactéries *pks+* vivantes ; ceci suggérait que la colibactine est un composé PK-NRP extrêmement instable, réactif et/ou produit en quantité très faible. Ainsi, pendant plus d'une décennie après la publication de sa découverte en 2006, elle est restée une toxine évasive, presque virtuelle, un défi pour les chimistes spécialistes de ce type de métabolites. La découverte de la peptidase ClbP et de la protéine de protection ClbS ont permis de passer un cap important. En effet, les équipes de chimistes embarqués dans « la course à la colibactine » (Bode, 2015) ont alors commencé à utiliser des mutants *clbP* ou *clbP clbS* pour isoler et caractériser la précolibactine, moins instable que le métabolite mature. Rapidement, une avalanche (une quinzaine en 3 ans) de publications a mis au jour des candidates précolibactines (figure 36). Ces précolibactines montraient un couple d'anneaux thiazoles trouvé dans la Bleomycine A2, un polyketide-peptide hybride qui interagit avec le sillon de l'ADN. Plus intéressant encore, un autre motif fonctionnel était un cyclopropane électrophile, trouvé dans certaines classes de métabolites naturels alkylant l'ADN telles les duocarmycines et les illudines. Ceci suggérait que la colibactine pouvait interagir directement avec l'ADN en l'alkylant.

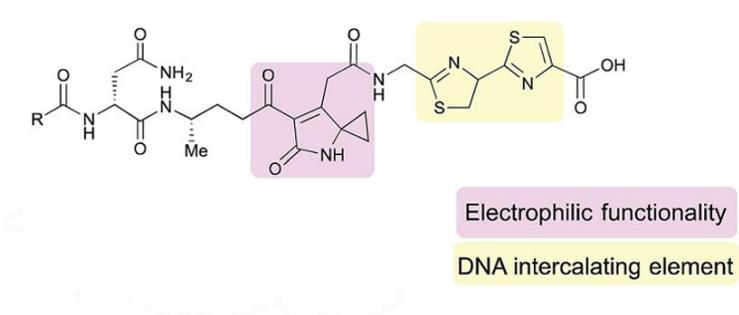


Figure 36: la structure d'une précolibactine candidate fait apparaître des motifs fonctionnels suggérant que la colibactine pourrait interagir avec l'ADN (d'après Balskus E.)

Nous avons utilisé ces nouvelles données pour examiner en le mode d'action de la colibactine. Avec Nadège Bossuet-Greif, nous avons raisonné que si la colibactine alkyle (donc se fixe à) l'ADN, rajouter de l'ADN dans le milieu de culture pendant l'infection de cellules épithéliales avec des *E. coli pks+* devrait protéger les cellules. Nous avons bien observé cet effet de protection ; plus la quantité d'ADN dans le milieu augmentait et moins les cellules montraient la phosphorylation de H2AX. L'ADN exogène servait donc de piège à colibactine. Cet ADN a ensuite été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose en condition dénaturante : nous avons ainsi découvert que les deux brins d'ADN étaient pontés de façon covalente, non dénaturable (figure 37).

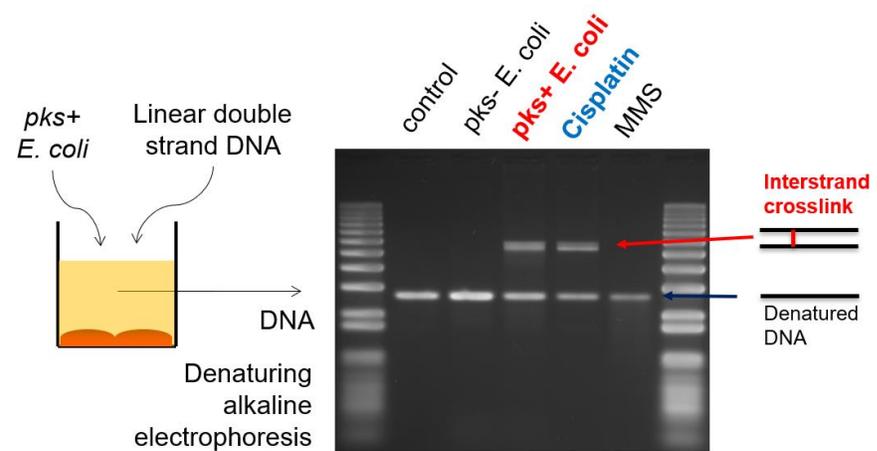


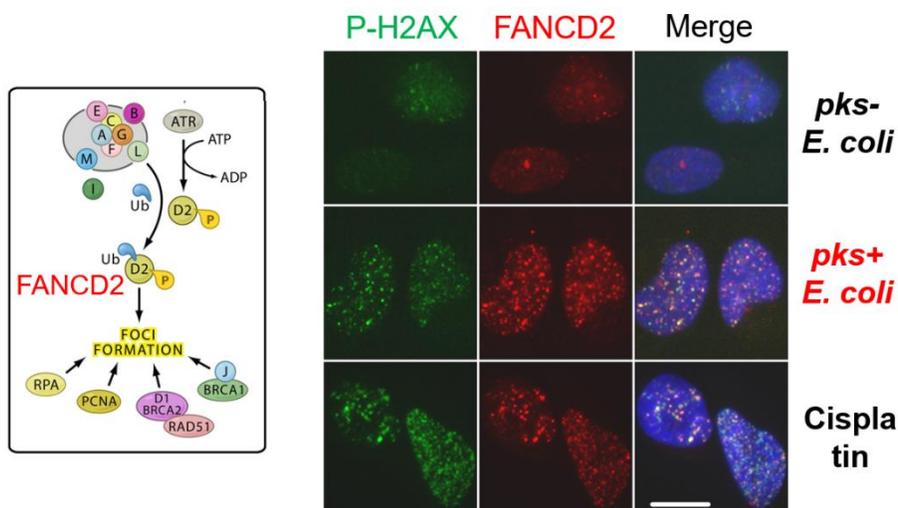
Figure 37: l'ADN double brin exposé aux *E. coli pks+* montre des pontages interbrins détectables par électrophorèse dénaturante.

Le phénotype de pontage de l'ADN exposé aux bactéries *pks+* était semblable à celui induit par le cisplatine, un anticancéreux qui induit des pontages inter et intrabrin dans l'ADN. L'agent induisant ce pontage devait bien être la colibactine, car la mutation des

gènes *clb* à différents niveaux de la biosynthèse de la colibactine (*clbA*, *clbH*, *clbQ*, *clbP*) abrogeait le phénotype de pontage. La même activité de pontage était retrouvée dans une variété d'entérobactéries possédant l'îlot *pks*, comme *Citrobacter koseri*, *Klebsiella pneumoniae* et *Erwinia oleae*. De plus, le phénotype de pontage de l'ADN exposé aux bactéries *pks+* était abrogé par addition de la protéine de résistance ClbS purifiée dans le milieu de culture. Tous ces résultats prouvaient que c'était bien la colibactine mature qui générant le pontage de l'ADN.

Nous avons ensuite examiné dans les cellules épithéliales infectées par les *E. coli pks+* si on pouvait détecter la formation de lésions de pontage, en collaboration avec Gladys Mirey et Julien Vignard (Toxalim, Toulouse). Les lésions de pontage de l'ADN sont connues pour être prises en charge par la voie de réparation mutée dans l'anémie de Fanconi (FA). Cette voie est activée typiquement pendant la phase S, quand les fourches de réplifications convergent sur un pontage, ce qui résulte dans le désassemblage du réplisome, et l'activation de la kinase ATR. Nous avons bien observé par western-blots l'activation (phosphorylation) d'ATR dans les cellules infectées par les *E. coli pks+*. L'activation de la voie ATR par la colibactine était confirmée par l'examen des protéines substrat de la kinase ATR, avec la phosphorylation de Chk1 et de RPA. L'inhibition d'ATR avec l'inhibiteur ATRi résultait en la mort cellulaire par rentrée en division des cellules et catastrophe mitotique. Pour preuve supplémentaire d'activation de la voie ATR-FA par la colibactine, nous avons observé que la protéine FANCD2 (protéine D2 de la voie de l'anémie de Fanconi) était mono-ubiquitylée et se localisait dans les foyers p-H2AX dans les noyaux des cellules infectées par les *E. coli pks+* (figure 38). L'inhibition d'ATR avec

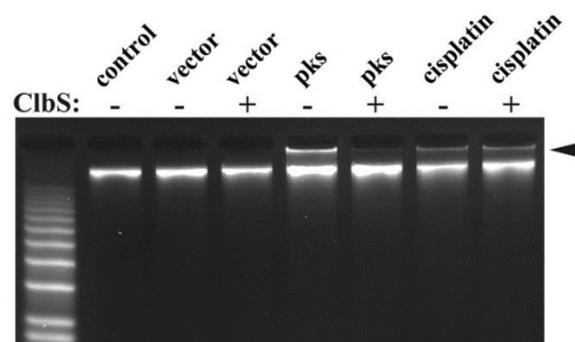
Figure 38: la protéine FANCD2 de réparation des pontages d'ADN est recrutée dans cellules infectées par les *E. coli pks+*



l'inhibiteur ATRi résultait en l'inhibition de la formation de ces foyers pH2AX/FANCD2, ce qui prouvait bien l'activation de la voie ATR-FA. FANCD2 est connue pour former avec H2AX des foyers de réparation de l'ADN au niveau des fourches de réplication bloquées par les pontages pour recruter les nucléases qui excisent l'ADN lésé. En cohérence avec l'importance de cette voie de réparation pour les dommages induits par la colibactine, l'inhibition de FANCD2 par transfection de siRNA résultait en une viabilité cellulaire réduite suite à l'infection avec les bactéries *pks+*.

Pour visualiser directement les pontages de l'ADN dans le génome des cellules infectées par les *E. coli pks+*, l'ADN génomique a été purifié et analysé par électrophorèse dénaturante. Une fraction de l'ADN ne migrerait pas dans le gel mais restait piégé dans le puit d'électrophorèse, ce que nous interprétons comme la formation de ponts d'ADN, résultant en l'inhibition de la dénaturation et de la migration de l'ADN de très haut poids moléculaire apparent. Ce phénotype était abrogé par ajout de ClbS dans le milieu de coculture, ce qui confirmait le rôle de la colibactine mature dans le pontage de l'ADN génomique cellulaire (figure 39).

Figure 39: l'ADN génomique des cellules épithéliales infectées par les *E. coli pks+* montre un défaut de migration électrophorétique en condition dénaturante. Ce phénotype est abrogé par l'ajout de la protéine de résistance à la colibactine ClbS pendant l'infection.



Ce travail a été effectué essentiellement par Nadège Bossuet-Greif sous ma direction, et nous signons la publication en première et dernier auteurs (Bossuet-Greif et al., 2018). Cette publication a immédiatement retenu l'attention des équipes de chimistes engagées dans la course à la colibactine. Nous montrions en effet qu'il était possible et même facile de purifier la colibactine, fixée sur l'ADN double brin exposé aux bactéries ou sur l'ADN de cellules infectées. Rapidement, les deux équipes de Emily Balskus (Harvard) et Seth Herzon & Jason Crawford ont démontré indépendamment la fixation de la colibactine à deux adénines des deux brins de l'ADN (Wilson et al., 2019; Xue et al., 2019).

La structure de la colibactine était finalement élucidée 13 ans après la publication de sa découverte (figure 40).

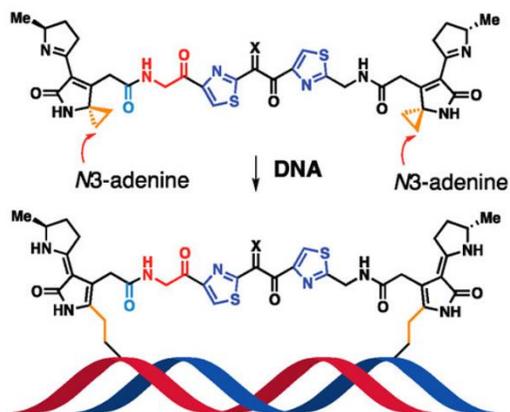


Figure 40: structure de la colibactine fixée à deux adénines des deux brins de l'ADN double brin (Wilson et al., 2019; Xue et al., 2019)

Un petit bilan et quelques perspectives

“There are known knowns; there are things we know we know.
We also know there are known unknowns; we know there are some things we do not
know.
But there are also unknown unknowns; the ones we don't know we don't know.”

Donald Rumsfeld, 2002

Nous nous sommes intéressés à l'analyse des bases moléculaires et cellulaires de l'interaction avec les cellules hôte des *E. coli* pathogènes EPEC et ExPEC, puis commensales et probiotique. Nous avons identifié CDT, puis Cif et enfin colibactine, sur la base de leur capacité à bloquer le cycle des cellules eucaryotes, une notion pionnière. Nous avons été aussi pionniers dans la notion que les bactéries peuvent produire des génotoxines qui induisent des dommages à l'ADN. Des doctorants que j'ai co-encadré ont participé de façon importante à ces découvertes ; Gabriel Cuevas-Ramos a en effet démontré l'expression de la colibactine dans la lumière intestinale, et découvert que l'infection avec de faibles doses de bactéries produisant la colibactine inflige des dommages qui sont incomplètement réparés, résultant en la mutagenèse et la transformation cellulaire (Cuevas-Ramos et al., 2010). Nadège Bossuet-Greif a découvert un nouveau système d'autoprotection chez les *E. coli* produisant la colibactine (Bossuet-Greif et al., 2016), puis elle a démontré que la colibactine induit des pontages à l'ADN (Bossuet-Greif et al., 2018). Camille Chagneau vient de montrer que les *E. coli* uropathogènes *pks+* produisent la colibactine et des dommages à l'ADN dans la vessie lors d'une infection urinaire (Chagneau et al., 2020)(papier soumis, *vide infra*). Enfin, Marion Garofalo, en première année de thèse, a des résultats prometteurs sur la synergie entre la colibactine et un contaminant alimentaire (*vide infra*). J'espère que le lecteur m'accordera d'écrire que même si j'ai un peu tardé à écrire ce mémoire, le bilan de ces travaux apparait comme positif ; ils ont contribué à former des étudiants, et à générer des savoirs fondamentaux, qui sont maintenant reconnus et enrichis par des communautés

scientifiques au-delà des seuls microbiologistes. En témoignent les plus de 150 papiers sur la colibactine dans Pubmed. Son implication possible dans le cancer colorectal a même connu quelques échos dans le grand public. Mais nos découvertes posent de nombreuses nouvelles questions. La découverte que des bactéries commensales et même la souche probiotique Nissle 1917 produisent la colibactine, nous a conduit à infléchir notre thématique pour étudier le rôle et la dangerosité de ces toxines dans des affections aiguës, mais aussi dans un contexte d'infection chronique et de commensalisme, au sein de la communauté microbienne intestinale. La frontière entre bactéries pathogènes et bactéries commensales/probiotiques est floue. On mesure aussi la faiblesse de nos connaissances sur les entérobactéries commensales et sur le mode d'action des probiotiques. *E. coli* constitue à ce titre un excellent organisme modèle pour étudier le continuum entre bactéries commensales, probiotiques et pathogènes. *E. coli* n'est pas seulement une bête de cirque d'organisme modèle. L'émergence de nouvelles souches pathogènes (O104 :H4 ou encore le clone pandémique ST131) et la multi-résistance aux antibiotiques nous rappellent que *E. coli* reste un problème de santé publique majeur et qu'il faut poursuivre nos recherches.

Les cyclomodulines, facteurs de pathogénicité

Un concept conducteur de nos travaux initiaux était que les bactéries produisent des toxines qui interfèrent avec la prolifération des cellules eucaryotes. Nous avons proposé le terme « cyclomoduline » pour décrire cette famille de toxines. L'existence de cyclomodulines chez de nombreuses entérobactéries pathogènes, mais aussi commensales, laisse penser qu'elles confèrent un avantage sélectif aux bactéries qui la produisent. On peut spéculer que cet avantage pourrait être lié à la modulation de la multiplication cellulaire des tissus où la réponse proliférative est essentielle, comme l'épithélium intestinal dont le taux de renouvellement est très élevé. Ainsi, une cyclomoduline comme Cif participerait à la persistance locale des EPEC adhérentes, en ralentissant le renouvellement de l'épithélium le long de l'axe crypte-villosités (Taieb et al., 2011). Les cyclomodulines pourraient aussi favoriser l'adhésion et l'invasion des bactéries, en altérant l'expression de récepteurs de l'hôte qui varient en fonction du stade du cycle cellulaire. Ces hypothèses restent à être étayées *in vivo*. De plus, l'altération du cycle n'est pas nécessairement le phénotype le plus relevant dans l'interaction bactérie-

cellule. En effet, on a vu que l'inhibition par Cif de l'activité des complexes cullines-RING-E3 ubiquitin ligase résulte en l'altération de la stabilité de nombreux effecteurs cellulaires (Figure 15). Il a été démontré récemment que Cif altère la réponse immune innée des cellules hôte à l'infection : en bloquant l'ubiquitination du peptide antimicrobien perforine-2, son activité bactéricide est abrogée, ce qui promeut la survie de l'entéropathogène *cif+* *in vivo* (McCormack et al., 2015). Les cyclomodulines peuvent aussi inhiber les mécanismes de défense de l'hôte, comme montré avec la toxine VacA de *H. pylori* qui induit un arrêt du cycle en phase G1/S dans les lymphocytes T, et une réduction des cytokines impliquées dans la défense de l'hôte. De même, CDT de *A. actinomycetemcomitans* dérégule la réponse immune locale et facilite l'invasion bactérienne (El-Aouar Filho et al., 2017). Nous avons aussi observé que la production de colibactine pendant un sepsis aggravait la lymphopénie résultant en une létalité accrue (figure 23). Ainsi, les cyclomodulines qui interfèrent avec la prolifération et la différenciation des cellules T inhibent la réponse immune locale et favorisent l'infection.

La colibactine, un nouveau facteur promoteur du cancer colorectal ?

La découverte que les cyclomodulines induisent des dommages à l'ADN et transforment les cellules suggérait que la présence de bactéries toxigènes dans le microbiote pouvait constituer un facteur prédisposant au développement de certains cancers, dont l'impact pouvait être sous-estimé. En effet, la latence entre l'initiation d'un cancer d'origine bactérienne et son développement, à un moment où cet agent a disparu ou est resté inaperçu, explique que le lien causal est difficile à faire. Pourtant il est maintenant reconnu que derrière de nombreuses maladies chroniques se cache une pathologie infectieuse (par exemple, ulcères et cancer de l'estomac pour *Helicobacter pylori*). Nous avons découvert la colibactine, et démontré dans des modèles d'infection de cellules en culture qu'elle est puissamment mutagène, pouvant transformer les cellules (figure 41).

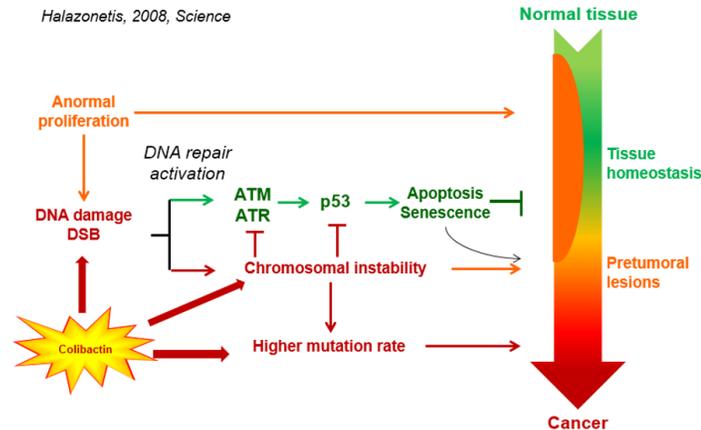
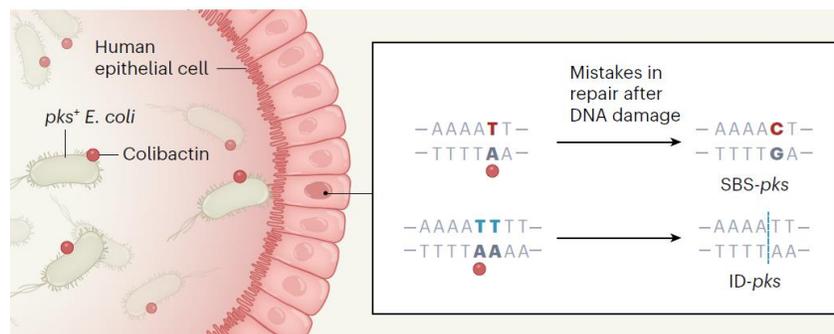


Figure 41: la colibactine induit l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN, la première barrière anticancéreuse, mais favorise aussi la survenue de mutations et la tumorigenèse.

Nous avons aussi démontré que la colibactine est produite dans la lumière intestinale dans des modèles murins, et qu'elle induit des dommages à l'ADN des entérocytes, en particulier lors de la primo-colonisation des animaux nouveau-nés. Ces résultats résonnent tout particulièrement avec la découverte récente par deux équipes indépendantes de la signature mutationnelle de la colibactine (Dziubańska-Kusibab et al., 2020; Pleguezuelos-Manzano et al., 2020). Dans ces travaux, des cellules en culture, ou encore des organoïdes de colon, ont été infectés par des *E. coli pks+* puis les cellules ont été séquencées pour mettre en évidence les mutations absentes dans des cellules contrôles. Deux types de mutations sont associées à la colibactine : une substitution simple de base (SBS-pks) au niveau d'une séquence riche en A et T, et une délétion d'une thymine au

Figure 42: la signature spécifique de mutation induite par la colibactine est retrouvée dans les banques de données de cancers chez l'Homme. D'après Yang & Jobin, Nature 2020



niveau d'homopolymères de thymines (ID-pks). Ainsi, la colibactine se fixe à deux adénines des brins opposés de l'ADN dans des régions riches en A & T, induisant une cassure double brin et l'introduction de mutations par une réparation infidèle (figure 42).

La signature mutationnelle SBS-pks et ID-pks de la colibactine a aussi été trouvée dans les séquences de tumeurs colorectales chez l'Homme (Dziubańska-Kusibab et al., 2020; Pleguezuelos-Manzano et al., 2020); la signature était particulièrement présente dans des métastases de tumeurs colorectales, et elle a été trouvée dans le gène suppresseur de tumeur APC, qui est le gène le plus fréquemment muté dans le cancer colorectal. C'est une preuve directe que la colibactine participe à la carcinogénèse colorectale chez l'Homme. Or, une autre étude récente identifie cette signature dans les cryptes intestinales de colon humain, isolées chez des individus en bonne santé (Lee-Six et al., 2019). L'analyse phylogénétique de ces mutations indique qu'elles ont lieux chez le sujet jeune, avant 10 ans. Avec notre observation dans le modèle rongeur des dommages à l'ADN induit par la colibactine dans une fenêtre d'exposition limitée à la primo-colonisation (Payros et al., 2014), ceci suggère que la colibactine pourrait imprimer des mutations chez l'Homme, dès le plus jeune âge.

D'autres données fournissent des arguments épidémiologiques en faveur d'un rôle de la colibactine dans le cancer colorectal. En effet, il est connu depuis 20 ans que des biopsies de cancer colique montrent des *E. coli* (Swidsinski et al., 1998). Ces *E. coli* hébergent fréquemment l'îlot *pks* (Arthur et al., 2012; Buc et al., 2013; Prorok-Hamon et al., 2013). Des *E. coli pks+* sont aussi trouvés plus fréquemment dans les selles de patients souffrant de cancer colorectal par rapport à des sujets sains (Arthur et al., 2012; Buc et al., 2013; Eklöf et al., 2017; Iyadorai et al., 2020). De plus, des patients porteurs d'un déficit génétique dans le gène suppresseur de tumeur APC et développent des polypes intestinaux dès leur plus jeune âge (polypose adénomateuse familiale) hébergent fréquemment dans leur muqueuse intestinale des *E. coli pks+* (Dejea et al., 2018).

Il a été précédemment proposé un modèle qui décrit comment des bactéries «conductrices & passagères» pourraient jouer un rôle dans l'initiation et la promotion du cancer colorectal (Tjalsma et al., 2012). Dans ce modèle, les bactéries «conductrices» initieraient le cancer, altérant ainsi la niche intestinale qui favorise plus tard la prolifération des bactéries opportunistes «passagères». Nous n'avons pas observé de lésion tumorale coliques chez les animaux colonisés durant toute leur vie, et de façon trans-générationnelle, par des *E. coli pks+* (données non publiées). Par contre chez des souris prédisposées au CRC (mutées pour IL10 et/ou APC), ou encore traitées au DSS+AOM, ces bactéries augmentent la gravité du cancer (Arthur et al., 2012; Bonnet et

al., 2014; Cevallos et al., 2019; Cougnoux et al., 2014; Tomkovich et al., 2017). De plus, le nombre de tumeurs induites était réduit chez des animaux traités avec un inhibiteur d'une enzyme de la voie de biosynthèse de la colibactine (Cougnoux et al., 2016). L'ensemble de ces études fournissent donc un faisceau d'arguments forts en faveur d'un rôle de la colibactine dans la promotion du cancer colorectal. Les *E. coli pks+* pourraient imprimer des dommages à l'ADN dans les cellules souches, dès le premier âge (donc dans un rôle de « conducteur ») et plus tard à la faveur d'une inflammation, dans le rôle promoteur des « passagères ».

Dans les modèles murins colonisés par des *E. coli pks+*, une seule injection d'AOM cancérigène déclenche la formation de nombreuses tumeurs coliques, lorsqu'elle est associée à une colite chronique induite par du DSS. Toutefois, sans traitement DSS donc en l'absence d'inflammation, plusieurs injections d'AOM sont nécessaires pour former des tumeurs qui mettent également plus de temps à se former (Cevallos et al., 2019). De même, lorsque des souris IL10KO sont mono-colonisées par une *E. coli pks+* et traitées par de l'AOM, elles développent des carcinomes invasifs. La mono-colonisation avec la *E. coli* mutée pour la production de colibactine diminue la multiplicité des tumeurs chez les souris AOM/IL10KO sans modifier l'inflammation intestinale (Arthur et al., 2012). Nous n'avons pas observé de lésion tumorale coliques chez les animaux colonisés durant toute leur vie par des *E. coli pks+* en l'absence d'inflammation (données non publiées). Ces observations montrent que l'association de la génotoxicité de la colibactine à un contexte inflammatoire fonctionne en synergie dans la promotion du cancer. Pourquoi cette synergie est-elle nécessaire pour la carcinogenèse ? Il est connu que l'inflammation peut altérer l'intégrité de la barrière intestinale et de la couche de mucus (Johansson, 2014), ce qui pourrait favoriser le rapprochement entre *E. coli* et les entérocytes – et on a vu que au moins *in vitro*, la colibactine semble être délivrée par contact, ou tout du moins à proximité directe. De plus, l'inflammation chronique favorise par elle-même les lésions cancérigènes, via la formation de ROS par les cellules inflammatoires. Les ROS peuvent induire des dommages à l'ADN, et affecter l'expression et la fonction des système de réponse et de réparation des dommages à l'ADN (Ray et al., 2012). Ainsi les maladies chroniques inflammatoires de l'intestin (MICI) sont un des facteurs de risque identifié du cancer colorectal. Or, les MICI sont associées à une dysbiose du microbiote, avec une augmentation marquée de la population des entérobactéries et une disruption de

l'anaérobiose intestinale (Rigottier-Gois, 2013; Zeng et al., 2017). 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 (Cevallos et al. 2019). L'oxygène représente un important paramètre du tube digestif en intervenant à la fois dans la composition du microbiote mais également sur la régulation des facteurs de virulence des entérobactéries – par exemple les *E. coli* entérotoxigéniques répriment l'expression des adhésines et des entérotoxines dans la lumière intestinale à faible teneur en oxygène, mais les exprime à proximité de l'épithélium intestinal qui diffuse de l'oxygène dans le milieu ce qui inactive le répresseur FNR (Crofts et al., 2018). Ainsi, on peut faire l'hypothèse que l'inflammation altère la barrière intestinale, et induit une augmentation de l'oxygène intestinal, ce qui favorise ainsi la croissance des *E. coli pks+* et leur rapprochement des entérocytes. De plus l'oxygène pourrait impacter sur l'expression des enzymes de synthèse de la colibactine – une étude bio-informatique préliminaire suggère qu'il pourrait y avoir des boîte FNR en amont de certains promoteurs de l'îlot *pks*. L'oxygène pourrait aussi altérer directement la colibactine. En effet, les chimistes ont montré qu'elle est sensible à l'oxydation aérobie au niveau de la liaison C-C entre les deux anneaux thiazoles (Figure 40). Le laboratoire s'est équipé d'une station de culture à hypoxie afin d'examiner comment l'oxygène module la génotoxicité des *E. coli pks+*. C'est le sujet des travaux de M2R et de thèse d'exercice de Pharmacie de Cécile Guyonnet que je co-encadre.

Le cancer colorectal représente dans le monde (en 2018) le deuxième et troisième cancer le plus fréquent chez les femmes et les hommes respectivement, et la quatrième cause de décès (880 000/an) par cancer (<https://gco.iarc.fr/today/>). Sa distribution varie considérablement géographiquement, avec plus des deux tiers des cas survenant dans des pays à indice de développement humain élevé ou très élevé. On peut noter un certain parallèle entre sa distribution et la prévalence des *E. coli pks+* du groupe B2, majoritaires dans les colibiototes humains en Europe, au Japon et aux Etats-Unis. Toutefois, le cancer colorectal est multifactoriel, et l'affirmation d'une relation causale colibactine - cancer est évidemment bien trop limitative. Nous devons considérer le rôle de *E. coli pks+* dans le cadre d'un microbiote complexe et d'une alimentation qui apportent de concert une myriade de métabolite pro et anti-carcinogènes. En effet, il est clair que l'étiologie de ce cancer est étroitement liée au style de vie occidental et à ses habitudes alimentaires

(Arnold et al., 2017; Chan and Giovannucci, 2010). Outre le mode de vie sédentaire, le régime alimentaire représente le facteur de risque le plus significatif dans 80 % des cas ; sont en cause principalement la consommation d'alcool, l'excès de viandes rouges et de charcuteries. Depuis 2015 le Centre International de Recherche sur le cancer (CIRC) a classé la consommation de viandes transformées comme cancérogène, et la consommation de viandes rouges comme probablement cancérogène. Ainsi, même si la découverte d'un rôle de la colibactine dans le cancer colorectal est importante, l'alimentation est le premier facteur sur lequel on peut intervenir pour la prévention de cette maladie.

Un contaminant alimentaire exacerbe la génotoxicité du colibiote intestinal

La nourriture est fréquemment contaminée par des toxines naturelles telles que les mycotoxines. Ces métabolites sont produits par les champignons *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium*. Les enquêtes mondiales ont estimé que 70% de la production agricole mondiale est contaminée par des mycotoxines. De plus, la plupart des mycotoxines sont résistantes à la chaleur et persistent pendant la transformation des aliments, atteignant ainsi l'assiette du consommateur. Les mycotoxines trichothécènes (TCT) telles que le déoxynivalénol (DON), le nivalénol et la toxine T-2 produites par *Fusarium* sont largement présentes dans les produits alimentaires à base de céréales. Une grande enquête européenne a montré que 44% des 18 000 échantillons d'aliments étaient contaminés par le DON à des niveaux dépassant les limites maximales dans 0,8% des échantillons. Les évaluations de l'exposition ont conclu que les adultes et les jeunes enfants sont exposés au DON à des niveaux proches ou supérieurs à la dose journalière tolérable. Ainsi, les niveaux maximaux admissibles actuels de contamination par le DON pourraient être dépassés pendant les années de forte prévalence de *Fusarium*. Les TCT ont des effets émétiques : ils provoquent des nausées et vomissements aigus, des maux de tête et des étourdissements, de la fièvre, des douleurs abdominales et de la diarrhée. Au niveau moléculaire, les TCT se lient au ribosome et inhibent la traduction, aboutissant à un stress ribotoxique pro-inflammatoire.

De nombreuses études ont montré que le microbiote intestinal participe à la cancérogenèse colorectale. Cependant, la conséquence combinée d'un contaminant alimentaire et d'une incidence accrue de bactéries génotoxiques intestinales n'a jamais été

abordée. On a vu que les *E. coli pks+* associées à une inflammation, peuvent favoriser la cancérogenèse du côlon. Le DON, la mycotoxine la plus répandue contaminant la chaîne alimentaire en Europe, induit une inflammation intestinale et un stress oxydatif. En collaboration avec l'équipe d'Isabelle Oswald (Inrae Toxalim, Toulouse), il a été observé une augmentation des dommages à l'ADN chez les animaux co-exposés à une *E. coli pks+* commensale et au DON, suggérant un rôle important de ce contaminant alimentaire dans la modulation de la génotoxicité du colibacte (Payros et al., 2017).

Nous avons donc conçu le projet « Genofood », qui vise à comprendre comment la contamination des aliments par un trichothécène aggrave la génotoxicité des *E. coli pks+*, et comment cette association pourrait induire des lésions cancéreuses. Ce projet que je coordonne, en collaboration avec les équipes d'Isabelle Oswald et de Muriel Thomas (Inrae Micalis, Jouy-en-Josas) est financé par l'ANR (2019). Nous allons examiner l'impact du DON sur l'expression et la génotoxicité de la colibactine, et décrypter les bases moléculaires de la synergie. Nous allons étudier l'effet du DON sur la niche spatio-temporelle occupée par les *E. coli pks+* et sur le microbiote intestinal. Enfin, nous allons évaluer l'effet du DON sur le potentiel carcinogène de la colibactine dans un modèle chez la souris. Marion Garofalo que je co-encadre avec Isabelle Oswald, a débuté sa thèse sur le sujet. Ce projet fournira, pour la première fois, des données pour évaluer les risques combinés de mycotoxines contaminant la chaîne alimentaire et de souches *E. coli pks+*. Comme l'augmentation des maladies dans les pays industrialisés telles que les maladies inflammatoires de l'intestin, le diabète et les cancers semble être corrélée à l'émergence de souches *E. coli B2 pks+*, l'identification du DON comme modulateur de la génotoxicité des bactéries présentes dans l'intestin est un sujet majeur du point de vue de la santé publique.

On retrouve la colibactine dans une des infections bactériennes les plus courantes

Les infections urinaires communautaires ou nosocomiales sont une des infections bactériennes les plus fréquentes ; elles touchent 150 millions de personnes par an à travers le monde et on estime que 40% des femmes et 12% des hommes y sont confrontés au cours de leur vie, avec un pic d'incidence chez le jeune adulte et la personne très âgée. Un quart des femmes souffrent d'infections récurrentes 6 à 12 mois après la première infection. On

distingue les infections des voies urinaires basses (cystites), des infections hautes ou pyélonéphrites avec un risque de suppuration locale (abcès rénal) ou de généralisation de l'infection (sepsis grave). Il existe également des colonisations asymptomatiques de l'arbre urinaire, on parle alors de bactériurie asymptomatique. Ces dernières sont le plus souvent non diagnostiquées car le dépistage systématique n'est préconisé que chez la femme enceinte et avant une intervention génito-urinaire invasive. Les souches de *E. coli* uropathogènes (UPEC) sont les principales bactéries responsables de ces infections (Flores-Mireles et al., 2015). Les UPEC expriment un assortiment de facteurs de virulence leur permettant la colonisation du tractus urinaire. Les UPEC se répliquent dans la lumière vésicale et une fraction des bactéries envahit les cellules urothéliales superficielles de la vessie. Les UPEC intracellulaires persistent et se multiplient dans le cytosol pour former un assemblage ressemblant à un biofilm appelé communauté de bactéries intracellulaires (IBCs). Ce mécanisme empêche l'élimination des bactéries par le flux urinaire et les protège contre la réponse inflammatoire de l'hôte et les traitements antibiotiques. L'infection déclenche l'exfoliation des cellules urothéliales superficielles. Ce processus qui participe à l'élimination des IBCs est à double tranchant car il favorise la dissémination des bactéries dans les cellules urothéliales sous-jacentes aux cellules exfoliées, ainsi que la formation de réservoirs intracellulaires inactifs à longue durée de vie extrêmement difficiles à éradiquer par les traitements antibiotiques. La résurgence des UPEC à partir de ces réservoirs quiescents peut être à l'origine d'infections récurrentes.

L'îlot *pks* est fréquent chez les UPECs ; il a été trouvé chez 72 % de *E. coli* responsables de prostatite (Krieger et al., 2011), et il est plus fréquemment retrouvé dans les souches issues d'urosepsis par rapport aux souches commensales isolées de selles (Dubois et al., 2010). Les premiers résultats d'une étude au CHU de Toulouse retrouvent l'îlot *pks* dans plus de 40% des UPECs isolées d'urines de patientes admises pour des infections urinaires (Massip et al., 2020). De plus, Camille Chagneau (en doctorat, que je co-encadre) a détecté dans les urines de ces patientes le produit de clivage C14-Asn généré lors de la maturation de la précolibactine par ClbP. Dans un modèle d'infection urinaire chez la souris, nous avons détecté des dommages à l'ADN dans les cellules urothéliales de souris infectées avec une UPEC *pks+* mais pas par un mutant *clbP* (figure 43)(Chagneau et al., 2020) .

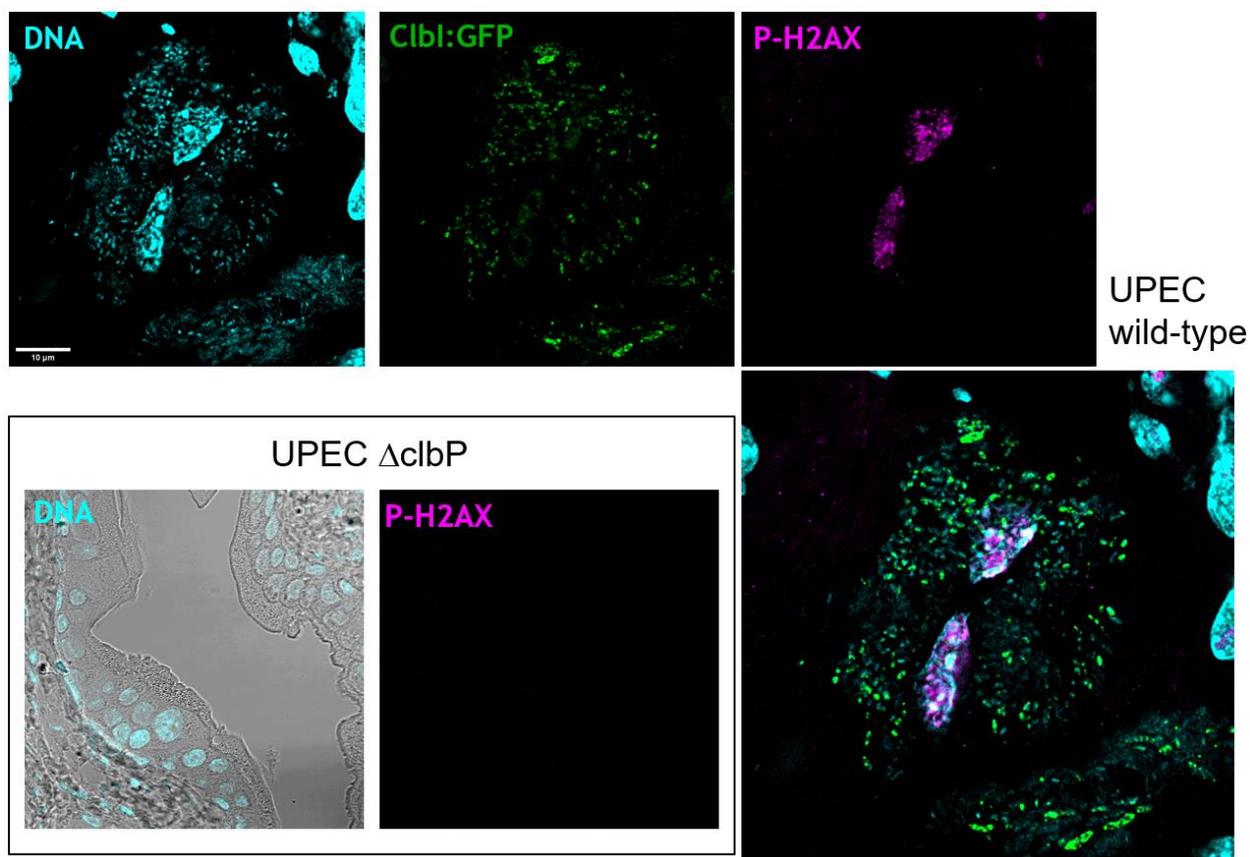


Figure 43: expression de la colibactine et induction de dommages à l'ADN par les *E. coli* uropathogènes au sein de la communauté bactérienne intracellulaire dans les cellules de vessies

Nous avons pu faire la preuve directe de la production de colibactine par les bactéries dans le cytosol des cellules urothéliales, par la détection de p-H2AX dans les noyaux des cellules envahies, par la détection de C14-Asn dans l'urine des animaux infectés, et par la détection de l'expression de la PKS ClbI fusionnée à la GFP (figure 43). De façon remarquable, il semblerait que seule une fraction des bactéries exprimerait la machinerie de synthèse de la colibactine. Il pourrait donc y avoir une hétérogénéité d'expression de la colibactine dans la population bactérienne. De plus, l'examen en microscopie confocale STED à haute résolution (30 nm /pixel, ce qui est la taille estimée d'un complexe de synthèse NRPS-PKS) fait aussi apparaître que la distribution de la machinerie à l'intérieur des bactéries n'est pas homogène mais semble se localiser dans des *foci* ou des plaques sub-membranaires (figure 44). Ces observations pilotes posent de nouvelles questions ; comment la machinerie de synthèse Clb (le « colibactisome ») s'assemble-t-elle ? Comment la production de colibactine est-elle régulée ? Ces questions

fondamentales sont actuellement étudiées par Nadège Bossuet-Greif dans ses travaux de thèse.

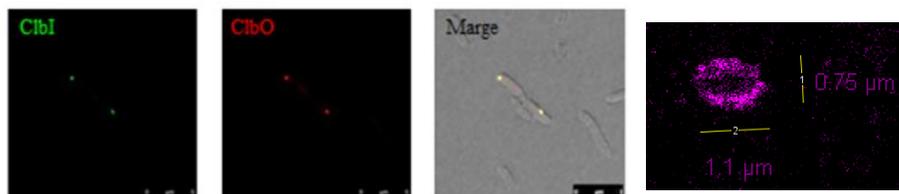


Figure 44: les mégasynthèses ClbI et ClbO de la machinerie de synthèse de la colibactine sont localisé dans des foci ou des plaques sub membranaires. L'image à droite montre la détection de ClbI-GFP en microscopie STED à haute résolution, sur une bactérie intracellulaire dans une infection urinaire de souris.

Considérant la division extrêmement rapide des bactéries au sein des IBCs (une division toutes les 30 min environ, ce qui est aussi rapide que dans un milieu riche *in vitro*), on peut poser la question du rapport coût/bénéfice pour les bactéries de la production de colibactine. En effet, le coût métabolique de l'expression et du fonctionnement des machinerie de biosynthèse PKS-NRPS est près de 1000 fois plus élevé que celui de la synthèse de peptides par les ribosomes (Amoutzias et al., 2016). Donc si les UPEC expriment une telle voie énergétiquement couteuse, elles doivent forcément en tirer un avantage adaptatif. Le rôle de la colibactine et des dommages à l'ADN dans l'infection urinaire reste à découvrir – serait-ce une altération de la réponse de l'urothélium à l'infection ? Nous pouvons aussi faire l'hypothèse que d'autres produits de la voie *pks* apportent un avantage aux bactéries.

Nous avons montré que la voie de synthèse de la colibactine est intriquée avec celles des sidérophores et des sidérophores-microcines, qui sont des facteurs clefs dans la compétition bactérienne pour l'occupation des niches écologiques. De plus, le C14-Asn produit par ClbP pendant la maturation de la précolibactine, montre une activité anti-bactérienne (modérée) contre *Bacillus subtilis* (Faïs et al., 2016). La voie de synthèse de la colibactine permet la production d'un bouquet de métabolites bioactifs (Vizcaino et al., 2014). L'équipe a récemment décrit que chez la souche probiotique Nissle 1917 la voie *pks* permet la synthèse de l'aminolipide C12-Asn-GABA, avec une activité anti-douleur (Pérez-Berezo et al., 2017). Les neurones nocicepteurs du tractus intestinal ont un rôle important dans la protection contre les entéropathogènes et l'homéostasie intestinale, car ils régulent la densité des cellules M et l'inflammation (Lai et al., 2020). Ainsi, il apparaît que l'îlot *pks*

permet la synthèse d'un bouquet de métabolites qui ciblent les bactéries du microbiote et le tissu intestinal hôte, pour favoriser la colonisation intestinale des bactéries *pks+*. L'impact de ces différents métabolites dans la physiopathologie urinaire n'est pas connu, c'est la question au cœur de la thèse de Camille Chagneau.

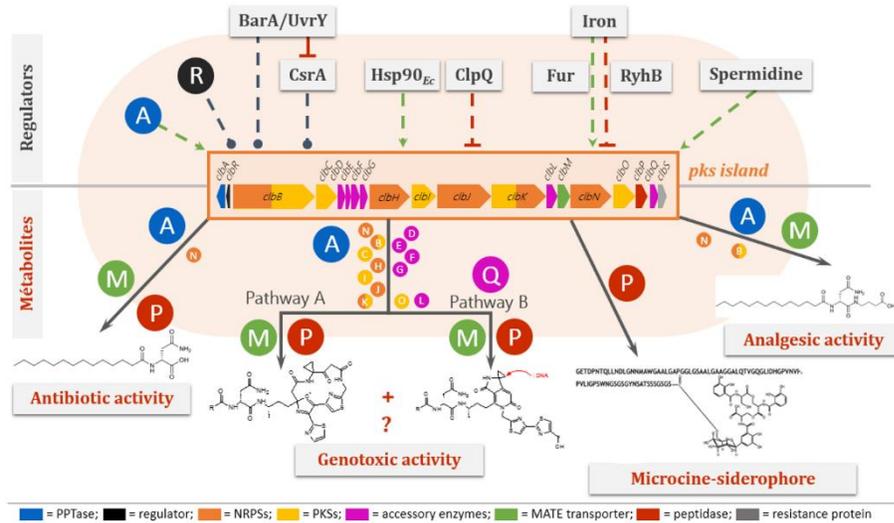


Figure 45: la voie de synthèse *pks* et des différentes enzymes *clb* permet la synthèse d'un bouquet de métabolite avec des bioactivités variées, sous le contrôle d'un réseau de régulation complexe.

Nous avons observé dans l'infection urinaire chez la souris des dommages à l'ADN dans les cellules souches urothéliales CK14+ (Chagneau et al., 2020). Ces cellules sont connues pour participer à la régénération de l'urothélium consécutif à une érosion, et sont impliquées dans le processus de tumorigenèse dans le cancer de la vessie. Il est donc possible que des dommages à l'ADN dans ces cellules pourrait propager des mutations. Or, la signature mutationnelle de la colibactine a aussi été retrouvée dans des tumeurs de la vessie (Dziubańska-Kusibab et al., 2020; Pleguezuelos-Manzano et al., 2020). Les facteurs de risques bien connus dans le cancer de la vessie sont la consommation de tabac et l'exposition a des solvants. Mais certaines études épidémiologiques suggèrent que des infections urinaires répétées sont associées à un risque accru de cancer de la vessie (Vermeulen et al., 2015). Nous avons aussi trouvé du C14-Asn dans les urines de patientes présentant une bactériurie asymptomatique, qui ne sont pas traitées par des antibiotiques et peuvent ainsi persister des mois ou des années. Il sera intéressant dans le futur

d'examiner les conséquences à long terme de la production de colibactine par les UPEC, et si elle a un rôle dans le cancer de la vessie.

Pour conclure, nos travaux ont participé à montrer comment des entérobactéries pouvaient influencer l'intégrité génomique des cellules de l'hôte, avec des effets possiblement délétères à long terme. L'induction d'instabilité génomique a le potentiel d'affecter la santé et la longévité humaine. La prochaine étape sera donc d'identifier de nouvelles approches prophylactiques contre ces effets délétères. Il pourra être intéressant de dépister et éliminer les entérobactéries *pks+*, ou inhiber leur génotoxicité, chez les individus à risque – les sujets atteints de polypose adénomateuse familiale, sujets porteurs de polypes intestinaux... et pourquoi pas dans le futur manipuler le colibiote néonatal afin de réduire la colonisation par des B2 *pks+*.

Bibliographie

- Amoutzias, G.D., Chaliotis, A., and Mossialos, D. (2016). Discovery Strategies of Bioactive Compounds Synthesized by Nonribosomal Peptide Synthetases and Type-I Polyketide Synthases Derived from Marine Microbiomes. *Mar Drugs* 14.
- Arnold, M., Sierra, M.S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 66, 683–691.
- Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.-J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., et al. (2012). Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 338, 120–123.
- Beld, J., Sonnenschein, E.C., Vickery, C.R., Noel, J.P., and Burkart, M.D. (2014). The phosphopantetheinyl transferases: catalysis of a post-translational modification crucial for life. *Nat Prod Rep* 31, 61–108.
- Beloin, C., Roux, A., and Ghigo, J.M. (2008). Escherichia coli biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, 249–289.
- Blount, Z.D. (2015). The unexhausted potential of E. coli. *ELife* 4, e05826.
- Bode, H.B. (2015). The Microbes inside Us and the Race for Colibactin. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 54, 10408–10411.
- Bonnet, M., Buc, E., Sauvanet, P., Darcha, C., Dubois, D., Pereira, B., Déchelotte, P., Bonnet, R., Pezet, D., and Darfeuille-Michaud, A. (2014). Colonization of the Human Gut by E. coli and Colorectal Cancer Risk. *Clin Cancer Res* 20, 859–867.
- Bossuet-Greif, N., Dubois, D., Petit, C., Tronnet, S., Martin, P., Bonnet, R., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2016). Escherichia coli CfbS is a colibactin resistance protein. *Mol. Microbiol.* 99, 897–908.
- Bossuet-Greif, N., Vignard, J., Taieb, F., Mirey, G., Dubois, D., Petit, C., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2018). The Colibactin Genotoxin Generates DNA Interstrand Cross-Links in Infected Cells. *MBio* 9, e02393-17.
- Boullier, S., Nougayrède, J.-P., Marchès, O., Tasca, C., Boury, M., Oswald, E., De Rycke, J., and Milon, A. (2003). Genetically engineered enteropathogenic Escherichia coli strain elicits a specific immune response and protects against a virulent challenge. *Microbes Infect.* 5, 857–867.
- Brotherton, C.A., and Balskus, E.P. (2013). A prodrug resistance mechanism is involved in colibactin biosynthesis and cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 3359–3362.
- Buc, E., Dubois, D., Sauvanet, P., Raisch, J., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., Pezet, D., and Bonnet, R. (2013). High Prevalence of Mucosa-Associated E. coli Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer. *PLoS ONE* 8, e56964.
- Cevallos, S.A., Lee, J.-Y., Tiffany, C.R., Byndloss, A.J., Johnston, L., Byndloss, M.X., and Bäumlér, A.J. (2019). Increased Epithelial Oxygenation Links Colitis to an Expansion of Tumorigenic Bacteria. *MBio* 10.
- Chagneau, C.V., Massip, C., Bossuet-Greif, N., Fremez, C., Motta, J.-P., Shima, A., Besson, C., Faouder, P.L., Cénac, N., Roth, M.-P., et al. (2020). Uropathogenic E. coli induces DNA damage in the bladder. *BioRxiv* 2020.05.07.080291.
- Chan, A.T., and Giovannucci, E.L. (2010). Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology* 138, 2029–2043.e10.

- Chang, D.-E., Smalley, D.J., Tucker, D.L., Leatham, M.P., Norris, W.E., Stevenson, S.J., Anderson, A.B., Grissom, J.E., Laux, D.C., Cohen, P.S., et al. (2004). Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 7427–7432.
- Conway, T., and Cohen, P.S. (2015). Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. *Microbiol Spectr* *3*.
- Cossart, P., Boquet, P., Normark, S., and Rappuoli, R. (1996). Cellular microbiology emerging. *Science* *271*, 315–316.
- Cougnoux, A., Dalmaso, G., Martinez, R., Buc, E., Delmas, J., Gibold, L., Sauvanet, P., Darcha, C., Déchelotte, P., Bonnet, M., et al. (2014). Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* *63*, 1932–1942.
- Cougnoux, A., Delmas, J., Gibold, L., Faïs, T., Romagnoli, C., Robin, F., Cuevas-Ramos, G., Oswald, E., Darfeuille-Michaud, A., Prati, F., et al. (2016). Small-molecule inhibitors prevent the genotoxic and protumoural effects induced by colibactin-producing bacteria. *Gut* *65*, 278–285.
- Crofts, A.A., Giovanetti, S.M., Rubin, E.J., Poly, F.M., Gutiérrez, R.L., Talaat, K.R., Porter, C.K., Riddle, M.S., DeNearing, B., Brubaker, J., et al. (2018). Enterotoxigenic *E. coli* virulence gene regulation in human infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *115*, E8968–E8976.
- Cuevas-Ramos, G., Petit, C.R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2010). *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 11537–11542.
- Cui, J., Yao, Q., Li, S., Ding, X., Lu, Q., Mao, H., Liu, L., Zheng, N., Chen, S., and Shao, F. (2010). Glutamine deamidation and dysfunction of ubiquitin/NEDD8 induced by a bacterial effector family. *Science* *329*, 1215–1218.
- De Rycke, J., Mazars, P., Nougayrède, J.P., Tasca, C., Boury, M., Herault, F., Valette, A., and Oswald, E. (1996). Mitotic block and delayed lethality in HeLa epithelial cells exposed to *Escherichia coli* BM2-1 producing cytotoxic necrotizing factor type 1. *Infect. Immun.* *64*, 1694–1705.
- De Rycke, J., Nougayrède, J.P., Oswald, E., and Mazars, P. (1997). Interaction of *Escherichia coli* producing cytotoxic necrotizing factor with HeLa epithelial cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* *412*, 363–366.
- Dejea, C.M., Fathi, P., Craig, J.M., Boleij, A., Taddese, R., Geis, A.L., Wu, X., DeStefano Shields, C.E., Hechenbleikner, E.M., Huso, D.L., et al. (2018). Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science* *359*, 592–597.
- Deriu, E., Liu, J.Z., Pezeshki, M., Edwards, R.A., Ochoa, R.J., Contreras, H., Libby, S.J., Fang, F.C., and Raffatellu, M. (2013). Probiotic bacteria reduce salmonella typhimurium intestinal colonization by competing for iron. *Cell Host Microbe* *14*, 26–37.
- Dubois, D., Delmas, J., Cady, A., Robin, F., Sivignon, A., Oswald, E., and Bonnet, R. (2010). Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* *48*, 2122–2129.
- Dziubańska-Kusibab, P.J., Berger, H., Battistini, F., Bouwman, B.A.M., Iftekhar, A., Katainen, R., Cajuso, T., Crosetto, N., Orozco, M., Aaltonen, L.A., et al. (2020). Colibactin DNA-damage signature indicates mutational impact in colorectal cancer. *Nat. Med.*
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* *308*, 1635–1638.
- Eklöf, V., Löfgren-Burström, A., Zingmark, C., Edin, S., Larsson, P., Karling, P., Alexeyev, O., Rutegård, J., Wikberg, M.L., and Palmqvist, R. (2017). Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection. *Int. J. Cancer* *141*, 2528–2536.
- El-Aouar Filho, R.A., Nicolas, A., De Paula Castro, T.L., Deplanche, M., De Carvalho Azevedo, V.A., Goossens, P.L., Taieb, F., Lina, G., Le Loir, Y., and Berkova, N. (2017). Heterogeneous Family of Cyclomodulins: Smart

Weapons That Allow Bacteria to Hijack the Eukaryotic Cell Cycle and Promote Infections. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 208.

- Faïß, T., Cougnoux, A., Dalmaso, G., Laurent, F., Delmas, J., and Bonnet, R. (2016). Antibiotic Activity of *Escherichia coli* against Multiresistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 6986–6988.
- Falkow, S. (2004). Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity — a personal recollection 15 years later. *Nat Rev Microbiol* 2, 67–72.
- Finegold, S.M., Sutter, V.L., and Mathisen, G.E. (1983). CHAPTER 1 - Normal Indigenous Intestinal Flora. In *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*, D.J. Hentges, ed. (Academic Press), pp. 3–31.
- Flores-Mireles, A.L., Walker, J.N., Caparon, M., and Hultgren, S.J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 269–284.
- Gustafsson, B.E., Daft, F.S., McDaniel, E.G., Smith, J.C., and Fitzgerald, R.J. (1962). Effects of vitamin K-active compounds and intestinal microorganisms in vitamin K-deficient germfree rats. *J. Nutr.* 78, 461–468.
- Hacker, J., Hentschel, U., and Dobrindt, U. (2003). Prokaryotic chromosomes and disease. *Science* 301, 790–793.
- Ho, M., Mettouchi, A., Wilson, B.A., and Lemichez, E. (2018). CNF1-like deamidase domains: common Lego bricks among cancer-promoting immunomodulatory bacterial virulence factors. *Pathog Dis* 76.
- Hua, Y., Yan, K., and Wan, C. (2018). Clever Cooperation: Interactions Between EspF and Host Proteins. *Front Microbiol* 9, 2831.
- Ishii, S., and Sadowsky, M.J. (2008). *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. *Microbes Environ.* 23, 101–108.
- Iyadorai, T., Mariappan, V., Vellasamy, K.M., Wanyiri, J.W., Roslani, A.C., Lee, G.K., Sears, C., and Vadivelu, J. (2020). Prevalence and association of pks+ *Escherichia coli* with colorectal cancer in patients at the University Malaya Medical Centre, Malaysia. *PLoS ONE* 15, e0228217.
- Johansson, M.E.V. (2014). Mucus layers in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 2124–2131.
- Johnson, J.R., Clabots, C., and Kuskowski, M.A. (2008a). Multiple-host sharing, long-term persistence, and virulence of *Escherichia coli* clones from human and animal household members. *J. Clin. Microbiol.* 46, 4078–4082.
- Johnson, J.R., Johnston, B., Kuskowski, M.A., Nougayrede, J.-P., and Oswald, E. (2008b). Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3906–3911.
- Jubelin, G., Chavez, C.V., Taieb, F., Banfield, M.J., Samba-Louaka, A., Nobe, R., Nougayrède, J.-P., Zumbihl, R., Givaudan, A., Escoubas, J.-M., et al. (2009). Cycle inhibiting factors (CIFs) are a growing family of functional cyclomodulins present in invertebrate and mammal bacterial pathogens. *PLoS ONE* 4, e4855.
- Jubelin, G., Taieb, F., Duda, D.M., Hsu, Y., Samba-Louaka, A., Nobe, R., Penary, M., Watrin, C., Nougayrède, J.-P., Schulman, B.A., et al. (2010). Pathogenic bacteria target NEDD8-conjugated cullins to hijack host-cell signaling pathways. *PLoS Pathog.* 6, e1001128.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L.T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123–140.
- Krieger, J.N., Dobrindt, U., Riley, D.E., and Oswald, E. (2011). Acute *Escherichia coli* prostatitis in previously healthy young men: bacterial virulence factors, antimicrobial resistance, and clinical outcomes. *Urology* 77, 1420–1425.
- Lai, N.Y., Musser, M.A., Pinho-Ribeiro, F.A., Baral, P., Jacobson, A., Ma, P., Potts, D.E., Chen, Z., Paik, D., Soualhi, S., et al. (2020). Gut-Innervating Nociceptor Neurons Regulate Peyer's Patch Microfold Cells and SFB Levels to Mediate *Salmonella* Host Defense. *Cell* 180, 33–49.e22.

- Larzabal, M., Cataldi, A.A., and Vilte, D.A. (2019). Human and Veterinary Vaccines against Pathogenic *Escherichia coli*. *The Universe of Escherichia Coli*.
- Lee-Six, H., Olafsson, S., Ellis, P., Osborne, R.J., Sanders, M.A., Moore, L., Georgakopoulos, N., Torrente, F., Noorani, A., Goddard, M., et al. (2019). The landscape of somatic mutation in normal colorectal epithelial cells. *Nature* *574*, 532–537.
- Marchès, O., Nougayrède, J.P., Boullier, S., Mainil, J., Charlier, G., Raymond, I., Pohl, P., Boury, M., De Rycke, J., Milon, A., et al. (2000). Role of tir and intimin in the virulence of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O103:H2. *Infect. Immun.* *68*, 2171–2182.
- Marchès, O., Ledger, T.N., Boury, M., Ohara, M., Tu, X., Goffaux, F., Mainil, J., Rosenshine, I., Sugai, M., De Rycke, J., et al. (2003). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol. Microbiol.* *50*, 1553–1567.
- Martin, P., Marcq, I., Magistro, G., Penary, M., Garcie, C., Payros, D., Boury, M., Olier, M., Nougayrède, J.-P., Audebert, M., et al. (2013). Interplay between siderophores and colibactin genotoxin biosynthetic pathways in *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* *9*, e1003437.
- Massip, C., Branchu, P., Bossuet-Greif, N., Chagneau, C.V., Gaillard, D., Martin, P., Boury, M., Sécher, T., Dubois, D., Nougayrède, J.-P., et al. (2019). Deciphering the interplay between the genotoxic and probiotic activities of *Escherichia coli* Nissle 1917. *PLoS Pathog.* *15*, e1008029.
- Massip, C., Chagneau, C.V., Boury, M., and Oswald, E. (2020). The synergistic triad between microcin, colibactin, and salmochelin gene clusters in uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbes Infect.* *22*, 144–147.
- McCormack, R.M., Lyapichev, K., Olsson, M.L., Podack, E.R., and Munson, G.P. (2015). Enteric pathogens deploy cell cycle inhibiting factors to block the bactericidal activity of Perforin-2. *Elife* *4*.
- McNamara, B.P., Koutsouris, A., O'Connell, C.B., Nougayrède, J.P., Sonnenberg, M.S., and Hecht, G. (2001). Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *J. Clin. Invest.* *107*, 621–629.
- Mitsuoka, T., and Hayakawa, K. (1973). [The fecal flora in man. I. Composition of the fecal flora of various age groups]. *Zentralbl Bakteriolog Orig A* *223*, 333–342.
- Nagai, T., Abe, A., and Sasakawa, C. (2005). Targeting of enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF. *J. Biol. Chem.* *280*, 2998–3011.
- Nougayrède, J.-P., and Sonnenberg, M.S. (2004). Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. *Cell. Microbiol.* *6*, 1097–1111.
- Nougayrède, J.P., Marchès, O., Boury, M., Mainil, J., Charlier, G., Pohl, P., De Rycke, J., Milon, A., and Oswald, E. (1999). The long-term cytoskeletal rearrangement induced by rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* is Esp dependent but intimin independent. *Mol. Microbiol.* *31*, 19–30.
- Nougayrède, J.P., Boury, M., Tasca, C., Marchès, O., Milon, A., Oswald, E., and De Rycke, J. (2001). Type III secretion-dependent cell cycle block caused in HeLa cells by enteropathogenic *Escherichia coli* O103. *Infect. Immun.* *69*, 6785–6795.
- Nougayrède, J.-P., Fernandes, P.J., and Sonnenberg, M.S. (2003). Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell. Microbiol.* *5*, 359–372.
- Nougayrède, J.-P., Taieb, F., De Rycke, J., and Oswald, E. (2005). Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends Microbiol.* *13*, 103–110.
- Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., and Oswald, E. (2006). *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* *313*, 848–851.

- Nougayrède, J.-P., Foster, G.H., and Donnenberg, M.S. (2007). Enteropathogenic *Escherichia coli* effector EspF interacts with host protein Abcf2. *Cell. Microbiol.* 9, 680–693.
- Nowrouzian, F., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I.-L., Aberg, N., Wold, A.E., and Adlerberth, I. (2003). *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatr. Res.* 54, 8–14.
- Olier, M., Marcq, I., Salvador-Cartier, C., Secher, T., Dobrindt, U., Boury, M., Bacquié, V., Pénary, M., Gaultier, E., Nougayrède, J.-P., et al. (2012). Genotoxicity of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microbes* 3, 501–509.
- Oswald, E., Nougayrède, J.-P., Taieb, F., and Sugai, M. (2005). Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 83–91.
- Payros, D., Secher, T., Boury, M., Brehin, C., Ménard, S., Salvador-Cartier, C., Cuevas-Ramos, G., Watrin, C., Marcq, I., Nougayrède, J.-P., et al. (2014). Maternally acquired genotoxic *Escherichia coli* alters offspring's intestinal homeostasis. *Gut Microbes* 5, 313–325.
- Payros, D., Dobrindt, U., Martin, P., Secher, T., Bracarense, A.P.F.L., Boury, M., Laffitte, J., Pinton, P., Oswald, E., and Oswald, I.P. (2017). The Food Contaminant Deoxynivalenol Exacerbates the Genotoxicity of Gut Microbiota. *MBio* 8.
- Peralta-Ramírez, J., Hernandez, J.M., Manning-Cela, R., Luna-Muñoz, J., Garcia-Tovar, C., Nougayrède, J.-P., Oswald, E., and Navarro-Garcia, F. (2008). EspF Interacts with Nucleation-Promoting Factors To Recruit Junctional Proteins into Pedestals for Pedestal Maturation and Disruption of Paracellular Permeability. *Infection and Immunity* 76, 3854–3868.
- Pérès, S.Y., Marchès, O., Daigle, F., Nougayrède, J.P., Herault, F., Tasca, C., De Rycke, J., and Oswald, E. (1997). A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.* 24, 1095–1107.
- Pérez-Berezo, T., Pujo, J., Martin, P., Le Faouder, P., Galano, J.-M., Guy, A., Knauf, C., Tabet, J.C., Tronnet, S., Barreau, F., et al. (2017). Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Nat Commun* 8, 1314.
- Pinaud, L., Sansonetti, P.J., and Phalipon, A. (2018). Host Cell Targeting by Enteropathogenic Bacteria T3SS Effectors. *Trends Microbiol.* 26, 266–283.
- Pleguezuelos-Manzano, C., Puschhof, J., Rosendahl Huber, A., van Hoeck, A., Wood, H.M., Nomburg, J., Gurjao, C., Manders, F., Dalmaso, G., Stege, P.B., et al. (2020). Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+ *E. coli*. *Nature* 580, 269–273.
- Prorok-Hamon, M., Friswell, M.K., Alswied, A., Roberts, C.L., Song, F., Flanagan, P.K., Knight, P., Codling, C., Marchesi, J.R., Winstanley, C., et al. (2013). Colonic mucosa-associated diffusely adherent afaC+ *Escherichia coli* expressing lpfA and pks are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut* gutjnl-2013-304739.
- Putze, J., Hennequin, C., Nougayrède, J.-P., Zhang, W., Homburg, S., Karch, H., Bringer, M.-A., Fayolle, C., Carniel, E., Rabsch, W., et al. (2009). Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family Enterobacteriaceae. *Infect. Immun.* 77, 4696–4703.
- Ray, P.D., Huang, B.-W., and Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* 24, 981–990.
- Rigottier-Gois, L. (2013). Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis. *ISME J* 7, 1256–1261.
- Russo, T.A., and Johnson, J.R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection* 5, 449–456.

- Samba-Louaka, A., Nougayrède, J.-P., Watrin, C., Jubelin, G., Oswald, E., and Taieb, F. (2008). Bacterial cyclomodulin Cif blocks the host cell cycle by stabilizing the cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27. *Cell. Microbiol.* *10*, 2496–2508.
- Sassone-Corsi, M., and Raffatellu, M. (2015). No Vacancy: How Beneficial Microbes Cooperate with Immunity To Provide Colonization Resistance to Pathogens. *The Journal of Immunology* *194*, 4081–4087.
- Sassone-Corsi, M., Nuccio, S.-P., Liu, H., Hernandez, D., Vu, C.T., Takahashi, A.A., Edwards, R.A., and Raffatellu, M. (2016). Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut. *Nature* *540*, 280–283.
- Savageau, M.A. (1983). *Escherichia coli* Habitats, Cell Types, and Molecular Mechanisms of Gene Control. *The American Naturalist* *122*, 732–744.
- Scherlach, K., and Hertweck, C. (2009). Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org. Biomol. Chem.* *7*, 1753–1760.
- Sears, H.J., Brownlee, I., and Uchiyama, J.K. (1950). Persistence of Individual Strains of *Escherichia Coli* in the Intestinal Tract of Man. *Journal of Bacteriology* *59*, 293–301.
- Secher, T., Samba-Louaka, A., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2013). *Escherichia coli* producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. *PLoS ONE* *8*, e77157.
- Secher, T., Brehin, C., and Oswald, E. (2016). Early settlers: which *E. coli* strains do you not want at birth? *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY* *311*, G123–G129.
- Swidsinski, A., Khilkin, M., Kerjaschki, D., Schreiber, S., Ortner, M., Weber, J., and Lochs, H. (1998). Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology* *115*, 281–286.
- Taieb, F., Nougayrède, J.-P., Watrin, C., Samba-Louaka, A., and Oswald, E. (2006). *Escherichia coli* cyclomodulin Cif induces G2 arrest of the host cell cycle without activation of the DNA-damage checkpoint-signalling pathway. *Cell. Microbiol.* *8*, 1910–1921.
- Taieb, F., Nougayrède, J.-P., and Oswald, E. (2011). Cycle inhibiting factors (cifs): cyclomodulins that usurp the ubiquitin-dependent degradation pathway of host cells. *Toxins (Basel)* *3*, 356–368.
- Th. Escherich, and K. S. Bettelheim (1988). The Intestinal Bacteria of the Neonate and Breast-Fed Infant. *Reviews of Infectious Diseases* *10*, 1220–1225.
- Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J.R., and Dutilh, B.E. (2012). A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat. Rev. Microbiol.* *10*, 575–582.
- Tomas, J., Reygnier, J., Mayeur, C., Ducroc, R., Bouet, S., Bridonneau, C., Cavin, J.-B., Thomas, M., Langella, P., and Cherbuy, C. (2015). Early colonizing *Escherichia coli* elicits remodeling of rat colonic epithelium shifting toward a new homeostatic state. *ISME J* *9*, 46–58.
- Tomkovich, S., Yang, Y., Winglee, K., Gauthier, J., Mühlbauer, M., Sun, X., Mohamadzadeh, M., Liu, X., Martin, P., Wang, G.P., et al. (2017). Locoregional Effects of Microbiota in a Preclinical Model of Colon Carcinogenesis. *Cancer Res.* *77*, 2620–2632.
- Vermeulen, S.H., Hanum, N., Grotenhuis, A.J., Castaño-Vinyals, G., van der Heijden, A.G., Aben, K.K., Mysorekar, I.U., and Kiemeneij, L.A. (2015). Recurrent urinary tract infection and risk of bladder cancer in the Nijmegen bladder cancer study. *Br. J. Cancer* *112*, 594–600.
- Vizcaino, M.I., Engel, P., Trautman, E., and Crawford, J.M. (2014). Comparative metabolomics and structural characterizations illuminate colibactin pathway-dependent small molecules. *J. Am. Chem. Soc.* *136*, 9244–9247.
- Wickham, M.E., Brown, N.F., Boyle, E.C., Coombes, B.K., and Finlay, B.B. (2007). Virulence Is Positively Selected by Transmission Success between Mammalian Hosts. *Current Biology* *17*, 783–788.

Wilson, M.R., Jiang, Y., Villalta, P.W., Stornetta, A., Boudreau, P.D., Carrá, A., Brennan, C.A., Chun, E., Ngo, L., Samson, L.D., et al. (2019). The human gut bacterial genotoxin colibactin alkylates DNA. *Science* 363.

Xue, M., Kim, C.S., Healy, A.R., Wernke, K.M., Wang, Z., Frischling, M.C., Shine, E.E., Wang, W., Herzon, S.B., and Crawford, J.M. (2019). Structure elucidation of colibactin and its DNA cross-links. *Science* 365.

Zeng, M., Inohara, N., and Nuñez, G. (2017). Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol* 10, 18–26.