



HAL
open science

Etude de l'effet de la colonisation des nouveau-nés par des souches de *Escherichia coli* génotoxiques sur le développement et la fonctionnalité de la barrière intestinale

Delphine Payros

► **To cite this version:**

Delphine Payros. Etude de l'effet de la colonisation des nouveau-nés par des souches de *Escherichia coli* génotoxiques sur le développement et la fonctionnalité de la barrière intestinale. Biologie animale. UT3, 2012. Français. NNT : 2012TOU30356 . tel-04890929

HAL Id: tel-04890929

<https://hal.inrae.fr/tel-04890929v1>

Submitted on 16 Jan 2025

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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : *Physiologie Animale - Microbiologie*

Présentée et soutenue par *Delphine PAYROS*
Le 26 Octobre 2012

Titre : *Etude de l'effet de la colonisation des nouveau-nés par des souches de Escherichia coli génotoxiques sur le développement et la fonctionnalité de la barrière intestinale.*

JURY

Pr Philippe SANSONETTI
Pr Olivier GOULET
CR Muriel THOMAS
Pr Eric OSWALD

Ecole doctorale : *Biologie Santé Biotechnologie*
Unité de recherche : *INRA USC1360*
Directeur(s) de Thèse : *Pr Eric OSWALD et DR Pascale PLAISANCIE*
Rapporteurs : *Pr Philippe SANSONETTI, Pr Olivier GOULET et CR Muriel THOMAS*

RESUME

Au cours du développement post-natal, le microbiote intestinal interagit intimement avec l'hôte et module à la fois la différenciation de l'épithélium intestinal et la maturation du système immunitaire. Hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'Homme et des animaux à sang chaud, *E. coli* s'établit dans le tractus digestif dès les premières heures ou jours qui suivent la naissance. *E. coli* est alors une des espèces bactériennes dominantes de la flore du nouveau-né avant de devenir la bactérie aérobie facultative prédominante au sein du microbiote adulte. Certaines souches commensales de *E. coli* sont capables d'induire des dommages à l'ADN dans les entérocytes. La génotoxicité de ces souches résulte de la production d'une toxine, la Colibactine, synthétisée à partir de synthèses de polycétides et de peptides non ribosomiaux. Cette voie de biosynthèse est codée par un îlot génomique appelé *pks*. Plusieurs études épidémiologiques récentes montrent que plus de 30% des jeunes enfants âgés de trois jours sont colonisés par des *E. coli* qui portent l'îlot *pks*.

Afin d'analyser les effets à long terme de la colonisation précoce des nouveau-nés par des souches de *E. coli* génotoxiques, nous avons développé un modèle animal expérimental qui mime la transmission naturelle des *E. coli* du microbiote de la mère au nouveau-né. Pour cela, des femelles rats gestantes sont gavées avec une souche commensale humaine génotoxique (*E. coli* WT), son mutant isogénique non génotoxique (*E. coli* Δ *clbA*) ou le mutant complétement (*E. coli* Δ *clbA*+*clbA*) pour lequel la production de la Colibactine a été restaurée. Après la naissance, la transmission des souches bactériennes et la persistance de la colonisation chez les nouveau-nés ont été évaluées. En parallèle, les dommages à l'ADN occasionnés par ces souches sur l'épithélium intestinal ont été comparés sur une période de 100 jours. Enfin, le développement et la maturation de l'épithélium intestinal ainsi que sa fonction de barrière ont été analysés sur cette même période.

Les souches de *E. coli*, produisant ou non la Colibactine, sont transmises à la descendance et colonisent de manière stable le tractus digestif tout au long de la vie de l'animal. Dès le deuxième jour après la naissance, des cassures double-brin de l'ADN (CDB) ont été observées dans les entérocytes des rats colonisés par la souche de *E. coli* WT ou *E. coli* Δ *clbA*+*clbA* complétement mais sont absentes chez les nouveau-nés colonisés par le mutant *E. coli* Δ *clbA*. Si de manière surprenante, aucune CDB n'a été détectée chez ces rats devenus adultes (100 jours), une fraction des cellules en mitose présente en revanche des

signes de persistance des CDB : des ponts anaphasiques sont observés chez les animaux adultes colonisés par des souches génotoxiques. L'étude des conséquences du portage à long terme de souches génotoxiques sur le développement de l'épithélium intestinal, a révélé une augmentation significative de la prolifération et de l'apoptose des entérocytes corrélée avec une augmentation de la vitesse de migration de ces cellules épithéliales le long de l'axe crypte-villosité chez les animaux exposés à des souches génotoxiques depuis la naissance. De plus, une augmentation du nombre des cellules entéroendocrines et des cellules de Paneth a été constatée chez ces mêmes animaux. Les répercussions des perturbations précédemment observées sur la fonction de la barrière intestinale ont été analysées *ex vivo* en chambres de Ussing et montrent une augmentation de la perméabilité intestinale chez les rats colonisés depuis la naissance par des souches génotoxiques en comparaison à des animaux colonisés par le mutant non génotoxique.

Ainsi, la colonisation du nouveau-né par des *E. coli* génotoxiques altère non seulement le développement et la maturation de l'épithélium intestinal à l'âge adulte mais également son intégrité. Ces modifications ont clairement des conséquences physiopathologiques pour l'hôte qui dépassent une prédisposition au développement de cancers colorectaux.

ABSTRACT

During early development, intestinal microbiota intimately interacts with the host gastrointestinal (GI) tract and modulates epithelial cell differentiation and immune system maturation. *Escherichia coli* is one of the first bacteria colonizing the GI tract of mammals and humans within a few days after birth and become the predominant facultative anaerobic bacteria in the adult microbiota. Certain commensal *E. coli* are able to induce DNA damage in eukaryotic cells. Genotoxicity of such *E. coli* strains is known to result from Colibactin synthesis, an hybrid peptide polyketide product able to induce DNA double strand breaks in enterocytes. The biosynthesis pathway of Colibactin is encoded by a genomic island called *pks*. Several recent epidemiologic studies showed that more thirty per cent of three days old infants are colonized by *E. coli pks+*. To analyze the long-term effects of colonization early in life by genotoxic *E. coli* strains, we developed an animal model that mimics the natural transmission of *E. coli* from the mother' to the neonate through direct contact with the maternal microbiota. Pregnant WISTAR rats were fed with a human genotoxic wild-type commensal *E. coli* (*E. coli* WT), an isogenic non-genotoxic mutant (*E. coli* $\Delta clbA$), or an isogenic complemented mutant (*E. coli* $\Delta clbA+clbA$) for which genotoxicity was restored. After delivery, pups' colonization and DNA-damages in enterocytes were monitored during 100 days. In addition, we analyzed gut development and maturation over the same period. *E. coli* strains, producing or not Colibactin, were transmitted to the offspring and stably colonized the gut. DNA double strand breaks (DSBs) were observed in enterocytes of newborn rats colonized by *E. coli* WT or *E. coli* $\Delta clbA+clbA$ complemented strain but were absent in newborn rats colonized by *E. coli* $\Delta clbA$ mutant. Interestingly, such genotoxicity was not detected in adults but mitotic cells present signs of DSBs' persistence with an increased number of anaphasic bridges in adult animals colonized since birth by genotoxic strains. The numbers of proliferating and apoptotic cells were also significantly increased in the intestinal crypts of rats exposed to genotoxic *E. coli* strains as compared to non-genotoxic *E. coli* $\Delta clbA$ mutant and this was correlated with an increase of intestinal epithelial cells migration along the crypt-villus axis in rats colonized with the genotoxic *E. coli* strains. In addition, the numbers of enteroendocrines cells and Paneth cells were increased in small intestine of the same animals. Finally, *ex-vivo* analysis of the intestinal barrier using Ussing chambers demonstrated that paracellular permeability to 4kDa dextran-FITC flux was increased in rats colonized by the genotoxic *E. coli* strains as compared to rats colonized by the isogenic non-genotoxic $\Delta clbA$ mutant.

The genotoxicity of commensal *E. coli* colonizing the newborns has long-lasting consequences on intestinal epithelium integrity, development and maturation at adulthood. These bacteria could be of major concerns since they are increasingly isolated from neonates in Europe and the USA.

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| LISTE DES FIGURES | IX |
| PRINCIPALES ABREVIATIONS..... | 1 |
| DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES | 1 |
| CHAPITRE I L'EPITHELIUM INTESTINAL | 2 |
| 1. Généralités sur le tractus gastro-intestinal | 2 |
| 1.1. Structure générale du tractus digestif..... | 2 |
| 1.2. Développement de l'épithélium intestinal chez le mammifère | 3 |
| 2. L'épithélium intestinal, un tissu hautement différencié en renouvellement constant | 5 |
| 2.1. De la cellule souche intestinale aux cellules transitoires en prolifération | 5 |
| 2.1.1. La cellule souche intestinale..... | 5 |
| 2.1.2. La signalisation Wnt..... | 7 |
| 2.1.3. Les CEIs en prolifération: une "population transitoire en prolifération" | 8 |
| 2.2. La différenciation de l'épithélium intestinal | 8 |
| 2.2.1. Les cellules absorbatives, les entérocytes..... | 9 |
| 2.2.2. Les cellules sécrétoires | 10 |
| 2.2.3. Les cellules calciformes | 11 |
| 2.2.4. Les cellules entéroendocrines | 11 |
| 2.2.5. Les cellules de Paneth | 12 |
| 2.3. La mort cellulaire, l'exfoliation des CEIs..... | 13 |
| 3. La muqueuse intestinale, une barrière physique, immunologique et microbiologique | 14 |
| 3.1. La motilité intestinale: la "barrière mécanique" | 15 |
| 3.2. Le microbiote intestinal: la "barrière microbiologique" | 15 |
| 3.3. Structure de la barrière intestinale: la "barrière physique" | 15 |
| 3.3.1. Les cellules épithéliales intestinales | 15 |
| 3.3.2. Le gel de mucus | 16 |
| 3.3.3. La perméabilité intestinale | 18 |
| 3.3.4. Les jonctions intercellulaires | 19 |
| 3.4. Immunité de la muqueuse intestinale: la "barrière immunologique" | 21 |

| | |
|---|----|
| 3.4.1. Les sites effecteurs | 22 |
| 3.4.2. Les sites inducteurs | 23 |
| 3.4.3. Le “double jeu” de l’immunité intestinale..... | 25 |

CHAPITRE II LE MICROBIOTE INTESTINAL..... 29

| | |
|--|-----------|
| 1. Généralités sur les “habitants” du tractus digestif : notion de microbiote..... | 29 |
| 1.1. De la microflore intestinale au microbiote intestinal..... | 29 |
| 1.2. Localisation du microbiote intestinal | 30 |
| 2. Le microbiote intestinal du nouveau-né: acquisition et composition..... | 31 |
| 2.1. Etablissement et développement du microbiote intestinal chez l’enfant | 31 |
| 2.2. Facteurs influençant la colonisation néonatale | 33 |
| 2.2.1. Effet du microbiote intestinal de la mère..... | 34 |
| 2.2.2. Effet du mode de délivrance | 35 |
| 2.2.3. Effet du mode d’alimentation du nouveau-né | 36 |
| 2.2.4. Effet de la modulation du microbiote par l’utilisation d’antibiotiques | 37 |
| 3. Le microbiote intestinal chez l’adulte : composition et diversité | 37 |
| 3.1. Composition et diversité. | 37 |
| 3.2. Facteurs influençant la composition du microbiote adulte. | 39 |
| 3.2.1. L’alimentation..... | 39 |
| 3.2.2. L’âge | 40 |
| 3.2.3. L’effet des antibiotiques sur le microbiote adulte | 40 |
| 4. Rôle du microbiote intestinal dans la physiologie de l’hôte | 41 |
| 4.1. Fonctions métaboliques et nutritives..... | 41 |
| 4.2. Rôle dans la différenciation de l’épithélium intestinal et sa maturation | 43 |
| 4.3. Développement du système immunitaire intestinal..... | 44 |
| 4.4. Rôle protecteur : l’effet barrière..... | 45 |
| 4.5. Rôle du microbiote intestinal dans la physiologie globale de l’hôte..... | 45 |
| 5. Altération du microbiote et impact sur la santé de l’hôte : cause ou conséquence ? | 46 |
| 5.1. Les désordres métaboliques | 46 |
| 5.1.1. L’obésité | 46 |
| 5.1.2. Le diabète de type 1 | 47 |
| 5.2. Les maladies inflammatoires de l’intestin..... | 47 |
| 5.3. le cancer du côlon | 48 |
| 5.4. L’allergie | 48 |

CHAPITRE III : *ESCHERICHIA COLI* : HOTE NATUREL DU TRACTUS DIGESTIF..... 50

| | |
|--|-----------|
| 1. Généralités sur <i>E. coli</i> | 50 |
| 2. Classification, diversité et éléments génétiques mobiles des <i>E. coli</i>..... | 51 |
| 2.1. Classement en sérotype | 51 |
| 2.2. Classement en groupes phylogénétiques | 51 |
| 2.3. Le groupe phylogénétique B2 | 53 |
| 2.4. Plasticité génomique des <i>E. coli</i> | 54 |
| 2.5. Les îlots génomiques et/ou de pathogénicité | 56 |
| 3. <i>E. coli</i> : sa place au sein du microbiote intestinal | 58 |
| 3.1. <i>E. coli</i> est une des premières bactéries à coloniser le tractus digestif du nouveau-né..... | 58 |
| 3.2. A l'âge adulte, <i>E. coli</i> est toujours présente dans le microbiote intestinal | 60 |
| 3.2.1. La colonisation de l'intestin par <i>E. coli</i> dépend de son métabolisme | 60 |
| 3.2.2. La disponibilité des nutriments | 61 |
| 3.2.3. La croissance des <i>E. coli</i> dans le gel de mucus de l'intestin | 61 |

CHAPITRE IV LA COLIBACTINE : UNE GENOTOXINE BACTERIENNE 63

| | |
|---|-----------|
| 1. L'îlot génomique <i>pks</i> et la machinerie de synthèse de la Colibactine..... | 64 |
| 2. La synthèse des composés « NRP et PK »..... | 65 |
| 2.1. Les chaînes d'assemblage des composés PK..... | 68 |
| 2.2. Les chaînes d'assemblage des composés NRP | 68 |
| 2.3. Les chaînes d'assemblage des composés hybrides PK-NRP | 69 |
| 3. La place de l'îlot <i>pks</i> au sein du génome de <i>E. coli</i> | 69 |
| 4. Distribution de l'îlot <i>pks</i> au sein du microbiote intestinal..... | 70 |
| 4.1. Distribution de l'îlot <i>pks</i> dans la population adulte | 70 |
| 4.2. Présence de <i>E. coli pks+</i> chez les jeunes enfants | 71 |
| 5. Effets de la Colibactine | 73 |
| 5.1. la Colibactine est génotoxique..... | 74 |
| 5.2. La Colibactine, un agent carcinogène potentiel ? | 77 |
| 5.3. La Colibactine joue un rôle dans l'effet probiotique de la souche <i>E. coli</i> Nissle 1917. | 79 |

RESULTATS EXPERIMENTAUX 83

| | |
|--|------------|
| OBJECTIFS DE LA THESE..... | 84 |
| ETUDE 1: LA COLONISATION NEONATALE DES NOUVEAU-NES PAR DES <i>E. COLI</i> GENOTOXIQUES INDUIT DE PROFONDES MODIFICATIONS DANS L'EPITHELIUM INTESTINAL A L'AGE ADULTE..... | 85 |
| ETUDE 2 : LE ROLE DE LA COLIBACTINE DANS LA DIFFERENCIATION EPITHELIALE ET L'INTEGRITE DE LA BARRIERE INTESTINALE | 119 |
| DISCUSSION..... | 134 |
| CHAPITRE I LA COLIBACTINE : SON ROLE AU SEIN DU MICROBIOTE INTESTINAL | 135 |
| 1. Développement d'un modèle de colonisation stable et "naturelle" du tractus digestif par des souches commensales de <i>E. coli</i> | 135 |
| 2. La Colibactine : un facteur favorisant la colonisation intestinale ?..... | 137 |
| 3. Le Colibactine : un antibiotique ? | 138 |
| CHAPITRE II LA COLIBACTINE, UN LIEN AVEC LE CANCER ? | 140 |
| 1. Colonisation Bactérienne, Dommage à l'ADN et Prolifération, un lien avec le cancer du côlon ?.... | 140 |
| 1.1. Maladies infectieuses et cancer | 140 |
| 1.2. Bactéries et cancer colorectal | 140 |
| 1.3. La Colibactine : un facteur intervenant dans le processus de cancérogenèse colorectale ? | 142 |
| 1.4. Est-ce que la colonisation à la naissance par des <i>E. coli</i> génotoxiques est suffisante pour induire le développement du CRC ? | 145 |
| 2. La cellule souche, un acteur essentiel de l'homéostasie intestinale..... | 145 |
| 3. Mécanisme d'action de la Colibactine sur les CEIs ?..... | 148 |
| CHAPITRE III DIFFERENCIATION ET BARRIERE EPITHELIALE, LE ROLE JOUE PAR LA COLIBACTINE ? | 151 |
| REFERENCES..... | 154 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| <i>Figure 1 – Le tractus digestif.</i> | 3 |
| <i>Figure 2 – Développement de l'épithélium intestinal.</i> | 4 |
| <i>Figure 3 – Organisation cellulaire de l'épithélium intestinal.</i> | 6 |
| <i>Figure 4 – La signalisation Wnt.</i> | 8 |
| <i>Figure 5 – La signalisation Notch.</i> | 9 |
| <i>Figure 6 – Diagramme résumant les étapes clefs de la différenciation intestinale.</i> | 10 |
| <i>Figure 7 – Mécanisme d'élimination des CEIs.</i> | 14 |
| <i>Figure 8 – Représentation schématique de la barrière mucoale du côlon.</i> | 17 |
| <i>Figure 9 – La perméabilité intestinale.</i> | 18 |
| <i>Figure 10 – Schéma des différents complexes de jonctions intercellulaires dans l'épithélium intestinal.</i> | 20 |
| <i>Figure 11 – Le système immunitaire intestinal.</i> | 22 |
| <i>Figure 12 – Composition de la flore dominante, sous-dominante et transitoire.</i> | 30 |
| <i>Figure 13 – Potentiel oxydo-réducteur dans le tractus GI.</i> | 32 |
| <i>Figure 14 – Facteurs influençant le développement du microbiote intestinal chez l'Homme.</i> | 34 |
| <i>Figure 15 – Composition du microbiote intestinal.</i> | 38 |
| <i>Figure 16 – Relation hôte/microbiote : implication dans la physiologie humaine.</i> | 41 |
| <i>Figure 17 – Analyse phylogénétique utilisant la méthode MLST.</i> | 52 |
| <i>Figure 18 - Arbre phylogénétique de 68 souches de E. coli.</i> | 53 |
| <i>Figure 19 – Plasticité génomique des souches de E. coli.</i> | 54 |
| <i>Figure 20 – Sites de colonisation des Escherichia coli pathogènes.</i> | 55 |
| <i>Figure 21 – Contribution des éléments génétiques mobiles à l'adaptation des E. coli commensales et à l'évolution d'une E. coli commensale vers un caractère pathogène.</i> | 57 |
| <i>Figure 22 – Evolution de la colonisation du tractus digestif humain par Escherichia coli.</i> | 59 |
| <i>Figure 23 – Observation de la souche E. coli BJ4 dans le côlon.</i> | 62 |
| <i>Figure 24 – Les cyclomodulines bactériennes régulent et contrôlent la progression du cycle cellulaire.</i> | 63 |
| <i>Figure 25 – Représentation schématique de l'îlot pks.</i> | 65 |
| <i>Figure 26 – Exemples de métabolites secondaires de type PK, NRP et hybrides utilisés en médecine.</i> | 66 |
| <i>Figure 27 – Domaines essentiels formant les modules des PKS et des NRPS.</i> | 67 |
| <i>Figure 28 – Distribution de l'îlot pks au sein des groupes phylogénétique de E. coli.</i> | 71 |
| <i>Figure 29 – Analyse japonaise métagénomique de la présence des gènes de l'îlot pks</i> | 72 |
| <i>Figure 30 – L'îlot pks est nécessaire pour induire l'activité cytopathique.</i> | 74 |
| <i>Figure 31 – Induction de cassures double-brin à l'ADN après infections avec des souches de E. coli portant l'îlot pks.</i> | 74 |
| <i>Figure 32 – Activation du point de contrôle G2/M dans les cellules exposées à des souches de E. coli pks+.</i> | 76 |

| | |
|--|-----|
| Figure 33 – <i>E. coli</i> pks+ induit des CDBs dans les entérocytes in vivo. | 76 |
| Figure 34 – Réparation des dommages à l'ADN et division cellulaire après l'infection à faible m.o.i avec des <i>E. coli</i> pks+. | 77 |
| Figure 35 - L'infection à faible dose avec des <i>E. coli</i> pks+ induit une instabilité chromosomique et une augmentation de la fréquence des mutations et de la transformation cellulaire. | 78 |
| Figure 36 – La souche EcN est génotoxique. | 79 |
| Figure 37 – EcN a besoin d'un îlot pks fonctionnel pour atténuer la colite induite par le transfert de lymphocytes T CD45RB^{high} chez la souris. | 80 |
| Figure 38 – La voie de signalisation mTOR. | 149 |

PRINCIPALES ABRÉVIATIONS

| | |
|----------------|--|
| <i>ADN</i> | <i>acide désoxyribonucléique</i> |
| <i>Akt</i> | <i>Protein Kinase B</i> |
| <i>AOM</i> | <i>Azoxyméthane</i> |
| <i>APC</i> | <i>adenomatous polyposis coli</i> |
| <i>ARN</i> | <i>acide ribonucléique</i> |
| <i>ARNt</i> | <i>acide ribonucléique de transfert</i> |
| <i>ATM</i> | <i>Ataxia telangiectasia mutated</i> |
| <i>BAC</i> | <i>bacterial artificial chromosome</i> |
| <i>bmi1</i> | <i>gène de la famille des Polycomb</i> |
| <i>CBC</i> | <i>crypt base columnar cells</i> |
| <i>CDB</i> | <i>Cassures double brins</i> |
| <i>CDT</i> | <i>Cytolethal Distending Toxin</i> |
| <i>CEI</i> | <i>cellule épithéliale intestinale</i> |
| <i>cfu</i> | <i>colonies forming units</i> |
| <i>CgA</i> | <i>chromogranin A</i> |
| <i>Chk2</i> | <i>checkpoint kinase 2</i> |
| <i>Cif</i> | <i>Cycling inhibiting factor</i> |
| <i>clb</i> | <i>gènes de l'îlot pks</i> |
| <i>CNF</i> | <i>Cytolethal Necrotizing Factor</i> |
| <i>CP</i> | <i>crypto-plaques</i> |
| <i>CRC</i> | <i>cancer colorectal</i> |
| <i>CSI</i> | <i>cellule souche intestinal</i> |
| <i>DAEC</i> | <i>« Diffusely adherent » E. coli</i> |
| <i>DAMP</i> | <i>Damage-Associated Molecular Pattern</i> |
| <i>DC</i> | <i>cellule dendritique</i> |
| <i>DKK1</i> | <i>inhibiteur Dickkopf-1</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>escherichia coli</i> |
| <i>EAEC</i> | <i>E. coli entéro-aggrégatives</i> |
| <i>EAF</i> | <i>épithélium associé aux follicules</i> |
| <i>EcN</i> | <i>escherichia coli nissle 1917</i> |
| <i>ECOR</i> | <i>collection de référence de E. coli</i> |
| <i>EGF</i> | <i>Epidermal Growth Factor</i> |
| <i>EHEC</i> | <i>E. coli entéro-hémorragiques</i> |
| <i>EIEC</i> | <i>E. coli entéro-invasives</i> |
| <i>elf3</i> | <i>E74-like factor-3</i> |
| <i>EPEC</i> | <i>E. coli entéro-pathogènes</i> |

| | |
|-----------------|--|
| <i>ETEC</i> | <i>E. coli entéro-toxigéniques</i> |
| <i>ExPEC</i> | <i>E. coli pathogènes extra-intestinales</i> |
| <i>FGFR</i> | <i>Fibroblast growth factor receptor</i> |
| <i>FISH</i> | <i>Fluorescence in situ hybridization</i> |
| <i>GALT</i> | <i>Gut-Associated Lymphoid Tissu</i> |
| <i>GI</i> | <i>gastrointestinal</i> |
| <i>GSK3</i> | <i>Glycogen synthase kinase 3 β</i> |
| <i>Gy</i> | <i>Grey (unité de dose d'irradiation)</i> |
| <i>H</i> | <i>antigène flagellaire</i> |
| <i>Hath1</i> | <i>ATOH1 atonal homolog 1 (Drosophila)</i> |
| <i>HD5, HD6</i> | <i>Human Defensin 5, 6</i> |
| <i>Hes1</i> | <i>Hairy/Enhancer of Split family</i> |
| <i>HPA</i> | <i>Hypothalamic-pituitary-adrenal</i> |
| <i>HPV</i> | <i>papillomavirus humains</i> |
| <i>IAP</i> | <i>Intestinale Alkaline Phosphatase</i> |
| <i>IBD</i> | <i>maladies inflammatoires de l'intestin</i> |
| <i>IEL</i> | <i>Intra Epithelial Lymphocyte</i> |
| <i>Ig</i> | <i>Immunoglobuline</i> |
| <i>IL</i> | <i>Interleukine</i> |
| <i>ILF</i> | <i>Isolated Lymphoid Follicle</i> |
| <i>JA</i> | <i>jonction adhérente</i> |
| <i>JAM</i> | <i>molécule jonctionnelle adhérente</i> |
| <i>klf4</i> | <i>kruppel-like factor 4</i> |
| <i>klf4</i> | <i>antigène de capsule</i> |
| <i>LB</i> | <i>lymphocyte B</i> |
| <i>lgr5</i> | <i>Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5</i> |
| <i>LPS</i> | <i>Lipopolysaccharide</i> |
| <i>LRP</i> | <i>lipoprotein receptor-related protein</i> |
| <i>LT</i> | <i>lymphocyte T</i> |
| <i>m.o.i</i> | <i>multiplicity of infection</i> |
| <i>MC</i> | <i>maladie de Crohn</i> |
| <i>MEE</i> | <i>Multilocus enzyme electrophoresis</i> |
| <i>MLN</i> | <i>Mesenteric Lymph Nodes</i> |
| <i>MLST</i> | <i>Multi-locus sequence typing</i> |
| <i>mTOR</i> | <i>Mammalian target of rapamycin</i> |
| <i>Muc 2</i> | <i>Mucine 2</i> |
| <i>NCID</i> | <i>Notch Intra Cellular Domain</i> |
| <i>Ngn3</i> | <i>Neurogenin 3</i> |
| <i>NHEJ</i> | <i>Non Homologous End Joining</i> |
| <i>NK</i> | <i>natural killer</i> |

| | |
|-----------------------------|---|
| <i>NLR</i> | <i>Nod like receptors</i> |
| <i>NMEC</i> | <i>E. coli méningitiques néonatales</i> |
| <i>NOD</i> | <i>Non Obese Diabetic</i> |
| <i>NOD1</i> | <i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1</i> |
| <i>NRPS</i> | <i>non-ribosomal peptides megasynthase</i> |
| <i>O</i> | <i>antigène somatique</i> |
| <i>OVA</i> | <i>ovalbumine</i> |
| <i>PAI</i> | <i>ilot de pathogénicité</i> |
| <i>PAMP</i> | <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> |
| <i>PAS</i> | <i>Periodic Acid Schiff</i> |
| <i>PCR</i> | <i>polymerase chain reaction</i> |
| <i>PDK1</i> | <i><u>Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 1</u></i> |
| <i>PI3K</i> | <i>Phosphoinositide 3-kinase</i> |
| <i>PIP2,</i> <i>PIP3</i> | <i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, triphosphate</i> |
| <i>PKS</i> | <i>polykétide synthase</i> |
| <i>PP</i> | <i>plaques de Peyer</i> |
| <i>PPT</i> | <i>phosphatéthéinyl transférase</i> |
| <i>PRR</i> | <i>Pattern recognition receptor</i> |
| <i>PSA</i> | <i>antigène capsulaire de B. fragilis</i> |

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I

L'EPITHELIUM INTESTINAL

La muqueuse intestinale est à l'interface entre l'organisme et l'environnement extérieur et constitue la plus grande surface en contact avec l'environnement extérieur recouvrant plus de 300m² pour l'intestin grêle seulement. Cette très grande surface d'échange joue plusieurs rôles majeurs dans la physiologie de l'hôte : d'une part elle permet l'absorption des nutriments et d'autre part constitue une barrière de défense de l'hôte contre les agressions extérieures avec une organisation cellulaire adaptée et le développement d'une réponse immunitaire innée et adaptative plus spécifique.

1. Généralités sur le tractus gastro-intestinal

1.1. Structure générale du tractus digestif

Le rôle essentiel de l'appareil digestif est d'absorber, d'assimiler les nutriments dans les circulations sanguine et lymphatique et d'éliminer les éléments non assimilables.

Le système digestif commence par la bouche (comprenant les dents et la langue) continue avec le pharynx et l'œsophage avant que les aliments ingérés arrivent dans l'estomac (**Figure 1**). L'appareil digestif se poursuit par l'intestin grêle et le côlon avant de se terminer par le rectum et l'anus. Le tractus intestinal est divisé entre l'intestin grêle et le côlon. L'intestin grêle est lui-même divisé en trois parties de l'estomac vers le caecum : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. L'appareil digestif comprend également des glandes digestives (les glandes salivaires, le foie, le pancréas et les glandes de l'intestin qui sécrètent plusieurs catégories d'enzymes) (**Figure 1**).

Dans la suite de mon exposé je m'intéresserai plus précisément aux épithélia de l'intestin grêle et du côlon.

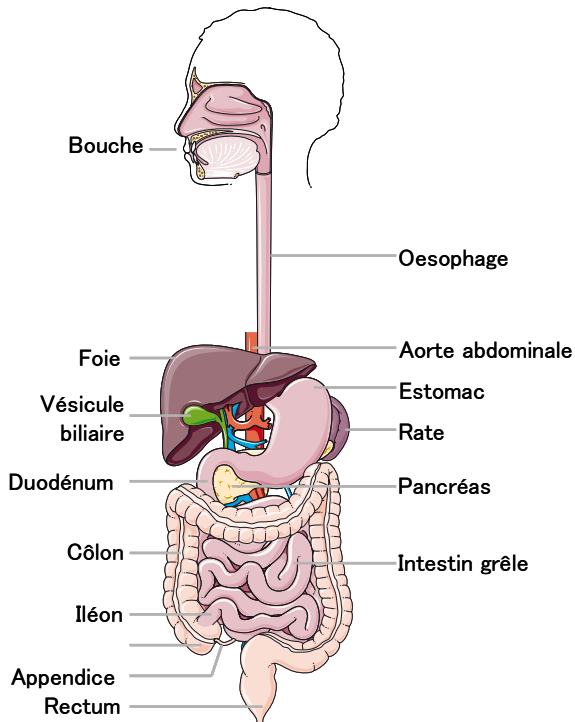


Figure 1 – Le tractus digestif.

D'après Servier Medical Art. Localisation des différents segments constituant l'appareil digestif. La partie supérieure commence par la bouche et s'étend jusqu'à l'estomac. La partie inférieure s'étend du pylore (sortie de l'estomac) au rectum. L'appareil digestif comprend également des glandes : vésicule biliaire, rate, pancréas.

1.2. Développement de l'épithélium intestinal chez le mammifère

Le tractus digestif prend son origine à partir du repliement des feuillets de l'endoderme qui, après remodelage, donne naissance, autour du jour embryonnaire 9 (E9.0), à un tube digestif embryonnaire entouré par des feuillets mésodermiques [1]. Une fois le tube digestif formé, l'épithélium intestinal simple se condense pour former un épithélium pseudo-stratifié. Du jour E9.5 au jour E13.5, la longueur et la circonférence du tube digestif augmentent du fait de l'expansion du tissu mésenchymateux (provenant des feuillets mésodermiques), de l'épithélium et de la lumière. Pendant cette phase embryonnaire, toutes les cellules épithéliales intestinales (CEIs), qui sont encore indifférenciées, prolifèrent activement.

Autour du jour embryonnaire E14, l'épithélium se réorganise en épithélium prismatique, c'est-à-dire qu'il n'est plus constitué que d'une couche unique de cellules. La morphogenèse des villosités commence au jour E15 et implique le repositionnement du mésenchyme sous l'épithélium intestinal. La formation des villosités s'accompagne de l'initiation de la différenciation cellulaire avec l'apparition de régions inter-villositaires invaginées dans le mésenchyme. Pendant la réorganisation tissulaire et l'émergence des villosités, les cellules en prolifération sont dispersées à travers tout le tissu épithélial. En revanche, après l'émergence des villosités à E15, la prolifération est de moins en moins

observée dans les villosités et est confinée dans les régions inter-villositaires à E17 (**Figure 2**).

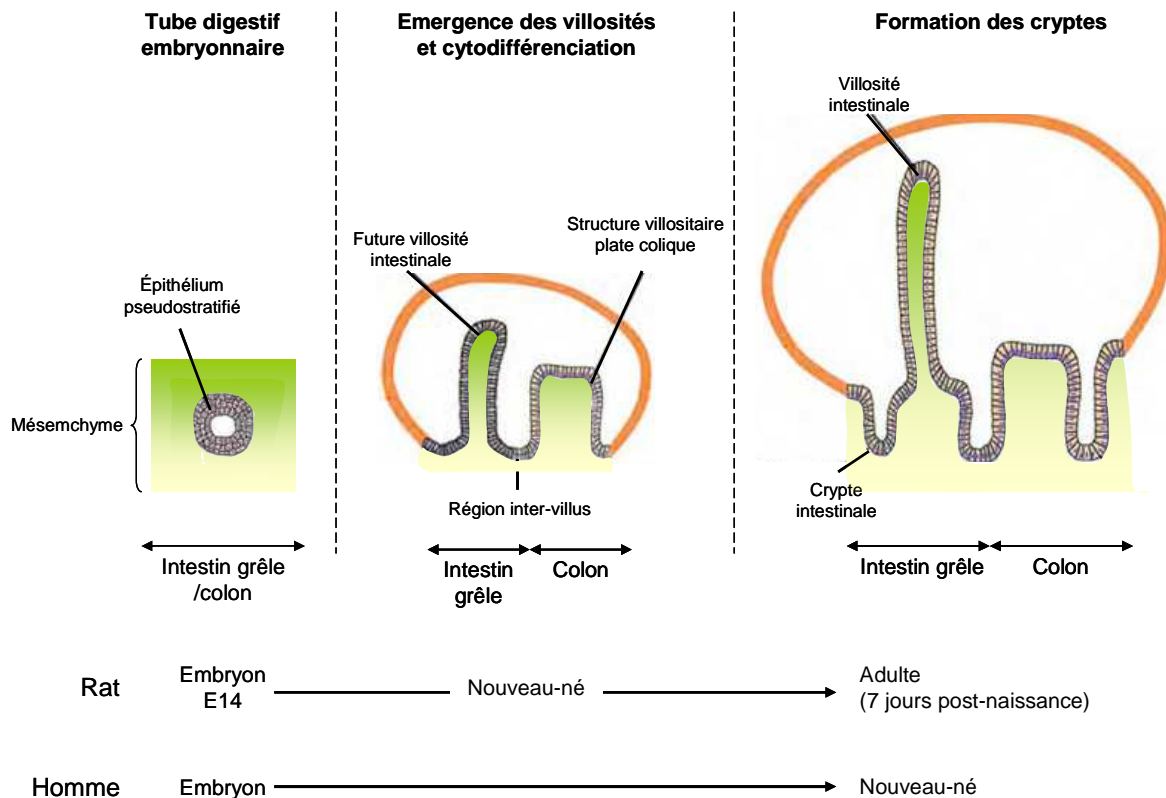


Figure 2 – Développement de l'épithélium intestinal.

Inspiré de De Santa Barbara & al. [2], Crosnier et al.[3]. Comparaison du développement embryonnaire et post-natal de l'épithélium intestinal chez le rat et l'Homme. En vert, le mésenchyme prend son origine dans les feuillettes du mésoderme. En gris, l'épithélium du tube digestif provient des feuillettes de l'endoderme.

Chez le rongeur, le développement intestinal continue après la naissance pour être complet au moment du sevrage. De ce fait, les cryptes, présentes tout le long du tractus intestinal de l'estomac au rectum, se développent tardivement et apparaissent à partir du 7^{ème} jour après la naissance par invagination des régions inter-villositaires. Chez l'Homme, la morphogenèse de l'épithélium intestinal est complète à la naissance (**Figure 2**).

Des différences structurales sont observées entre l'épithélium de l'intestin grêle et l'épithélium colique. La présence des villosités est caractéristique de l'intestin grêle où les cryptes sont intercalées avec les villosités pour former des unités cryptes-villosités alors que dans le côlon, les villosités sont absentes. Deux populations cellulaires peuvent être différenciées dans les épithélia intestinal et colique : une population retrouvée dans les cryptes où les cellules souches intestinales donnent naissance à une population progénitrice de

cellules transitoires en prolifération et un pool de cellules différenciées, aux propriétés absorbatives ou sécrétoires, situées dans le haut des cryptes et des villosités (**Figure 2**).

2. L'épithélium intestinal, un tissu hautement différencié en renouvellement constant

L'épithélium intestinal de mammifère est renouvelé tous les 4 à 5 jours. Il est constitué d'une monocouche de cellules épithéliales polarisées présentant une bordure en brosse à leur extrémité apicale et qui reposent sur la *lamina propria*. L'ensemble des CEIs provient de cellules souches pluripotentes résidentes au fond des cryptes. Les cellules souches, lors de leur division, donnent naissance à une nouvelle cellule souche, permettant le maintien du pool de cellules souches, et à une cellule fille possédant une grande capacité de prolifération, donnant ainsi naissance à un pool de cellules "transitoires" prolifératives. Après expression de différents facteurs de transcription et de régulation, les cellules transitoires prolifératives migrent progressivement vers le haut des cryptes et se différencient soit en cellules absorbatives : les entérocytes ; soit en cellules sécrétoires : les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth qui sont retrouvées au fond des cryptes intercalées avec les cellules souches. Enfin, les cellules caliciformes, entéroendocrines et les entérocytes atteignent le haut des villosités en quelques jours et sont exfoliés après apoptose dans la lumière intestinale [4].

2.1. De la cellule souche intestinale aux cellules transitoires en prolifération

2.1.1. La cellule souche intestinale

Les cellules souches intestinales (CSI) sont à l'origine du renouvellement de l'épithélium en donnant naissance aux cellules transitoires en prolifération qui se différencieront en cellules absorbatives ou sécrétoires. Deux écoles s'opposent pour la caractérisation des CSI et ont déterminé deux types de CSIs [4]. Découvertes par Cheng et Leblond en 1974, les cellules souches situées entre les cellules de Paneth à la base des cryptes, appelées cellules "Crypt-Base-Columnar" (CBC) expriment le gène *lgr5* (*Leucine-*

rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5), une cible de la signalisation Wnt et sont très sensibles aux dommages à l'ADN induits par des radiations [5] [6]. Ces cellules CBC sont sous le contrôle de la signalisation Wnt et ont la capacité de pouvoir proliférer continuellement en l'absence de dommages à l'ADN et de donner naissance aux cellules transitoires en prolifération. Le second type de cellules souches exprime le gène *bmi1* (gène de la famille des Polycomb) et réside à la position +4 à partir de la base de la crypte [7]. Elles sont insensibles à l'irradiation et restent dans un état quiescent en l'absence de dommages à l'épithélium ou de rupture de l'homéostasie intestinale. Cependant, après une irradiation donnant lieu à des dommages à l'ADN et à l'élimination des cellules CBCs *lgr5+*, les cellules souches situées en position +4 *bmi1+*, normalement quiescentes, prolifèrent de manière importante pour repeupler les cryptes et les villosités et sont capables de donner naissance à toutes les cellules différenciées [8] (**Figure 3**).

Approximativement 95% des cellules souches se divisent de manière asymétrique donnant naissance à une nouvelle cellule souche, auto-renouvelée, et à une cellule transitoire en prolifération, l'autre cellule fille. Dans 5% des cas, une cellule souche se divise de manière symétrique et donne naissance à deux nouvelles cellules souches ou à deux cellules filles progénitrices transitoires qui vont se différencier ensuite en cellule absorbative ou sécrétoire [9].

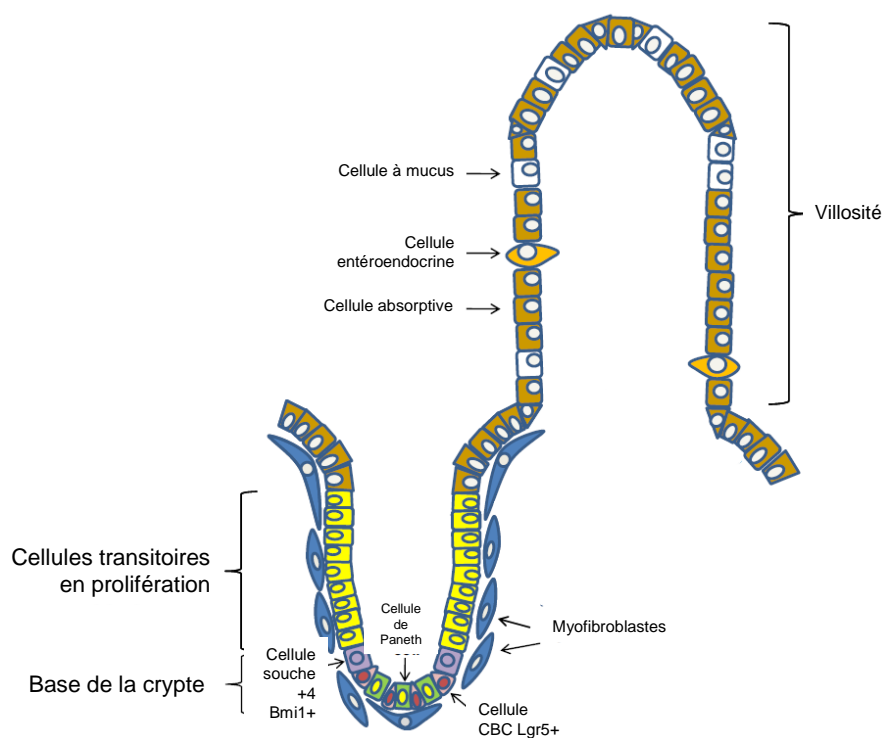


Figure 3 – Organisation cellulaire de l'épithélium intestinal.

D'après Shaker et al., [10].

→ **La niche des CSIs:** cette niche délimite un microenvironnement qui supporte les cellules souches. Dans l'épithélium intestinal, la niche des CSIs est formée de nombreux types cellulaires dont le plus important est le fibroblaste péricryptique, encore appelé myofibroblaste [11]. Ces cellules sécrètent de nombreux facteurs de croissance et des cytokines qui promeuvent la prolifération des cellules souches. Les myofibroblastes situés sous les cellules CBCs *lgr5+* expriment notamment de façon élevée les ligands de la voie de signalisation Wnt [12, 13]. Les interactions cellule/cellule entre les cellules souches cancéreuses et les cellules stromales se révèlent nécessaires pour le développement de la pathologie. En effet, Vermeulen & al., ont démontré récemment une activité Wnt élevée dans les cellules souches cancéreuses et les adénocarcinomes. Cette activité Wnt était localisée dans les myofibroblastes du stroma [14].

2.1.2. La signalisation Wnt

L'acteur majeur de l'activation de la voie Wnt est la protéine β -caténine. En l'absence de signal Wnt (liaison du ligand sur son récepteur), la β -caténine est phosphorylée par un complexe de dégradation avant d'être adressée au protéasome où elle est dégradée. Le complexe de dégradation est formé des protéines suppresseurs de tumeur : l'axine, la protéine APC ("*adenomatous polyposis coli*"), et de la kinase constitutivement active GSK3 ("*Glycogen synthase kinase 3 β* "). Lorsque les ligands de Wnt se lient à leur récepteur frizzled et à la protéine LRP ("*lipoprotein receptor-related protein*"), le complexe de dégradation est inactivé et la protéine β -caténine se retrouve libre et s'accumule dans le cytoplasme. Sa translocation dans le noyau et sa liaison aux facteurs de transcription de type TCF ("*T cell factor*") conduisent à la transcription de gènes cibles [4]. La signalisation Wnt est nécessaire à la maintenance des cellules souches intestinales. En effet, la délétion de *pcf4*, une des cibles de la voie Wnt conduit à la perte des cellules souches [15] tout comme la mutation de la protéine β -caténine [16]. Le premier gène cible identifié est le facteur de transcription *c-Myc* qui est exprimé dans toutes les cellules transitoires en prolifération de l'intestin et sa délétion conduit à l'effacement des cryptes intestinales. De plus, des études montrent une surexpression de ce facteur dans les cancers colorectaux (CRC) [17, 18]. D'autres gènes sont des cibles de l'activation de la signalisation Wnt comme le gène *sox9* qui régule la différenciation des cellules de Paneth ou *lgr5* qui est exprimé dans les cellules souches CBCs [19, 20] (**Figure 4**).

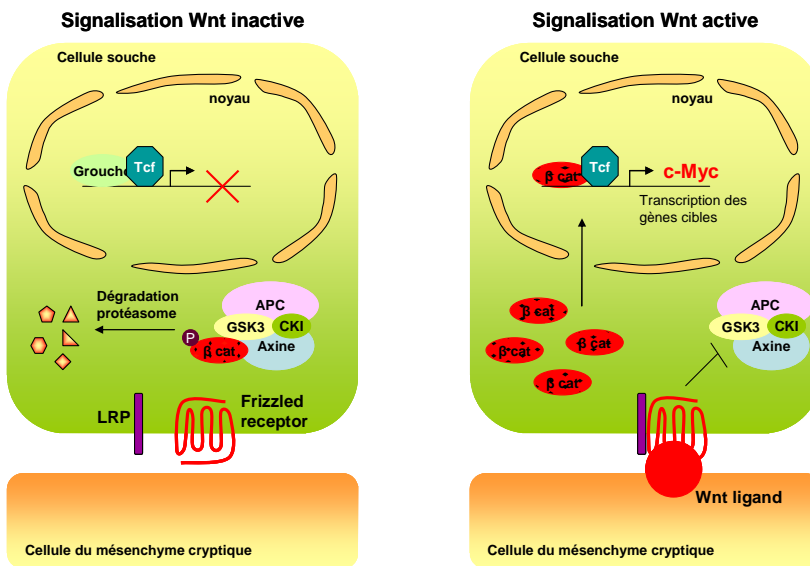


Figure 4 – La signalisation Wnt.
D'après Van der Flier et al.[4]

2.1.3. Les CEIs en prolifération: une “population transitoire en prolifération”

Les cellules souches présentes dans les cryptes donnent naissance à un nombre important de cellules transitoires en prolifération. La prolifération des CEIs dans les cryptes est conduite principalement par la signalisation Wnt [4]. En effet, la mutation de la protéine β -caténine aboutit à la diminution du compartiment prolifératif [21]. L'inhibition transgénique de la signalisation Wnt par liaison de l'inhibiteur Dickkopf-1 (DKK1) au récepteur Frizzled conduit à une réduction drastique de la prolifération cellulaire dans les cryptes intestinales [13, 22] (Figure 3).

2.2. La différenciation de l'épithélium intestinal

Comme déjà évoqué précédemment, les cellules transitoires en prolifération se différencient finalement en quatre types cellulaires différents:

- un type cellulaire absorbant: les entérocytes
- trois types cellulaires sécrétoires: les cellules à mucus, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth.

La signalisation Notch a un rôle central dans le maintien de la population de cellules souches et des cellules progénitrices dans les cryptes ainsi que dans les étapes de différenciation des CEIs régulant leur devenir absorptif ou sécrétoire [23]. La voie Notch est activée quand ses ligands (Jagged ou Delta) se lient aux récepteurs Notch situés sur les CEIs. Cette liaison induit la libération par clivage protéolytique du domaine NCID (“*Notch Intra Cellular Domain*”) qui, après translocation dans le noyau, forme un complexe transcriptionnel en se liant avec des protéines régulatrices (CSL, MAML-1 ou p300/CBP) [24]. L’activation de la voie Notch régule ainsi l’expression de nombreux gènes et augmente notamment l’expression du facteur de transcription *Hes1* (

Figure 5).

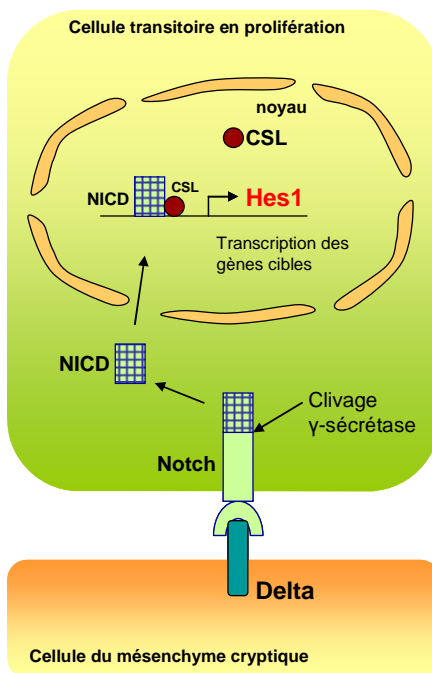


Figure 5 – La signalisation Notch.

Inspirée de Yeung et al. [25]. Après liaison du récepteur Notch à son ligand, le domaine NICD est libéré par clivage protéolytique (γ -sécrétase) avant d’être transloqué dans le noyau. Une fois lié aux protéines régulatrices telles que CSL, ce complexe induit la transcription de gènes cibles. L’induction de l’expression du facteur de transcription *Hes1* est la plus caractéristique.

2.2.1. Les cellules absorptives, les entérocytes

Les entérocytes représentent plus de 80% du nombre total des CEIs. Leur différenciation est induite par l’activation de la voie Notch qui aboutit à l’activation du facteur de transcription *Hes1* (“*Hairy/Enhancer of Split family*”) (Figure 6). *Hes1* est un répresseur transcriptionnel dont la cible principale est le gène *Hath1* (Homme, *Math1*=souris, *Rath1*=Rat) dans l’épithélium intestinal conduisant ainsi à la différenciation des entérocytes. Plusieurs études montrent que la délétion du gène *Hes1* chez la souris conduit à une

diminution du nombre de cellules absorbives favorisant ainsi une augmentation du nombre de cellules entéroendocrines et de cellules de Paneth [26, 27].

La principale fonction des entérocytes est de réguler l'absorption des ions et des nutriments. Les entérocytes possèdent à la surface de leur pôle apical des microvillosités qui forment une bordure en brosse contenant de nombreuses enzymes digestives et des transporteurs nécessaires pour le métabolisme et l'assimilation des nutriments.

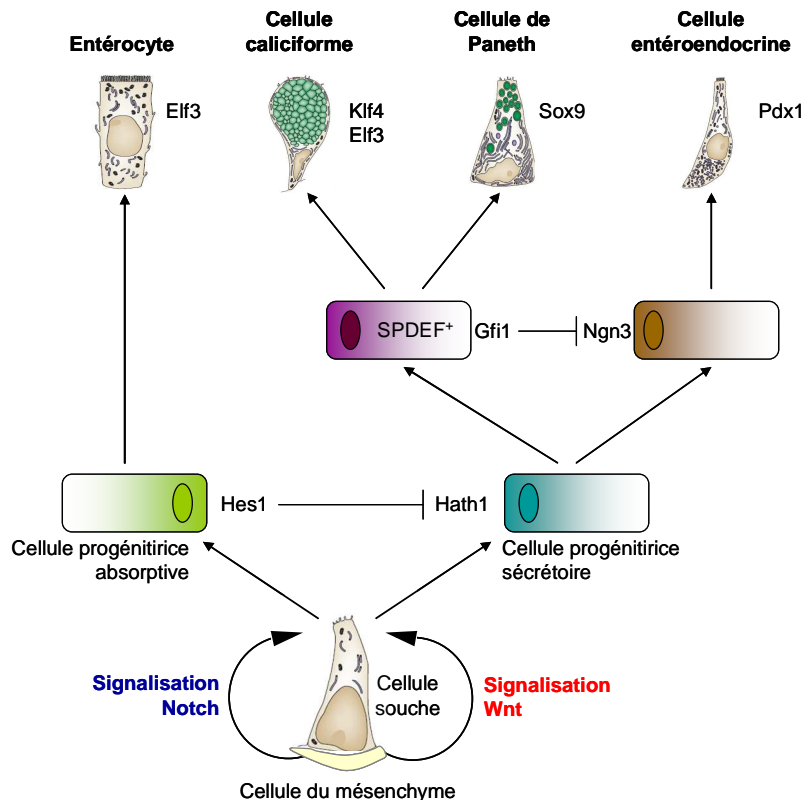


Figure 6 – Diagramme résumant les étapes clés de la différenciation intestinale.

Inspiré de van der Flier *et al.* [4] et Noah *et al.*[28]. Les cellules souches intestinales prolifèrent sous le contrôle des voies Wnt et Notch et peuvent se différencier en quatre types cellulaires principaux. *Hath1* est nécessaire pour induire la différenciation en cellules sécrétrices. *Gfi1* et *Sox9* sont responsables de la différenciation des cellules de Paneth. *Gfi1*, *Klf4* et *Eif3* sont indispensables pour le développement des cellules caliciformes. *Ngn3* est requis pour la différenciation des cellules entéroendocrines. *Hes1*, à travers *Eif3* est responsable de la différenciation des entérocytes.

2.2.2. Les cellules sécrétoires

Lorsque la voie Notch n'est plus activée, on observe l'émergence d'un progéniteur commun à toutes les cellules sécrétoires. Le facteur de transcription *Hath1* est nécessaire pour la différenciation des CEIs en cellules sécrétoires. En effet, des souris déficientes pour *Math1* sont dépourvues de cellules sécrétoires et l'épithélium est alors composé seulement d'entérocytes [29] (Figure 6).

2.2.3. *Les cellules caliciformes*

Les cellules caliciformes ou cellules à mucus sont retrouvées tout le long du tractus digestif et leur proportion augmente du duodénum (4%) au côlon (16%) de manière similaire à l'augmentation du nombre de microorganismes présents de l'intestin grêle au côlon [4]. La différenciation des cellules à mucus s'effectue via l'inhibition de la signalisation Notch conduisant ainsi à une rapide et complète conversion des cellules épithéliales en cellules sécrétoires par l'activation du facteur de transcription *Hath1*. L'expression des facteurs de transcription *klf4* ("kruppel-like factor 4") et *elf3* ("E74-like factor-3") contribue à la différenciation terminale des cellules à mucus. La délétion du facteur *klf4* entraîne la perte des cellules à mucus [30] (**Figure 6**).

Les cellules caliciformes synthétisent et sécrètent des molécules bioactives comme les mucines. Les mucines sont des glycoprotéines hautement O-glycosylées assemblées en homo-oligomères. Plus de 20 gènes différents codant pour des mucines ont été identifiés et deux types de mucines peuvent être distingués:

- les mucines transmembranaires: Muc1, Muc3, Muc4, Muc13...
- les mucines sécrétées: Muc2, Muc5AC, Muc5B, Muc6...

Les cellules à mucus sécrètent d'autres protéines dans le gel de mucus en plus des mucines comme les protéines trefoils. Les protéines trefoils sont impliquées dans les liaisons non-covalentes des mucines et sont capables d'altérer les propriétés aussi bien biophysique que protective du mucus. Ces protéines recouvrent la surface apicale des entérocytes et possèdent une structure particulière leur conférant une résistance élevée au clivage protéolytique. De plus les protéines trefoils sont impliquées dans l'homéostasie des muqueuses en participant à la réparation des lésions de l'épithélium en influençant l'apoptose et la migration cellulaire [31, 32].

2.2.4. *Les cellules entéroendocrines*

Les cellules entéroendocrines, comme les cellules caliciformes, sont retrouvées tout le long de l'épithélium intestinal, de la muqueuse stomacale au rectum. Le nombre total de cellules entéroendocrines représente approximativement 1% du nombre total de CEIs [33, 34].

Plus de quinze sous-types différents ont été décrits et elles sont la plus grande population cellulaire productrice d'hormones corporelles.

Le facteur de transcription *Ngn3* (« *Neurogenin 3* »), cible de l'activation de la cascade de signalisation *Notch-Hes1-Hath1*, est requis pour la différenciation des cellules entéroendocrines. D'autres gènes sont nécessaires à la spécification des cellules entéroendocrines comme le facteur de transcription *Pdx1* dans la muqueuse gastrique, *Pax4* et *Pax6* dans la muqueuse duodénale [4, 35] (Figure 6).

2.2.5. *Les cellules de Paneth*

Les cellules de Paneth sont principalement localisées de part et d'autre des cellules souches au fond des cryptes de l'intestin grêle alors qu'elles sont absentes de la muqueuse colique. Cependant des cellules aux propriétés similaires CD24+ résideraient entre les cellules souches dans le côlon et seraient l'équivalent des cellules de Paneth [36]. Les cellules de Paneth sont présentes au fond des cryptes intestinales pendant 21 jours avant d'être éliminées par phagocytose [37].

Les cellules de Paneth sont soumises à la signalisation Wnt et reçoivent des signaux de différenciation et de maturation de la part des cibles de la voie Wnt [38]. Les cellules de Paneth expriment le facteur β -caténine dans leur noyau contrairement aux autres types cellulaires différenciés et un défaut d'expression de ce facteur conduit à une déplétion des cellules de Paneth. Le facteur de transcription, *Sox9*, cible de la voie Wnt/ β -caténine a été décrit comme le facteur de transcription essentiel pour la différenciation des cellules de Paneth [39] et sa délétion conduit à la perte des cellules de Paneth.

Les cellules de Paneth sécrètent des molécules antimicrobiennes comme les défensines ou le lysozyme dans la couche de mucus afin de concentrer l'activité bactéricide à proximité de l'épithélium et ainsi maintenir la stérilité des cryptes intestinales [40]. L'expression de ces protéines antimicrobiennes est induite par des composants cellulaires des bactéries pathogènes et non-pathogènes présentes dans la lumière intestinale comme le LPS (lipopolysaccharide) qui est reconnu par les TLRs ("*Toll Like Receptors*"), les NLR ("*Nod like receptors*") et les RLR ("*RIG-I-Like receptors*") associés aux cellules de Paneth. La défensine α est une des protéines antimicrobiennes la plus importante de l'épithélium intestinal en participant à l'homéostasie face aux bactéries commensales telles que *Escherichia coli* et en le protégeant

contre les invasions pathogènes comme *Salmonella typhimurium* [41, 42]. En effet, l'expression transgénique de la défensine $\alpha 5$ humaine chez la souris induit une protection contre l'infection par *S. typhimurium*. De plus, le rôle des cellules de Paneth dans l'inflammation a été décrite par Wekhamp *et al.*, chez des patients souffrant de maladie de Crohn. Ils montrent que l'expression iléale des défensines humaines HD5 et HD6, produites par les cellules de Paneth est diminuée dans les zones affectées par la pathologie [43].

Enfin, il a été récemment décrit que les cellules de Paneth sont capables de produire des ligands pour les signalisations Wnt et Notch, suggérant un rôle trophique des cellules de Paneth dans la régulation du pool de cellules souches adjacentes [36].

2.3. La mort cellulaire, l'exfoliation des CEIs

Le renouvellement rapide de l'épithélium coïncide avec l'exfoliation apicale des "vieux" entérocytes tout en maintenant l'intégrité de la barrière intestinale. Le processus d'apoptose est induit par la perte de l'ancrage des CEIs aux cellules adjacentes et à la *lamina propria*. C'est le mécanisme principal par lequel les CEIs sont éliminées en haut des villosités (intestin grêle) ou des cryptes (côlon). Cependant, les mécanismes contrôlant la mort cellulaire dans l'intestin sont encore peu connus (**Figure 7**).

L'apoptose des CEIs, contrairement à la nécrose, est initiée par l'activation de signaux pro-apoptotiques faisant intervenir les protéines caspases [44, 45]. Des analyses microscopiques montrent que durant l'élimination des CEIs, des changements morphologiques ont lieu au niveau des cellules adjacentes notamment concernant le repositionnement de leurs jonctions intercellulaires et de leur cytosquelette d'actine. Les jonctions intercellulaires se positionnent sous la cellule à éliminer et par un mécanisme de fermeture éclair, la poussent du bas vers le haut, hors de l'épithélium vers la lumière intestinale. Ce processus d'élimination des CEIs peut être modélisé par l'administration de TNF ("*Tumor Necrotizing Factor*") *in vivo*. De fortes doses de TNF sont responsables de l'exfoliation massive des cellules épithéliales qui résulte de la redistribution des composants des jonctions intercellulaires sous la membrane basolatérale. À ce moment-là les jonctions se contractent et forment une structure en entonnoir par laquelle elle élimine la cellule apoptotique [46]. Ce phénomène d'étranglement des cellules en apoptose fait intervenir des réarrangements du cytosquelette d'actine et des microtubules induisant le recrutement

d'enzymes telles que la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK) ou des kinases associées aux protéines Rho [47, 48].

Bien que la fonctionnalité de la barrière soit maintenue pendant l'élimination physiologique des CEIs, le risque d'endommager la barrière est accru dans les maladies inflammatoires, où la prolifération et le renouvellement cellulaire sont augmentés. En effet, en plus du TNF, d'autres cytokines pro-inflammatoires altèrent la barrière et promeuvent l'inflammation intestinale comme l'interféron γ ou IL13. Cette interleukine a été identifiée comme un inducteur potentiel de l'apoptose dans la colite ulcéreuse [49, 50] (**Figure 7**).

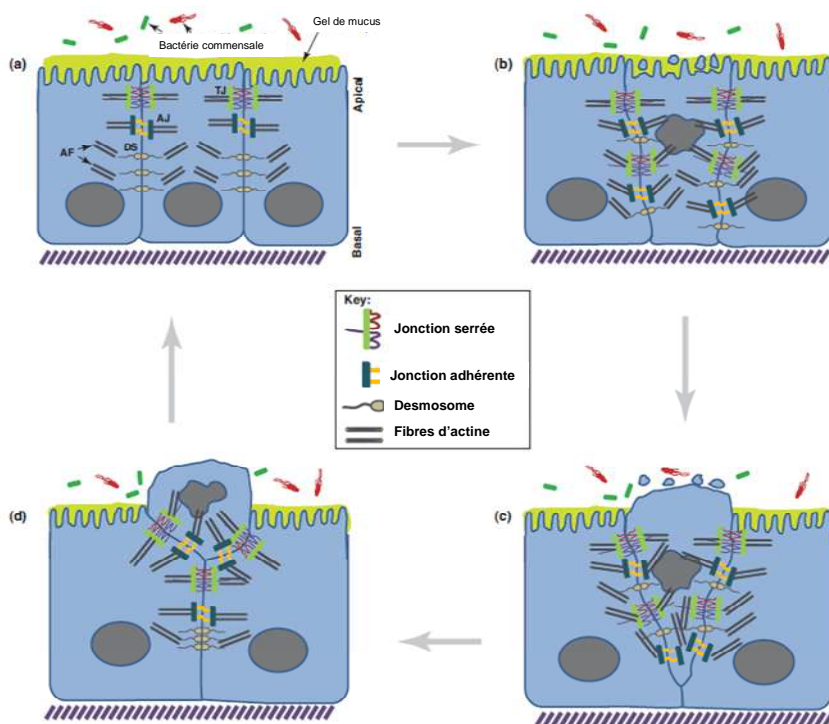


Figure 7 – Mécanisme d'élimination des CEIs.

D'après Vereecke *et al.* [51]. (a) Les CEIs polarisées sont fermement connectées par les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. (b) De hautes doses de TNF induisent la redistribution rapide des jonctions intercellulaires et des éléments du cytosquelette à la membrane basolatérale, formant une structure en entonnoir. (c) La cellule en cours d'apoptose est éliminée progressivement par contraction du cytosquelette. (d) Après élimination de la cellule morte, les jonctions intercellulaires se reforment sur les pôles latéraux.

3. La muqueuse intestinale, une barrière physique, immunologique et microbiologique

Le tractus gastro-intestinal représente la plus grande surface d'échanges entre l'organisme et le milieu extérieur. Tout au long de la vie, le tube digestif est la première surface à être exposée aux aliments mais aussi aux xénobiotiques (substances étrangères au corps humain: molécules pharmacologiques, bactéries, virus, parasites...). Afin de prévenir la pénétration dans l'organisme de ces xénobiotiques, la muqueuse intestinale joue le rôle de barrière de défenses organisée en quatre unités fonctionnelles i/ la barrière mécanique, ii/ la

barrière écologique correspondant au microbiote intestinal, iii/ la barrière physique composée des CEIs, du gel de mucus, des jonctions intercellulaires et des propriétés de perméabilité de l'épithélium intestinal et enfin iv/ la barrière immunologique comprenant les organes et cellules immunitaires de l'intestin ainsi que leurs sécrétions (immunoglobulines, cytokines...).

3.1. La motilité intestinale: la “barrière mécanique”

Les mouvements péristaltiques intestinaux empêchent la prolifération des bactéries dans la lumière intestinale. Ces mouvements de propulsion, répétitifs et réguliers préviennent l'adhérence des bactéries à l'épithélium intestinal ainsi que leur translocation à travers la muqueuse intestinale et contribuent à leur élimination en même temps que les composés alimentaires non digérés [52].

3.2. Le microbiote intestinal: la “barrière microbiologique”

Les bactéries commensales qui peuplent notre tube digestif constituent la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes. Les bactéries commensales empêchent la colonisation de la muqueuse intestinale par des bactéries pathogènes en colonisant préférentiellement et massivement la niche écologique que constitue l'intestin, en entrant en compétition pour les nutriments nécessaires à leur croissance, en produisant localement des substances antimicrobiennes, appelées bactériocines ou en intervenant dans la mise en place d'une réponse immunitaire efficace (voir Chapitre II: Microbiote Intestinal) [53, 54].

3.3. Structure de la barrière intestinale: la “barrière physique”

3.3.1. Les cellules épithéliales intestinales

Les CEIs forment la première barrière physique assurant la protection de la muqueuse intestinale du fait de leur organisation en couche unique de cellules reliées entre elles par des

complexes jonctionnels (Chapitre I.3.3.3 La perméabilité intestinale) et de par leurs capacités à sécréter des peptides antimicrobiens à leur surface apicale. La production de ces produits antimicrobiens induit l'élimination des microorganismes, l'attraction des monocytes et potentialise l'opsonisation et la phagocytose par les macrophages [4].

3.3.2. *Le gel de mucus*

L'intégralité de l'épithélium intestinal est recouverte d'une couche de mucus. Le gel de mucus tapisse et lubrifie la paroi intestinale facilitant ainsi le passage des selles et protégeant l'épithélium contre l'érosion mécanique et les agressions pathogènes. L'épaisseur du gel de mucus varie tout le long du tractus digestif, s'étendant sur plus de 700 μm dans l'estomac et le côlon, il ne mesure qu'entre 150 à 300 μm dans l'intestin grêle [55] (**Figure 8**). La barrière de mucus est formée de deux couches [56, 57] :

- une couche mince en contact étroit avec l'épithélium, généralement considérée comme stérile et difficile à dégrader. Le gel de mucus adhérent fournit une matrice pour la rétention d'un large éventail de molécules bioactives incluant les mucines, des glycoprotéines, les facteurs trefoils, des peptides antimicrobiens et des Immunoglobulines A sécrétées (sIgA).

- une couche extérieure, non adhérente et plus épaisse, est remplacée lors des mouvements de péristaltisme et dégradée plus facilement par l'activité enzymatique de certaines bactéries (glycosidases). Non stérile, le gel de mucus non adhérent héberge de nombreuses bactéries de la flore commensale intestinale. En effet, les bactéries sont capables de pénétrer le gel de mucus non adhérent et de se lier via leurs adhésines de surface aux nombreux glycanes portés par les protéines du mucus. Enfin, la richesse du mucus en oligosaccharides apporte une source d'énergie pour la bactérie. Les bactéries commensales via l'expression d'enzymes spécialisées libèrent de nombreux sucres en dégradant les polymères de mucines. Les résidus peuvent à la fois être utilisés par la bactérie comme source d'énergie mais aussi être transformés en acides aminés à chaîne courte qui après diffusion à travers le gel de mucus gagnent l'épithélium et contribuent à l'homéostasie intestinale [58](**Figure 8**).

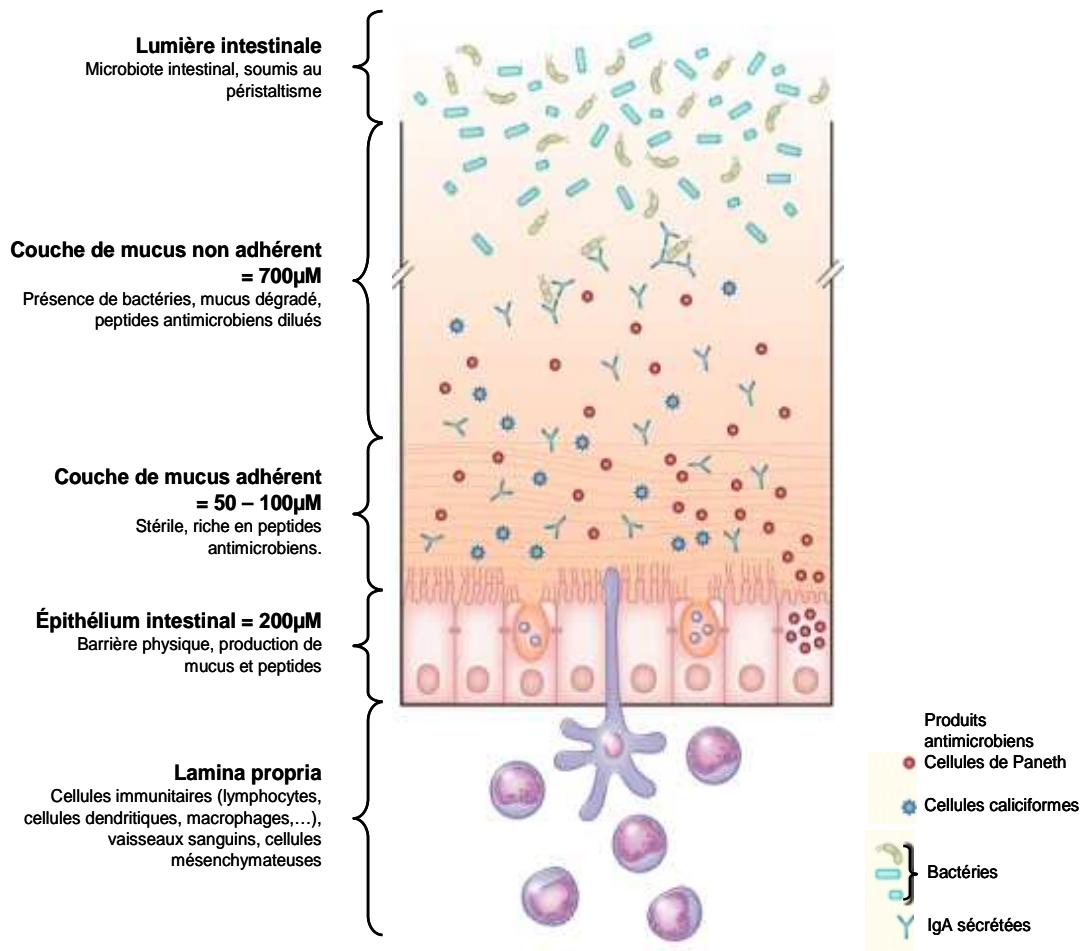


Figure 8 – Représentation schématique de la barrière muqueuse du côlon.

D'après McGuckin *et al.* [59], et Kim *et al.* [60]. La surface de l'épithélium intestinal est recouverte par deux couches de mucus, l'une fortement adhérente à la muqueuse mesure entre 50 et 100µM, l'autre extérieure et non adhérente mesure environ 700µM chez le rat.

La mucine principale intervenant dans la formation du gel de mucus est la mucine Muc2 qui une fois dimérisée dans le réticulum endoplasmique, est fortement O-glycosylée dans le Golgi avant d'être polymérisée par des ponts disulfures sur sa partie N-terminale. Sa perte permet aux bactéries d'entrer directement en contact avec les cellules épithéliales et de pénétrer dans les cryptes, décrites comme stériles [57]. Les souris déficientes pour le gène *Muc2* développent une maladie inflammatoire conduisant à l'apparition de diarrhées, de perte de poids et parfois au cancer du côlon [61, 62](**Figure 8**).

3.3.3. La perméabilité intestinale

L'épithélium intestinal, comme déjà mentionné précédemment, peut être défini comme une frontière entre l'organisme et l'environnement extérieur. La perméabilité de l'épithélium est assurée par deux voies principales ; l'une transcellulaire permet le passage de molécules de haut poids moléculaire à travers la cellule, l'autre paracellulaire est associée à un transport de molécules de faible poids moléculaire ($\leq 10\text{kDa}$) à travers l'espace intercellulaire.

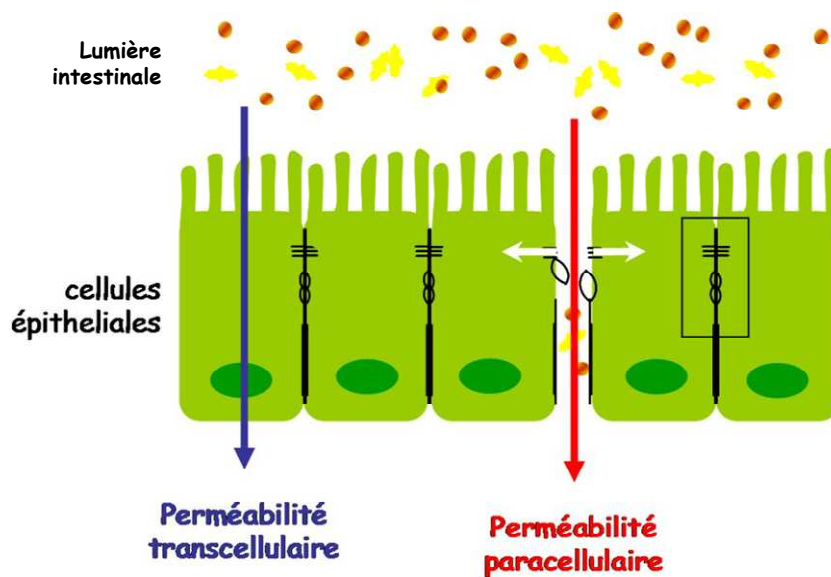


Figure 9 – La perméabilité intestinale.

En bleu, la perméabilité transcellulaire assure la diffusion passive de petites molécules hydrophiles et le passage actif par endocytose de grosses molécules ($> 10\text{kDa}$).

En rouge, la voie paracellulaire assure le passage des ions et électrolytes et des molécules de taille moyenne ($< 10\text{kDa}$).

a) La perméabilité transcellulaire :

La voie transcellulaire est la principale voie impliquée dans le transport des molécules hydrophiles de petite taille. Ce transport implique généralement une diffusion passive *via* les aquaporines. Le transport des acides aminés, vitamines et autres nutriments s'effectue activement avec l'aide de transporteurs ou par endocytose pour les peptides de grande taille et les produits bactériens incapables d'emprunter l'espace intercellulaire. Le processus initial d'endocytose implique l'invagination de la membrane de la CEI via la formation de puits de clathrine [63-65] ou à travers des microdomaines enrichis en cholestérol appelés radeaux lipidiques [66]. Ainsi, il a été montré que certaines entérotoxines bactériennes et virus utilisent ce processus pour entrer dans les entérocytes.

Une fois dans la cellule, la majorité des macromolécules utilisant la voie transcellulaire pour pénétrer l'épithélium intestinal est dirigée vers les voies de dégradation

limitant ainsi l'entrée de molécules aux propriétés antigéniques dans l'organisme. Cependant, de faibles quantités de protéines (<10%) ne sont pas digérées dans l'entérocyte et sont transportées à travers la cellule épithéliale sous forme intacte [67] (**Figure 9**).

b) La perméabilité paracellulaire :

La perméabilité paracellulaire assure le passage des électrolytes et de l'eau mais également le transport sélectif de plus grosses molécules telles que certains sucres (jusqu'à 10 kDa) à travers l'espace intercellulaire. L'ouverture et l'accessibilité de l'espace intercellulaire sont contrôlées par les jonctions serrées, complexes protéiques localisés à la jonction latérale et le long de la membrane basale.

La perméabilité paracellulaire peut être évaluée par la mesure de la résistance transépithéliale de l'épithélium intestinal ou par l'évaluation du passage de molécules marquées du pôle muqueux vers le pôle apical. La résistance transépithéliale rend compte des flux trans-jonctionnels des ions et est inversement corrélée avec la perméabilité paracellulaire qui permet le passage de molécules de petite taille. Ces deux paramètres sont complémentaires et inversement corrélés (**Figure 9**).

3.3.4. Les jonctions intercellulaires

L'espace entre deux cellules épithéliales est fermé par des jonctions intercellulaires constituant une véritable frontière entre la lumière intestinale et le milieu intérieur. Les jonctions intercellulaires sont des structures dynamiques localisées au niveau apical et latéral des CEIs. Trois complexes protéiques, les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes, interviennent dans le maintien de l'homéostasie mécanique et chimique de l'épithélium intestinal tout en favorisant les échanges entre les cellules [68] (Figure 10).

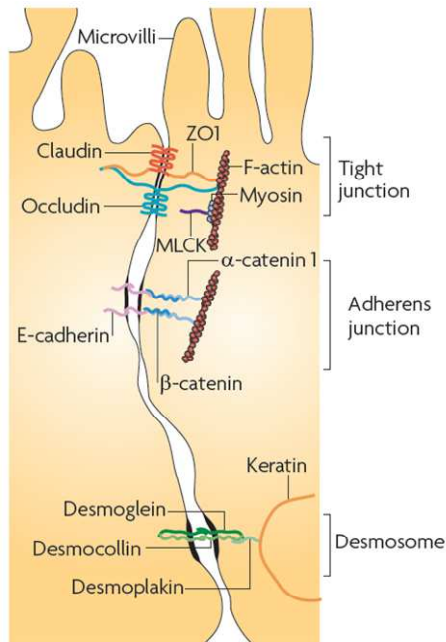


Figure 10 – Schéma des différents complexes de jonctions intercellulaires dans l'épithélium intestinal.

D'après Turner *et al.* [68].

a) Les jonctions serrées (“*Tight junctions*”):

Ce sont les complexes les plus solides qui assurent l'étanchéité des épithéliums. Situées au pôle apical des CEIs, elles assurent le passage paracellulaire sélectif de certains composés. Leur perméabilité définit ainsi les fonctions de barrière de l'épithélium. Sur le plan moléculaire, les jonctions serrées sont composées de 4 types de protéines transmembranaires (occludines, claudines, molécules d'adhésion jonctionnelles (protéines JAM) et les tricellulines) auxquelles s'ajoutent des protéines adaptatrices intracellulaires (ZO, “*Zonula Occludens*”), et des complexes de signalisation qui régulent les liaisons au cytosquelette. En plus du rôle prépondérant des jonctions serrées dans le maintien de l'étanchéité de l'épithélium intestinal, des données montrent que ces structures sont également impliquées dans les mécanismes de régulation de la prolifération, polarisation et différenciation des CEIs [69]. Capaldo *et al.*, ont montré que les protéines de jonction ZO intervenaient dans la stabilisation de la cycline D1 impliquée durant la mitose cellulaire. Les protéines ZO/cycline D1 forment des complexes qui régulent la transition G1/S durant la mitose. Un défaut dans la formation de ce complexe conduit à une accumulation des cellules en G1 et à une diminution du pool de cellules en phase S et en G2/M [69].

b) Les jonctions adhérentes (JA):

Les JA sont formées elles aussi d'une liaison entre une protéine transmembranaire, la E-cadhérine avec une protéine cytoplasmique, la caténine. Situées juste en dessous des jonctions serrées, les JA permettent elles aussi de relier soit directement, soit via une protéine adaptatrice le cytosquelette d'actine de CEIs adjacentes. En plus de leur rôle dans la formation des jonctions intercellulaires, les JA interviennent également dans les phénomènes de migration, différenciation et polarisation des CEIs. En effet, une diminution de l'expression de la E-cadhérine perturbe la structure des JA mais conduit également à un défaut de la migration et de la prolifération cellulaire dans l'intestin [70].

c) Les desmosomes:

Les desmosomes sont eux aussi formés de protéines transmembranaires (desmogléine) et de protéines intracellulaires (desmoplakine) qui connectent les filaments intermédiaires du cytosquelette, contribuant ainsi à la liaison entre les cellules.

3.4. Immunité de la muqueuse intestinale: la "barrière immunologique"

La barrière immunologique, est formée de tissus lymphoïdes hautement spécialisés associés à la muqueuse ou GALT ("*Gut-Associated Lymphoid Tissue*"). Les GALT peuvent être divisés en sites effecteurs diffus incluant des cellules immunitaires de la *lamina propria* ou de l'épithélium comme les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL pour "*Intra Epithelial Lymphocyte*") et en sites inducteurs formés de structures hautement organisées regroupant les crypto-plaques (CPs), les follicules lymphoïdes isolés (ILF pour "*Isolated Lymphoid Follicle*"), les plaques de Peyer (PPs) et les nœuds lymphatiques mésentériques (MLN pour "*Mesenteric Lymph Nodes*"). Les GALT représentent les organes lymphoïdes les plus importants de tout l'organisme en regroupant plus de 80% des cellules immunitaires. Ils jouent un rôle fondamental en induisant des réponses immunitaires spécifiques contre les pathogènes qui envahissent l'épithélium intestinal et en induisant une tolérance contre les antigènes présents dans l'environnement de l'épithélium (antigènes alimentaires ou de la flore commensale) (**Figure 11**)[71].

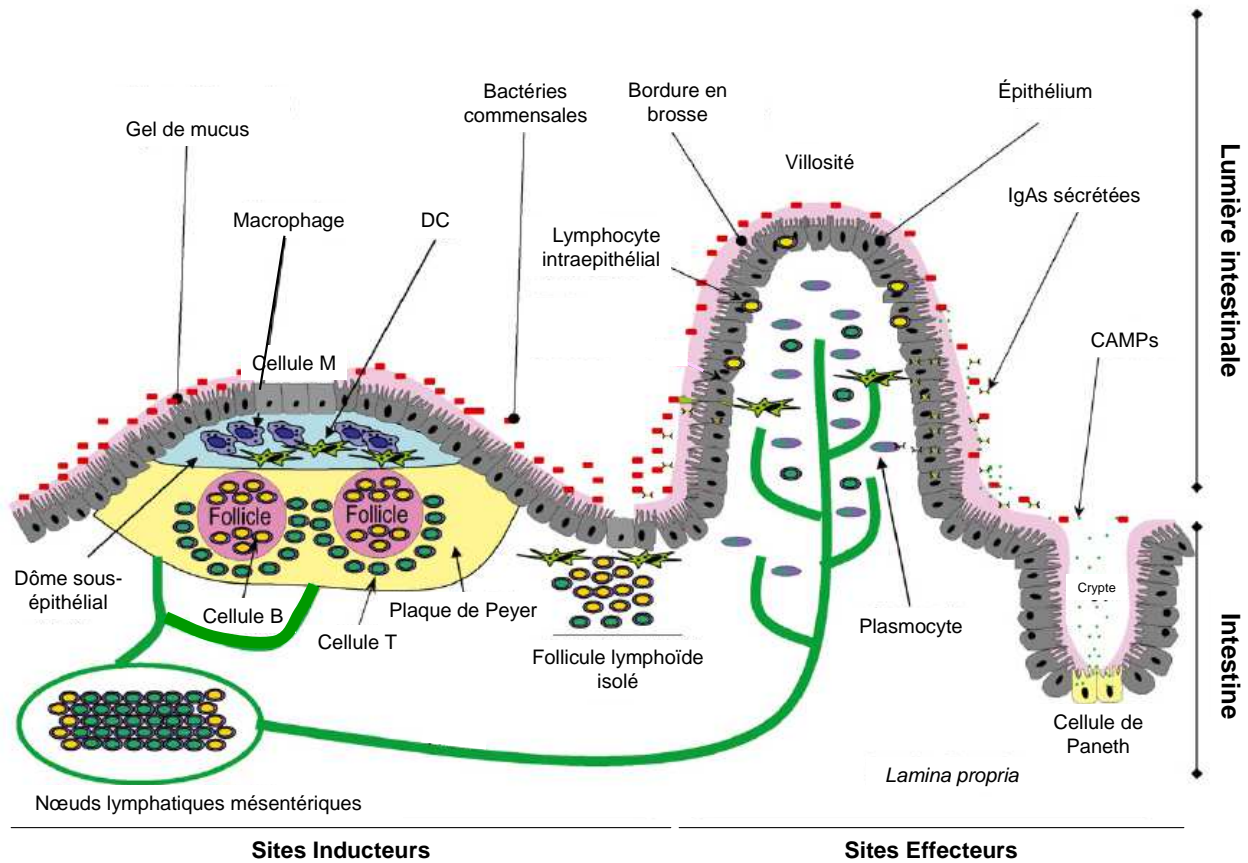


Figure 11 – Le système immunitaire intestinal.

D'après Magalhaes *et al.*, [71]. DC = cellule dendritique. CAMPs = peptides antimicrobiens. Le système immunitaire intestinal est séparé en deux zones. Les sites inducteurs sont composés des crypto-plaques, des follicules lymphoïdes isolés, des nœuds lymphatiques mésentériques et des plaques de Peyer. Les sites effecteurs sont formés de la *lamina propria* et de l'épithélium (qui contient les lymphocytes intra-épithéliaux).

3.4.1. Les sites effecteurs

Les sites effecteurs sont les lieux où les cellules immunitaires différenciées exercent leur fonction cytotoxique ou régulatrice (lymphocytes T) et leur fonction humorale (lymphocyte B).

a) La *lamina propria*:

La *lamina propria* comprend un grand nombre de lymphocytes T, B, des macrophages et des cellules dendritiques (DCs). Les DCs sont capables d'étendre leurs dendrites entre les CEIs afin de surveiller le microbiote situé à la surface de l'épithélium intestinal. La découverte d'une bactérie pathogène active la DC qui va migrer à travers la *lamina propria* vers les MLNs afin d'induire la réponse immunitaire adaptative. La *lamina propria* renferme

les cellules de l'immunité innée ainsi que les Immunoglobulines et cytokines sécrétées par les cellules de l'immunité adaptative retrouvées dans les organes spécialisés de l'immunité, les MLNs, les PPs et les CPs. La population de lymphocytes T (LT) est constituée à la fois de cellules T conventionnelles mais aussi de LT CD8+ régulateurs. Les lymphocytes B (LB) présents dans la *lamina propria* forment une population essentiellement constituée de plasmocytes qui sécrètent les immunoglobulines (IgA, IgM et IgG) [71].

b) Les lymphocytes intra-épithéliaux (IELs):

Localisés dans l'épithélium et la *lamina propria*, les IELs sont des lymphocytes qui enregistrent et reconnaissent en premier les signaux de dangers représentés par les antigènes ou les bactéries pathogènes. Ils forment une population hétérogène comprenant des LT CD4+ minoritaires et les LT CD8+ généralement cytotoxiques sont majoritaires.

3.4.2. Les sites inducteurs

Les sites inducteurs sont les lieux où les antigènes présents dans la lumière intestinale sont collectés et où ils induisent une réponse immunitaire spécifique.

a) Les crypto-plaques (CPs):

Ce sont des structures peu organisées, situées à la base des cryptes épithéliales et distribuées aléatoirement tout le long de l'intestin, du grêle, où elles sont les plus nombreuses, au côlon [72]. Très peu de LT et LB matures sont présents dans ces structures (<2%). Les CPs sont composées majoritairement de trois types cellulaires: des cellules Lin- c-kit+ représentant 70% de la population cellulaire des CPs, des cellules dendritiques (30% environ) et des cellules stromales. Les cellules Lin- c-kit+ n'expriment pas les marqueurs des cellules immunitaires matures (CD3, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, B220...) mais des marqueurs caractéristiques des cellules souches lympho-hématopoïétiques tels que c-kit, le récepteur à l'interleukine 7 (IL7), ou encore ROR γ t ("*retinoid acid-related orphan receptor γ '*") [73].

Les crypto-plaques joueraient un rôle dans la génération des tissus lymphoïdes secondaires et tertiaires comme les ILFs et favoriseraient le développement de certaines sous-populations de lymphocytes, comme les LT Th17 à travers notamment l'expression de

ROR γ t, les cellules NKp46+ IL22+, importantes pour l'homéostasie et l'immunité intestinale [74-76], ou les IELs [77]. Cependant, les résultats concernant la maturation des IELs par les crypto-plaques sont controversés et contredite par Pabst *et al.* [78].

b) Les plaques de Peyer (PPs):

Situées immédiatement sous l'épithélium et présentes uniquement dans l'intestin grêle, les PPs sont recouvertes par un épithélium spécialisé appelé épithélium associé aux follicules (EAF). Il est dépourvu en cellules caliciformes et cellules de Paneth et il est formé d'entérocytes particuliers présentant de faibles niveaux d'enzymes digestives et une bordure en brosse diminuée. De plus l'EAF contient des cellules spécialisées, les cellules M [79]. Les cellules M sont capables de capturer directement dans la lumière intestinale des antigènes solubles ou des bactéries par endocytose ou phagocytose et de les libérer ensuite du côté basolatéral dans le dôme sous-épithélial des PPs où ils sont captés et apprêtés par les DCs ou détruits par les macrophages présents. Sous le dôme, une zone interfolliculaire riche en LT entoure les follicules lymphoïdes composés d'un centre germinatif très riche en LB et en LT auxiliaires.

c) Les follicules lymphoïdes isolés (ILFs) :

Anatomiquement similaires aux lymphoïdes folliculaires des PPs, les ILFs sont présents à la fois dans l'intestin grêle et le côlon. Les ILFs jouent le même rôle que les PPs.

d) Les ganglions lymphoïdes mésentériques (MLNs) :

Les MLNs sont les plus grands ganglions lymphatiques présents dans l'organisme. Ils font le lien entre la muqueuse, via les vaisseaux lymphatiques qui drainent les PPs, la *lamina propria*, des cellules T et B effectrices, et la circulation générale. Les MLNs interviennent dans l'activation et la tolérisation des LT et LB naïfs en lymphocytes effecteurs, cytotoxiques ou producteurs d'anticorps, les plasmocytes. Les DCs contenues dans la *lamina propria* capturent directement des bactéries ou des composants microbiens (pathogènes ou commensaux) dans la lumière intestinale grâce à l'extension de leurs dendrites à travers les jonctions intercellulaires [80]. Ces DCs migrent ensuite via le système lymphatique au niveau des MLN où elles présentent les antigènes aux lymphocytes T pour qu'ils soient activés et deviennent effecteurs [81].

3.4.3. *Le “double jeu” de l'immunité intestinale*

L'hôte est en permanence soumis au challenge de discriminer les bactéries symbiotiques (“commensales”) des bactéries pathogènes dans le but d'induire une réponse immunitaire adaptée. Ainsi, le système immunitaire mucosal a deux fonctions principales qui s'opposent radicalement. En effet, la réponse du système immunitaire diffère en fonction du pouvoir pathogène ou non des souches bactériennes présentes dans la lumière intestinale. La réponse de l'hôte à des bactéries pathogènes est caractérisée par la reconnaissance rapide et par la forte activation de la réponse immunitaire innée (c'est-à-dire inflammatoire) et adaptative, conduisant à l'éradication du microorganisme. Cependant, cette réponse s'accompagne souvent de dommages importants pour le tissu intestinal. En revanche, la réponse de l'hôte à des bactéries commensales est caractérisée par un processus appelé tolérance qui regroupe les mécanismes de reconnaissance des microorganismes et contrôle les réponses immunitaires innées (c'est-à-dire inflammation physiologique) et adaptatives [82].

Cependant, comment l'hôte discrimine-t-il un microorganisme pathogène d'une bactérie symbiotique afin d'ajuster au mieux sa réponse immunitaire ? Trois hypothèses principales, mais probablement complémentaires permettent d'expliquer les capacités discriminantes de l'hôte:

- Les signaux de reconnaissance des bactéries commensales (PAMPs « Pathogen-associated molecular patterns ») subissent des modifications biochimiques qui les rendent moins agonistes pour se fixer sur les PRRs (“*Pattern recognition receptor*”) en comparaison aux PAMPs des microorganismes pathogènes (a).
- Les bactéries commensales expriment des effecteurs spécifiques qui induisent activement des signaux tolérogènes limitant l'inflammation (b).
- Les pathogènes créent, en plus de leur affinité pour les récepteurs PRRs, un niveau particulier de stress qui est perçu par l'hôte comme un signal de danger, conduisant à une réponse inflammatoire avec pour conséquence l'éradication du pathogène (c).

a) Identification des bactéries symbiotiques

Le lipide A du LPS (lypopolysaccharide) des *Bacteroidetes* est sous forme de tétra- ou pentacycle et n'est pas agoniste voire même un antagoniste du complexe TLR4/CD14/MD2. De ce fait, le lipide A n'est pas capable d'induire la signalisation TLR4. En revanche, le lipide

A du LPS des Entérobactéries est retrouvé sous forme hexacyclée et est agoniste pour le TLR4 [83]. Or du fait de la dominance des *Bacteroidetes* sur les *Entérobactéries* (plusieurs logs (4-6)), l'écrasante production de lipide A non agoniste pour l'hôte par les *Bacteroidetes* inhibe le reconnaissance des *Entérobactéries*, largement minoritaires. Dans la maladie de Crohn, la déplétion des *Bacteroidetes* au profit des *Protéobactéries*, et plus particulièrement des *Entérobactéries* contribue à l'attachement intime de ces bactéries à la surface épithéliale qui sont ainsi capables d'induire de forts signaux pro-inflammatoires via la liaison de leur lipide A au récepteur TLR4 [84, 85].

D'autre part, de nombreuses études ont montré que les CEIs exprimaient peu de TLR4 et MD2 à leur surface, les rendant ainsi moins sensibles au LPS [86, 87]. Une des explications pourrait être que, du fait de leur continuelle exposition à la flore endogène et au LPS qui en dérive, les cellules épithéliales, deviennent tolérante vis-à-vis d'autres PAMPs potentiellement pathogènes, et réduisent l'expression de TLR4 à leur surface. Des études *in vitro* ont d'ailleurs mis en évidence que des expositions prolongées au LPS, rendent des lignées de CEIs insensibles à d'autres PAMPs [88]. De même dans la *lamina propria*, les DC expriment peu de TLR4 et TLR2 [89]. À l'inverse, le TLR5 est très largement exprimé à la surface basolatérale des cellules épithéliales. Les bactéries commensales présentes le long de la membrane apicale n'ont pas besoin d'exprimer le flagelle. Seules les bactéries pathogéniques, qui une fois la barrière épithéliale franchie ont besoin d'un flagelle pour se déplacer, pourront ainsi être détectées. Ainsi, la compartimentalisation de l'expression des TLRs est un des facteurs principaux expliquant la tolérance immune de la muqueuse [90].

La tolérance vis-à-vis des PAMPs produits par les bactéries commensales est mise en place très précocement après la naissance puisque par exemple, l'épithélium intestinal est tolérant pour les molécules de LPS très tôt chez le nouveau-né [91]. En effet, après la naissance, le tractus digestif est colonisé par une flore complexe et très variée. Les CEIs sont exposées au LPS des bactéries et augmentent l'expression du microRNA-146a. La surexpression de ce microRNA conduit à la dégradation de IRAK1 qui, exprimé à faible niveau promeut l'homéostasie mucoale via la signalisation TLR4 [92, 93].

- b) Les bactéries commensales expriment des effecteurs spécifiques qui induisent activement des signaux tolérogènes limitant l'inflammation.

Bacteroidetes fragilis protège les animaux contre le développement de colite induit par *Helicobacter hepaticus*. L'activité anti-inflammatoire de *B. fragilis* nécessite l'expression de l'antigène polysaccharide capsulaire. En effet, les animaux colonisés avec un mutant négatif pour le polysaccharide de *B. fragilis* ne sont plus protégés de la colite induite par *H. hepaticus* [94]. La monocolonisation d'animaux axéniques par *B. fragilis* augmente les capacités immuno-suppressives des LT régulateurs en induisant notamment la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 pendant la colonisation [95]. De plus, les polysaccharides purifiés suppriment la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17.

Les SFB (“*Segmentous Filamentous Bacteria*”) sont des bactéries du groupe *Clostridium* non cultivables qui adhèrent fortement à la surface des cellules épithéliales dans l'iléum. Ces bactéries sont suffisantes pour induire l'apparition de LT CD4⁺ produisant de l'IL17 et de l'IL22 (les LT Th17) dans la *lamina propria*. La colonisation avec des SFB est corrélée avec une augmentation de l'expression des gènes de défense pro-inflammatoires et antimicrobiens qui permettent d'augmenter la résistance de la muqueuse intestinale aux infections par *Citrobacter rodentium* [96].

c) Les pathogènes induisent des signaux de danger.

En plus de leur capacité à se lier aux récepteurs de type PRR grâce à leurs PAMPs, il est aussi nécessaire de considérer l'expression d'autres signaux liés directement à la pathogénicité elle-même des souches pathogènes. Des études génomiques comparatives ont montré que les bactéries pathogènes expriment de nombreux gènes regroupés dans des îlots de pathogénicité qui codent pour des fonctions de virulence permettant l'adhésion cellulaire, l'invasion cellulaire, l'expression d'appareil de sécrétion dans les cellules de l'hôte induisant l'injection de leurs effecteurs et la production de toxines [97]. La pathogénicité des souches affecte les signaux de reconnaissance par l'engagement de signaux dits de danger. Ces signaux de danger sont divisés en deux catégories:

- les signaux émis par les structures cellulaires de l'hôte qui sont soumis aux facteurs de virulence
- les DAMPs (“*Damage-Associated Molecular Pattern*”), molécules de l'hôte libérées en conséquence des effets délétères du processus infectieux. Ces DAMPs peuvent ensuite être reconnus par les PRRs et entraîner la cascade de signalisation

conduisant à l'activation du système immunitaire et à l'éradication du pathogène [98].

CHAPITRE II

LE MICROBIOTE INTESTINAL

Le microbiote définit l'ensemble des espèces bactériennes chez l'Homme qui colonise toutes les surfaces du corps humain exposées à l'environnement extérieur. L'organe le plus colonisé est le tractus GI où le côlon à lui seul contient plus de 70% de tous les microbes du corps humain [99]. Ainsi, 10^{13} à 10^{14} microorganismes cohabitent pacifiquement dans notre tractus gastro-intestinal avec la muqueuse ; l'épithélium intestinal mais aussi le système immunitaire mucosal [99, 100] et constituent une part intégrante de la physiologie de l'hôte. Des altérations dans sa composition sont impliquées dans de nombreux problèmes de santé et dans le développement de pathologies.

1. Généralités sur les “habitants” du tractus digestif : notion de microbiote

1.1. De la microflore intestinale au microbiote intestinal

Avant les années 2000, la composition de la microflore adulte était évaluée uniquement sur environ 30% des bactéries totales de l'intestin correspondant aux bactéries cultivables. Cependant, depuis une dizaine d'années, l'évolution des techniques d'analyse des bactéries peuplant le tractus digestif telles que les méthodes de séquençage de l'ARN 16S, le développement de la métagénomique et l'apparition du pyroséquençage a permis de caractériser l'ensemble des espèces bactériennes, les archées, les champignons et de requalifier la microflore intestinale en microbiote intestinal, un terme plus en adéquation pour signifier la richesse et la forte diversité inter-individuelle [101]. Ainsi, ces nouvelles techniques basées sur l'analyse de la diversité des génomes montrent que le microbiote se divise en grands phyla (environ 50) mais deux prédominent: les *Firmicutes* (comprenant deux grands groupes: *Clostridium leptum* et *Clostridium coccoïdes*) et les *Bacteroidetes* [102].

Le microbiote intestinal est dominée par la flore dite “dominante” comprenant entre 10^9 et 10^{11} cfu (“colonies forming units”) par gramme de fèces et composée principalement de bactéries anaérobies strictes comme les *Bacteroidetes*, les *Bifidobactéries*, les *Firmicutes*....

La flore dite “sous-dominante” représente entre 10^6 et 10^8 cfu/gramme de fèces et est composée de bactéries aérobies/anaérobies facultatives comme les *Entérobactéries*, les *Streptocoques* et les *Entérocoques*. Enfin, la flore dite “transitoire” ne s’implante pas durablement dans le tractus GI et est composée d’espèces bactériennes de passage comme *Citrobacter*, *Klebsiella* ou encore *Enterobacter*....

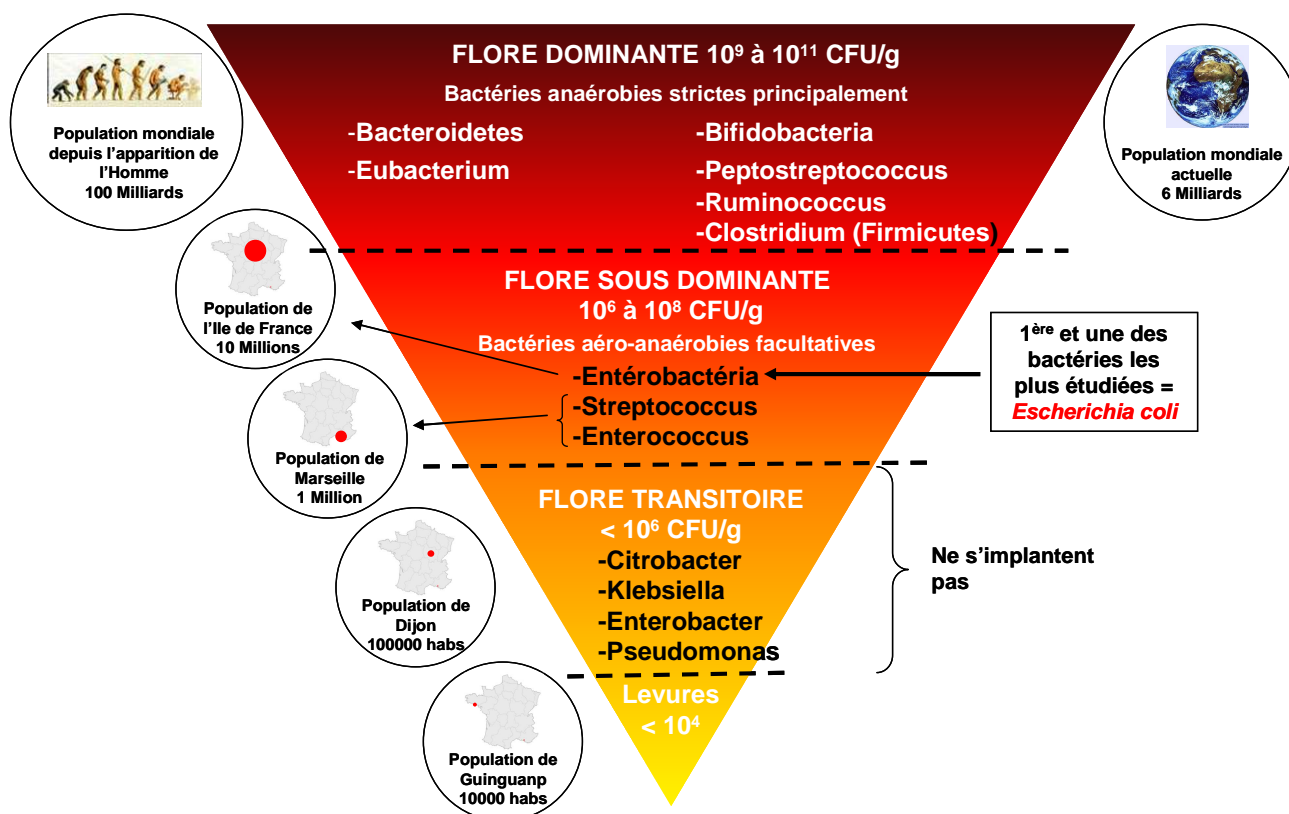


Figure 12 – Composition de la flore dominante, sous-dominante et transitoire.

1.2. Localisation du microbiote intestinal

Le nombre de bactéries présentes dans le tractus intestinal montre un continuum de l’estomac vers le rectum. 10^1 à 10^3 bactéries par gramme de contenu luminal sont retrouvées dans l’estomac et le duodénum et progressivement leur nombre augmente vers le rectum. 10^4 à 10^7 bactéries sont retrouvés dans le jéjunum et l’iléum et leur nombre culmine à environ 10^{11} - 10^{12} bactéries par gramme dans le côlon [103].

De plus, la composition microbienne varie entre les différents sites. Des échantillons isolés de l’intestin grêle sont enrichis en *Firmicutes* et *Actinobactéries* alors que la prévalence

des *Bacteroidetes* est plus forte dans le côlon [104]. En plus de l'hétérogénéité longitudinale retrouvée pour la composition du microbiote intestinal, il existe aussi une grande variation transversale, de l'épithélium intestinal vers le centre de la lumière intestinale. En effet, l'épithélium intestinal est séparé de la lumière par une couche de mucus. Le microbiote présent dans la lumière intestinale diffère significativement des espèces bactériennes retrouvées dans le gel de mucus, des espèces retrouvées dans la proximité immédiate de l'épithélium. Ainsi, Swidsinski *et al.* montrent que de nombreuses espèces bactériennes présentes dans la lumière intestinale n'ont pas accès au gel de mucus et aux CEIs. Par exemple, les *Bacteroidetes*, *Bifidobactéries*, *Streptocoques* et les membres des *Entérobactéries* et *Ruminocoques* sont uniquement retrouvés dans les fèces alors que les *Lactobacilles* et les *Entérocoques* sont détectés dans le gel de mucus et les cryptes intestinales de l'intestin grêle [105]. La localisation des SFB est un bon exemple pour témoigner de la colonisation différentielle de souches bactériennes le long et à travers le tractus digestif. En effet, les SFB sont surtout retrouvées au niveau de l'iléum et uniquement en contact avec l'épithélium intestinal [106].

2. Le microbiote intestinal du nouveau-né: acquisition et composition

2.1. Etablissement et développement du microbiote intestinal chez l'enfant

Conceptuellement, les nouveau-nés sont stériles jusqu'à la naissance et leur microbiote s'établit et se développe pendant les premiers mois qui suivent la naissance. Cependant, des études controversées montrent la présence de bactéries dans le liquide amniotique de nouveau-nés suggérant que les nouveau-nés ne sont pas stériles à la naissance [107] [108]. Les premières espèces bactériennes à coloniser le tube digestif apparaissent et prolifèrent de manière dépendante des caractéristiques de l'hôte et de l'alimentation du nouveau-né mais d'autres facteurs peuvent aussi influencer de manière significative l'acquisition et la diversité du microbiote [53, 109, 110].

Pendant les premiers jours après la naissance, la composition du microbiote intestinal évolue rapidement. Quelques heures après la naissance, les bactéries commencent à apparaître dans les fèces. Du fait du potentiel oxydo-réducteur positif dans le tractus digestif du

nouveau-né après la naissance, les premières bactéries à coloniser initialement le tractus GI sont les bactéries aérobies-anaérobies facultatives (comme *E. coli* ou *Streptococcus spp.*) qui représentent de 1.10^8 à 1.10^{10} cfu/gramme de fèces 24 à 48 heures après le naissance [111, 112]. Elles sont prédominantes pendant les deux premières semaines de la vie. Parmi elles, les *Staphylocoques*, les *Entérobactéries* et les *Streptocoques* sont les genres les plus communément isolés de la flore fécale des nouveau-nés à la naissance. Petit à petit, ces bactéries contribuent à générer un environnement anaérobie par la consommation de l'oxygène présent dans le tractus digestif, créant ainsi des conditions favorables pour la croissance des bactéries strictement anaérobies [53, 113] (Figure 13). Après une semaine, les *Bifidobactéries*, les *Bacteroidetes* et les bactéries *Clostridium* commencent à apparaître et sont détectés dans les fèces des jeunes enfants allaités par leur mère (voir chapitre II.3.3). Les *Bifidobactéries* deviennent alors l'espèce bactérienne dominante et sont retrouvées dans plus de 80% des enfants [114]. En revanche la colonisation par les *Protéobactéries* chez le nouveau-né âgé d'une semaine est plus controversée. Les *Bacteroidetes*, bactéries anaérobies strictes et les *Clostridia*, les deux grands groupes bactériens sont retrouvées chez environ la moitié des enfants [115].

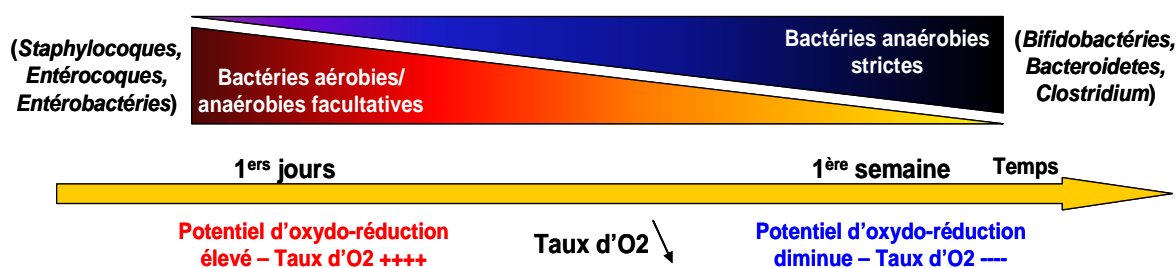


Figure 13 – Potentiel oxydo-réducteur dans le tractus GI.

Evolution de la colonisation bactérienne chez le nouveau-né en fonction de la consommation d'oxygène par les espèces bactériennes aérobies/anaérobies facultatives puis de l'apparition des bactéries anaérobies strictes.

À l'âge de six mois, 10^{10} gènes par gramme de fèces ont été retrouvés avec une grande abondance de bactéries anaérobies en comparaison du nombre de bactéries aérobies. De plus, la diversité de la composition du microbiote semble plus élevée [116]. A cet âge-là, les *Clostridia* et les *Bacteroidetes* sont retrouvés chez tous les enfants et la fréquence des *Bacteroidetes* est augmentée [115]. En accord avec l'étude de Palmer et al., tous les enfants hébergent un grand nombre de γ -*Protéobactéries* [115, 116].

Le microbiote intestinal du nouveau-né rat ressemble-t-il au microbiote retrouvé chez l'Homme ?

Les coques Gram+ comme *Staphylococcus spp.* ou *Enterococcus* sont considérés comme étant les premiers colonisateurs chez le rat et sont présents dans le microbiote intestinal au moins jusqu'à la sixième semaine. Après quelques jours, les bactéries Gram- sont retrouvées avec la même prévalence que chez l'Homme alors que les *Lactobacilles* sont présents en plus grand nombre que les bactéries Gram+ chez le rat [117, 118]. À 10 jours, le microbiote aérobie est dominant avec un grand nombre d'*Entérobactéries*, de *Streptocoques* et d'*Entérocoques* dans les fèces des nouveau-nés. Les bactéries anaérobies strictes comme les *Lactobacilles* et les *Bacteroidetes* apparaissent quelques jours après et à 15 jours, le microbiote intestinal du jeune rat est dominé par les *Entérobactéries*, les *Lactobacilles* et les *Entérocoques* [119].

De manière similaire à l'Homme, le microbiote des rats nouveau-nés est moins complexe en comparaison à la composition bactérienne observée chez leur mère [119]. De plus, la diversité est faible avant le sevrage mais augmente avec l'âge. En accord avec les résultats obtenus chez l'Homme, le microbiote du rat est considéré comme unique [120]. Enfin, comme chez l'Homme, la plupart des espèces bactériennes présentes chez les rats nouveau-nés dérivent du microbiote intestinal de leurs mères et sont toujours détectés lorsque le microbiote intestinal du rat est mature, à l'âge adulte [120, 121].

2.2. Facteurs influençant la colonisation néonatale

Durant les premiers mois qui suivent la naissance, la composition du microbiote intestinal infantile est très variable et dépend de nombreux facteurs comme le temps de gestation, le mode de naissance (naturelle ou par césarienne), le mode d'alimentation, le sevrage et l'exposition aux facteurs de l'environnement {Dominguez-Bello, 2010 #304; Orrhage, 1999 #305; Penders, 2006 #306}[110] (**Figure 14**).

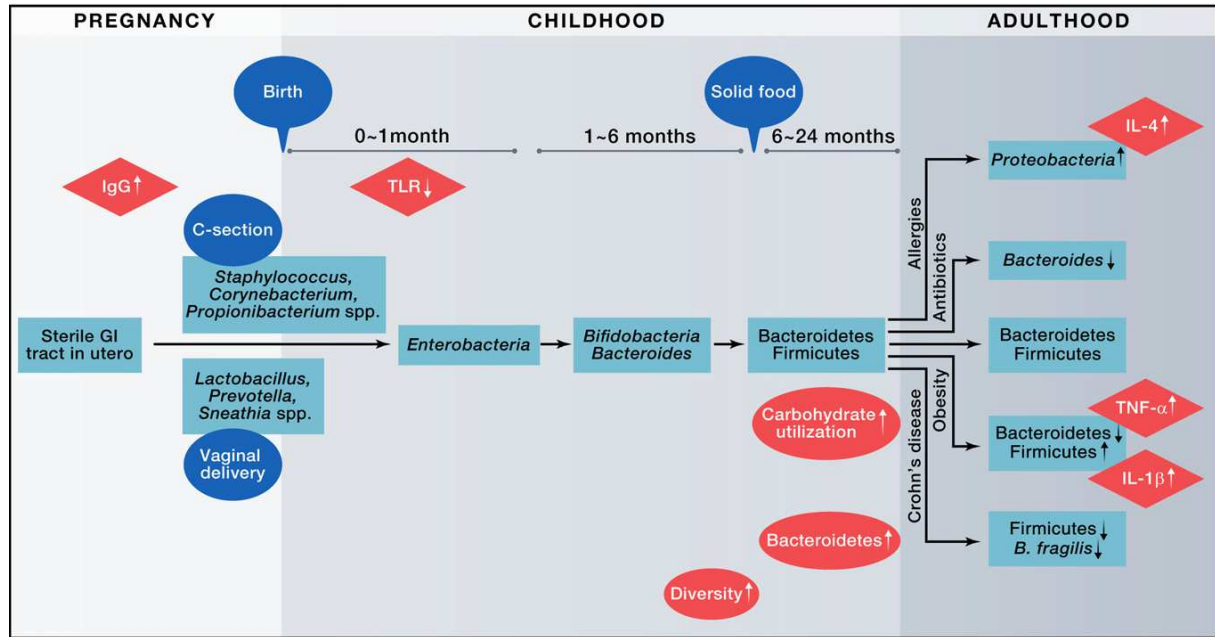


Figure 14 – Facteurs influençant le développement du microbiote intestinal chez l’Homme.

D’après Clemente *et al.*[110]. En bleu, les facteurs influençant l’acquisition et la maturation du microbiote intestinal. En rouge, impact du microbiote intestinal sur la physiologie de l’hôte, le métabolisme énergétique, le développement du système immunitaire.

2.2.1. Effet du microbiote intestinal de la mère

Suite au passage à travers le canal vaginal de la mère, les nouveau-nés sont exposés à une population microbienne importante par son nombre et sa diversité. Ley *et al.*, ont montré que, chez la souris, le microbiote de nouveau-nés est très similaire à celui de leur mère [122, 123]. Chez la femme en bonne santé, la bactérie vaginale majoritaire est *Lactobacillus* et elle est transmise en priorité aux nouveau-nés [124]. Cependant, des études épidémiologiques sur la transmission des *Lactobacilles* de la mère au nouveau-né ont montré que seulement un enfant sur quatre est colonisé par l’espèce présente chez la mère à la naissance et un mois plus tard, cette espèce de *Lactobacille* est remplacée par une espèce associée au lait maternel [125]. La comparaison 1 mois et 11 mois après la naissance du microbiote intestinal d’une mère et de son enfant a montré que l’enfant acquiert rapidement les fonctions géniques liées au microbiote de la mère sans pour autant présenter une réplique exacte du microbiote maternel. En revanche, à 11 mois, l’analyse de deux principaux phyla présents chez le jeune enfant, les *Bacteroidetes* et les *Bifidobactéries* révèle que ces deux phyla sont inversement retrouvés chez l’enfant et la mère [126]. Les auteurs concluent que le microbiote maternel peut être transmis à l’enfant mais ne persiste pas durablement. De plus, il a été montré que le

microbiote de jumeaux homozygote et dizygote était similaire à celui de leur frères et sœurs suggérant ainsi que la colonisation des nouveau-nés par le microbiote de leur mère est décisive pour déterminer le microbiote adulte [116].

2.2.2. *Effet du mode de délivrance*

Le mode de délivrance joue un rôle majeur dans l'établissement du microbiote intestinal chez le nouveau-né. En effet, plus de la moitié des enfants naissent dans une structure hospitalière et environ 10% des nouveau-nés naissent par césarienne. Il est donc important de caractériser l'impact du mode de délivrance sur l'acquisition et l'établissement du microbiote chez les nouveau-nés. Comme déjà évoqué plus haut, il est connu que le microbiote vaginal et péri-anal de la mère sont les origines principales de la colonisation des nouveau-nés nés par voie naturelle alors que les premiers microbes acquis par les nouveau-nés nés par césarienne proviennent généralement de la peau et de l'environnement proche (équipement et personnel médical) [122, 127]. Dominguez-Bello *et al.*, montrent que les enfants nés naturellement acquièrent des espèces bactériennes proches de celles retrouvées chez les mères, dominés par les *Lactobacilles*, *Prevotella spp.*, et *Sneathia spp.*, alors que chez les enfants nés par césarienne, les espèces bactériennes retrouvées sont similaires à celles retrouvées sur la peau des mères comme *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium spp.* [122]. D'autres études montrent chez les enfants nés par césarienne une colonisation plus tardive et moins fréquente par les *Bifidobactéries* [114, 115, 128, 129]. Cette différence dans la colonisation des nouveau-nés par les *Bifidobactéries* peut s'expliquer par l'utilisation plus élevée d'antibiotiques lors d'un accouchement par césarienne [130].

Cependant, les résultats obtenus au regard des autres groupes bactériens et notamment des *Firmicutes* et des *Bacteroidetes* sont plus controversés. Certaines études montrent que chez les enfants nés par césarienne la colonisation par des espèces *Clostridia* est plus fréquente comparée à une colonisation par les *Bacteroidetes* [114, 115]. Huurre *et al.* ne montrent aucune différence au regard des proportions de *Clostridia* et *Bacteroidetes* retrouvées chez les enfants nés naturellement ou par césarienne [128]. La même observation a été faite concernant les *Entérobactéries*. Adlerberth *et al.* montrent que leur nombre augmente chez les enfants nés par césarienne alors que paradoxalement ils constatent un nombre moins important de *E. coli* chez ces mêmes enfants ces dernières années [115]. Ces résultats sont en

désaccord avec ceux obtenus par Penders *et al.* qui observent une augmentation du nombre de *E. coli* chez les enfants nés par césarienne [114].

Enfin, il a été montré, d'une part que les différences observées entre les enfants nés naturellement ou par césarienne sont toujours visibles plusieurs mois après la naissance (et probablement plus longtemps) [114]. En effet, chez des enfants âgés de sept ans, le nombre de *Clostridia* est moins important chez les enfants nés par césarienne que chez les enfants nés naturellement [131]. D'autre part, le microbiote intestinal des enfants nés par césarienne est moins diversifié et contient moins de bactéries que le microbiote d'enfants nés naturellement [128, 129]. De plus, Biasucci *et al.* reportent des profils de variation inter- et intra-groupe plus grands chez les enfants nés naturellement que chez les enfants nés par césarienne.

2.2.3. Effet du mode d'alimentation du nouveau-né

Le lait maternel est considéré comme la meilleure source nutritive pour le développement du nouveau-né. Le lait maternel contient un large éventail de nutriments nécessaires à la croissance de l'enfant: des carbohydrates, des oligosaccharides non-digérables, des nucléotides, des acides gras, des Immunoglobulines, des cytokines, de la lactoferrine et des facteurs immunomodulateurs [132, 133]. Par exemple, les oligosaccharides issus du lait maternel sont transformés dans le côlon stimulant la croissance d'espèces bactériennes comme les *Bifidobactéries* [134]. De plus, le lait maternel abrite un grand nombre d'espèces bactériennes comme les *Staphylocoques*, les *Lactobacilles*, les *Streptocoques*, les *Bifidobactéries* et des *E. coli*. Ces bactéries proviennent probablement de la peau du sein et des conduits lactaires [124, 135]. Le lait maternel est donc un véhicule important de souches bactériennes intervenant dans la transmission d'espèces bactériennes mère/enfant. Ainsi, il a été estimé qu'un enfant consomme approximativement 800 mL de lait par jour et ingère ainsi 1.10^5 - 1.10^7 bactéries chaque jour [136, 137]. Au contraire du lait maternel, le lait maternisé n'est pas une source naturelle de bactéries mais il est amélioré pour se rapprocher le plus possible de la composition du lait maternel. L'addition de prébiotiques (fructo- et galacto-oligosaccharides) et probiotiques (*Lactobacillus*) a été décrite pour stimuler la croissance des *Bifidobactéries* et des *Lactobacilles* de manière similaire au lait maternel [138, 139]. Les enfants nourris avec du lait maternisé sont plus souvent colonisés avec *E. coli*, *C. difficile*, *B. fragilis* et les *Lactobacilles* que les enfants uniquement nourris au sein [114].

En revanche, il a été montré que des enfants nourris au lait maternel sont colonisés plus fréquemment et plus rapidement par des *Bifidobactéries* [114, 140].

2.2.4. Effet de la modulation du microbiote par l'utilisation d'antibiotiques

Les antibiotiques ont des effets à long terme sur la colonisation intestinale par les bactéries et l'utilisation d'un traitement antibiotique chez la femme enceinte ou l'enfant est associé à un défaut dans l'établissement des espèces bactériennes anaérobies strictes dans le tractus digestif [141, 142]. Les paramètres associés à l'utilisation des antibiotiques comme la spécificité, la dose, le temps de traitement ou le mode d'administration sont très variables, rendant difficile de qualifier et quantifier de manière exacte l'impact des antibiotiques sur la composition du microbiote intestinal. Cependant, il semble que l'utilisation d'antibiotiques perturbe alors la colonisation précoce du nouveau-né en diminuant la colonisation par les *Bifidobactéries* alors qu'une augmentation des *Entérocoques* et des *Entérobactéries* est observée [114, 143-146].

Bien que l'utilisation d'un traitement antibiotique ne semble pas avoir d'effets majeurs sur la colonisation intestinale fécale à long terme, il a été suggéré que l'exposition à des antibiotiques chez le jeune enfant peut conduire au développement de certaines pathologies souvent associées à des désordres immunitaires comme l'asthme, des maladies allergiques ou encore de l'eczéma [147-149].

3. Le microbiote intestinal chez l'adulte : composition et diversité

3.1. Composition et diversité.

À la fin de la première année de vie, le microbiote intestinal du jeune enfant se stabilise et se complexifie pour ressembler au microbiote intestinal adulte. Le microbiote intestinal adulte est composé majoritairement de bactéries anaérobies strictes qui dominent les bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives de plusieurs log. Bien qu'il y ait plus de 50 phyla décrits à cette date, le microbiote intestinal humain est dominé seulement par deux phyla majeurs: les *Bacteroidetes* et les *Firmicutes*, alors que les *Protéobactéries*, les

Actinobactéries, les *Fusobactéries* et les *Cyanobactéries* sont présents en minorité [54, 101, 102, 150] (Figure 15). Si la diversité du microbiote intestinal en termes de phyla est stable, le nombre d'espèces bactériennes présentes dans le tractus intestinal varie de manière importante et évolue perpétuellement. Il est admis que le tractus intestinal contient plus de 100 trillion de bactéries représentant plus de 1000 espèces bactériennes différentes [101, 151-153]. Cependant, une étude récente impliquant plusieurs sujets suggère que le microbiote intestinal est composé de plus de 35 000 espèces bactériennes [104]. Récemment, Arumugan *et al.* ont répertorié le microbiote de plusieurs individus en trois « entérotypes » basés sur les genres dominants présents dans le tractus intestinal, les Bacteroidetes, *Prevotella* et *Ruminococcus* [154].

Au sein du microbiote intestinal adulte, une grande variabilité intra- et inter-individuelle sont observées au cours du temps [99, 112, 155]. Néanmoins, malgré cette grande diversité et variabilité, un microbiome commun est partagé entre les individus qui assure ainsi la conservation des fonctions métaboliques fournies par le microbiote [156, 157].

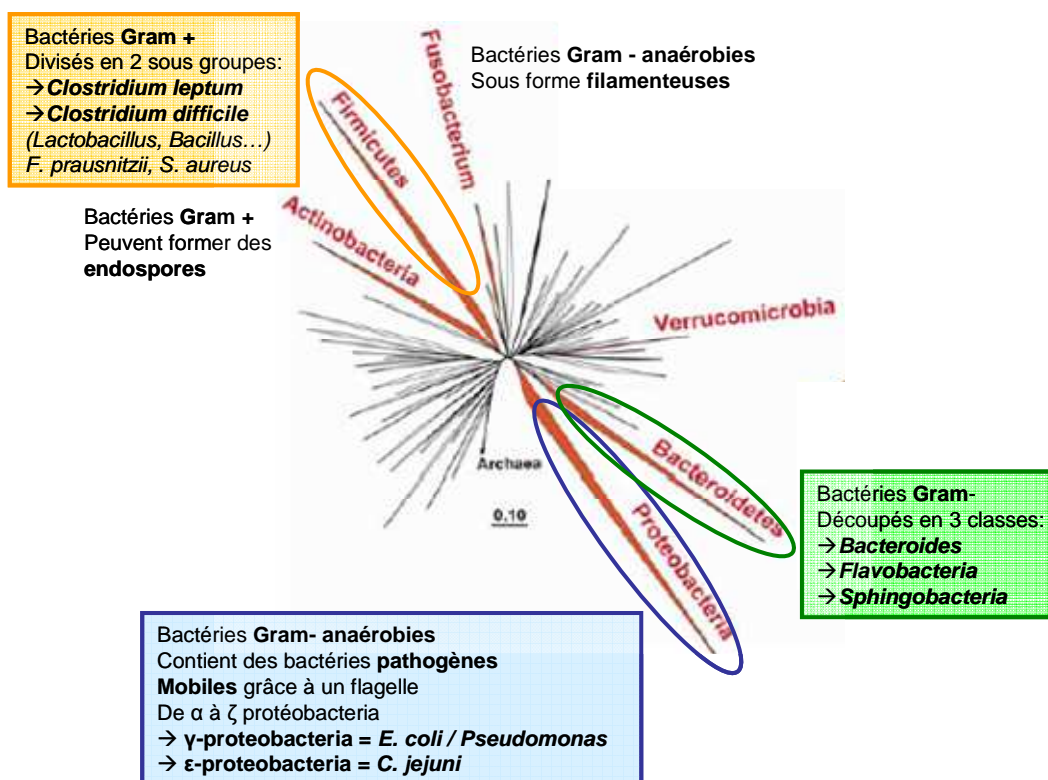


Figure 15 – Composition du microbiote intestinal.

D'après Eckburg et al. [101]

Le microbiote intestinal du rat adulte ressemble t-il au microbiote retrouvé chez l'Homme ?

L'analyse du microbiote intestinal de rats adultes montre que la diversité bactérienne est du même ordre de grandeur chez le rat et chez l'Homme [121, 158, 159]. De plus, les phyla décrits chez le rat sont similaires à ceux retrouvés chez l'Homme avec la présence de *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Protéobactéries* et d'*Actinobactéries*. Cependant, des différences sont observées avec une augmentation de la détection des *Lactobacilles* et des *Verrucomicrobiaceae* dans le microbiote de rat en comparaison au microbiote de l'Homme.

Enfin, plusieurs différences ont été retrouvées quant à la présence de telle ou telle espèce bactérienne dans le microbiote du rat ou de l'Homme. Les SFB sont détectées en abondance par qPCR dans le microbiote associé à la muqueuse intestinale chez le rat alors qu'elles sont absentes du tractus digestif chez l'Homme [106, 118]. En revanche, *Faecalibacterium prauznitzii* (*F. prauznitzii*) est rare dans le microbiote du rat et abondant dans la lumière intestinale de l'Homme [159].

3.2. Facteurs influençant la composition du microbiote adulte.

Des différences dans la composition du microbiote peuvent être observées en raison des lieux géographiques de résidence des individus, de l'environnement local, de l'hérédité, de l'alimentation ou encore de l'âge [110]. Quelques uns des facteurs influençant la composition du microbiote intestinal adulte sont décrits ci-après.

3.2.1. L'alimentation

Les changements des habitudes alimentaires ont des effets significatifs sur la composition du microbiote. Des études chez la souris montrent un changement d'alimentation vers une nourriture plus riche conduit à des changements dans le microbiote intestinal avec une diminution de la diversité [160]. La même observation a été faite chez l'Homme où une alimentation plus riche en graisses conduit à une dominance des *Bacteroidetes* alors qu'une alimentation riche en carbohydrates est associée à une dominance des *Prevotella* [161].

Ainsi, l'alimentation humaine joue un rôle dans le remodelage du microbiome qui, en retour affecte les capacités des individus à absorber et métaboliser les nutriments. Le microbiote de souris minces, transplanté chez une souris obèse rétablit son poids corporel, indiquant que les différences observées dans la composition bactérienne affecte le métabolisme énergétique et influence la prédisposition des mammifères à devenir obèses [160].

3.2.2. *L'âge*

Une fois le microbiote mature chez l'adulte, sa composition reste relativement stable. Chez la personne âgée en revanche, sa composition diffère particulièrement dans les proportions de *Bacteroidetes* et *Firmicutes* retrouvées [162]. La plus grande variabilité observée chez les personnes âgées que chez les jeunes adultes peut s'expliquer par une utilisation plus importante de médicaments à cet âge-là et une incidence à développer des pathologies plus grandes.

3.2.3. *L'effet des antibiotiques sur le microbiote adulte*

De nombreuses études rapportent que l'utilisation des antibiotiques altère de manière importante la composition du microbiote intestinal [141, 163, 164]. Lors de l'utilisation d'un traitement antibiotique, la résistance à la colonisation du tractus digestif par des microbes étrangers est réduite et peut permettre la croissance d'autres bactéries commensales induisant ainsi des changements permanents de la composition du microbiote.

L'utilisation répétée d'antibiotiques dans la santé humaine pourrait être responsable de l'augmentation du réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques dans notre propre microbiome [165]. Plusieurs services de santé Européens ont observé une réduction du nombre de gènes de résistance après une diminution de la prescription d'antibiotiques [166].

Enfin, l'administration de traitements antibiotiques augmente la sensibilité aux infections par *Salmonella* et est associée avec une période prolongée d'infections comparé avec des patients qui ne reçoivent pas d'antibiotiques [167].

4. Rôle du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte

Chez le nouveau-né, le microbiote intestinal a d'importants rôles dans le métabolisme, la nutrition, le développement de l'épithélium intestinal, les fonctions immunologiques et la mise en place des défenses de l'hôte contre les agressions pathogènes. Chez les adultes, le microbiote intestinal commensal est relativement stable et est à l'origine d'une association symbiotique avec l'hôte. Ainsi, l'hôte est capable de façonner la composition et le développement du microbiote intestinal et en contrepartie, le microbiote intestinal module le développement et certaines fonctions de l'hôte.

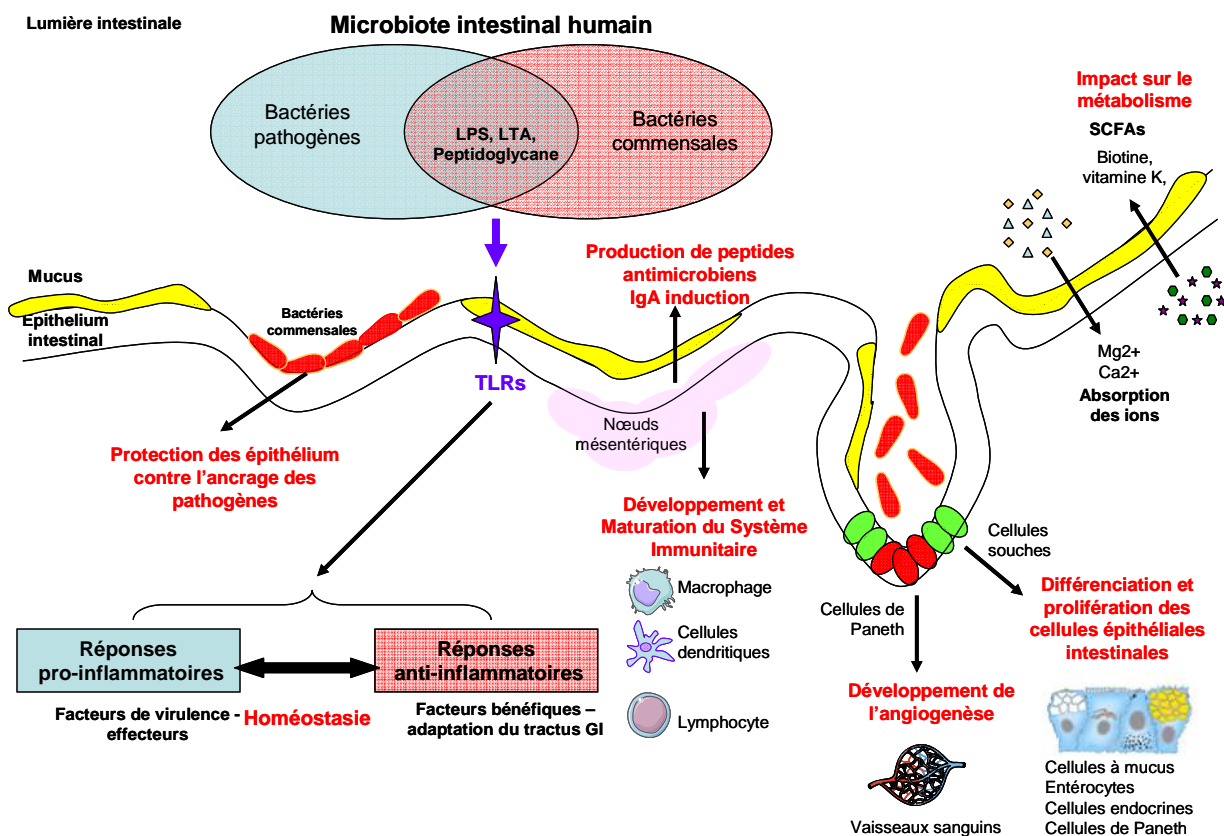


Figure 16 – Relation hôte/microbiote : implication dans la physiologie humaine.

4.1. Fonctions métaboliques et nutritives

Le microbiote intestinal est capable d'utiliser des composés d'origine exogène (alimentation) ou endogène (mucus intestinal) de manière compétitive vis-à-vis des autres microorganismes afin de subvenir à sa propre croissance. Les bactéries contenues dans le

microbiote intestinal sont capables de métaboliser et fermenter les composés situés dans la lumière intestinale et d'induire la formation d'une grande variété de métabolites, incluant des acides gras à chaînes courtes (SCFA "*Short Chain Fatty Acids*"), des vitamines, et plusieurs gaz (

Figure 16). Les SCFAs peuvent être réabsorbés au niveau du côlon et stockés comme source d'énergie au lieu d'être excrétés dans les fèces. Il est estimé que plus de 2 Kcal d'énergie sont récupérées par gramme de fibres, indiquant que le microbiote constitue un organe métabolique essentiel [168]. Cependant le type de métabolites formés est dépendant du type de bactéries retrouvées dans la lumière intestinale et des substrats présents. Par exemple, la bactérie *Streptococcus thermophilus* est capable, lorsqu'elle colonise des animaux axéniques, d'induire la formation, par une réaction de glycolyse, de lactate dans le caecum [169].

En plus d'être capables d'utiliser les produits formés pour leur propre croissance et leur développement, les bactéries commensales en métabolisant les nutriments en composés bioactifs sont capables de modifier les fonctions physiologiques de l'hôte. Par exemple, la production de SCFAs par le microbiote intestinal forme des médiateurs qui sont à l'origine d'interactions entre les microorganismes et l'hôte. Ainsi, la fermentation des carbohydrates non-digérables en SCFAs (butyrate, acetate, propionate et lactate) permet de moduler un grand nombre de fonctions de l'hôte [170]. La baisse du pH observée lors du métabolisme des SCFAs pourrait être impliquée dans la maintenance des écosystèmes bactériens {Duncan, 2009 #233}. Le butyrate formé est utilisé comme source d'énergie par les CEIs dans le côlon alors que l'acétate est potentiellement utilisé comme précurseur pour former les molécules de cholestérol ou de nouveaux acides gras. Le propionate quand à lui est un substrat induisant la synthèse de glucose est utilisé au niveau du foie [171, 172]. Enfin, les SCFAs ont été identifiés comme les ligands physiologiques de la famille de récepteurs GPR43 et 41 qui sont exprimés à la surface de nombreux types cellulaires (cellules immunitaires, cellules endocrines, adipocytes...) [170]. L'activation du récepteur GPR43 par l'acétate et le propionate contribue à l'inhibition de la lipolyse et à la différenciation des adipocytes promouvant ainsi l'expansion du tissu adipeux chez des animaux sous alimentation riche [173]. Ainsi, les SCFAs sont considérés comme une source d'énergie indirecte, produits par le microbiote intestinal et ont un rôle dans la régulation du métabolisme énergétique, l'immunité, l'expansion du tissu adipeux et la modulation du développement tumoral [170].

4.2. Rôle dans la différenciation de l'épithélium intestinal et sa maturation

L'épithélium intestinal est par définition à l'interface entre l'hôte et l'environnement extérieur. Il est formé de CEIs polarisées avec à leur surface apicale la production de mucus, des microvillosités et la présence de jonctions serrées, qui forme l'interface avec l'environnement luminal riche en bactéries et une surface basolatérale optimale pour les interactions avec l'hôte lui-même.

Les acides gras, générés par la flore commensale sont capables d'agir directement sur les CEIs. Les SCFAs stimulent la différenciation des CEIs à la fois dans l'intestin grêle et le côlon [174]. Des études menées avec des animaux gnotobiotiques ont montré que le microbiote intestinal influençait la prolifération, la survie, et la fonction de barrière de l'épithélium intestinal [175-178]. Chez les animaux axéniques, la taille des villosités intestinales est augmentée alors que les cryptes sont atrophiées traduisant un renouvellement des CEIs plus lent [179]. D'autre part, la comparaison entre des animaux axéniques et des animaux conventionnels a permis de mettre en évidence que le microbiote intestinal contribue à la maturation de l'épithélium colique avec une augmentation de la taille des cryptes dans le côlon associée à une diminution de l'expression des protéines pro-apoptotiques [180]. A l'inverse, la déplétion du microbiote dans le tractus GI murin induit macroscopiquement un épithélium intestinal similaire à celui observé chez les animaux axéniques [181]. De plus, la colonisation d'animaux axéniques par l'espèce bactérienne *Bacteroidetes thetaiotaomicron* a mis en évidence une implication de souches commensales dans la régulation de l'angiogenèse au niveau intestinal [182].

De nombreux membres du microbiote contribuent à la maintenance de l'intégrité de la barrière intestinale à travers la maintenance des jonctions intercellulaires et la promotion de la réparation épithéliale suite à une blessure. De ce fait, il a été montré que *B. thetaiotaomicron* induisait l'expression du facteur sprr2a, important dans le maintien de la formation des desmosomes [178]. D'autre part, plusieurs souches probiotiques comme *Lactobacillus* ou *E. coli Nissle 1917* contribuent à la maintenance des jonctions serrées dans l'épithélium intestinal, fournissant ainsi un effet protecteur face aux agressions pathogènes ou à l'inflammation intestinale [183, 184].

4.3. Développement du système immunitaire intestinal

L'importance du microbiote intestinal dans le développement du système immunitaire a été étudiée à partir d'animaux axéniques. Les animaux axéniques contiennent un nombre anormal de cellules immunitaires et présentent des défauts au niveau de leurs structures lymphoïdes locales et systémiques. La rate et les nœuds lymphatiques sont très peu formés chez ces animaux. Une hypoplasie des plaques de Peyer et une diminution du nombre d'ILFs matures ont aussi été observées [185]. Les bactéries commensales de l'intestin fournissent des signaux inducteurs pour le développement des sous-types lymphocytaires clefs de la muqueuse intestinale: le microbiote intestinal dirige la commutation de classe des LB intestinaux [186], conduit au développement de LT effecteurs Th17 [187], et inhibe la production de LT régulateurs [188]. De plus, la flore commensale influence le devenir des réponses immunitaires systémiques en déterminant le ratio des cellules T effectrices Th1 et Th2 [189]. Chez des animaux axéniques, un défaut de la prolifération des LT CD4 est observé mais la colonisation par l'espèce bactérienne *Bacteriodes fragilis* ou par l'antigène capsulaire PSA restaure l'expansion des LT CD4+. La reconnaissance et la présentation de l'antigène PSA par les cellules dendritiques aux LT immatures dans les MLNs sont nécessaires pour promouvoir la prolifération des lymphocytes. Ainsi, l'exposition d'un composé structural unique du microbiote intestinal commensal induit la maturation de l'immunité de l'hôte à la fois localement et systématiquement au niveau moléculaire, cellulaire et organique. Enfin, les peptidoglycanes des bactéries Gram-négatif induisent la formation des ILFs à travers la signalisation par le récepteur NOD1. Suite à la reconnaissance du microbiote par les TLRs, les ILFs deviennent des zone B matures [190].

La composition du microbiote intestinal et l'exposition précoce à des pathogènes alimentaires et orofécaux influencent l'homéostasie au niveau de la muqueuse intestinale à la fois en stimulant la sécrétion d'IgA au niveau de la surface de l'épithélium et en promouvant la tolérance orale à travers un shift d'une activité dominante Th2 durant la période néonatale à un équilibre dans la production des cytokines plus tard à l'âge adulte et une réponse dominée par les lymphocytes Th1 [191].

À la vue du rôle joué par le microbiote intestinal sur le développement et la maturation du système immunitaire de l'hôte, des altérations de sa composition peuvent donc changer le développement immunitaire et prédisposer au développement de certaines pathologies immuno-dépendantes plus tard dans la vie comme l'allergie, l'obésité ou le diabète [54].

4.4. Rôle protecteur : l'effet barrière

Le microbiote intestinal forme la première ligne de défense de l'organisme et permet de mettre en place une résistance à la colonisation par bactéries pathogènes. Le terme de résistance à la colonisation est communément utilisé pour décrire les capacités du microbiote intestinal à résister à l'invasion par des microorganismes pathogènes et à prévenir la croissance de pathogènes potentiels présents naturellement en faible nombre dans le tractus digestif [192, 193]. Les mécanismes impliqués dans cette résistance incluent des facteurs de l'hôte et des facteurs bactériens comme l'exclusion compétitive pour l'occupation des sites d'attachement, la consommation des sources de nutriments et la production de peptides antimicrobiens aussi bien par le microbiote intestinal que par les cellules de l'hôte [53]. Ainsi, des études *in vitro* ont montré que la combinaison entre les SCFAs et un faible pH inhibait la croissance de bactéries pathogènes [194]. D'autre part, la présence physique du microbiote dans le tractus GI inhibe la colonisation par des espèces pathogènes. Par exemple, il a été montré *in vitro* que la présence dans des isolats fécaux de bactéries Gram+ anaérobies a un effet inhibiteur plus grand sur la croissance de souches pathogènes entériques que des isolats contenant des souches Gram- anaérobies [195]. Des composés sécrétés par *Lactobacillus* diminuent également la colonisation *in vivo* par des souches de *E. coli* pathogènes [196]. De plus, il a été suggéré que la présence de SFB dans la muqueuse iléale permet d'exclure physiquement *Salmonella enteritidis* de ses sites d'attachement et prévient aussi bien la colonisation par des souches de *E. coli* entéropathogènes chez le lapin [Heczko, 2000 #1].

4.5. Rôle du microbiote intestinal dans la physiologie globale de l'hôte

L'importance du rôle du microbiote intestinal n'est pas confinée au tractus GI lui-même. L'utilisation d'animaux axéniques en comparaison à l'étude d'animaux SPF a montré plusieurs défauts dans le système cardio-vasculaire [197-199].

De plus, le développement du système nerveux est affecté chez les animaux axéniques avec l'observation d'anormalités dans la régulation de l'axe HPA ("*Hypothalamic-pituitary-adrenal*") réduisant ainsi la perception de la douleur inflammatoire [200]. Ainsi, il a été montré que le microbiote intestinal influence le développement de l'axe HPA, de manière spécifique dans le temps, influençant ainsi la réponse de l'hôte à un stress [201]. La mono-

association de souris axénique avec l'espèce bactérienne *Bifidobacterium infantis* est suffisante pour normaliser la réponse au stress mais uniquement si la colonisation intestinale par cette souche est réalisée chez les jeunes animaux [202] mettant ainsi en évidence une fenêtre d'action limitée dans le temps pour le bon développement de certains processus physiologiques de l'hôte.

5. Altération du microbiote et impact sur la santé de l'hôte : cause ou conséquence ?

La mise en évidence de l'implication du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte ne fait plus doute. Cependant, de nombreuses perturbations de la composition du microbiote peuvent être la cause ou la conséquence de nombreuses pathologies chez l'Homme. Des différences dans la composition microbienne ont été proposées pour être impliquées dans de nombreuses pathologies métaboliques (obésité, diabète...), l'allergie, les maladies inflammatoires de l'intestin ou encore le CRC [54].

Néanmoins, il est très difficile à ce jour de déterminer si l'altération du microbiote intestinale est la cause ou la conséquence du développement de la pathologie.

5.1. Les désordres métaboliques

5.1.1. L'obésité

La relation entre microbiote intestinal et obésité a été mise en évidence pour la première fois chez des souris axéniques colonisées avec une flore conventionnelle. Le poids des animaux axéniques nouvellement colonisés augmente considérablement (plus de 50%) deux semaines après la colonisation contrairement à des animaux conventionnels. De plus l'expression d'ARNm codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse d'acides gras est augmentée alors que la sensibilité à l'insuline est diminuée [203]. D'autre part, Turnbaugh *et al.* montrent que la colonisation d'animaux axéniques par un microbiote issu de souris obèses (souris ob/ob) résultent en une augmentation significative de la prise de poids en comparaison à des animaux axéniques colonisés avec un microbiote d'individus minces. Les

auteurs suggèrent que le microbiome d'individus obèses a une capacité augmentée pour accumuler de l'énergie à partir de la nourriture alors que les souris minces excrètent significativement plus d'énergie dans leur fèces [157].

Dans ces études l'analyse de la composition du microbiote d'individus obèses met en évidence une augmentation de la proportion des *Firmicutes* et une diminution du nombre de *Bacteroidetes* comparé à des animaux minces [123, 157, 160].

5.1.2. *Le diabète de type 1*

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune dont les symptômes sont causés par la destruction des cellules β du pancréas, cellules productrices de l'insuline. Des modifications dans l'alimentation qui modulent le microbiote intestinal en réduisant le nombre total de bactéries caecales protègent contre le développement de la pathologie chez le rat [204, 205]. D'autre part, la relation microbiote/diabète de type 1 a été faite avec l'utilisation de souris NOD ("*Non Obese Diabetic*") qui sont des souris génétiquement modifiées pour développer le diabète de type 1. L'utilisation de souris NOD MyD88ko révèle que la destruction des cellules β est MyD88 dépendante. La comparaison du microbiote de souris NOD MyD88ko ou NOD MyD88ko/+ montre une diminution du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* chez les individus NOD MyD88ko protégés contre le développement de la pathologie [206].

Comme dans le cas de l'obésité, le traitement de souris NOD par le probiotique VSL#3 (un cocktail de *Lactobacilles*, *Streptocoques* et *Bifidobactéries*) réduit la destruction des cellules β du pancréas et l'inflammation locale grâce à l'augmentation de la production d'IL10 (dans les plaques de Peyer) et au niveau systémique dans la rate et le pancréas [207]

5.2. **Les maladies inflammatoires de l'intestin**

Les maladies inflammatoires de l'intestin (IBD) regroupent la maladie de Crohn (MC) et la colite ulcéreuse (UC pour "*ulcerative colitis*"). Ce sont des pathologies multifactorielles associant la génétique humaine et la composition du microbiome. En plus de l'observation de défauts génétiques humains, une dysbiose bactérienne a été décrite chez les patients souffrant

d'IBD [208-210]. Les patients souffrant d'IBD présentent une diminution de la diversité dans leur microbiote et une augmentation du nombre de bactéries en contact avec la muqueuse intestinale. Une réduction du nombre des deux phyla principaux, les *Bacteroidetes* et les *Firmicutes* est observée chez les patients souffrant d'IBD [211]. Les patients souffrant de MC montre une augmentation des *Protéobactéries* et plus particulièrement de l'espèce *E. coli* [212].

Des études expérimentales réalisées chez des animaux axéniques ont pu mettre en évidence l'implication du microbiote intestinal dans le développement de cette pathologie. Les animaux axéniques ne développent pas d'inflammation intestinale [213]. De plus le rôle de la bactérie commensale *F. prauznitzii* a largement été montré comme étant une bactérie importante dans la maladie de Crohn. Son nombre décroît avec l'avancée de la pathologie et chez l'Homme, une diminution du nombre de *F. prauznitzii* est associée avec une augmentation de la fréquence des rechutes dans le cadre de la maladie de Crohn [156, 214, 215].

5.3. le cancer du côlon

Bien que peu d'études abordent la composition du microbiote chez les patients souffrant de CRC, de récents travaux indiquent des différences lors de la comparaison du microbiome de patients et de personnes asymptomatiques. Par exemple, l'analyse des selles de patients souffrant de CRC montrent une augmentation des populations de *Bacteroidetes* et *Prevotella* spp. en comparaison aux personnes asymptomatiques [216]. De plus, une diminution du nombre de *Firmicutes* et une augmentation de la proportion de *Bacteroidetes* est observé avec l'âge, mettant ainsi en relation le moment d'apparition de la pathologie (âge mûr) et l'augmentation des *Bacteroidetes*.

5.4. L'allergie

Bien que l'amélioration dans la santé humaine et l'allongement de la durée de vie depuis le 19ème siècle ont été faites grâce aux avancées des conditions sanitaires et de l'augmentation de l'hygiène constante au cours du temps et ont permis de réduire la mortalité

due aux épidémies et aux maladies infectieuses de manière drastique, il apparaît depuis quelques décennies que la faible exposition de l'Homme à des microbes est délétère pour la santé humaine. Proposée par Strachan en 1986, l' "hypothèse hygiéniste" suggère que l'exposition inadéquate à des microorganismes ou à leurs produits se développant en réponse aux conditions d'hygiène de plus en plus drastiques (hôpitaux, produits aseptisant, hygiène accrue...) et aux conditions de vie moderne (famille plus petite, utilisation d'antibiotiques, césarienne, vie citadine aseptisée...) sont responsables de l'augmentation de la prévalence de maladies allergiques comme l'eczéma ou l'asthme. En effet, ces pathologies sont en recrudescence dans les pays ayant adoptés un style de vie "aseptisé" (pays développés) [217, 218]. L'incidence de ces pathologies est réduite dans les populations présentes dans les pays moins industrialisés ou dans les zones rurales des pays développés. Des défauts quantitatif et qualitatif dans le microbiote intestinal et notamment pendant la phase d'acquisition du microbiote chez le très jeune enfant où il joue un grand rôle dans le développement du système immunitaire pourrait expliquer les différences observées entre les populations. Le terme de "vieux amis", rend compte des microbes originaires des plantes, du sol et des animaux domestiques qui ont co-évolués avec l'Homme avant leur changement de conditions de vie dans un environnement urbain aseptisé [219, 220]. Il est possible qu'un microbiote inadéquat ou insuffisant (absence des "vieux amis") conduise à la dérégulation du système immunitaire induisant des changements dans la réponse allergique [221-223].

CHAPITRE III :

ESCHERICHIA COLI : HÔTE NATUREL DU TRACTUS DIGESTIF

1. Généralités sur *E. coli*

Escherichia coli (*E. coli*) a été découvert en 1885 par le pédiatre allemand Theodor Escherich dans des selles de nourrissons. D'abord appelée *Bacterium coli commune* par Eschrich, elle a été rebaptisée *Escherichia coli* en 1919. *E. coli* est une bactérie Gram négatif qui appartient au phylum des γ -Protéobactéries, à l'ordre des Entérobactéries et à la famille des *Enterobacteriaceae*. *E. coli* est la bactérie aérobie-anaérobie facultative majoritaire du tractus GI chez les mammifères.

Hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'Homme et des animaux à sang chaud, *E. coli* s'établit dans le tractus digestif dès les premières heures après la naissance et sa niche écologique est la surface luminale de l'intestin et plus précisément du côlon. *E. coli* constitue alors tout au long de la vie l'espèce bactérienne dominante de la microflore anaérobie facultative de l'intestin.

De nos jours, *E. coli* est sans doute l'organisme vivant le plus connu et le plus étudié : en effet, l'ancienneté de sa découverte et sa culture aisée (division toutes les 20 minutes à 37°C dans un milieu riche) ainsi que ses grandes capacités transformantes en font un outil d'étude de choix. Le nombre important de publications scientifiques en témoigne (295534 publications à ce jour).

Si *E. coli* est avant tout un hôte commensal du microbiote intestinal, elle est aussi un redoutable pathogène pour l'Homme et les animaux à sang chaud. Les *E. coli* pathogènes, regroupées en différents pathovars, sont l'une des principales causes de morbidité et de mortalité chez l'Homme dans le monde. En effet, chaque année *E. coli* est responsable de la mort de plus de deux millions de personnes souffrant d'infections intra- ou extra-intestinales.

2. Classification, diversité et éléments génétiques mobiles des *E. coli*.

2.1. Classement en sérotype

Au sein de l'espèce *E. coli*, l'une des premières classifications a été basée sur la distribution non aléatoire des antigènes ou sérotypage et a été réalisée pour la première fois en 1976 par Orskov *et al.* [224]. *E. coli* peut ainsi être classifiée en sérovars, en fonction de l'association de plusieurs antigènes spécifiques :

- l'antigène somatique O, définit le séro groupe. Il en existe plus de 150. Les antigènes somatiques sont composés de lipopolysaccharides (LPS) présents sur la paroi bactérienne. Certaines molécules de LPS (ou antigène O) protègent la bactérie de l'action lytique du complément, de la fixation des anticorps ou encore de la phagocytose.

- l'antigène flagellaire H est de nature protéique et entre en jeu dans la structure du flagelle permettant ainsi la mobilité de la bactérie. La diversité des antigènes H est due aux différents types de flagelline et il en existe plus de 56.

- les antigènes de capsule K sont désignés par les lettres L, A ou B. L'antigène L est le plus fréquent mais est thermolabile, l'antigène A est rare et est un antigène capsulaire thermostable. Enfin, l'antigène B est toujours présent chez les *E. coli* entéro pathogènes isolées de gastro-entérites infantiles. 80 antigènes K ont été dénombrés dans les souches de *E. coli*.

Au vu de la diversité des antigènes O, H et K retrouvés dans l'espèce *E. coli*, un grand nombre de sérotypes ont été décrits [225]. Le sérotypage des *E. coli* est très utilisé en épidémiologie pour différencier les souches.

2.2. Classement en groupes phylogénétiques

Dans les années 1980, Ochman et Selander établissent une collection de référence représentative de la diversité des souches de *E. coli*, la collection ECOR (« *Escherichia coli reference collection* ») [226]. Dans le même temps, ils ont montré par l'analyse en électrophorèse des différents locus de plus d'une vingtaine d'enzymes (méthode MLEE pour « *Multilocus enzyme electrophoresis* ») exprimées par les souches *E. coli*, une distribution

phylogénétique des souches de *E. coli*. Ainsi, quatre groupes phylogénétiques majeurs ont été identifiés : A, B1, B2 et D [227, 228]. Clermont *et al.*, au début des années 2000 ont développé une méthode simplifiée afin de déterminer le groupe phylogénétique des souches de *E. coli* par une analyse en PCR de deux gènes : *chuA* et *yjaA* et un fragment d'ADN, TSPE4.C2 [229]. De nos jours, l'analyse phylogénétique des souches de *E. coli* est réalisée grâce à la méthode MLST (« *Multi-locus sequence typing* »). Cette méthode a permis, grâce au séquençage de huit gènes de ménage du core génome de *E. coli* d'affiner leur classification en six groupes phylogénétiques distincts : A, B1, B2, D, E et F, ces deux derniers appartenant auparavant au groupe D [230, 231].

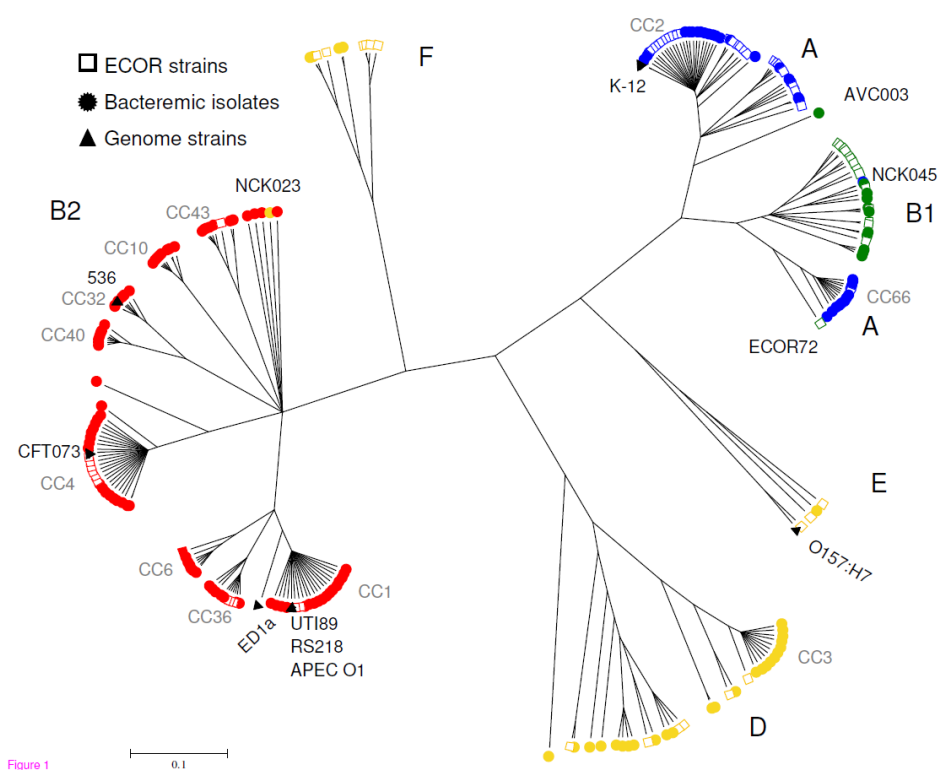


Figure 17 – Analyse phylogénétique utilisant la méthode MLST.

D'après Jaureguy *et al.*, [231]. Dans cette étude, la méthode MLST est basée sur l'analyse de la séquence de 8 gènes de *E. coli*. De 161 souches bactériémiques (cercles), 67 souches de la collection ECOR (carrés) et sept souches de *E. coli* de référence (triangles).

L'analyse phylogénétique des souches de *E. coli* a apporté des données sur l'évolution des souches de *E. coli*. Ainsi, Lecointre *et al.*, ont pu déterminés grâce à l'analyse des arbres phylogénétiques que le groupe B2 est considéré comme le groupe ancestral du lignage de *E. coli* alors que les groupes A et B1 sont les plus récents [232].

De manière générale, les souches commensales tout comme les souches pathogènes se répartissent au sein de l'ensemble de l'arbre phylogénétique. Cependant, les souches responsables d'infections extra-intestinales sont principalement retrouvées au sein du groupe B2 et minoritairement au sein du groupe D, alors que les souches pathogènes responsables de diarrhées aiguës et sévères, majoritairement associées à la production de toxines et/ou au détournement des fonctions de la cellule hôte sont exclusivement retrouvées au sein du groupe D.

2.3. Le groupe phylogénétique B2

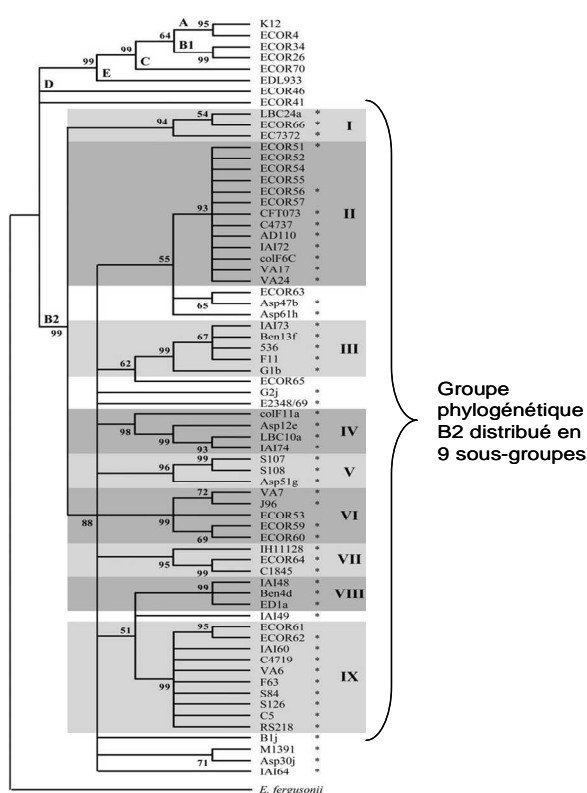


Figure 18 - Arbre phylogénétique de 68 souches de *E. coli*.

D'après Le Gall et al. *Escherichia fergusonii* sert de contrôle négatif. La construction de cet arbre est basée sur l'analyse simultanée de 7 gènes essentiels (*trpA*, *trpB*, *pabB*, *putP*, *icd*, *dinB* et *polB*).

Parmi ces groupes phylogénétiques, le groupe B2 plus ancien présente une grande diversité génétique et 9 sous-groupes ont été identifiés [233, 234] (**Figure 18**). De plus, le groupe B2 est le plus représenté parmi les souches isolées chez les personnes saines (asymptomatiques) et sa prévalence augmente depuis de nombreuses années dans les populations des pays industrialisés [235, 236]. En effet, tandis que les souches B2 représentent plus de 50% des souches isolées dans les fèces des populations des pays industrialisés, moins de 10% sont retrouvées chez les Amérindiens de Guyane française [237]. Cette prédominance s'observe dès la naissance puisque plus de 50% des souches de *E.*

coli isolées à partir de selles d'enfants appartiennent au groupe B2 [238-240]. Enfin, Nowrouzian *et al.* ont montré que les souches du groupe B2 ont une capacité supérieure à persister dans le microbiote commensal humain, comparé aux autres groupes phylogénétiques du fait de l'expression de facteurs (nommés ci-dessus) et donc une meilleure capacité à coloniser le tractus digestif [239].

2.4. Plasticité génomique des *E. coli*



Figure 19 – Plasticité génomique des souches de *E. coli*.

D'après Hendrickson [241]

Diagramme montrant en rose le « core génome », gènes communs à toutes les souches, en jaune le nombre moyen de gènes porté par chaque souche de *E. coli* et en vert, le pan-génome [242].

Le patrimoine génétique de la souche de *E. coli* de laboratoire K-12 non pathogène a été entièrement séquencé en 1997. Son génome comprend 4,6 millions de paires de bases codant environ 4200 protéines [243]. Le séquençage successif, en 2001 de deux autres souches de *E. coli* pathogènes, une *E. coli* entérohémorragique (EHEC) responsable de la « maladie du hamburger » et une souche de *E. coli* provoquant des infections urinaires et méningites néonatales, révèle que **seulement 40% de leurs gènes sont communs** [244]. Chez l'Homme et les grands singes plus de 99% des génomes sont identiques !

Chaque souche de *E. coli* porte en moyenne 4 721 gènes, et seulement 1 976 gènes appartiennent au « core génome », c'est-à-dire que uniquement 11% du nombre total de gènes retrouvés au sein de l'ensemble des souches de *E. coli* séquencées est commun à toutes les souches. La totalité des gènes retrouvés dans les souches de *E. coli* est appelée le « Pan-génome » et est estimée aujourd'hui à 17 838 gènes, mais ce nombre n'est pas exhaustif [242]. Malgré le fait que les fonctions fondamentales à la survie et à la croissance d'une

souche de *E. coli* soient relativement bien connues dans un modèle bactérien (étude d'une espèce particulière), aucune souche de *E. coli* ne peut représenter toutes les espèces de manière exhaustive. **Chaque souche de *E. coli* est unique de part l'expression de ses gènes (Figure 19).**

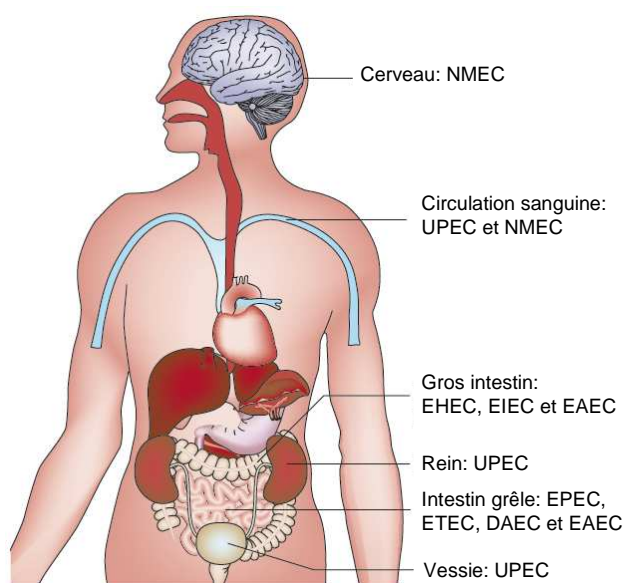


Figure 20 – Sites de colonisation des *Escherichia coli* pathogènes.

D'après Croxen et al. Les *Escherichia coli* pathogènes colonisent divers sites de l'organisme. NMEC = *E. coli* méningitiques néonatales. UPEC = *E. coli* uropathogènes. EHEC = *E. coli* entéro-hémorragiques. EPEC = *E. coli* entéro-pathogènes. DAEC = « Diffusely adherent » *E. coli*. EIEC = *E. coli* entéro-invasives. ETEC = *E. coli* entéro-toxigéniques. EAEC = *E. coli* entéro-aggrégatives.

Cette grande plasticité génomique explique le nombre élevé de pathovars différents retrouvés parmi l'espèce *E. coli*. *E. coli* est un redoutable pathogène responsable d'infections intra- et extra-intestinales comme les infections urinaires et l'apparition de méningites chez le nouveau-né. A ce jour, huit pathovars ainsi que leur mécanisme infectieux ont été décrits. Six pathovars intestinaux, les EPEC (*E. coli* entéro-pathogènes), les EHEC (*E. coli* entéro-hémorragiques), les ETEC (*E. coli* entéro-toxigéniques), les EIEC (*E. coli* entéro-invasives), les DAEC (« Diffusely adherent » *E. coli*) et les EAEC (*E. coli* entéro-aggrégatives) sont diarrhéiques alors que deux pathovars, les UPEC (*E. coli* uropathogènes) et les NMEC (*E. coli* méningitiques néonatales) sont des ExPEC (*E. coli* pathogènes extra-intestinales) [245]. Avec son large spectre de pathologies différentes, *E. coli* est une des principales causes de morbidité et de mortalité chez l'Homme dans le monde. Chaque année les infections à *E. coli* provoquent plus de deux millions de morts chez les enfants diarrhéiques et souffrant d'infections extra-intestinales (Figure 20).

Cependant, malgré cette grande diversité génomique, le génome de *E. coli* est extrêmement organisé avec l'observation de la présence de spots d'insertions des éléments

génétiques mobiles distribués non aléatoirement à la surface du génome de *E. coli*. Ainsi l'influx de gènes est confiné dans un petit nombre de positions conservées sur le chromosome qui sont souvent associées avec à des intégrases ou des ARN de transfert, ARNt [242, 246].

2.5. Les îlots génomiques et/ou de pathogénicité

Le transfert horizontal de gène et la perte d'information génétique contribue aux variations observées dans le contenu et la structure du génome. Ainsi, les gènes de virulence associés aux souches de *E. coli* sont fréquemment localisés sur des éléments génétiques mobiles comme les bactériophages, les plasmides, les transposons ou les îlots génomiques de pathogénicité et transmissibles par échange de matériel génétique entre les différentes souches. Cette grande plasticité génomique a permis à l'espèce *E. coli* de coloniser différentes niches écologiques ; ce qui explique la grande diversité des pathovars et des souches commensales retrouvées dans cette espèce bactérienne (**Figure 21**).

Les îlots de pathogénicité (ou îlots génomiques) contiennent un ou plusieurs gènes de virulence codant pour les traits de virulence nécessaires à l'adhésion, la colonisation, l'invasion et la sécrétion des toxines bactériennes intervenant dans les mécanismes de pathogénicité mis en place lors d'infections par les différents pathovars de *E. coli* [242]. Cependant certains de ces îlots sont aussi présents dans les souches commensales de *E. coli* et permettent d'augmenter les capacités d'adaptation (« fitness ») des bactéries à leur environnement [247]. Ces îlots génomiques pouvant aller jusqu'à 200kb sont généralement insérés sur le chromosome bactérien au niveau des gènes d'ARN de transfert (ARNt) et acquis par un processus de transfert horizontal. Leur contenu en motifs GC est plus élevé à leur extrémité comparé avec le reste de l'ADN bactérien (**Figure 1Figure 21**).

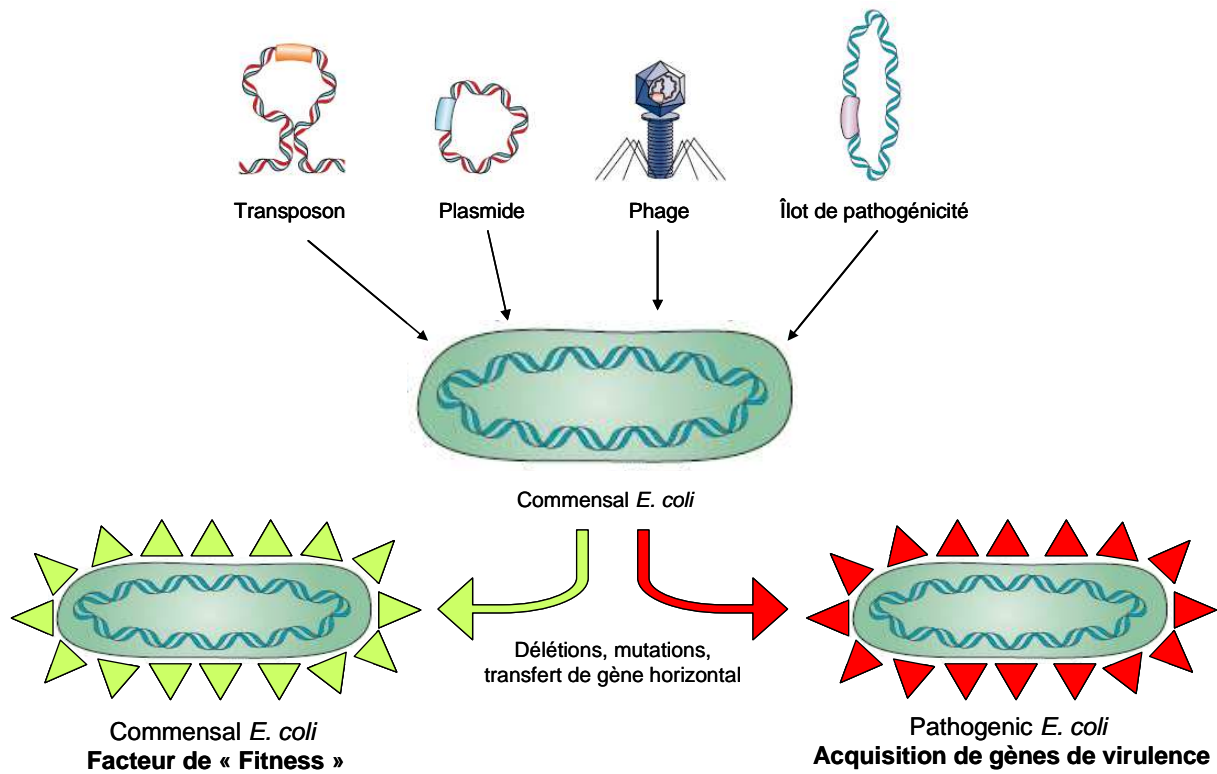


Figure 21 – Contribution des éléments génétiques mobiles à l’adaptation des *E. coli* commensales et à l’évolution d’une *E. coli* commensale vers un caractère pathogène.

D’après Kaper et al., De nombreux facteurs de virulence sont codés par les éléments génétiques mobiles tels que des transposons (ex : l’entérotoxine ST) ; des plasmides (ex : l’entérotoxine LT), des bactériophages (la toxine Shiga) ou des îlots de pathogénicité (=PAI, pathogenicity island) comme le LEE.

3. *E. coli* : sa place au sein du microbiote intestinal

Toutes les souches de *E. coli* n'ont pas les mêmes capacités pour résider au sein du tractus GI chez l'Homme. Ainsi, l'étude de la capacité des souches à persister dans le microbiote intestinal humain a permis de différencier des souches dites résidentes, présentes dans le microbiote intestinal plusieurs semaines ou mois de souches transitoires, présentes seulement quelques jours ou semaines [239, 248]. La capacité des souches de *E. coli* à coloniser le microbiote intestinal est liée à l'accumulation de facteurs pouvant contribuer à la persistance des souches dans la lumière intestinale. Ainsi, les souches résidentes expriment plus souvent des protéines frimbriaires de type fimbriae P et les gènes qui leur sont associés que les souches transitoires. Les gènes codant pour l'hémolysine, l'aérobactine, d'autres facteurs de virulence et les antigènes capsulaires K1 et K5 sont eux aussi plus souvent retrouvés dans les souches résidentes. Ces facteurs, souvent exprimés dans les souches pathogènes de *E. coli* sont aussi retrouvés dans les souches de *E. coli* commensales et contribuent ainsi à la colonisation du tractus digestif par la souche.

3.1. *E. coli* est une des premières bactéries à coloniser le tractus digestif du nouveau-né.

Les premières bactéries à coloniser le nouveau-né sont les bactéries aérobies-anaérobies facultatives telles que les *Entérobactéries* ou les *Lactobacilles* (Chapitre II.2 – p30). Elles colonisent de manière importante et rapide l'intestin du nouveau-né [236]. La présence d'oxygène dans le tube digestif au cours des premiers jours qui suivent la naissance permet aux *Entérobactéries* et notamment à *E. coli* d'être parmi les premières bactéries à coloniser le tractus digestif du nouveau-né dans les premières semaines de la vie. Ensuite, ses capacités anaérobies lui permettent de rester dans la flore dominante anaérobie lorsque la totalité de l'oxygène a été consommée. Au cours des premiers jours de la vie, *E. coli* représente ainsi la bactérie majoritaire du microbiote intestinal avec plus de 10^9 cfu par gramme de fèces avant l'expansion des bactéries anaérobies strictes [114, 249, 250]. Ainsi, chez les nouveau-nés âgés de un mois, environ 90% hébergent dans leur microbiote au moins une souche de *E. coli* [114, 116] (**Figure 22**).

Les premières souches à coloniser le tractus digestif du nouveau-né proviennent du microbiote fécal de la mère et aussi de l'environnement du nouveau-né (sage-femme, salle d'accouchement...) [251]. De ce fait l'augmentation des conditions d'hygiène dans les hôpitaux et les pays industrialisés ont réduit la colonisation précoce des nouveau-nés par *E. coli* [233, 238].

D'autre part, il a été montré que des souches de *E. coli* colonisant le tractus du nouveau-né s'implantent mieux et persistent plus longtemps après la naissance que les souches de *E. coli* apparues plus tard dans la vie de l'enfant [252]. De plus, la colonisation du tractus GI par une souche de *E. coli* commensale peut s'adapter génétiquement à l'intestin murin et devient ainsi une meilleure souche colonisatrice que chez la mère en utilisant par exemple les nutriments de manière plus efficace [253-255].

Pendant l'enfance, les *E. coli* sont détectés chez près de la moitié des enfants et leur concentration est d'environ 1.10^6 cfu/gramme de fèces [256]. Cependant parmi les enfants présentant des pathologies, la prévalence et la concentration pour *E. coli* et des autres espèces d'Entérobactéries augmentent [256, 257] (Figure 22).

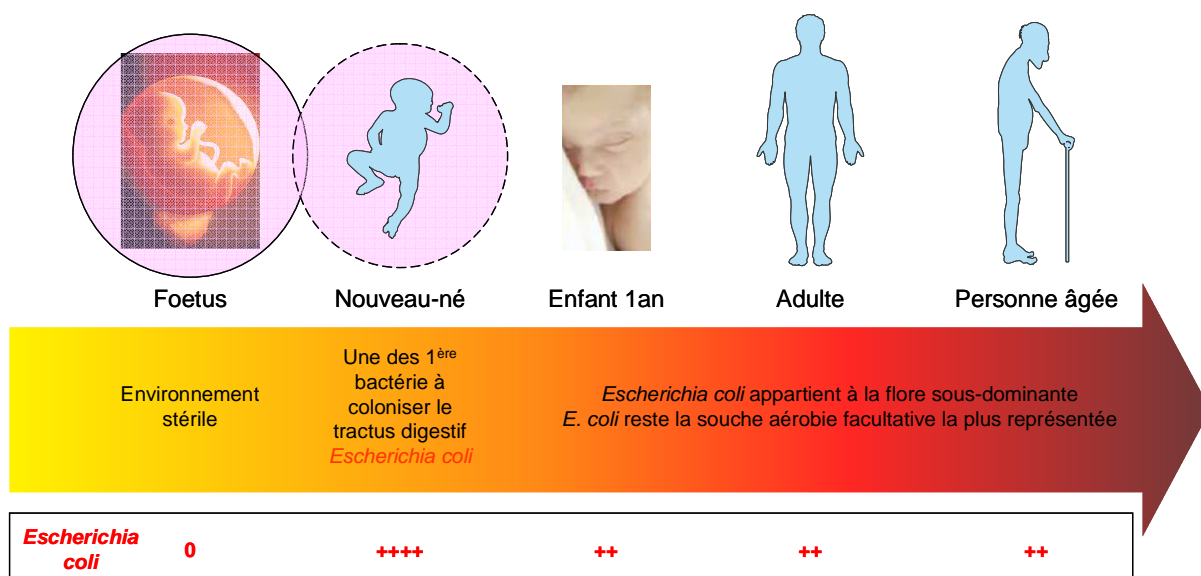


Figure 22 – Evolution de la colonisation du tractus digestif humain par *Escherichia coli*.

Le tractus digestif est stérile à la naissance. Le nouveau-né est rapidement colonisé par *E. coli* qui est alors la souche majoritaire avant de s'établir dans la flore sous-dominante à l'âge adulte. Cependant elle reste la souche aérobic facultative la plus importante à l'âge adulte.

3.2. A l'âge adulte, *E. coli* est toujours présente dans le microbiote intestinal

Après deux ans, le nombre de *E. coli* se stabilise autour de 10^8 cfu par gramme de fèces et graduellement décroît avec l'âge. *E. coli* n'est alors plus la souche bactérienne majoritaire mais s'intègre dans la flore sous-dominante à l'âge adulte. Cependant *E. coli* reste la souche aérobie-anaérobie facultative la plus représentée et l'*Entérobactérie* la plus importante dans le microbiote adulte.

L'homéostasie nécessaire pour la colonisation du tractus GI par des espèces bactériennes commensales et l'exclusion des espèces pathogènes loin des muqueuses est aussi retrouvée au sein de l'espèce *E. coli*. Malo *et al.*, ont montré récemment qu'une enzyme intestinale, IAP ("*Intestinale Alkaline Phosphatase*") était nécessaire pour l'exclusion des bactéries pathogènes de l'épithélium intestinal et de leur translocation à travers l'épithélium intestinal. En revanche, la perte de cette enzyme inhibe la colonisation du tractus digestif par des souches commensales et notamment par la souche *E. coli* et inhibe leur survie au profit des bactéries pathogènes. Ainsi, l'enzyme IAP lorsqu'elle est exprimée inhibe la translocation de bactéries pathogènes à travers la muqueuse intestinale en favorisant la croissance des bactéries commensales et notamment de *E. coli* [258].

Cependant, de nombreux autres facteurs entrent en jeu dans la colonisation ou plutôt le maintien de la colonisation par *E. coli* : le métabolisme des *E. coli*, l'âge, la susceptibilité à développer des pathologies intestinales et extra-intestinales, le gel de mucus, l'accessibilité aux nutriments...

3.2.1. La colonisation de l'intestin par *E. coli* dépend de son métabolisme

Afin de coloniser et de persister dans le tractus digestif, les souches de *E. coli* commensales doivent synthétiser et consommer des composés particuliers. Ainsi, la synthèse de pyrimidines et purines est nécessaire à la souche de *E. coli* commensale MG1655 pour coloniser le tractus GI chez la souris [259].

3.2.2. *La disponibilité des nutriments*

Leatham *et al.*, ont montré que la souche de *E. coli* commensale MG1655 était résistante à une colonisation supplémentaire par la même souche. En revanche la colonisation du tractus digestif par une souche de *E. coli* différente de la première est possible [260]. Il semble donc que différentes souches de *E. coli* ont des programmes nutritionnels différents permettant leur croissance dans l'intestin. Les différences d'efficacité de la colonisation par chaque souche de *E. coli* peut s'expliquer par l'occupation spécifique de niches écologiques différentes possédant des propriétés nutritionnelles qui leur sont propres [260].

De plus, afin de renforcer l'hypothèse que chaque souche de *E. coli* possède des propriétés différentes tant au niveau génétique que métabolique pour coloniser préférentiellement le tractus GI, le choix des nutriments par chaque souche est porté par les gènes du pan-géome [261, 262].

Enfin, l'utilisation différentielle des nutriments (sucres, carbone...) par les souches de *E. coli* commensales ou pathogènes conditionne elle aussi les capacités colonisatrices de *E. coli* [263, 264].

3.2.3. *La croissance des E. coli dans le gel de mucus de l'intestin*

De nombreuses études montrent que le gel de mucus serait une source de nutriments pour les *E. coli*. Des expériences d'immunofluorescence en FISH ("*Fluorescence in situ hybridization*") de l'intestin murin ont montré que la souche de *E. coli* BJ4, une souche commensale isolée chez le rat, était dispersée dans le gel de mucus mais non associée avec l'épithélium [265]. *In vitro*, une croissance rapide des souches de *E. coli* est observé dans du mucus intestinal. En revanche, la croissance des *E. coli* est arrêtée en présence du contenu luminal [266]. Parmi les mutants de *E. coli* incapables de coloniser le tractus GI, nombreux sont ceux incapables de pénétrer le gel de mucus, de survivre ou de croître dans le gel de mucus [267] (**Figure 23**).

Il semble dans que la capacité des *E. coli* à se multiplier et à survivre dans le mucus soit une condition critique et nécessaire pour assurer la colonisation du tractus digestif. Ainsi, au moins sept sucres différents issus du métabolisme du mucus contribuent à différents degrés

à la colonisation du tractus digestif par la souche de *E. coli* MG1655. Le plus important sucre décrit est le gluconate.

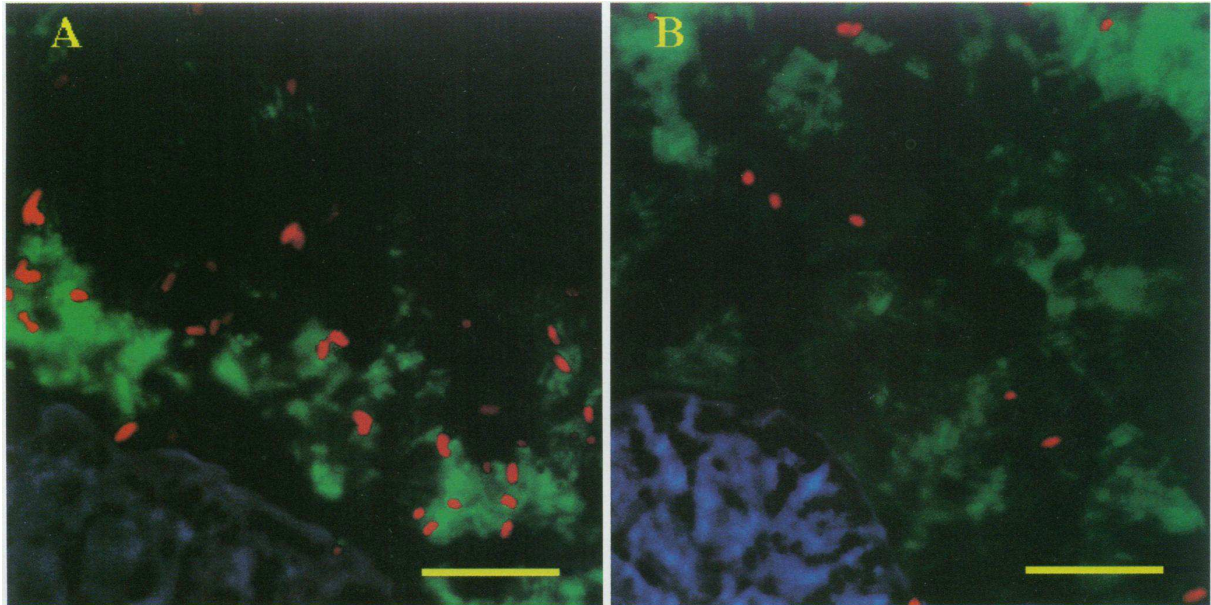


Figure 23 – Observation de la souche *E. coli* BJ4 dans le côlon.

D'après Poulsen et al., [266]. FISH réalisé sur des coupes de 10µm d'épaisseur. En rouge, la sonde EC 1531 marque les *E. coli*. La sonde EUB338 en vert cible la totalité des bactéries. En bleu, la surface de l'épithélium à été marquée. (A) Coupe réalisée un jour après le gavage avec la souche *E. coli* BJ4. (B) Coupe réalisée 10 jours après le gavage avec la souche *E. coli* BJ4.

CHAPITRE IV

LA COLIBACTINE : UNE GÉNOTOXINE BACTÉRIENNE

E. coli produit de nombreuses toxines dont les cyclomodulines qui piratent le déroulement du cycle cellulaire de l'hôte. Quatre cyclomodulines ont été décrites chez *E. coli* (Figure 24) :

- une cyclomoduline activatrice qui stimule la prolifération des cellules : CNF (« *Cytolethal Necrotizing Factor* »)
- trois cyclomodulines inhibitrices qui bloquent la mitose et la progression du cycle cellulaire en différentes phases : CDT (« *Cytolethal Distending Toxin* »), Cif (« *Cycling inhibiting factor* ») et la Colibactine.

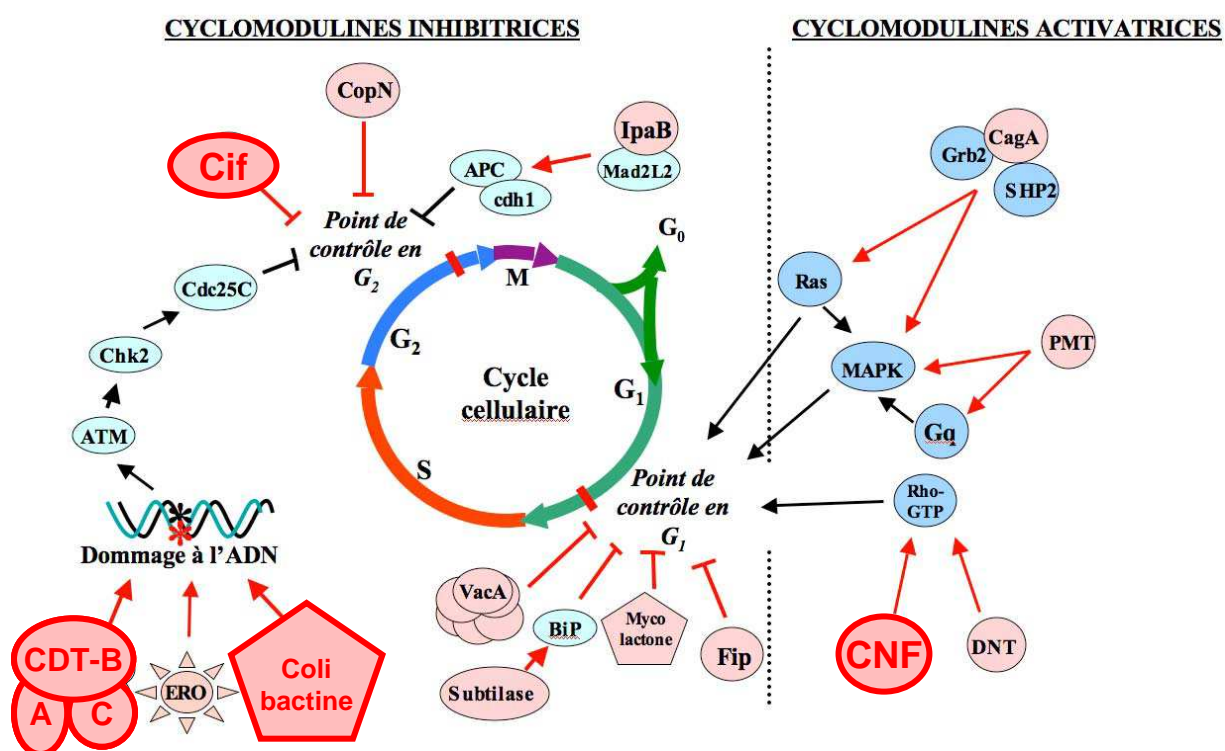


Figure 24 – Les cyclomodulines bactériennes régulent et contrôlent la progression du cycle cellulaire. D'après Nougayrède et al., [268].

En altérant le déroulement du cycle cellulaire, les cyclomodulines bactériennes peuvent modifier la réponse de l'hôte. D'une part, en stimulant la progression du cycle cellulaire, CNF peut interférer dans les mécanismes de différenciation et de développement

des cellules et pourrait ainsi être directement impliqué dans des phénomènes de cancérogenèse en participant à une prolifération incontrôlée des cellules infectées. D'autre part, en bloquant la mitose, les cyclomodulines inhibitrices comme CDT ou Cif, peuvent empêcher la mise en place de la réponse immunitaire en inhibant la prolifération des lymphocytes. Enfin, ces toxines bactériennes pourraient altérer l'intégrité de la barrière épithéliale en ralentissant le renouvellement de l'épithélium intestinal favorisant ainsi le maintien de ces souches dans les cellules infectées [268, 269] (**Figure 24**).

La Colibactine est une cyclomoduline codée par un îlot génomique appelé *pks* et fréquemment retrouvé chez les *Entérobactéries* et majoritairement *E. coli* [270]. Cette cyclomoduline est une génotoxine dont la structure est encore inconnue à ce jour, mais dont les effets sur la cellule hôte ont été caractérisés par l'équipe d'Eric Oswald.

1. L'îlot génomique *pks* et la machinerie de synthèse de la Colibactine

La biosynthèse de la Colibactine est assurée par une machinerie enzymatique qui est codée par un îlot génomique appelé « *pks* » pour polyketide synthase. Décrit pour la première fois en 2006 par Nougayrède *et al.*, l'îlot de 54 kb, comprend 23 gènes dont 16 sont essentiels pour la synthèse de la Colibactine, un composé hybride de polycétide-peptide non ribosomal (PK-NRP) (Figure 25) [270].

L'analyse *in silico* des gènes essentiels pour l'activité de la Colibactine a permis d'identifier leur fonction putative : trois gènes codent des PKS (« *Polyketide synthases* ») (*clbC*, *clbI* et *clbO*), trois gènes codent des NRPS (« *Non-ribosomal peptides synthases* ») (*clbH*, *clbJ* et *clbN*), deux gènes codent des hybrides PKS-NRPS (*clbB* et *clbK*) et six gènes codent des enzymes dites accessoires. Parmi ces gènes accessoires, le gène *clbA* code pour une phosphopantéthéinyl transférase (PPT), enzyme indispensable à l'activation de la machinerie de synthèse de la Colibactine. Parmi les protéines essentielles, ClbL, annotée « amidase » et ClbP annotée « protéine FmtA-like » n'interviennent habituellement pas dans la biosynthèse de composés PK, NRP ou PK-NRP. Récemment cristallisée, la protéine extracytoplasmique ClbP est une peptidase à activer probablement impliquée dans la maturation de la Colibactine [271].

Sept des protéines codées par l'îlot ne sont pas requises pour la synthèse de la Colibactine : la protéine ClbR possède un motif de liaison à l'ADN et pourrait intervenir dans

la régulation transcriptionnelle de cet îlot génomique, une pompe à efflux, ClbM, une intégrase et trois transposases impliquées probablement dans la mobilité de l'îlot. Enfin, le gène *clbQ* code pour une thioestérase de type II qui pourrait intervenir comme enzyme de réparation lors de la biosynthèse des NRPK en éliminant les monomères incorrectement incorporés [272].

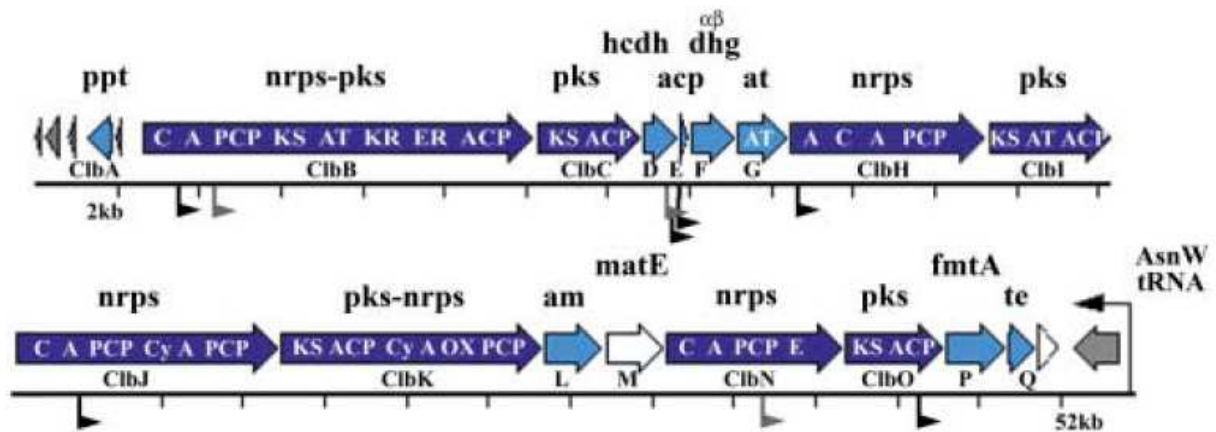


Figure 25 – Représentation schématique de l'îlot *pks*.

D'après Nougayrède *et al.* Les gènes essentiels à la synthèse de la Colibactine et à l'effet cytopathique sont indiqués en bleu (bleu foncé pour les NRPS et PKS et bleu clair pour les enzymes accessoires). Les gènes non essentiels pour induire l'effet cytopathique sont indiqués en blanc. Clb = Colibactin. Les fonctions prédites de chaque gène sont indiquées au dessus de chaque gène : *ppt* = phosphopantéthéinyl transférase, *nrps* = « nonribosomal peptide synthetase », *pks* = « polyketide synthase », *hcdh* = hydroxyl acyl coA déshydrogénase, *acp* = « acyl carrier protein », *dhg* = $\alpha\beta$ déshydrogénase, *at* = acyl-transférase, *am* = amidase, *te* = thioestérase.

2. La synthèse des composés « NRP et PK »

La biosynthèse des PK et NRP, deux classes de métabolites secondaires, a été principalement observée chez les microorganismes tels que les bactéries et les champignons. Chez les *Enterobacteriaceae*, seuls deux composés PK et NRP, l'entérobactine et la yersiniabactine (hybride PK-NRP), deux sidérophores (systèmes de chélation du fer) ont été décrits avant la découverte de la Colibactine en 2006 [270].

Les NRPS et PKS sont des systèmes de synthèse de macromolécules qui produisent des chaînes complexes de peptides et de polyketides respectivement. L'essentiel des médicaments d'origine naturelle produits jusque dans les années 1990 appartenait aux familles des composés PK, NRP et hybrides PK-NRP : de nombreux antibiotiques (pénicilline, céphalosporines, tétracyclines, ou encore l'érythromycine), des antifongiques

(nystatine), des antiparasitaires, des hypocholestérolémiants (lovastatine), des immunosuppresseurs (cyclosporine, rapamycine, tacrolimus) et des médicaments anticancéreux (bléomycine ou doxorubicine).

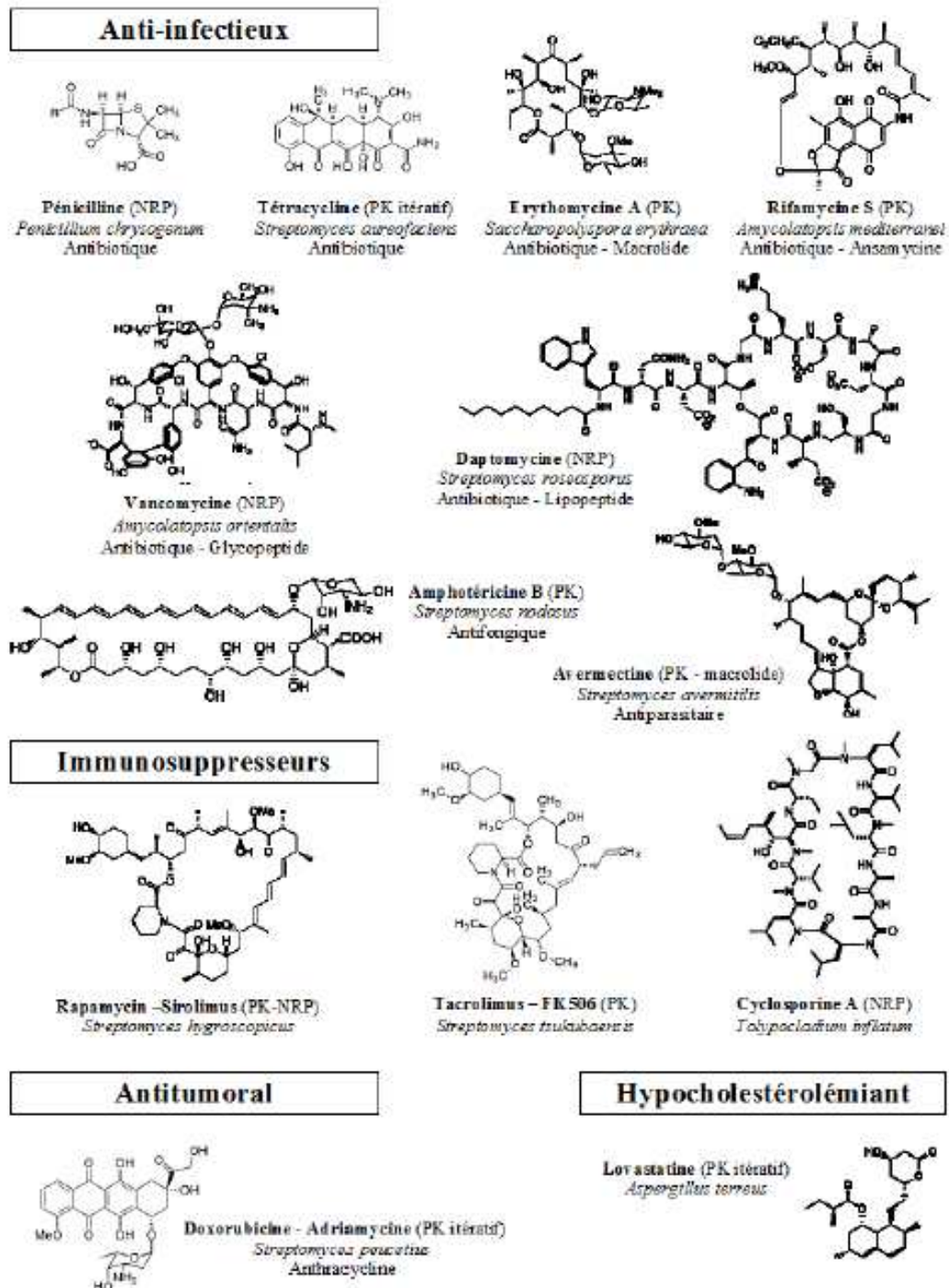


Figure 26 – Exemples de métabolites secondaires de type PK, NRP et hybrides utilisés en médecine.

Les composés de type PK, NRP et PK-NRP sont des oligomères synthétisés par des complexes multienzymatiques formés de mégasynthases et d'enzymes discrètes, c'est-à-dire qu'elles ont une activité enzymatique unique. Les monomères sont issus du métabolisme primaire (acides aminés pour les NRP et les acides carboxyliques à chaînes courtes pour les PK) ou du métabolisme secondaire (acides aminés non protéinogènes synthétisés à partir des métabolites primaires par des voies du métabolisme secondaires généralement codées par le groupe de gènes comprenant les gènes des mégasynthases). Les enzymes NRPS et PKS sont de très grandes protéines organisées en modules, eux-mêmes subdivisés en domaines et fonctionnent comme des chaînes d'assemblage constituées d'une ou plusieurs mégasynthases et catalysant plusieurs réactions se découpant en trois phases :

- l'initiation
- l'élongation : chaque module permet l'élongation du composé et consiste en l'addition d'un monomère sur le composé en cours de synthèse.
- la modification des monomères au cours des différentes phases d'élongation ou après l'assemblage. Ces modifications sont assurées au cours de l'élongation par des domaines optionnels des mégasynthases et à la fin de l'assemblage par des enzymes discrètes, dites de « finition », fréquemment codées dans le cluster comprenant les gènes des mégasynthases. Ces nombreuses modifications de l'oligomère sont à l'origine de la diversité des composés, notamment de type PK, et sont essentielles à leur activité biologique.

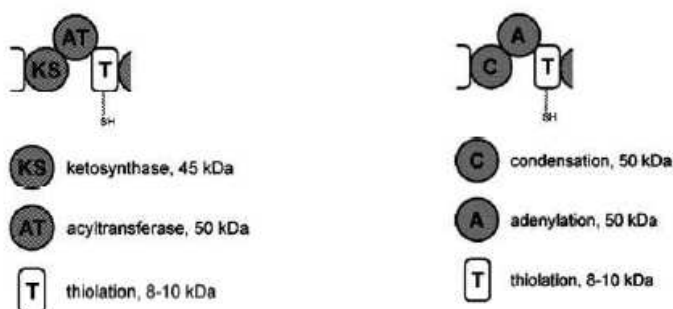


Figure 27 – Domaines essentiels formant les modules des PKS et des NRPS.

D'après Fischbach et Walsh [273].

Les mégasynthases PKS, NRPS et PKS-NRPS assurent l'essentiel de la synthèse des composés PK, NRP ou hybride PK-NRP. Chaque module possède trois domaines de base [273] (**Figure 27**):

1- le domaine de Thiolation = T, ACP, PCP fixe l'acide aminé monomérique sur la mégasynthase par une liaison thioester.

2- le domaine de KetoSynthase (KS) des PKS condensent le monomère sur la chaîne d'oligomère en croissance et le domaine de Condensation (C) des NRPS crée une liaison peptidique entre deux monomères.

3- le domaine AcylTranfèrase (AT) des PKS et le domaine d'Adénylation (A) des NRPS reconnaissent le monomère spécifique et le fixe par liaison thioesther au domaine de Thiolation.

2.1. Les chaînes d'assemblage des composés PK

Trois types de PKS ont été identifiés. Les PKS assemblent des monomères carboxyliques dérivés de l'acide malonique (**Figure 27**).

- Les PKS de type I (multimodulaires) ont un mode d'assemblage linéaire et utilisent les trois modules une seule fois dont l'ordre typique sur le module enzymatique est KS-AT-T. Le domaine T est aussi appelé ACP pour « Acyl Carrier Protein » et porte la chaîne acyle en cours d'élongation.
- Dans les PKS de type II, on retrouve les domaines KS et ACP (reconnaît le substrat en l'absence de domaine AT) dont le fonctionnement est itératif c'est-à-dire qu'un seul module peut condenser plusieurs fois le substrat. Enfin, le composé est libéré par l'action d'une thioestérase (TE).
- Les PKS de type III se distinguent par l'absence du domaine T ou ACP [274].

2.2. Les chaînes d'assemblage des composés NRP

Comme pour les PKS, trois types de NRPS sont décrits : les NRPS de type A (ou linéaires) dont les modules sont utilisés une seule fois, les NRPS de type B (ou itératifs), dont les modules sont utilisés plusieurs fois et le type C (ou type non linéaire), dont certains domaines sont absents et d'autres fonctionnent plus d'une fois.

Les NRPS, comme les PKS, sont composés de chaînes d'assemblage enzymatiques multimodulaires qui contiennent un module pour chaque monomère d'acide aminé incorporé. Les monomères assemblés sont les vingt acides aminés classiques et une centaine d'autres acides aminés « non-conventionnelles », conférant une énorme diversité structurale aux

composés formés. De manière équivalente aux trois domaines des PKS (KS-AT-T), il existe trois domaines de base dans un module minimal de NRPS. L'ordre conventionnel des domaines sur le module NRPS est C-A-T (**Figure 27**).

2.3. Les chaînes d'assemblage des composés hybrides PK-NRP

Les chaînes d'assemblage hybrides contiennent à la fois des modules enzymatiques de type PKS et NRPS. Ainsi, les molécules néoformées par ces enzymes multimodulaires sont des dérivés d'acides aminés et de chaînes carboxyliques courtes [275].

Les métabolites comme la yersiniabactine ou la Colibactine seraient issus de ces chaînes d'assemblage.

3. La place de l'îlot *pks* au sein du génome de *E. coli*

La séquence de l'îlot est très conservée chez les souches de *E. coli* du groupe B2, commensales ou pathogènes qui l'exprime ainsi que chez les autres espèces d'*Enterobacteriaceae* (> 99% d'identité des séquences nucléotidiques) [270, 276]. Cependant, l'îlot fait partie du pool de gènes flexibles de *E. coli* comme de nombreux facteurs de virulence [277].

Chez les *E. coli* du groupe B2, l'îlot *pks* est intégré au niveau d'une région chromosomique située dans le locus ARNt *AsnW*, un site privilégié d'insertion et d'échange d'éléments d'ADN [278]. En revanche, chez les autres souches porteuses ; *K pneumoniae*, *E. aerogenes*, *C. koseri* et les trois souches de *E. coli* appartenant au groupe B1, l'îlot est associé à des éléments géniques similaires à des éléments d'intégration et de conjugaison (ICE), ICEEc1 et ICEKp1. [276].

4. Distribution de l'îlot *pks* au sein du microbiote intestinal

4.1. Distribution de l'îlot *pks* dans la population adulte

D'après l'analyse des souches de la collection ECOR (collection de référence de *E. coli*), comprenant 72 souches de *E. coli*, l'îlot génomique est presque exclusivement observé au sein des isolats de *E. coli* du groupe phylogénétique B2 ; seulement trois isolats du groupe phylogénétique B1 portant l'îlot ont été observés jusqu'à présent [276]. Sa prévalence a d'abord été analysée dans la collection ECOR, et dans une autre collection de souches qui comprenait des souches ExPEC et commensales appartenant uniquement au groupe phylogénétique B2. L'îlot *pks* a ainsi été retrouvé dans 53% des souches ExPEC (n=97) et 34% des souches commensales (n=32), dont la souche probiotique *E. coli* Nissle 1917 [270].

Par la suite, la prévalence de l'îlot, ainsi que d'autres gènes de virulence, ont été étudiés dans 131 souches de *E. coli* isolées chez des vétérans américains comprenant 62 isolats sanguins de patients malades et 69 isolats fécaux issus de patients sains. Cette étude montre que les gènes marqueurs de l'îlot, *clbA*, *clbB*, *clbN* et *clbQ* sont significativement associés à une bactériémie et principalement identifiés chez des bactéries du groupe phylogénétique B2. Les gènes sont présents majoritairement dans les isolats sanguins, issus des patients malades, avec 58% des isolats positifs contre 32% pour les isolats fécaux [277]. Plus récemment, Dubois *et al.* ont étudié la distribution de l'îlot dans 197 souches de *E. coli* isolées de patients souffrant d'infections urinaires à UPEC (n=146) ou commensales (n=51). Cette étude montre, à nouveau, que la présence de l'îlot est uniquement associée au groupe phylogénétique B2. En revanche, les prévalences de l'îlot *pks* au sein des souches B2, ne sont pas significativement différentes entre les groupes de patients et de personnes saines, suggérant que l'îlot *pks* est principalement associé à une meilleure colonisation et non à une virulence plus importante [279].

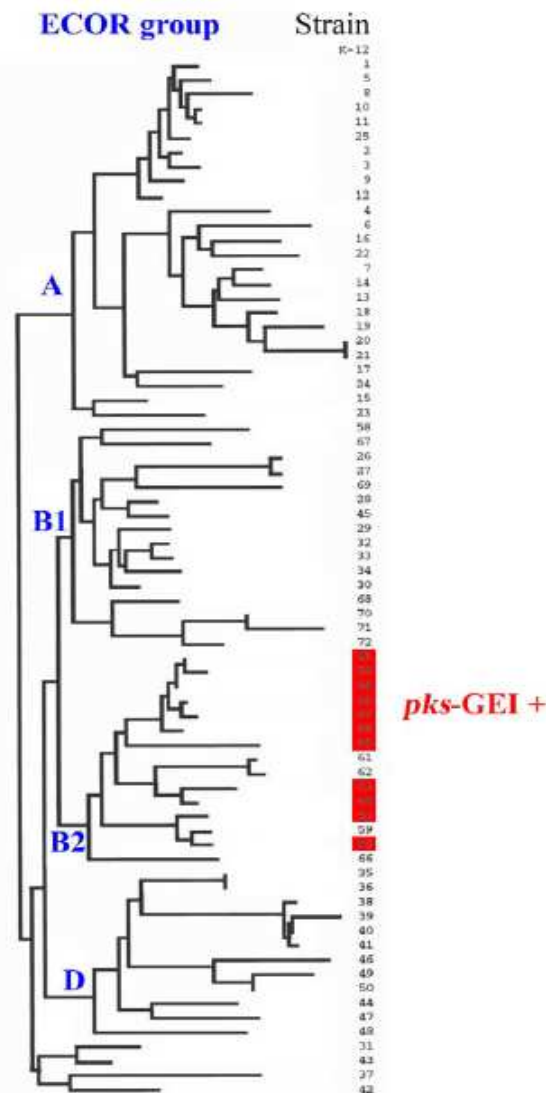


Figure 28 – Distribution de l'îlot *pks* au sein des groupes phylogénétiques de *E. coli*.

D'après Nougayrède et al. Détection de l'îlot *pks* parmi les souches de *E. coli* de la collection de référence (ECOR collection). Les souches positives pour l'îlot *pks* sont désignées en rouge.

La recherche de l'îlot *pks* a été élargie par criblage PCR. Ainsi, 1565 isolats d'*Enterobacteriaceae* ont été étudiés par Putze *et al.* Comme précédemment établi, l'îlot est retrouvé dans des souches de *E. coli* ExPEC (n=205, 37,1%) et des *E. coli* commensales (n=142, 19,7%) appartenant au groupe phylogénétique B2. L'îlot *pks* est également retrouvé dans d'autres espèces de la famille des Entérobactéries : *Klebsiella pneumoniae* (n=141, 3,5%), *Enterobacter aerogenes* (n=11, 27,3%) et *Citrobacter koseri* (n=1) [276]. Il est cependant absent des souches de *E. coli* pathogènes intestinales (n=689, EHEC, EPEC, ...), de *Shigella* spp. (n=10) et de *Salmonella enterica* (n=141) [270, 276, 277].

4.2. Présence de *E. coli pks+* chez les jeunes enfants

L'analyse métagénomique des fèces de 13 personnes en bonne santé d'âges variés, incluant des enfants non sevrés, révèle que 38,46% des personnes testées (n=5/13) portent au sein de leur microbiote intestinal les gènes de l'îlot *pks*. De manière intéressante, cette étude montre que 60% (n=3/5) des enfants âgés de moins de 2 ans possèdent les gènes de l'îlot. De plus, l'analyse de deux familles met en évidence une relation mère/enfant, avec l'observation dans une des familles du portage des gènes de l'îlot à la fois chez la mère et le jeune enfant, suggérant une transmission maternelle de ces souches [280] (**Figure 29**).

Une étude épidémiologique plus large et plus récente a été menée au laboratoire par une pédiatre sur 197 nouveau-nés issus de la maternité de Limoges. A trois jours, 54,3% (n=108) des nouveau-nés sont colonisés par au moins une souche de *E. coli* et parmi ces

enfants, 29% (n=31) portent au moins une souche de *E. coli* dotés de l'îlot *pks*+ dans leur microbiote (Branthomme, 2011).

| | Nom échantillon | Sexe | Age | Gènes de l'îlot <i>pks</i> |
|------------|-----------------|---------|---------|----------------------------|
| Individu | In-A | Mâle | 45 ans | + |
| Individu | In-B | Mâle | 6 mois | + |
| Individu | In-D | Mâle | 35 ans | - |
| Individu | In-E | Mâle | 3 mois | - |
| Individu | In-M | Féminin | 4 mois | + |
| Individu | In-R | Féminin | 24 ans | - |
| Famille I | F1-S | Mâle | 30 ans | - |
| | F1-T | Féminin | 28 ans | + |
| | F1-U | Féminin | 7 mois | + |
| Famille II | F2-V | Mâle | 37 ans | - |
| | F2-W | Féminin | 36 ans | - |
| | F2-X | Mâle | 3 ans | - |
| | F2-Y | Féminin | 1,5 ans | - |

Figure 29 – Analyse japonaise métagénomique de la présence des gènes de l'îlot *pks*

Etude menée chez 13 personnes en bonne santé.

D'après Kurokawa *et al.* [280]

Les souches de *E. coli* intestinales diffèrent dans leur capacité à se maintenir dans le microbiote des individus. Les souches colonisatrices à long terme, ou souches résidentes, persistent plusieurs mois ou années dans l'intestin, alors que les souches transitoires disparaissent du microbiote intestinal seulement quelques semaines après leur apparition. Souvent, les propriétés colonisatrices des souches de *E. coli* sont liées à leur capacité à exprimer des gènes de virulence. En effet, les souches du groupe phylogénétique B2 sont enrichies en gènes de virulence et ont la capacité de persister dans le microbiote intestinal plus longtemps que les souches des autres groupes phylogénétiques [236, 248]. Dans une étude publiée récemment, les auteurs analysent l'importance écologique de l'îlot *pks* dans la capacité des souches de *E. coli* à coloniser et à persister dans le microbiote intestinal [281]. Cent souches de *E. coli* isolées sur 130 enfants suédois âgés de 0 à 18 mois ont été analysées pour leur capacité de colonisation à long terme, intermédiaire, ou de colonisation transitoire du microbiote intestinal. Une comparaison entre les capacités colonisatrices de chaque souche et la présence de l'îlot *pks* a été réalisée. L'îlot a été retrouvé majoritairement parmi les souches résidentes de *E. coli* (53% contre 28% pour les souches colonisatrices intermédiaires et 14% pour les souches transitoires) et exclusivement dans le groupe phylogénétique B2, ce qui corrèle avec les études épidémiologiques réalisées précédemment. De plus, les souches B2 sont principalement retrouvées parmi les souches résidentes (72% contre 47% pour les souches colonisatrices intermédiaires et 7% pour les souches transitoires) ne mettant ainsi en

évidence aucune différence significative de la présence de l'îlot *pks* parmi les souches B2, qu'elles soient résidentes ou transitoires. Des études précédentes suggèrent que plusieurs facteurs de virulence associés contribuent à la persistance des souches de *E. coli* du groupe B2 dans le microbiote intestinal [236, 238, 239, 248, 282, 283]. En conclusion, ces données suggèrent donc que l'îlot *pks* ne confère pas à lui seul une meilleure capacité des souches qui le portent à coloniser le tractus digestif mais pourrait être un des multiples traits de pathogénicité accumulés par les souches B2 et qu'ensemble, ils augmentent les capacités de colonisation et de persistance de ces souches dans le microbiote intestinal [281].

5. Effets de la Colibactine

L'infection transitoire de cellules de mammifères par des souches de *E. coli* ExPEC ou commensales porteuses de l'îlot *pks* induit une mégalocytose, caractérisée par un élargissement progressif du cytoplasme et du noyau résultant de l'absence de mitose dans ces cellules.

La souche de laboratoire de *E. coli* K-12 ne possède pas l'îlot génomique et donc n'induit pas d'effet cytopathique. En revanche, la souche de laboratoire de *E. coli* DH10B, K-12 hébergeant un chromosome bactérien artificiel (BAC pour « *bacterial artificial chromosome* ») portant l'îlot *pks* complet est capable d'induire une mégalocytose ainsi que l'arrêt transitoire de la prolifération des cellules infectées, contrairement à une infection avec la souche de *E. coli* DH10B portant le vecteur BAC vide (**Figure 30**) [270].

L'activité cytopathique de la Colibactine est contact-dépendant et n'est pas observée lorsque les bactéries sont séparées des cellules par un filtre perméable. De plus, des bactéries tuées, par traitement antibiotique ou la chaleur, ne sont pas capables d'induire un effet cytopathique sur les cellules infectées [270].

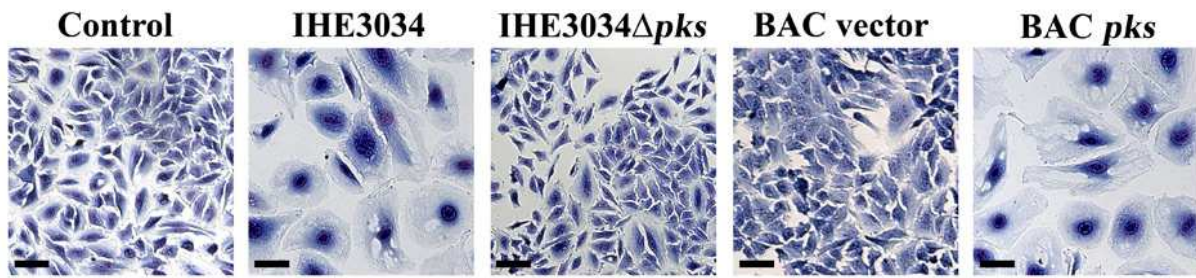


Figure 30 – L’îlot *pks* est nécessaire pour induire l’activité cytopathique.

D’après Nougayrède *et al.* Des cellules HeLa sont transitoirement infectées avec la souche de *E. coli* pathogène ExPEC IHE3034 ou la souche de laboratoire DH10B, lavées puis incubées avec de la gentamicine pendant 72h avant une coloration au Giemsa. Echelle = 50µm.

5.1. la Colibactine est génotoxique.

L’analyse du cycle cellulaire de cellules de mammifères infectées avec la souche *E. coli* DH10B BAC *pks* révèle que les noyaux des cellules géantes ont un contenu en ADN égal à 4n. Cette observation, combinée avec l’absence de division cellulaire indiquent que les cellules sont bloquées dans la transition G2/M du cycle cellulaire. Il a été montré que l’arrêt du cycle cellulaire peut être déclenché en réponse à des dommages à l’ADN [284].

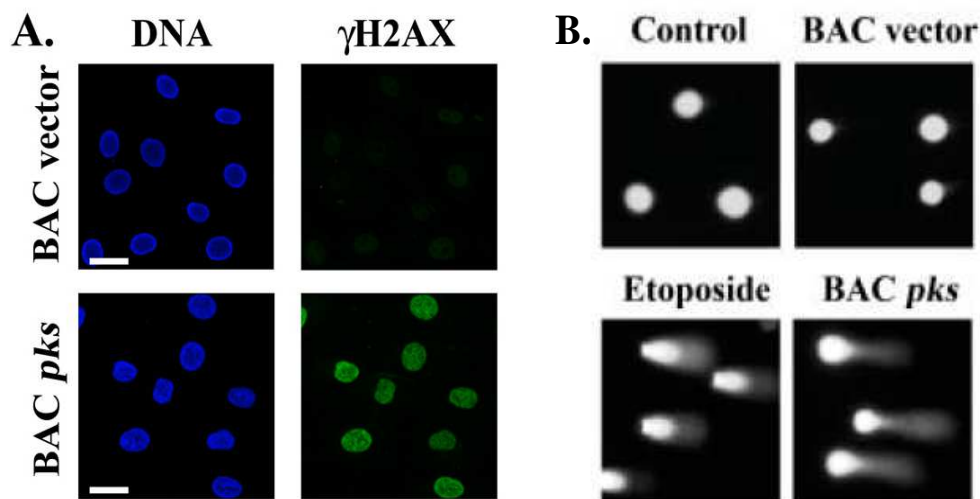


Figure 31 – Induction de cassures double-brin à l’ADN après infections avec des souches de *E. coli* portant l’îlot *pks*.

D’après Nougayrède *et al.* **A.** Des cellules IEC-6 sont infectées transitoirement pendant 4h avec la souche *E. coli* DH10B BAC*pks* ou le vecteur vide (BAC vector) (m.o.i.=100). 4h après la fin de l’infection, la phosphorylation de H2AX est examinée par immunofluorescence, l’ADN est visualisé en bleu et les foyers de H2AX phosphorylé, en vert. Echelle = 20µm. **B.** Des cellules HeLa infectées avec la souche *E. coli* DH10B BAC*pks* ou DH10B BACvector ou traitées avec de l’étoposide (inhibiteur de la topoisomérase II, qui induit des cassures double-brin de l’ADN). Les cellules sont ensuite placées en agarose, lysées et soumises à un champ électrique en conditions neutres permettant ainsi la migration de l’ADN endommagé hors du noyau.

Afin d'analyser si l'exposition de cellules à des bactéries portant l'îlot *pks* induit des dommages à l'ADN, la phosphorylation de l'histone H2AX a été évaluée. En effet, la phosphorylation de H2AX sur la sérine 139 est l'un des marqueurs les plus utilisés afin d'évaluer les dommages à l'ADN et notamment les cassures double brin de l'ADN (CDB) [285]. Des cellules infectées avec des bactéries portant le BAC *pks* présentent des foci de H2AX phosphorylée dans le noyau 4h après la fin de l'infection, traduisant ainsi la présence de CDB en réponse à l'expression de la Colibactine. Le signal de la phosphorylation de H2AX augmente de façon dose dépendante avec l'observation de foyers bien définis aux doses d'infections (m.o.i = « *multiplicity of infection* ») les plus faibles jusqu'à une réaction de type pan-nucléaire, lorsque la m.o.i dépasse 100 bactéries par cellule. Enfin, la présence de CDB a été confirmée par le test d'électrophorèse unicellulaire en gel (« *Comet assay* »), la queue de la « comète » s'allongeant avec l'augmentation du signal de phosphorylation de H2AX et de la dose d'infection, indiquant ainsi une augmentation des CDB (**Figure 31**) [270].

Ainsi, en réponse à des CDB de l'ADN, induites par l'expression de l'îlot *pks*, la voie de signalisation conduisant au blocage cellulaire en phase G2/M passe par l'activation de la voie ATM-Chk2 (**Figure 32**) [270].

Plus récemment, Cuevas-Ramos *et al.* ont montré que l'expression de l'îlot *pks* par des souches de *E. coli* induisait des CDB à l'ADN *in vivo*. Dans un modèle d'anse ligaturée de souris, une souche de *E. coli pks+* induit la formation de foyers d'histones H2AX phosphorylées. Cette étude montre que des *E. coli pks+* induisent la phosphorylation de H2AX *in vivo* suggérant des dommages à l'ADN dans les cellules épithéliales intestinales (**Figure 33**) [286].

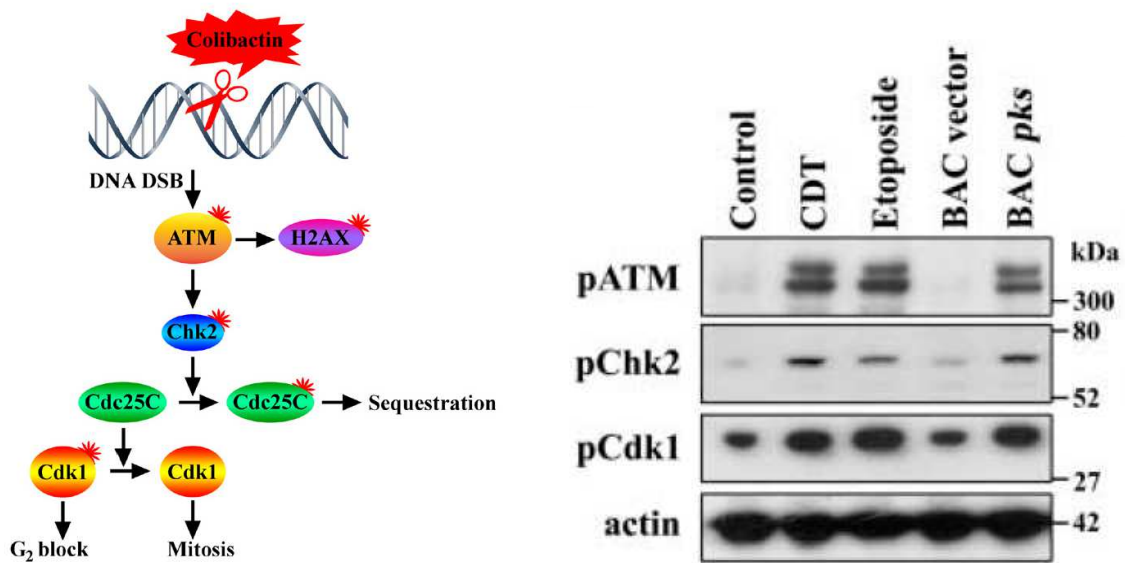


Figure 32 – Activation du point de contrôle G2/M dans les cellules exposées à des souches de *E. coli pks+*. D’après Nougayrède *et al.*

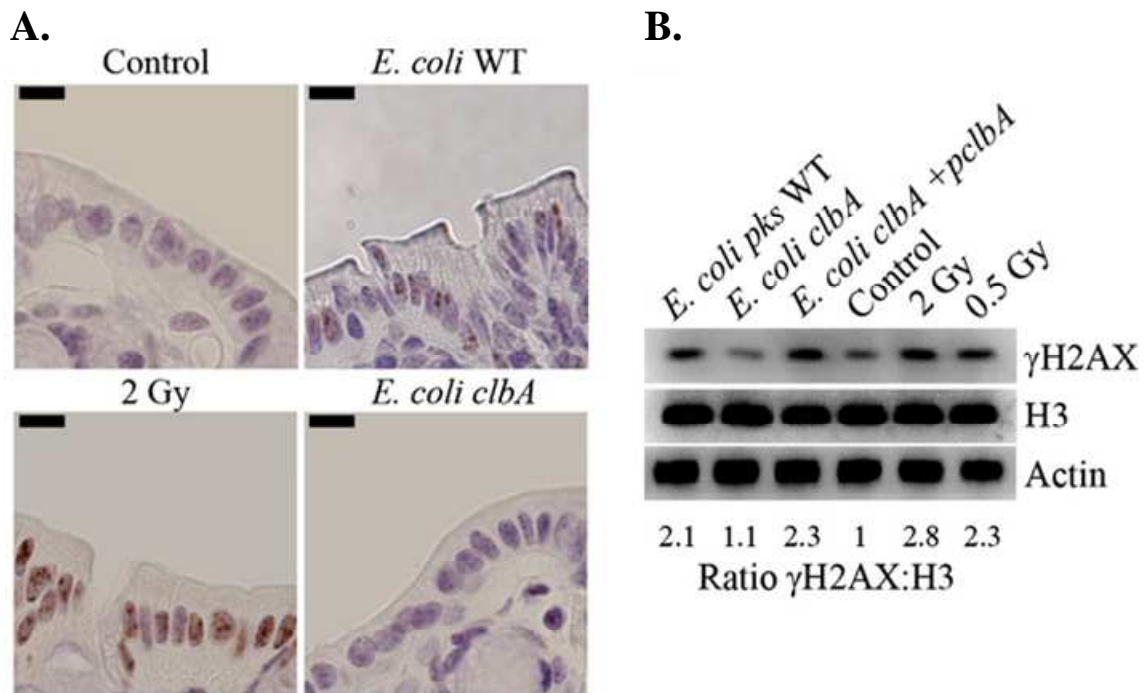


Figure 33 – *E. coli pks+* induit des CDBs dans les entérocytes *in vivo*.

D’après Cuevas-Ramos *et al.* A. Des anses ligaturées (« colon loops ») ont été réalisées chez la souris BALB/c et injectées avec un milieu de culture stérile (*control*) ou avec 3.10^9 *E. coli pks+* (*E. coli* WT) ou le mutant insogénique *E. coli clbA* pour lequel la biosynthèse de la Colibactine est empêchée par la délétion du gène *clbA*. Des souris irradiées par des rayons gamma (2Gy) sont utilisées comme contrôle positif de la présence de CDBs dans les entérocytes. Les coupes sont marquées avec la forme phosphorylée de H2AX, en marron, et contre-colorées avec l’hématoxyline. Echelle = 10 μ m. B. Analyse en Western blot des entérocytes 6h après l’inoculation des souches dans les anses ligaturées. L’histone H3 et l’actine servent de contrôle de la charge en protéine des puits.

5.2. La Colibactine, un agent carcinogène potentiel ?

Afin d'évaluer les conséquences des dommages à l'ADN observés en réponse à l'infection par des souches de *E. coli pks+*, des m.o.i de 1 à 20 bactéries ont été utilisées dans des expériences *in vitro* où le cycle cellulaire, la mort cellulaire et la réponse aux CDB étaient analysés 16 et 30h après l'infection (**Figure 34**). Une seule et courte exposition de cellules épithéliales de mammifères en culture (lignée CHO) à de faibles doses infectieuses de *E. coli pks+* (m.o.i = 5) induit une réponse cellulaire aux dommages à l'ADN, marquée par un arrêt transitoire du cycle cellulaire à t=16h. Les cellules reprennent ensuite leur division et présentent des signes de réparation de l'ADN avec une diminution de la phosphorylation de H2AX et la réparation de l'ADN de type NHEJ (« *Non Homologous End Joining* »). Des cellules exposées à un faible nombre de bactéries *pks+* présentent des dommages à l'ADN mais sont capables de les réparer et de reprendre leur cycle cellulaire (**Figure 34**) [286].

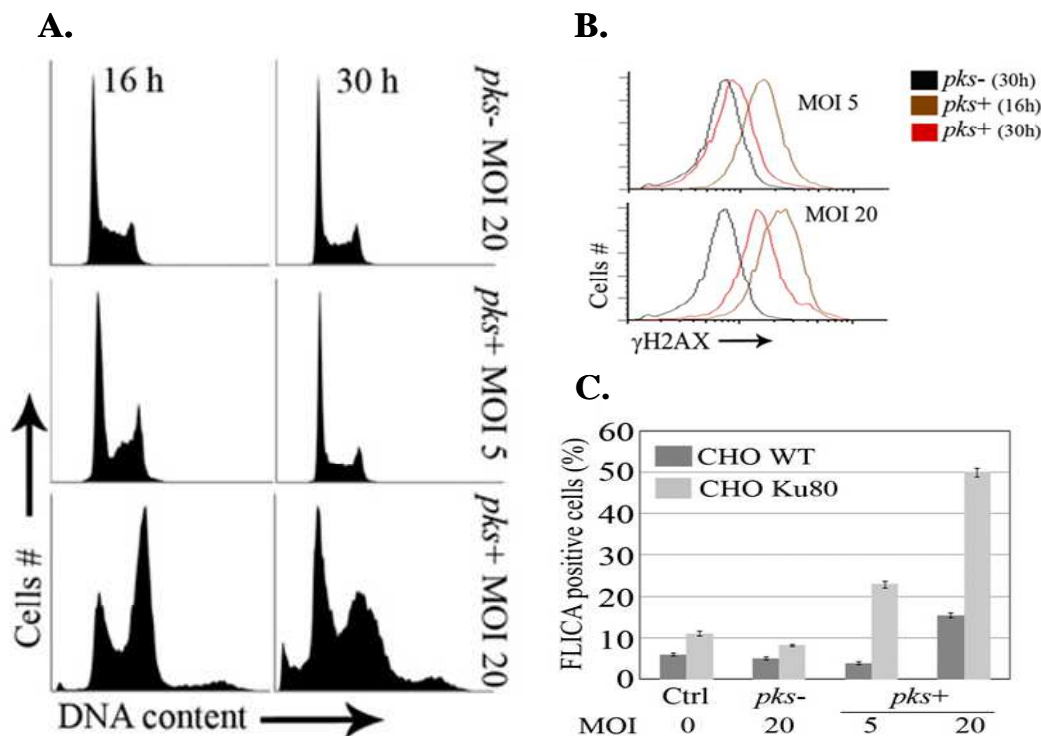


Figure 34 – Réparation des dommages à l'ADN et division cellulaire après l'infection à faible m.o.i avec des *E. coli pks+*.

D'après Cuevas-Ramos *et al.* [286]. Des cellules CHO sont infectées avec des *E. coli pks+* ou *pks-* à des m.o.i de 5 à 20 bactéries ou non infectées (ctrl). **A.** Analyse du cycle cellulaire 16 et 30 heures après la fin de l'infection. **B.** Phosphorylation de H2AX évaluée par cytométrie en flux 16 et 30 heures après la fin de l'infection. **C.** Des cellules CHO ou présentant un défaut d'expression de Ku80 (donc ne pouvant pas utiliser le système de réparation NHEJ) sont infectées et 24 heures après les cellules apoptotiques sont marqués avec le FLICA (« *carboxyfluorescein fluoromethyl ketone peptide inhibitor of caspases* ») et quantifiées par cytométrie en flux.

Cependant, 50% des cellules en mitose précédemment infectées par des *E. coli pks+* à faible dose infectieuse (m.o.i = 5) possèdent toujours un à quatre foyers H2AX phosphorylée 24h après la fin de l'infection. Ces foyers présents sur les chromosomes des cellules en division peuvent représenter soit les cicatrices des lésions à l'ADN réparées, soit des cassures non réparées [287, 288]. Les CDBs, non ou mal réparées, conduisent à la fusion des chromosomes qui résultent à la formation de ponts anaphasiques lors de la séparation des chromosomes et à des aberrations chromosomiques (micronoyaux, chromosomes en anneau, cassures de la chromatide) [286, 289] (**Figure 35**). Ces anomalies persistent dans les cellules en division jusqu'à 21 jours après l'infection, indiquant l'apparition de cycles cassures-fusion-pont (ou BFB pour « *breaking-fusion-bridge* ») générant ainsi une instabilité chromosomique sur le long terme. Enfin, Cuevas-Ramos *et al.* ont montré que l'infection à faible dose de cellules par des *E. coli pks+* augmente la fréquence des mutations ainsi que la formation de colonies cellulaires indépendantes de l'ancrage (**Figure 35**).

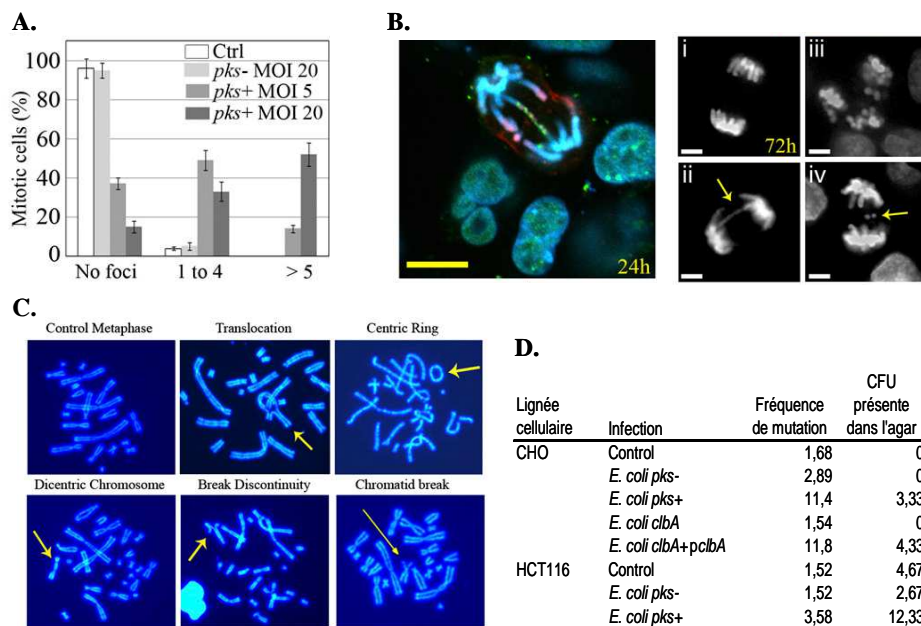


Figure 35 - L'infection à faible dose avec des *E. coli pks+* induit une instabilité chromosomique et une augmentation de la fréquence des mutations et de la transformation cellulaire.

D'après Cuevas-Ramos *et al.* **A.** Quantification des foyers de l'histone H2AX phosphorylée dans les cellules en mitoses. **B.** (à gauche) Pont anaphasique d'une cellule CHO 24 heures après l'infection. (à droite) 72 heures après l'infection (i) anaphase normale, (ii) pont anaphasique générant des ponts nucléoplasmiques, (iii) mitose multipolaire et (iv) chromosome retardé générant des micronoyaux. Echelle = 10µm. **C.** Aberrations chromosomiques des cellules métaphasiques 24h après infection. **D.** Tableau montrant la fréquence de mutation et de transformation des cellules CHO et HCT116 soumises à une infection avec des *E. coli* génotoxiques ou non. *E. coli pks-* ne possèdent pas l'îlot. *E. coli pks+* expriment l'îlot *pks*. *E. coli clbA* possède l'îlot mais est muté pour le gène *clbA* essentiel à la synthèse de la Colibactine. La souche *E. coli clbA+pclbA* a été complétée pour l'expression du gène *clbA* porté par un plasmide et exprime donc la génotoxine. Il a été introduit dans la souche mutée *E. coli clbA*.

5.3. La Colibactine joue un rôle dans l'effet probiotique de la souche *E. coli* Nissle 1917.

E. coli Nissle 1917 (*EcN*) a été découverte par le Professeur allemand Alfred Nissle en 1917 qui a isolé alors une souche non pathogène de *E. coli* à partir des selles d'un soldat de la Première Guerre Mondiale qui n'avait pas souffert d'entérocolite lors d'une épidémie sévère de shigellose. Ainsi, la souche *EcN* est aujourd'hui commercialisée sous le nom de Mutaflor® en Allemagne comme traitement oral de nombreux désordres intestinaux chez l'Homme [290]. Des essais comparant l'efficacité de la souche *EcN* à un traitement à la mesalazine, le principal traitement des patients souffrant de colite ulcéraive, ont montré que la souche probiotique est aussi efficace que la mesalazine pour prévenir des rechutes de la pathologie et est associé avec une augmentation du temps de rémission entre chaque épisode de la maladie [291-293].

EcN porte l'îlot *pks* dans son génome et est capable d'induire des CDB et des anomalies chromosomiques aux cellules eucaryotes *in vitro* [270, 294]. Afin d'analyser un possible lien entre la présence de l'îlot *pks* et l'effet probiotique de la souche *EcN*, une souche mutée de *EcN* pour le gène *clbA* a été construite et est incapable d'induire des dommages à l'ADN dans les cellules eucaryotes (**Figure 36**).

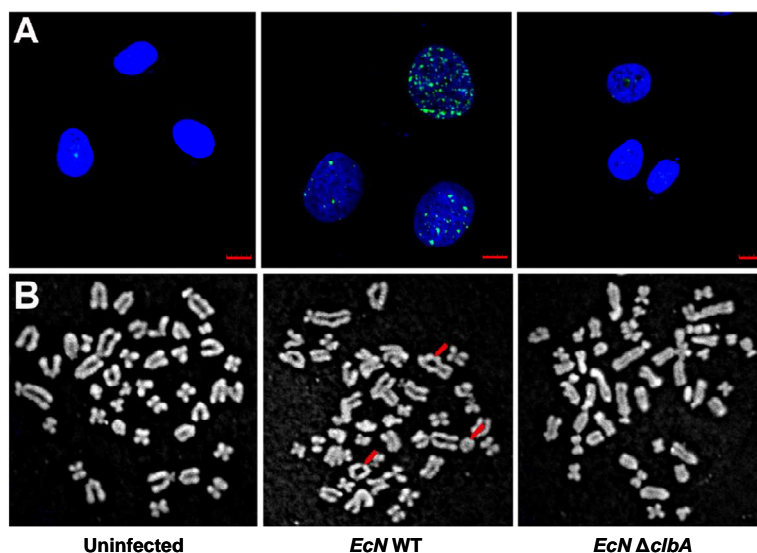


Figure 36 – La souche *EcN* est génotoxique.

D'après Olier et al.. [294] Des cellules IEC-6 ont été infectées de manière transitoire avec la souche *EcN* sauvage ou la souche *EcN* mutée pour le gène *clbA* avec une m.o.i de 100 (A) ou 20 (B) bactéries par cellule. (A) Les cellules ont été observées en microscopie pour l'ADN (en bleu) et la phosphorylation de H2AX (en vert). Echelle = 10 μ m. (B) Les chromosomes métaphasiques sont visualisés 72h après l'infection. Des cassures de la chromatide et les anomalies chromosomiques sont montrés par les flèches rouges.

Que ce soit dans un modèle de colite aigüe induite chimiquement chez le rat ou dans un modèle de colite chronique chez la souris, l'administration orale de la souche *EcN* sauvage ou mutée pour le gène *clbA* démontre le besoin d'une voie de biosynthèse fonctionnelle de la Colibactine pour à la fois l'amélioration des scores cliniques de la maladie et la modulation de l'expression des cytokines [294] (**Figure 37**). Le ratio poids/longueur du côlon qui est dépendant de la sévérité de la colite, est modulé par le traitement oral des animaux. Ainsi, ce ratio augmente chez les animaux présentant un côlon enflammé en comparaison à des animaux contrôles sains ainsi que l'expression de la cytokine pro-inflammatoire, IL1 β et de la cytokine anti-inflammatoire IL10. En revanche, l'administration orale de la souche *EcN* sauvage aux animaux améliore les signes cliniques et diminuent les dommages au niveau de côlon. Enfin, le traitement par la souche sauvage *EcN* diminue l'expression de l'IL-1 β en comparaison au mutant *clbA*.

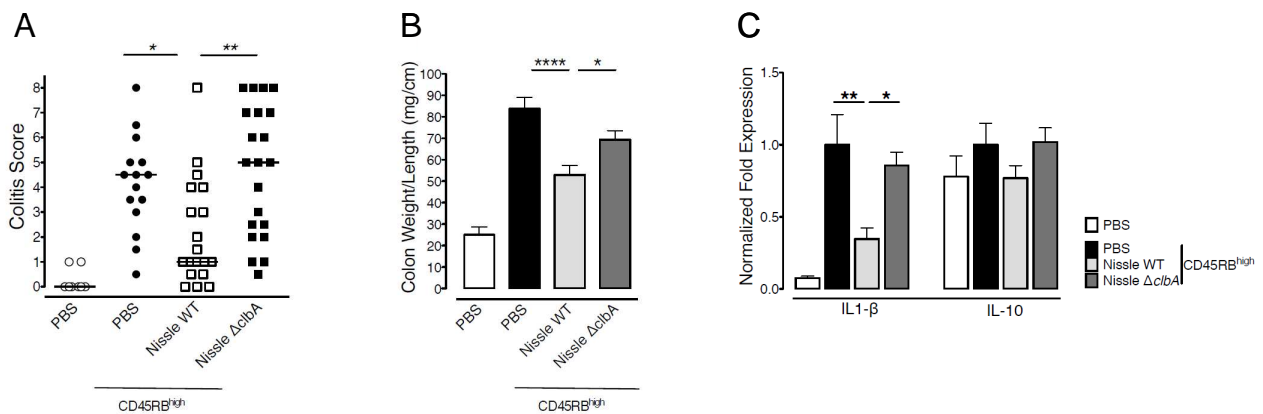


Figure 37 – *EcN* a besoin d'un îlot *pks* fonctionnel pour atténuer la colite induite par le transfert de lymphocytes T CD45RB^{high} chez la souris.

D'après Olier et al. [294]. (A) Scores cliniques de chaque souris. (B) Ratio poids/longueur des côlons. (C) Expression par qPCR des interleukines 1 β (IL-1 β) et IL-10. * <math>p<0.05</math>, **<math>p<0.01</math> et ****<math>p<0.0001</math>.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Au cours du développement post-natal, le microbiote intestinal interagit intimement avec l'hôte et module à la fois la différenciation de l'épithélium intestinal et la maturation du système immunitaire.

Escherichia coli est une des premières bactéries à coloniser le tractus GI du nouveau-né et à se maintenir tout au long de la vie. Au laboratoire, l'équipe a pu mettre en évidence que certaines souches de *E. coli* commensales portaient dans leur génome un îlot génomique *pks* codant pour la synthèse d'une génotoxine, la Colibactine. L'équipe a montré que la Colibactine induisait des CDB à l'ADN *in vivo* dans les entérocytes et était capable, *in vitro*, des aberrations chromosomiques et des mutations conduisant au développement d'une instabilité génétique.

Sachant, que l'Homme héberge dans son microbiote des souches de *E. coli* commensales génotoxiques depuis le plus jeune âge (3 jours) et ce jusqu'à l'âge adulte, nous nous sommes interrogés sur le rôle potentiel exercé par ces souches génotoxiques sur d'une part les capacités de *E. coli* à coloniser le tractus digestif et d'autre part le rôle de ces souches génotoxiques sur le développement et la maturation de l'épithélium intestinal de la naissance à l'âge adulte.

Mon travail de recherche s'est articulé autour de trois axes:

- Développer un modèle expérimental animal nous permettant d'analyser l'influence de la colonisation naturelle du nouveau-né par des souches de *E. coli* génotoxiques ou non transmises par le microbiote de leur mère.
- Analyser le rôle de la colonisation précoce des nouveau-nés par des *E. coli* génotoxiques sur le développement de l'épithélium intestinal du nouveau-né à l'âge adulte.
- Analyser le rôle de la colonisation précoce des nouveau-nés par des *E. coli* génotoxiques sur la différenciation et l'intégrité de la barrière intestinale.

**ETUDE 1: LA COLONISATION NÉONATALE DES NOUVEAU-NÉS PAR
DES *E. COLI* GÉNOTOXIQUES INDUIT DE PROFONDES
MODIFICATIONS DANS L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL À L'ÂGE
ADULTE.**

*Cette étude vous présente un modèle expérimental animal original que nous avons mis au point au laboratoire afin d'analyser le rôle de bactéries *E. coli* génotoxiques ou non sur d'une part leurs capacités à coloniser et à persister dans le microbiote intestinal du nouveau-né et de l'animal adulte respectivement. D'autre part l'influence de la présence de telles souches sur le développement de l'épithélium intestinal de la naissance à l'âge adulte a été évaluée.*

*Cette étude sera soumise pour publication dans un avenir proche (prochaines semaines) au journal *Cell Host & Microbes*.*

En prévision, nous avons commencé la rédaction d'un manuscrit mais celui-ci n'est pas terminé. Les résultats de cette étude présentés ci-après sont rédigés en anglais ainsi que les figures et leurs légendes. Cependant, l'introduction et la discussion de ces résultats (qui seront sujettes à modifications) sont écrites en français.

GENOTOXIC *ESCHERICHIA COLI* COLONIZING NEWBORNS AT BIRTH INDUCES PROFOUND MODIFICATIONS OF THE INTESTINAL EPITHELIUM AT ADULTHOOD.

Delphine Payros^{1,2,3,4,5}, Maïwenn Olier^{1,2,3,4,5}, Thomas Secher^{1,3,4,5}, Michèle Boury^{1,3,4,5}, Gabriel Cuevas^{1,3,4,5}, Patricia Martin^{1,3,4,5}, Camille Mayeur⁶, Claude Watrin^{1,3,4,5}, Christel Salvador-Cartier², Philippe Langella⁶, Pascale Plaisancié⁷, Jean-Philippe Nougayrède^{1,3,4,5}, Jean Fioramonti², Eric Oswald^{1,3,4,5,8}

¹INRA, USC 1360, Toulouse, F-31300, France,

²INRA, UMR 1331 INRA/ENVT Toxalim, Toulouse, F-31027, France,

³INSERM, UMR1043, Toulouse, F-31300, France,

⁴CNRS, UMR 5282, Toulouse, F-31400, France,

⁵Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse, F-31400, France,

⁶NRA, UMR1319 Micalis, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France.

⁷INSERM U. 1060, Université Lyon1, INRA 1235Lyon, F-69100, France,

⁸CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de bactériologie-Hygiène, Toulouse, F-31059, France.

SUMMARY (149 words)

Genotoxic *Escherichia coli* strains can be present in infant gut microbiota. To analyze the short- and long-term effects of early exposition to these genotoxic bacteria, we developed an animal model that mimics the natural transmission of *E. coli* from mothers to newborns. Genotoxic and non-genotoxic *E. coli* strains fed to pregnant rats were equally transmitted to the offspring and stably colonized the gut. When genotoxic *E. coli* strains were present in the early gut microbiota, DNA-damages were detected in the enterocytes of newborns but not in animals more than four weeks old. In contrast, signs of genotoxic stress such as anaphasic bridges, higher cell proliferation, apoptosis, accelerated epithelial cells migration and higher number of crypt fissions were observed at adulthood. Our findings illustrate how renewal of the mature epithelium depends on neonate gut residents and how critical are the characteristics of the first *E. coli* strain colonizing the newborn.

INTRODUCTION

Jusqu'à la naissance, le tractus GI de l'enfant est stérile et se colonise rapidement par un grand nombre d'espèces bactériennes (plus de 1000) [101]. Quelques mois après la naissance le microbiote se complexifie et atteint un état relatif d'équilibre à la fin de la première année de la vie [116]. Les premières souches bactériennes à coloniser le tractus des nouveau-nés proviennent de l'environnement proche du nourrisson (personnel et matériel médical) et plus particulièrement du microbiote intestinal et vaginal de la mère [114, 122, 295]. Hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'Homme et des animaux à sang chaud, *Escherichia coli* (*E. coli*) s'établit dans le tractus digestif dès les premières heures ou jours qui suivent la naissance. *E. coli* est alors une des espèces bactériennes dominantes de la flore du nouveau-né (10^9 cfu/gramme de fèces) avant de devenir la bactérie aérobie facultative prédominante au sein du microbiote adulte [116, 236, 250]. De plus, les *E. coli* appartenant au groupe phylogénétique B2 sont en recrudescence dans les populations des pays développés [235, 236]. Ce groupe phylogénétique B2 représente plus de 50% des souches de *E. coli* isolées chez le jeune enfant [238-240, 283]. Les souches B2 de *E. coli* sont généralement des hôtes naturels du tractus GI [235, 236] mais peuvent acquérir des déterminants spécifiques leur permettant de persister dans le microbiote des enfants [239, 283].

Plus de 30% d'entre elles portent un îlot génomique appelé *pks* [270]. L'îlot *pks* code pour une machinerie de synthèse NRPS-PKS qui permet la synthèse d'un composé hybride polycétide-peptides non ribosomiaux, la Colibactine. L'infection transitoire *in vitro* de cellules de mammifères avec des souches de *E. coli* portant l'îlot *pks* induit des dommages double-brins à l'ADN avec la formation de foyers H2AX phosphorylée [270, 286]. Récemment, il a été montré que l'infection *in vivo* dans un modèle d'anses ligaturées avec des souches génotoxiques de *E. coli* induisait des dommages à l'ADN dans les entérocytes murins contrairement à l'infection par une souche mutée de *E. coli* non-génotoxique [286]). De plus, une seule exposition faible des cellules à des *E. coli* génotoxiques avec des m.o.i faibles induit des dommages transitoires de l'ADN suivi par une réparation incomplète de l'ADN et conduisant à l'apparition de ponts anaphasiques et d'anormalités chromosomiques dans les cellules en division [286].

La prévalence des souches de *E. coli* portant l'îlot *pks* dans le microbiote intestinal humain a été analysée dans de nombreuses études épidémiologiques. Plus de 34% des souches commensales de *E. coli* du groupe phylogénétique B2 isolées de fèces adultes portent dans leur génome l'îlot *pks* [270]. Chez les très jeunes enfants, plus de 30% portent au moins une souche de *E. coli pks+* dans leur microbiote fécal à trois jours. La persistance de souches bactériennes résidentes dans le tractus GI du nouveau-né est actuellement peu connue et l'exposition précoce de l'épithélium intestinal à ces souches génotoxiques sur le développement intestinal n'a jamais été étudiée.

Afin d'analyser les effets à long terme de la colonisation précoce des nouveau-nés par des souches de *E. coli* génotoxiques, nous avons développé un modèle animal expérimental qui mime la transmission naturelle des *E. coli* du microbiote de la mère au nouveau-né. Pour cela, des femelles rats gestantes sont gavées avec une souche commensale humaine génotoxique (*E. coli* WT), son mutant isogénique non génotoxique (*E. coli ΔclbA*) ou le mutant complété (*E. coli ΔclbA+clbA*) pour lequel la production de la Colibactine a été restaurée. Après la naissance, la transmission des souches bactériennes et la persistance de la colonisation chez les nouveau-nés ont été évaluées. En parallèle, les dommages à l'ADN occasionnés par ces souches sur l'épithélium intestinal ont été comparés sur une période de 100 jours.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial Strains, Mutagenesis Procedures and Growth Conditions

Bacterial strains used in this study are listed in **Table S1**. The commensal *Escherichia coli* strain M1/5 kindly provided by U. Dobrindt (Universität Münster, Germany) was isolated from the stools of a healthy human volunteer and maintained in laboratories with minimal genetic manipulation. M1/5 strain belongs to the B2 phylogenetic group and harbors the *pks*-island, but none of the known virulence genes was detected. To investigate the potential role of Colibactin production *in vivo*, we generated chromosomal isogenic mutants of *E. coli* M1/5 by using the lambda Red recombinase method[296]. Procedures, primers and templates used for directed-mutagenesis and resultant mutants are presented in the **Supplemental Experimental Procedures** and **Table S1**, respectively. Before oral administrations, all *E. coli* strains were grown 6h in LB broth supplemented with antibiotics as appropriate at 37°C with shaking. These cultures were diluted 1:100 in LB broth without antibiotics overnight at 37°C with shaking. Bacterial pellets from these overnight cultures were resuspended in sterile PBS to the appropriate concentration (10^9 cfu/ml).

Experimental animal model

Primiparous timed-pregnant Wistar female rats were purchased (Janvier, St Berthevin, France) on gestational day 15 (E15 = embryonic day 15) and housed separately in an animal facility licensed by the French Ministry of Agriculture (agreement no. B 31.555. 13). All animal experiments were carried out in compliance with the European legislation on care and use of laboratory animals and reviewed by the regional ethics committee on animal experiment (Région Midi-Pyrénées; MP/03/62/11/11). Pregnant females were housed with free access to a breeding diet (RM1) and tap water and streptomycin was added in drinking water (5g/L) until parturition. Pregnant females were inoculated twice with PBS or 10^9 bacteria by intragastric gavages at E16 and E20. The day of birth was assigned at day 0. Neonatal gut bacterial colonization was followed as described thereafter. Body weight, gut development and maturation of offspring were specifically monitored from birth to weaning

(D2 to D28) or long time after weaning (D100) when gut maturation was completed (**Figure 1A**).

Follow up of colonic bacterial load

Sampling of caecum and colon of pups was required to follow and numerate maternally transmitted *E. coli* strains until postnatal day 15. After D15, levels of fecal maternally transmitted *E. coli* strains were assessed weekly. Organs or faeces homogenates were prepared in saline solution. Ten-fold serial dilutions were plated on MacConkey's medium supplemented with appropriate antibiotics. Plates were incubated at 37°C overnight.

***In vivo* γ -H2AX immunofluorescence**

Intestine or colon samples were placed immediately in optimum cutting temperature (OCT) compound and snap-frozen in liquid nitrogen. Gamma-irradiated newborn rats (0.5- or 2-Gy ^{137}Cs whole-body irradiation) were used as positive controls for DNA damage. Frozen sections (5 μm) were fixed in 4% formaldehyde, permeabilized with PBS-0,25% TritonX100, then blocked with PBS-0.1% Tween20-5% normal gut serum (NGS), stained and analyzed as described above in the **Supplemental Experimental Procedures**. Confocal aperture was set to achieve a z optical thickness of $\sim 0.5\ \mu\text{m}$ for foci quantification and $\sim 0.26\ \mu\text{m}$ for γ -H2AX foci localization analysis. At least 5 random fields have been analyzed to evaluate the number of H2AX-positive cells on the total number of intestinal epithelial cells.

Histology and immunohistochemistry

Intestinal and colon samples were collected, fixed with 4% paraformaldehyde for 24 hours, dehydrated and embedded in paraffin according to standard histological procedures. Sections (5 μm) were mounted on SuperFrost® Plus Slides then dewaxed in a xylene bath for 10 minutes and rehydrated in graded alcohol baths. For immunohistochemistry, endogenous peroxidase activity was quenched with 5% H_2O_2 in PBS (or methanol) and washed twice in PBS baths. Antigen retrieval was performed by heating section in 10mM sodium citrate (pH

6.0) for 10 min. Non specific binding sites were blocked with incubation in 2.5% normal goat serum (blocking solution) for 1 hour at room temperature (RT). To analyze intestinal cell proliferation, sections were incubated with primary antibody anti-PCNA (Proliferating Cellular Nuclear Antigen, 1/1000e, Santa Cruz) for 1 hour at RT in PBS with 2.5% BSA and then the immune reaction was detected by incubating for 30 min with IMPRESS reagent (Kit anti-mouse IMPRESS reagent, Vector laboratory) or incubated with anti phospho-Histone3 (1/50e, Cell signalling) overnight at 4°C in blocking solution. The immune reaction was detected by incubating for 30 min at RT with biotin secondary antibody followed by ABC complex for 30 min (Vectastain, Vector laboratory). In all cases, stainings were developed with DAB substrate (Vector Labs, brown precipitate) and Hematoxylin QS counterstained was used (Vector Labs). After dehydration, sections were mounted in Vectamount (Vector Labs) and images were acquired with a Leica DMRB fluorescence microscope or Nikon Eclipse 90i and analyzed with NIS Elements AR program.

Cell proliferation was analyzed by assessing the number of mitotic cells (phospho-H3-positive cells), proliferative cells (PCNA-positive cells) per crypt axis (25 to 50 crypts were analyzed per sections). All slides were analyzed by a two independent investigators who were blinded for the treatment. Crypt fission was measured on at least 100 well-oriented crypts per section. Anaphase bridges positive cells were determined on the total number of mitotic cells. For this purpose, 1-3 sections were analyzed per rat. All analyses were performed using NIS Elements-AR Image J software.

Cell death analysis

Cell death was quantified by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated tetramethylrhodamine-dUTP (TMR-dUTP) nicked labelling (TUNEL kit, Roche) on frozen sections of intestine and colon that have been fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with PBS-0.1% Triton X100-0.1% Sodium citrate. DNA was labeled with TO-PRO-3 (Invitrogen). Images were acquired with an Olympus IX70 laser scanning confocal microscope with the Fluoview software FV500. Confocal aperture was set to achieve a z optical thickness of $\sim 0.5 \mu\text{m}$ for foci quantification and $\sim 0.26 \mu\text{m}$ for foci localization analysis. Scoring (0-4) was based on the number of TUNEL-positive cells in

intestinal epithelium. 0= no TUNEL-positive cells; 1= < 5 TUNEL-positive cells; 2= 5 to 10 TUNEL-positive cells; 3= 11 to 40 TUNEL-positive cells; 4= > 41 TUNEL-positive cells.

Cell migration

100 days-old rats per group were sacrificed at 12, 24, and 48 hours after a single intraperitoneal 5-bromo-2'-deoxyuridine injection (BrdU; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; 50mg/kg body weight in saline solution). Intestinal sections were subjected to BrdU IHC (1/200, abcam ab6326).

To assess migration rates in intestines harvested between 12h and 48h after BrdU injection, locations of the foremost (12h and 24h) and least progressed (48h) BrdU-labeled enterocytes were recorded as the percent of epithelial cell positions between the crypt-villus boundary (0%) and villus tip (100%) in at least 10 well-oriented crypt-villus units per intestinal segment. All analyses were performed using NIS Elements-AR Image J software.

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 5.0d. The mean \pm standard error (SEM) is shown in figures, and p values were calculated using a one-way or two-way ANOVA followed by a Bonferroni post test unless otherwise stated. For gut colonization, CFU per gram of faeces or tissues were log transformed for the analysis. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant and is denoted by *. $p < 0.01$ is denoted by ** and $p < 0.001$ by ***.

RESULTS

Genotoxic and non-genotoxic commensal *E. coli* strains are equally transmitted from rat mother to their offspring and stably colonized the gut at adulthood in an asymptomatic way.

The *pks* island is present in commensal *E. coli* strains isolated from the stools of healthy humans. Strain M1/5 has been isolated from a healthy volunteer (**Supplementary Table 1**). To generate a non-genotoxic isogenic mutant of *E. coli* M1/5, we disrupted *clbA*, a gene localized on the *pks* island, which was previously shown to encode for an essential phosphopantetheinyl transferase [270]. Whereas the M1/5 wild-type (*E. coli* WT) strain was able to induce megalocytosis (**Supplementary Figure 1A**) and inflict high levels of DNA double strand breaks to cultured HeLa cells (**Supplementary Figure 1B**), the isogenic M1/5 $\Delta clbA$ mutant (*E. coli* $\Delta clbA$) was unable to induce such damage. The genotoxicity was restored in the complemented strain (*E. coli* $\Delta clbA+clbA$).

In order to investigate the effects of this commensal genotoxic *E. coli* strain and its isogenic mutants on the gut epithelium, we established an experimental animal model mimicking the early colonization of newborns by the *E. coli* strains from mother' microbiota (**Figure 1A**). Pregnant Wistar rats were first fed either with M1/5 wild-type (*E. coli* WT), its isogenic non-genotoxic derivative mutant (*E. coli* $\Delta clbA$) or the complemented strain (*E. coli* $\Delta clbA+clbA$) for which genotoxicity has been restored. Offspring from mothers which have been given Phosphate Buffer Saline (PBS) during late pregnancy was used as control. Orally administrated *E. coli* strains during late pregnancy represented during the perinatal period the main *Enterobacteriaceae* species in mothers' fecal microbiota and reached around 10^9 cfu per gramme of faeces whatever the strain (**Supplementary figure 2A**). The spontaneous transmission of these *E. coli* strains to the offspring was followed during the first two weeks of the postnatal period (**Figure 1B**). The three strains were equally detected two days after birth and represented the predominant bacterial species among the *Enterobacteriaceae* present in the gut of newborns (**Supplementary figure 2B**). FISH analysis confirmed that *E. coli* was one of the main bacterial species present in distal ileum lumen but also in close contact with the epithelial cells (**Supplementary figure 3**).

Colonization of faeces by the these three maternally acquired *E. coli* strains persisted throughout the animals' life (**Figure 1C**). For the three *E. coli* strains, we observed a

reduction of fecal counts from Day 21 to 35 which was not the consequence of the weaning of the pups (Day 28) but very likely the normal competition with strict anaerobes. At adulthood, the fecal *E. coli* strains levels (around 10^6 cfu/g faeces) were the same whatever the strain and in the same order of magnitude to those observed in adult human microbiota [114, 116]. The *E. coli* strains fed to mothers were systematically the predominant *Enterobacteria* species present in the offsprings' intestinal microbiota (**Supplementary figure 2B**). Analysis of the microbiota by quantification of the major phyla using real time PCR showed no significant differences between adult animals colonized since birth with genotoxic or non-genotoxic *E. coli* strains (**Supplementary figure 4A**). Health and body weight gain of offsprings were also followed and indicated that commensal *E. coli* strains, producing or not the genotoxin, colonized animals gut in a completely asymptomatic manner, without alteration of the body weight (**Supplementary figure 4B**).

Genotoxic *E. coli* strains maternally acquired at birth exacerbate DNA damage in intestinal epithelial cells of newborns.

We have previously shown that genotoxic *E. coli* strains massively and directly inoculated within mouse intestinal loops are able to induced DNA double-strand breaks (DSBs) in enterocytes 6 hours after infection [286]. We wondered if *E. coli* strains maternally acquired at birth are genotoxic to the enterocytes of newborns. The S139-phosphorylation of histone H2AX (γ H2AX), a sensitive marker of DSBs, was assessed by immunofluorescence in intestinal epithelial cells at different time-points after birth. From day two to day eight, significant higher numbers of γ H2AX-positive cells were systematically observed in the gut of newborns exposed to *E. coli* WT or *E. coli* $\Delta clbA+clbA$ as compared to newborn's gut exposed to the isogenic mutant, *E. coli* $\Delta clbA$ or in control animals (**Figure 2A and 2B**). During this first week of life, the γ H2AX signal observed in the gut of animals colonized at birth with wild-type *E. coli* strains was similar to the one observed in 0.5 Gy-irradiated animals (**Supplementary Figure 5**). Once pups reached around eight-days old, signal progressively decreased, and was no more detected in older animals at day twenty-eight and in adult animals at day one hundred. Thus, colonization of newborns with commensal genotoxic *E. coli* strains increased DSBs in the enterocytes of young pups, but phosphorylation of histone H2AX was no longer observed at adulthood.

Early colonization of the gut by genotoxic *E. coli* is associated with increased epithelial cell proliferation without change in crypt depth.

To address additional consequences on gut development and morphology of early exposition to genotoxic *E. coli* strains, epithelium proliferation rates were compared in young and old animals colonized since birth with genotoxic or non-genotoxic *E. coli* strains. Mucosal proliferation was determined by both immunohistochemical staining of phosphorylated histone H3, a marker of mitotic cells and of proliferative cell nuclear antigen (PCNA), a marker of the replicative S-phase of cell cycle in the crypt compartment (**Figure 3A**). This revealed that the number of mitotic cells significantly increased from day 15 to day 100 in the small intestine and colon of animals exposed to the genotoxic *E. coli* strains *E. coli* WT and *E. coli* $\Delta clbA+clbA$. In contrast, proliferation rates in the gut epithelium of rats primary colonized with the isogenic mutant *E. coli* $\Delta clbA$ were similar to those observed in control rats (**Figure 3C and 3D**). The increased number of mitotic cells was associated with a similar increased number of PCNA-positive cells in the adult animals colonized with genotoxic *E. coli* strains since birth, suggesting an expansion of the crypt progenitor cell compartment in these animals (**Figure 3B**). As crypt expansion can reflect hyperplasia of the proliferating compartment, crypt depth was measured all along the gut compartments of animals colonized since birth with genotoxic or non-genotoxic *E. coli* strains. As shown in **Supplementary figure 6**, crypt depth was not affected by the genotype of the *E. coli* strains.

Rats stably colonized by genotoxic *E. coli* at birth have increased rates of intestinal epithelial cell apoptosis.

A higher pool of proliferating cells within the crypt progenitor cell compartment without modification of the crypt morphology prompted us to quantify the number of apoptotic cells in the small intestine and in the colon. Apoptosis rates were determined by detecting DNA fragmentation by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) in cells along the gut of animals (**Figure 4A**). Very few apoptotic cells were detected in the young animals (8- and 15-days old animals) colonized with genotoxic or non-genotoxic *E. coli* strains. However, in 28- and 100-days old animals, significantly more apoptosis was observed in animals colonized with genotoxic *E. coli* strains as compared to animals colonized with the non-genotoxic strain or control animals (**Figure 4B and 4C**).

Early colonization of the gut with genotoxic *E. coli* led to an increased epithelium renewal in the intestine at adulthood.

In order to investigate whether the increase of both proliferation and apoptosis in the crypt compartment of animals colonized with genotoxic *E. coli* strains could have an impact on intestinal epithelial cell turnover, we monitored the enterocytes migration along the crypt-villus axis. To analyse the intestinal epithelial cells renewal, we quantified enterocyte motility *in vivo* by labelling dividing cells with bromodeoxyuridine (BrdUrd) at different times after a single injection. BrdU was incorporated into enterocyte nuclei at the bottom of the crypt and remained with cells during their transit to the villus tips. Because proliferation and apoptosis were similar in the small intestine and the colon, only BrdU-labelled enterocytes in the duodenum were analyzed for the enterocytes progression within the crypt-villus axis (**Figure 5A**). This revealed that the front of migration for the BrdU-positive cells at 12 and 24h after BrdU injection was significantly higher in animals colonized with genotoxic *E. coli* strains as compared to control animals or animals colonized with non-genotoxic *E. coli* (**Figure 5B and 5C**). Moreover, 48h after BrdU injection, enterocytes progressed more rapidly along the crypt-villus axis in animals colonized with genotoxic *E. coli* strains as compared to control animals or animals colonized with non-genotoxic *E. coli* (**Figure 5D**). These functional assays indicate that genotoxic *E. coli*, present since birth in the gut, modulate intestinal epithelium renewal in adult animals.

Rats stably colonized by genotoxic *E. coli* at birth have colonic cells with signs of increased chromosomal instability at adulthood.

Although no DNA damage was observed at adulthood, we wondered whether we could detect consequences of the genotoxic stress induced by the bacteria during the first week of life. Since misrepaired DSBs can induce chromosome fusions resulting in anaphase bridging [289, 297], we explored occurrence of these events in different segments of the adult gut epithelium in animals colonized since birth by genotoxic or non-genotoxic *E. coli* strains (**Figure 6A**). Interestingly, the number of anaphase bridges was significantly higher in the colon of 100-days old animals colonized since birth with genotoxic *E. coli* (**Figure 6C**). A similar trend, although not statistically significant, was observed in the small intestine (**Figure 6B**). Thus, our findings revealed that primary colonization with commensal genotoxic *E. coli* strains induced DSBs in the enterocytes of newborns, whereas no DNA damage longer were

observed at adulthood. Nevertheless, at adulthood, DNA damage has been revealed by the presence of anaphases bridging in intestinal epithelial cells in animals colonized by genotoxic *E. coli* strains. The formation of anaphase bridges or nucleoplasmic bridges is the initiating event that leads to breakage-fusion-bridge cycles, which is a key driver of chromosomal instability in cells [297].

Rats stably colonized by genotoxic *E. coli* at birth have an abnormal number of crypt fission at adulthood.

Furthermore, bifurcating crypts were observed with two flask-shaped based joining in a single unit at the top of the crypt (**Figure 7A**). These features are characteristic of crypt fission, which is a mechanism whereby intestinal crypts divide [298]. The number of crypt fission is higher in the gut throughout the three first postnatal weeks and then decreases with the animal age [299]. As expected, in young animals at day 8 and day 15 the percent of crypt fission was high but no difference was observed between all the groups. However, in older animals, at day 28 and day 100, the number of bifurcating crypts in the small intestine was significantly higher in animals colonized with genotoxic *E. coli* strain as compared to control animal or animals colonized with non-genotoxic *E. coli* (**Figure 7B et 7C**).

FIGURES

Figure 1. Genotoxic and Non-genotoxic *E. coli* Strains are Equally Transmitted from Rat Mother to Their Offspring.

Figure 2. Genotoxicity of *E. coli* Strains Maternally Acquired at Birth Exacerbates DNA Damage in Intestinal Epithelial Cells.

Figure 3. Early Colonization of the Gut by Genotoxic *E. coli* Result in the Increase of Epithelial Cell Proliferation.

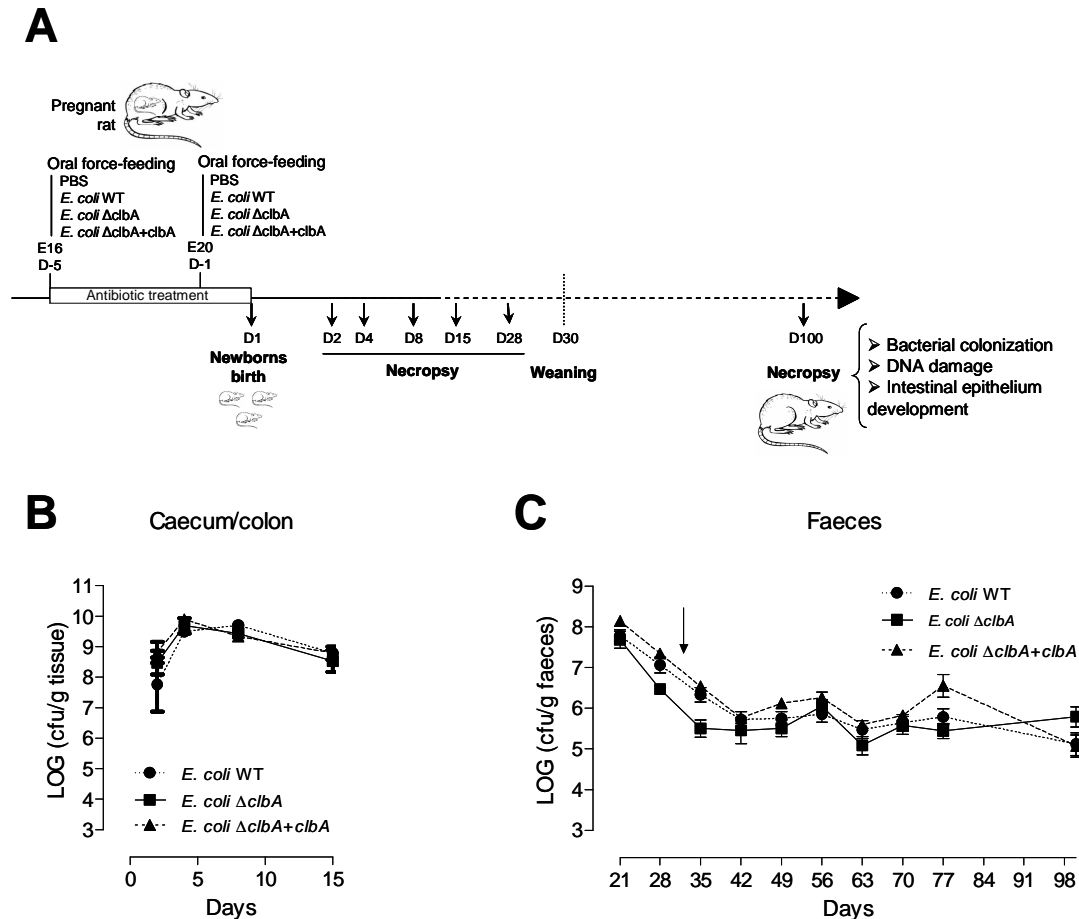
Figure 4. Early Colonization of the Gut with Genotoxic *E. coli* Strains Increases Apoptosis.

Figure 5. Early Colonization of the Gut with Genotoxic *E. coli* Increases Intestinal Epithelial Cells Migration in Duodenum.

Figure 6. Rats Stably Colonized by Genotoxic *E. coli* Strains at Birth have an Increased Number of Anaphase Bridges in Colonic Cells at Adulthood.

Figure 7. Early Colonization of the Gut with Genotoxic *E. coli* Increases Crypt Fission.

Figure 1. Genotoxic and Non-genotoxic *E. coli* Strains are Equally Transmitted from Rat Mother to Their Offspring.

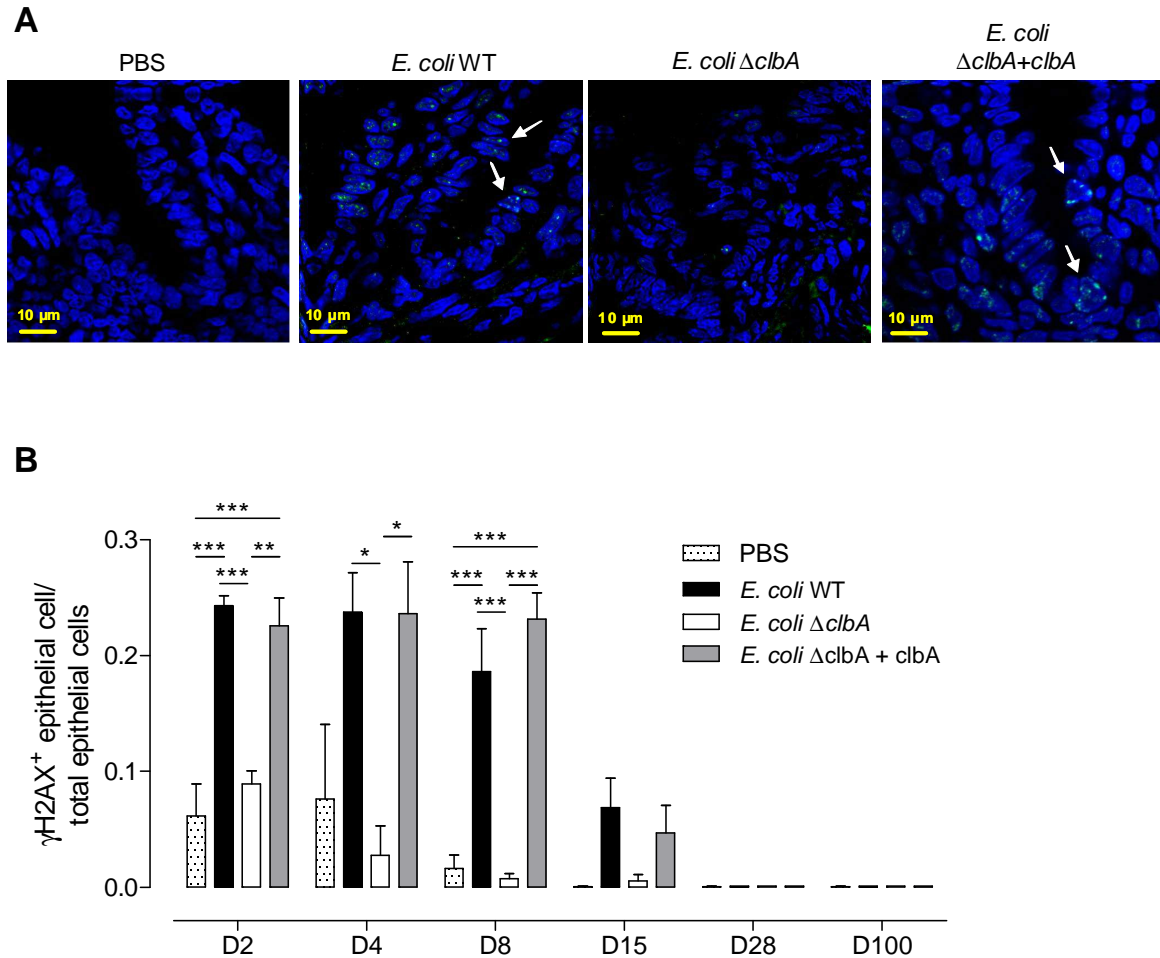


(A) Experimental design of animal model mimicking long-lasting colonization of the gut with maternally transmitted commensal *E. coli* strains from birth to adulthood. Pregnant rats (E16 = embryonic day 16) received antibiotic treatment (streptomycin, 5g/L) in drinking water until parturition and were orally inoculated at E16 and E20 with 10^9 CFU/mL with PBS, *E. coli* WT, *E. coli* $\Delta clbA$ or *E. coli* $\Delta clbA+clbA$. Newborns were sacrificed at D2, D4, D8, D15, D28 and D100 of life.

(B) Neonatal gut colonization counts of *E. coli* WT, *E. coli* $\Delta clbA$ or *E. coli* $\Delta clbA+clbA$ at the indicated times after birth.

(C) Fecal counts of *E. coli* WT, *E. coli* $\Delta clbA$ or *E. coli* $\Delta clbA+clbA$ in rats at the indicated times after birth. Weaning was highlighted with a black arrow. Data are representative for five independent experiments performed with as last 3 pregnant rats per group and analyses were performed on pups (3-5 rats at D2 and D4; 7-12 rats at D8; 8-11 rats at D15; 15-20 rats at D21-D100). Mean values \pm SEM are shown. See also Figure S1, S2

Figure 2. Genotoxicity of Commensal *E. coli* Strains Maternally Acquired at Birth Exacerbates DNA Damage in Intestinal Epithelial Cells

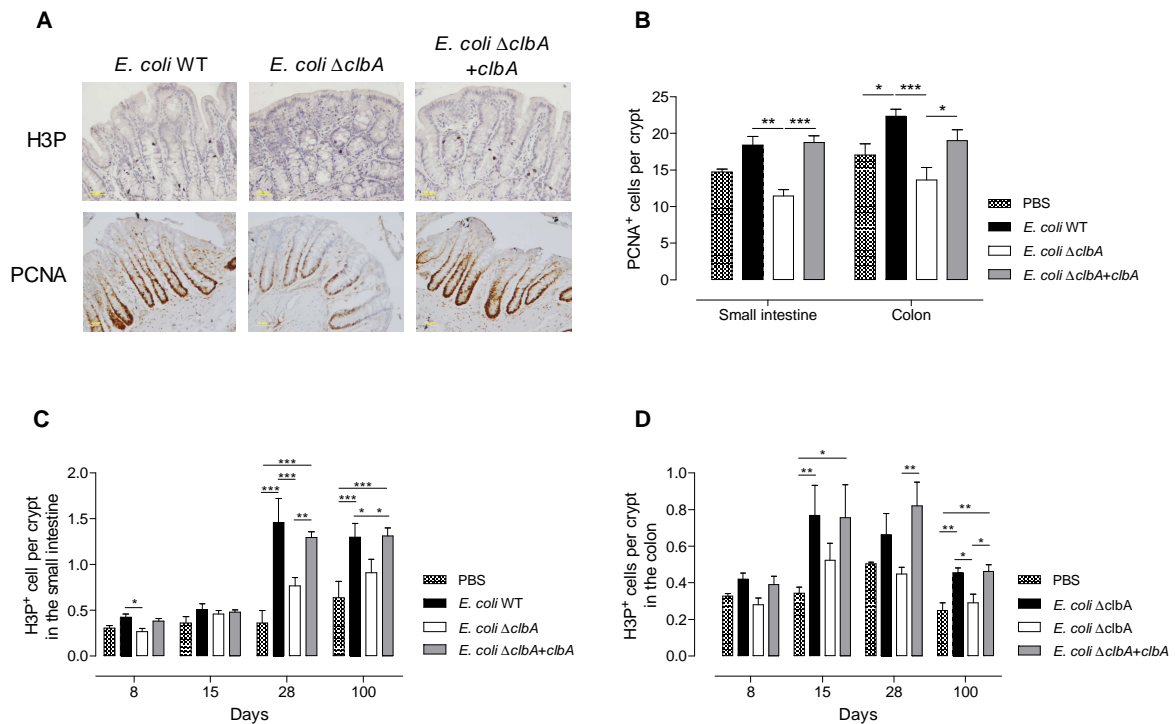


Immunofluorescence analysis of intestinal epithelium of offspring early colonized with maternally transmitted commensal *E. coli* WT, *E. coli* $\Delta clbA$, *E. coli* $\Delta clbA+clbA$ or control animals where mothers were treated with PBS at the indicated times after birth.

(A) Representative small intestine frozen sections at day 4. DNA was stained in blue and γ H2AX foci in green (white arrows). Small intestine frozen sections from gamma-irradiated mice (whole-body, 2Gy) were used as positive controls. Scale bars represent 10 μ m.

(B) Quantitative analysis of γ H2AX-positive epithelial cells. Pooled data from two independent experiments performed with groups of 3-5 rats are represented and are expressed as the mean \pm SEM. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$. Magnitude used for photomicrographs: x60.

Figure 3. Early Colonization of the Gut with Genotoxic *E. coli* Results in the Increase of Intestinal Epithelial Cells Proliferation



Histological analysis showing two proliferative markers in gut sections of 100 days-old animals colonized with genotoxic *E. coli* WT, *E. coli* Δ *clbA*+*clbA*, or non-genotoxic *E. coli* Δ *clbA* maternally acquired at birth. Offspring from mothers treated with PBS were used as control.

(A) Representative colon sections showing mitotic cells stained with phospho-H3 antibody and proliferative cells stained with PCNA antibody.

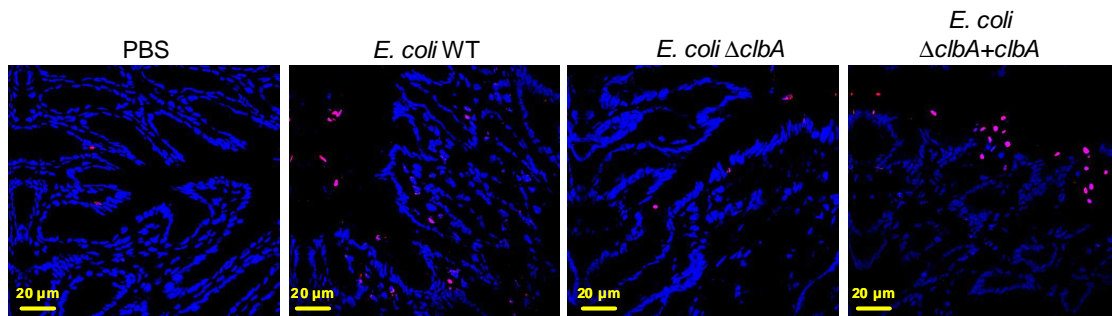
(B) Quantitative analysis of PCNA-positive cells per crypt-axis in the small intestine and in the colon in 100 days-old animals.

(C-D) Quantitative analysis of phospho-H3-positive cells per crypt axis in the small intestine (C) and in the colon (D).

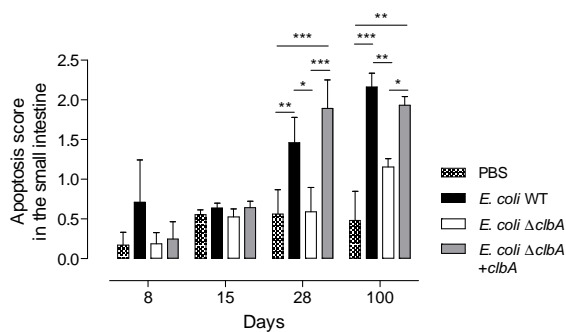
Pooled data from three independent experiments performed with groups of 4-10 rats are represented and are expressed as mean \pm SEM. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$. Magnitude used for photomicrographs: $\times 20$.

Figure 4. Early Colonization of the Gut with Genotoxic *E. coli* Strains Increases Apoptosis

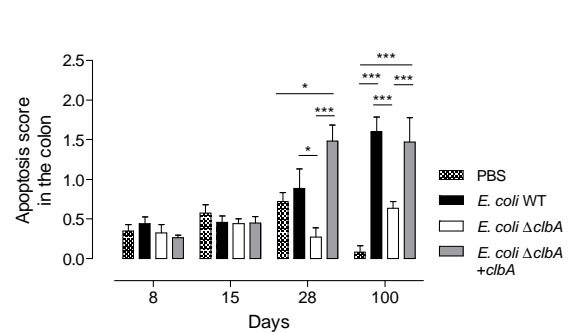
A



B



C

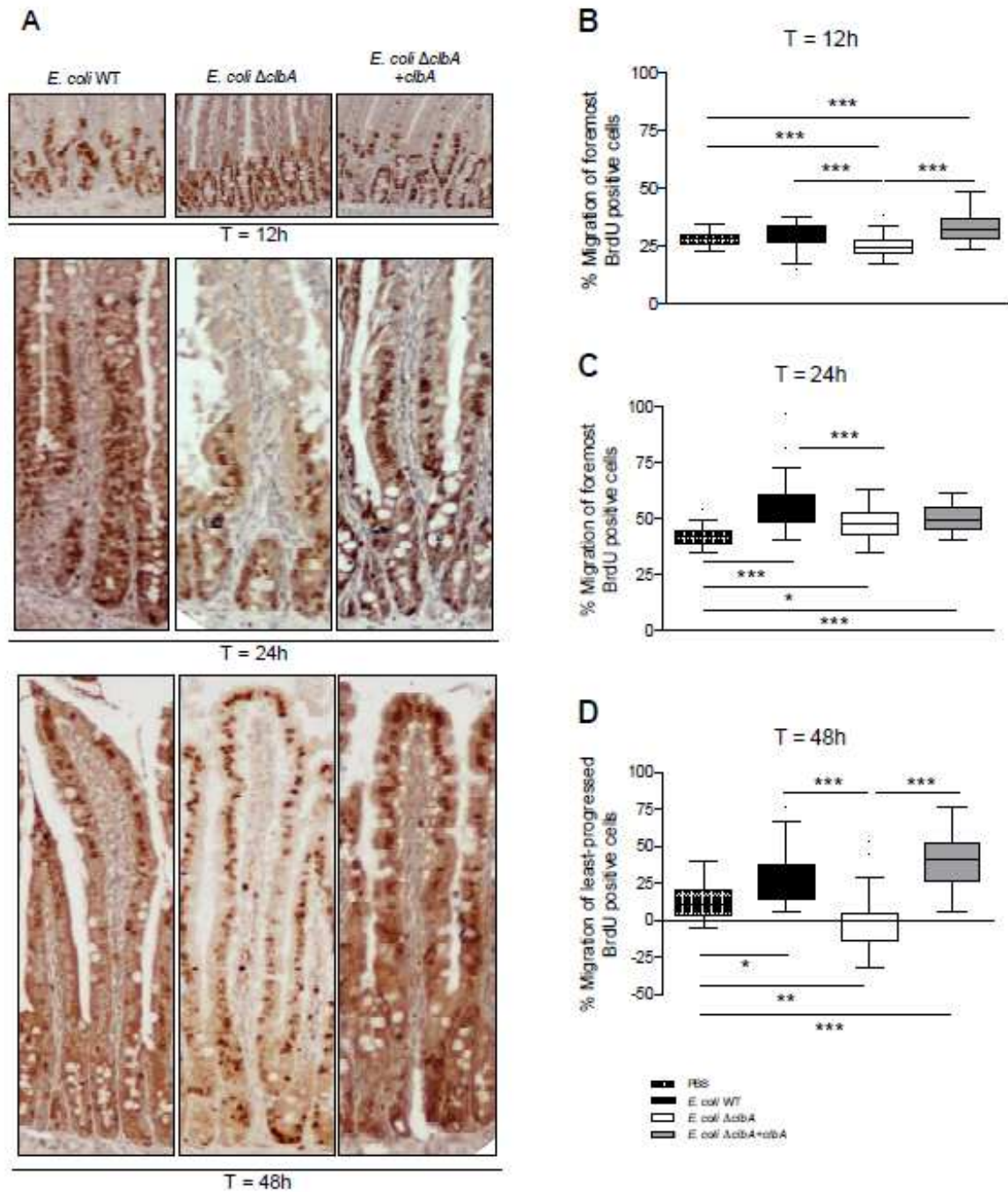


TUNEL assay (red, A) showing apoptotic intestinal cells from unweaned animals (D8 to D28) and adult animals (D100) colonized with genotoxic *E. coli* WT, *E. coli* $\Delta clbA + clbA$ or non-genotoxic *E. coli* $\Delta clbA$ maternally acquired at birth. Offspring from mothers treated with PBS were used as control.

(A) Representative frozen colonic sections from 100 days-old rats. DNA was stained in blue (Dapi) and apoptotic cells in red (TUNEL). Scale bars represent 20 μ m.

(B-C) Quantitative analysis of labeled apoptotic cells (*see* Experimental procedures) in the small intestine (B) and in the colon (C). Pooled data from two independent experiments performed with groups of 3-5 rats are represented and are expressed as mean \pm SEM. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$.

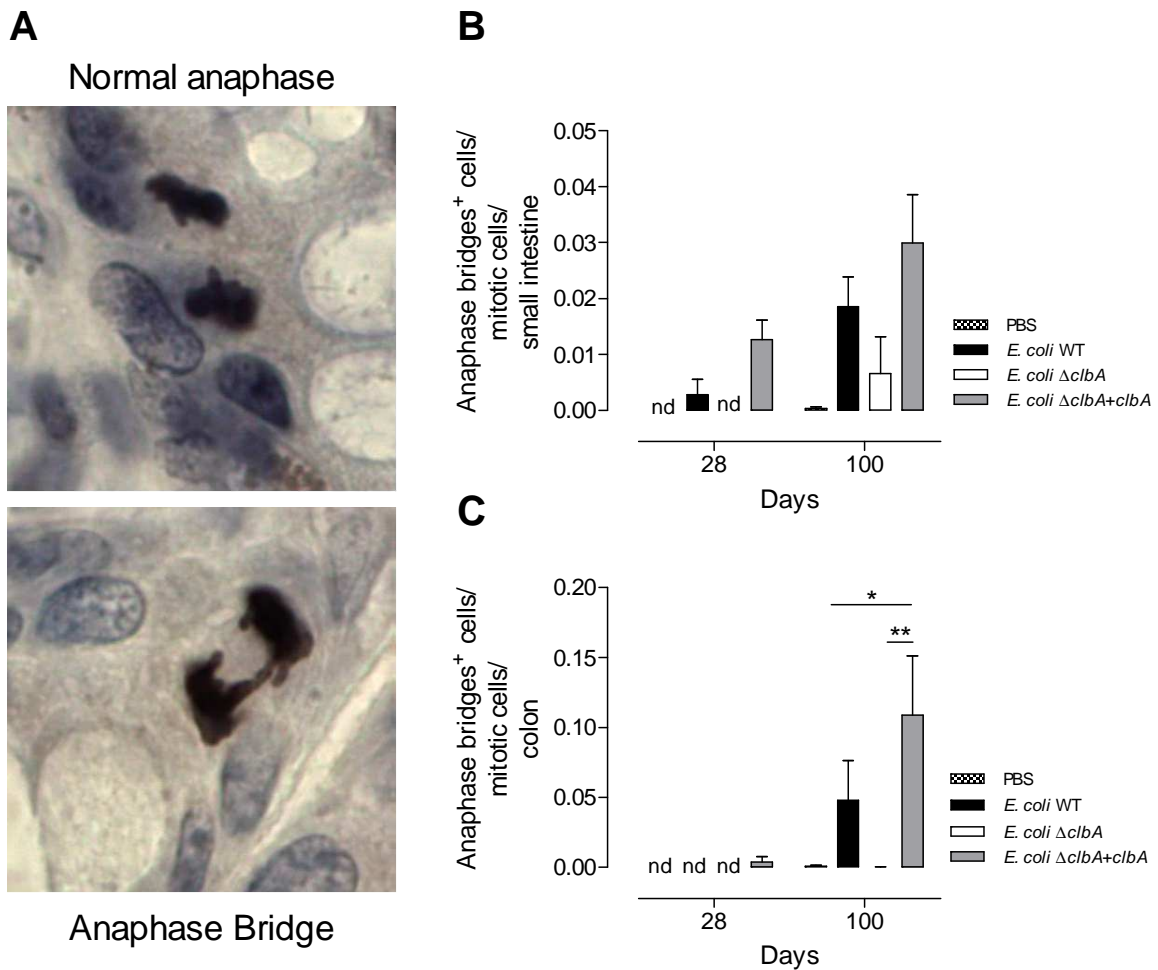
Figure 5. Early Colonization of the Gut with Genotoxic *E. coli* Increases Intestinal Epithelial Cells Migration in Duodenum at Adulthood



(A) BrdU staining of representative duodenal sections from 100 days-old rats receiving a single BrdU injection to quantify cell migration at 12h, 24h and 48h after BrdU injection. Gut of animals was colonized with genotoxic *E. coli* WT, *E. coli* $\Delta clbA + clbA$ or non-genotoxic *E. coli* $\Delta clbA$ maternally acquired at birth. Offspring from mothers treated with PBS were used as control. Magnitude used for photomicrographs: x10.

(B-D) Quantitative analysis of BrdU-positive enterocytes in the duodenum sections from 100 days-old rats treated as described in A. Graphs show mean \pm SEM position of foremost (B and C) and least-progressed (D) BrdU-positive enterocytes at 12h, 24h and 48h after BrdU injection. Experiment was performed with groups of 3-4 rats and results represented are expressed as mean \pm SEM. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$.

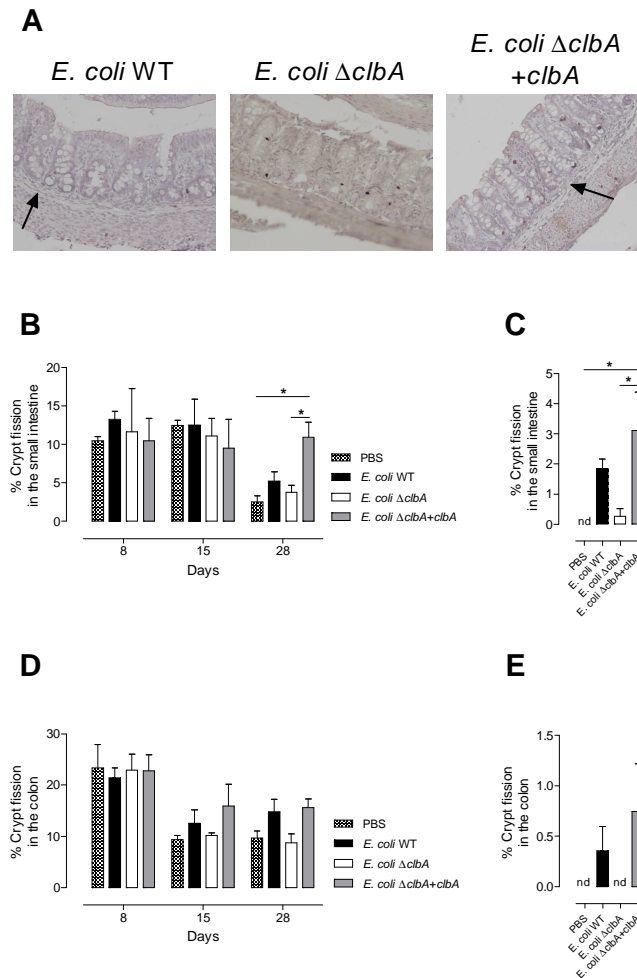
Figure 6. Early Colonization of the Gut with Genotoxic *E. coli* Strains Increases Anaphase Bridges in Adult Rats.



(A) Representative distal colonic sections stained with phospho-H3 antibody showing one normal anaphasic cell and one anaphase bridge from 100 days-old rats colonized as described in A.

(B-C) Quantitative histological analysis of anaphasic bridges in mitotic cells (normalized to total mitotic cells) in the small intestine (B) and in the colon (C) at day 28 and day 100. Pooled data from 2 independent experiments performed with groups of 5-10 rats are represented and are expressed as mean \pm SEM. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. Magnitude used for photomicrographs: x100

Figure 7. Early Colonization of the Gut with Genotoxic *E. coli* Increases Crypt Fission.



(A) Representative H&E-stained distal colonic sections showing crypt morphology of 28 days-old rats colonized with genotoxic *E. coli* WT, *E. coli* Δ *clbA*+*clbA* or non-genotoxic *E. coli* Δ *clbA* maternally acquired at birth. Black arrows show crypt fission. Magnitude used for photomicrographs: x20.

(B-E) Quantitative histological analysis of fissioning crypts (%) in the small intestine (B-C) and in the colon (D-E) of unweaned animals (D8 to D28) and adult animals (D100) (C-D). Pooled data from two independent experiments performed with groups of 5-10 rats are represented and are expressed as mean \pm SEM. * $p \leq 0.01$.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

This file includes:

Supplemental Experimental Procedures

Table S1

Figs. S1 to S6

Supplemental References

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial Strains, Mutagenesis Procedures and Growth Conditions

Construction of the M1/5 WT streptomycin resistant mutant. A natural K42R mutation is found in ribosomal protein S12 of *E. coli* MC1400 strain and confers high-level resistance to streptomycin. MC1400 *rpsL* gene was amplified using primer IHAP JPN99 and IHAP JPN100 and the PCR product was transformed by electroporation into *E. coli* M1/5 containing the lambda Red recombinase expression plasmid pKD46. After electroporation, streptomycin resistance was used to force mother's colonization by M1/5 and as a counter-selectable marker for quantification of all M1/5 isogenic strains from fecal contents. *E. coli* M1/5 *rpsL* K42R, *pks*-island positive was then named *E. coli* WT.

Construction of the E. coli ΔclbA mutant. Mutation in *clbA* coding for phosphopantetheinyl transferase was sufficient to abolish production of Colibactin (Nougayrede et al., 2006). The *clbA* gene from *E. coli* WT was replaced with a kanamycin resistance cassette, which was amplified from plasmid pKD4 using PCR with primers IHAP JPN44 and IHAP JPN45 (Nougayrede et al., 2006). Kanamycin resistance cassette was also used as a second selectable marker to detect this mutant by plating dilutions of fecal suspension. This mutant was noted *E. coli* Δ*clbA*.

Complementation of E. coli ΔclbA mutant. To answer of molecular Koch's postulate, a fragment consisting of the tetA promoteur and the *clbA* operon, including its putative promoter was subcloned onto the BmgB1 restriction site of pKD3 and the resulting plasmid

(pKD3-clbRA; kindly provided by U. Dobrindt, Germany) was transformed into *E. coli* DH5 α . This fragment together with the chloramphenicol resistance cassette was amplified using primers clbA_compl and down1960_cat3 (U. Dobrindt, Germany) and transformed by electroporation into *E. coli* Δ clbA containing the lambda Red recombinase expression plasmid pKD46 as described above. Complemented mutants, named *E. coli* Δ clbA+clbA, were selected on LB agar with chloramphenicol.

Cell culture, *in vitro* infection and genotoxicity assay.

Non transformed rat intestinal epithelial IEC-6 cells (ATCC CRL-1592) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM GlutaMax; Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen), 80 μ g ml⁻¹ gentamicin, and bovine insulin (0.1 unit ml⁻¹; Sigma) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. IEC-6 (~75% confluent) were washed four times and incubated in infection medium based on DMEM supplemented with 25 mM HEPES and 10% FBS (Invitrogen). Bacteria were pregrown in infection medium to the midlogarithmic phase, and then the infection dose was calculated to a multiplicity of infection of 20 or 100 bacteria per cell. After a 4h infection at 37°C and 5% CO₂, the cells were washed and grown until analysis in cell culture medium supplemented with 200 μ g/ml gentamicin.

DNA double strand breaks were demonstrated by γ -H2AX immunofluorescence analysis 18hours post-infection. Mouse anti- γ H2AX (Millipore) was diluted 1:500 in blocking solution and incubated overnight at 4°C. FITC-conjugated goat anti mouse secondary antibody (Invitrogen) was diluted 1:100 in blocking solution and incubated for 1h. DNA was counterstained for 5min with TO-PRO-3 (Invitrogen). Slides were mounted in Vectashield containing DAPI (Vectorlabs). Images were acquired with an Olympus IX70 laser scanning confocal microscope, in sequential mode, with the Fluoview FV500 software. At least 15 random fields have been evaluated for γ H2AX foci counting under 60x apochromic objective.

Microbiota analysis

The DNA extracts from faecal samples of 21 human stools were prepared as described previously [300]. Faecal samples from four individual animals were collected for each of the four experimental groups and stored at -80°C immediately after sampling. Total cellular DNA was extracted from Furet *et al.*, [301]. TaqMan® qPCR was adapted to quantify total bacteria population in addition to the dominant bacterial species *C. coccoides*, *Bacteroidetes/Prevotella*. Quantitative PCR using SYBR-Green® was performed for the *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* group. See Furet *et al.*, [301]

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Whole intestines were fixed in Carnoy solution, dehydrated and embedded in paraffin according to standard histological procedures. Sections (5µm) were mounted on SuperFrost® Plus Slides then dewaxed in a xylene baths and rehydrated in graded alcohol baths. Slides were treated for 1h at 37°C with 1mg/mL lysozyme (Sigma-Aldrich) and hybridized for 1h30 at 45°C with 2 µM of the universal bacterial 16S ribosomal RNA specific (UniBac, Amann *et al.*, 1990) FAM-conjugated PNA probe (Eurogentec) and *E. coli* bacterial probe (Eco16S06). Slides were counterstained with DAPI (Sigma-Aldrich) and imaged at x60 with Nikon Eclipse 90i fluorescent microscope.

Crypt depth analysis

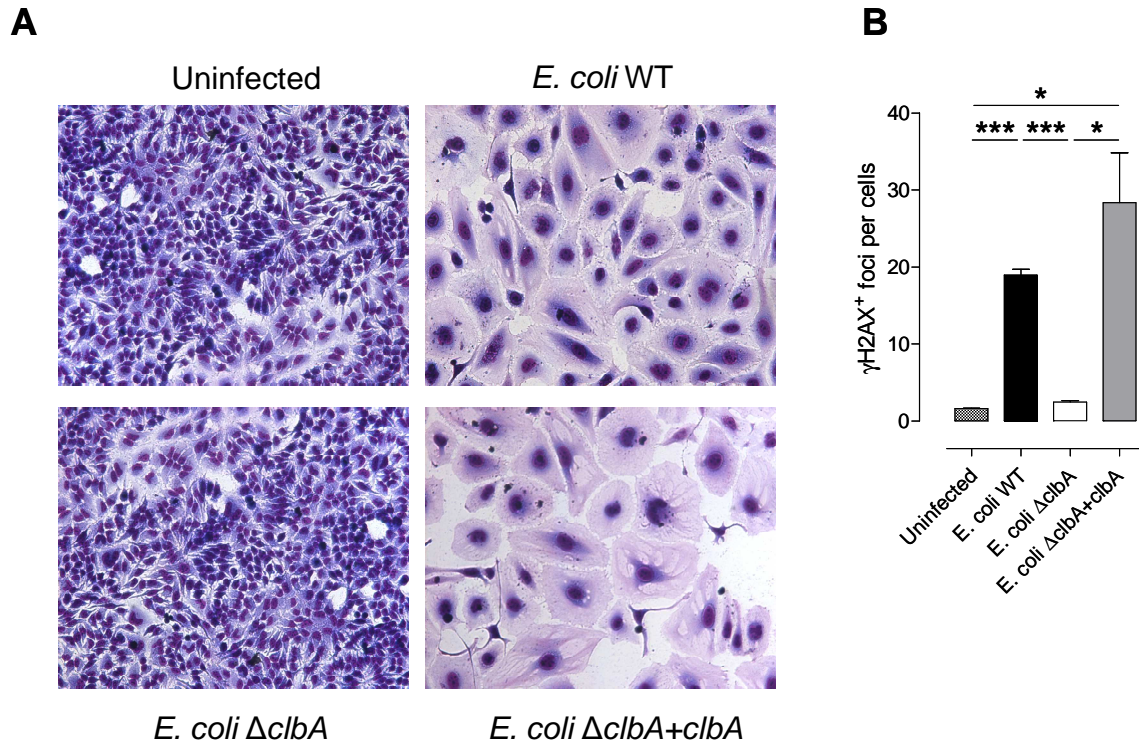
Representative H&E-stained distal colonic sections showing crypt morphology. To determine crypt depth, the perpendicular distance from the mucosal surface to the luminal surface of individual crypts was measured. Crypt fission was determined by measuring the number of crypts with bisecting fissure and a single luminal opening as previously described. Crypt depth was measured on at least 20 crypts per section.

SUPPLEMENTAL FIGURES

Supplementary Table 1. Bacterial Strains and Primers for Mutagenesis is Procedures

| Bacterial strains & plasmids used | Genotype and relevant characteristics |
|--|--|
| <i>Escherichia coli</i> M1/5 (U. Dobrindt, Germany) | O75:K5 |
| <i>Escherichia coli</i> K-12 MC4100 | rpsL K42R (genbank AF312716) streptomycin resistance |
| <i>E. coli</i> M1/5 strains generated by chromosomal directed-mutagenesis | |
| <i>E. coli</i> WT | rpsL K42R streptomycin resistance |
| <i>E. coli</i> Δ clbA | rpsL K42R, clbA::kan streptomycin & kanamycin resistance |
| <i>E. coli</i> Δ clbA+clbA | rpsL K42R, clbA::clbA-cat streptomycin & chloramphenicol resistance |
| Plasmids | |
| pkD46 | lambda red disruption system, temperature-sensitive replication of the plasmid |
| pkD4 | Tn5 neomycin phosphotranferase gene for generation of the kanamycin resistance cassette |
| pkD3-clbRA | clbA operon and chloramphenicol acetyltransferase gene for generation of the chloramphenicol resistance cassette |
| Targets and primers | |
| rpsL mutagenesis (K42R) | |
| IHAPJPN99 | ATGGCAACAGTTAACCCAGCTGG |
| IHAPJPN100 | TTAAGCCTTAGGACGCTTCACG |
| clbA mutagenesis | |
| IHAPJPN44 | GGACATACTAGTTTTTTCATCAAACCAGTAGAGATAAAGTTCCTTCACTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC |
| IHAPJPN45 | TTAGCTGATAGTCGTGGTGATAAAGTTGGGACTGCATAGGAAATAGCTCACATATGAATATCCTCCTTAG |
| clbA complementation | |
| clbA_compl | GGAATACGAATCACGCTATACACATTGCTAACAGGAATGAGATTATCTAAATGAGGATTGATATTAATTGG |
| down1960_cat3 | ATATGAAAATCAATATTATCGACGGCTCAGAAGTGTCTAGATTATCCGTGGCGATCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC |

Supplementary Figure 1. Wild-Type and Complemented M1/5 *E. coli* Strain Induced DNA Double-Strand Breaks in Epithelial Cells In Vitro



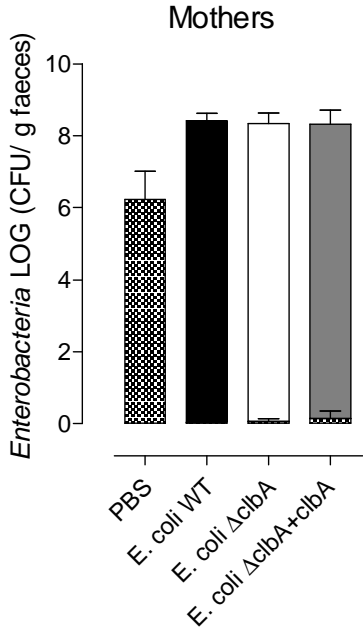
(A) Live commensal *E. coli* M1/5 strain or *E. coli* M1/5 $\Delta clbA$ or the complemented strain *E. coli* $\Delta clbA+clbA$ was added directly onto HeLa cells, cocultured for 4 hours, then washed. The cells were incubated for 72 h with gentamicin before staining with Giemsa. Scale bars 100 μ m.

(B) Quantitative analysis of γ H2AX-positive foci per cells. Pooled data from two independent experiments performed on at least thirty cells. Results are expressed as mean \pm SEM. * $p \leq 0.05$ and *** $p \leq 0.001$.

Supplementary figure 2. Levels of *Enterobacteriaceae* in faeces samples of pregnant rats and their offspring.

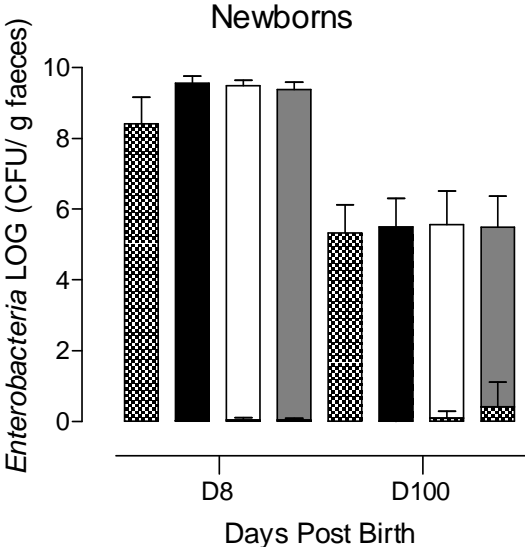
A

- ▨ fecal indigenous *Enterobacteria*
 - fecal *E.coli* WT resulting from two oral gavages
 - fecal *E.coli* $\Delta clbA$ resulting from two oral gavages
 - fecal *E.coli* $\Delta clbA+clbA$ resulting from two oral gavages
- isolated from microbiota of mothers before birth



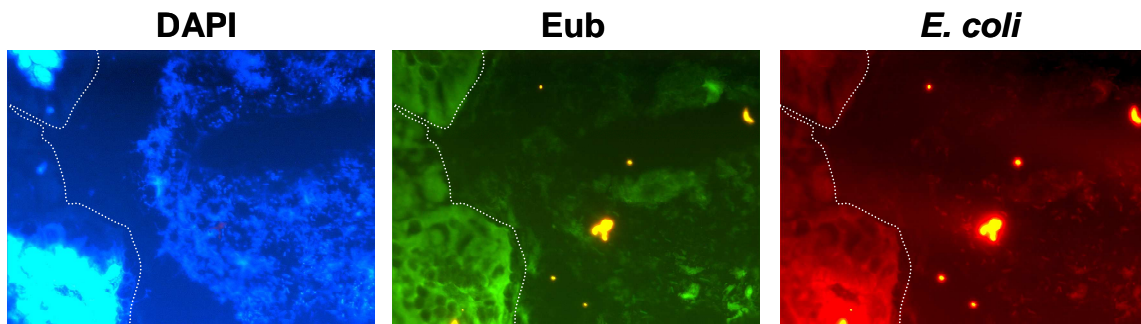
B

- ▨ fecal indigenous *Enterobacteria*
 - fecal *E.coli* WT
 - fecal *E.coli* $\Delta clbA$
 - fecal *E.coli* $\Delta clbA+clbA$
- isolated from microbiota of newborns after birth



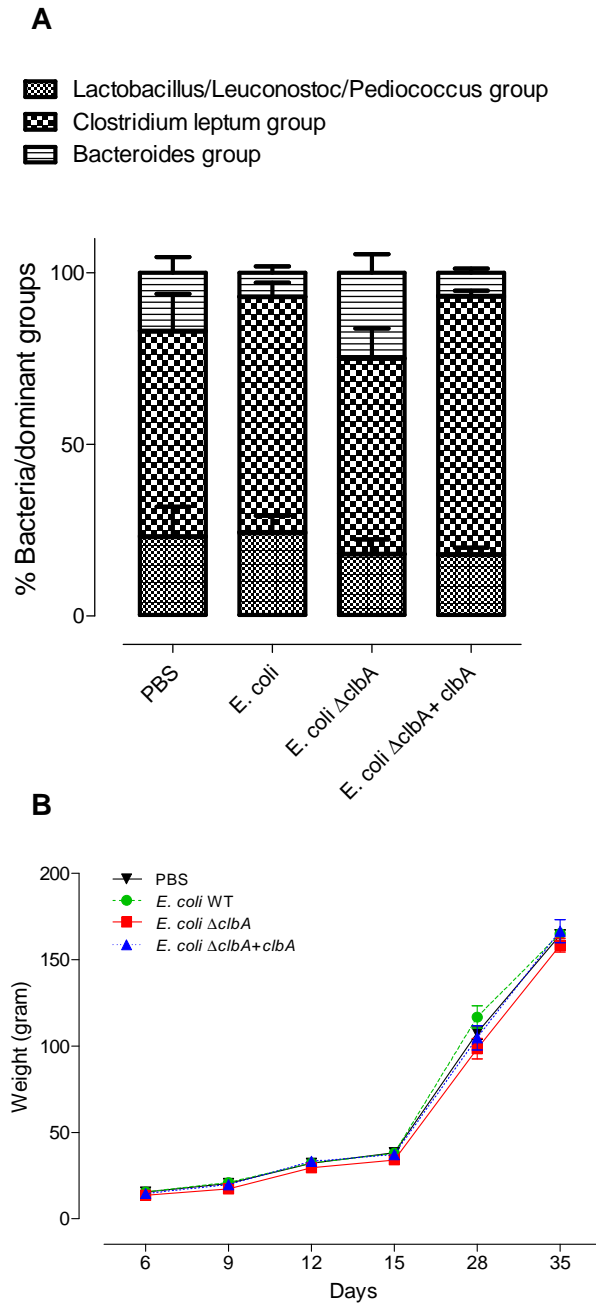
(A) Total *Enterobacteriaceae* and the colonization levels of *E. coli* WT, *E. coli* $\Delta clbA$ or *E. coli* $\Delta clbA+clbA$ levels were estimated from faeces collected from pregnant females before birth of their offspring. The quantity of indigenous *Enterobacteriaceae* and the colonization levels of *E. coli* strains from each group were estimated separately by serial dilution plating of fecal suspensions on Mac Conkey agar (total *Enterobacteriaceae*) and on Mac Conkey agar supplemented with streptomycin or streptomycin + kanamycin or streptomycin + chloramphenicol for selection of *E. coli* WT, *E. coli* $\Delta clbA$ or *E. coli* $\Delta clbA+clbA$ respectively. Colonization levels (n=6-11, Mean, SEM) are represented as Log (CFU/g faeces) from three pooled independent experiments. Two-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test.

(B) Total *Enterobacteriaceae* and the colonization levels of *E. coli* WT, *E. coli* $\Delta clbA$ or *E. coli* $\Delta clbA+clbA$ levels were estimated from faeces collected from newborns throughout the course of experiment (describe in Fig. 1A) at day 8 and 100 after birth. Colonization levels (n=14-32, Mean, SEM) are represented as Log (CFU/g faeces) from three pooled independent experiments. Two-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test.

Supplementary Figure 3. Bacterial localisation in the intestine in 8 days-old animals.

Bacteria shown in the distal ileum of 8 days old animals with universal bacterial 16S ribosomal RNA specific (UniBac, Amann *et al.*, 1990) FAM-conjugated PNA probe (Eurogentec) and *E. coli* bacterial probe (Eco16S06). Magnitude used for photomicrographs: x40.

Supplementary Figure 4. Early Colonization with Genotoxic Commensal *E. coli* Strains did not Impact on Body Weight and Microbiata Diversity.

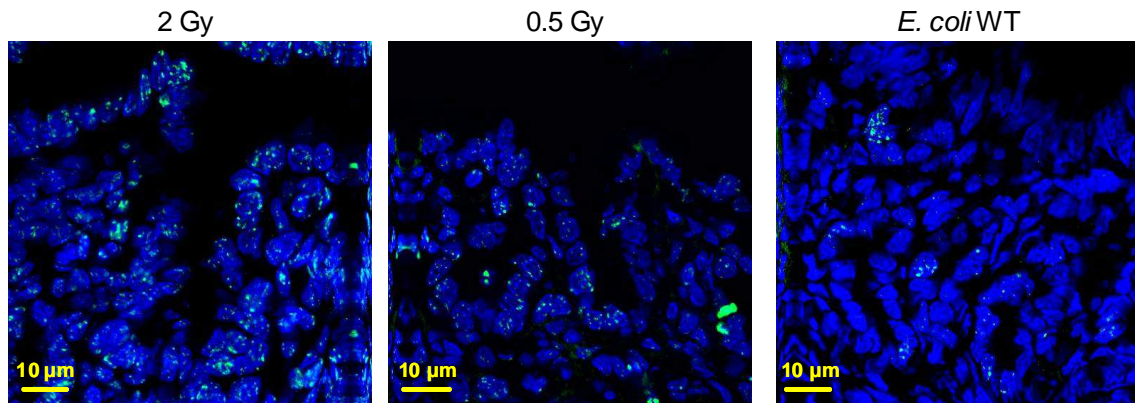


(A) Microbiota diversity represented by three major groups of bacteria: *Bacteroidetes*, *Clostridium leptum*, *Lactobacillus*...

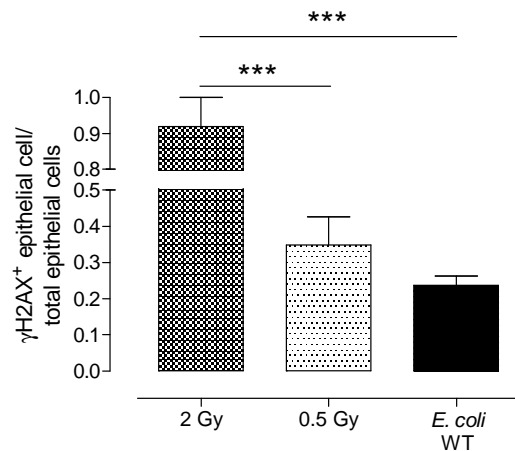
(B) Body weight in gram of control newborns or newborns colonized at birth with *E. coli* WT, *E. coli* $\Delta clbA$ or *E. coli* $\Delta clbA + clbA$ in six days-old to 35 days-old.

Supplementary Figure 4. Genotoxicity of Commensal *E. coli* Strains Maternally Acquired at Birth Mimics DNA Damage in Intestinal Epithelial Cells observed in 0.5 Gy irradiated animals.

A



B

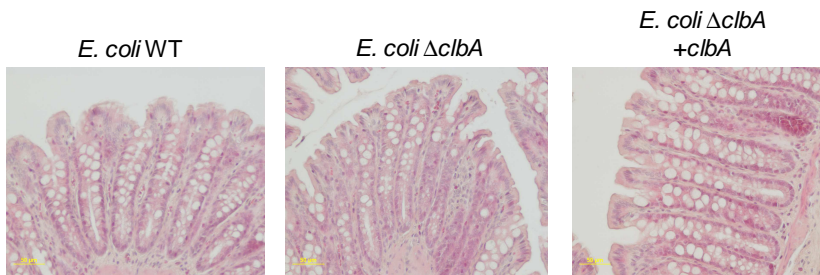


(A) Representative colon frozen sections at day 4. DNA was stained in blue and γ H2AX foci in green (white arrows). Colon frozen sections from gamma-irradiated mice (whole-body, 2 Gy or 0.5 Gy) were used as positive controls. Scale bars represent 10 μ m.

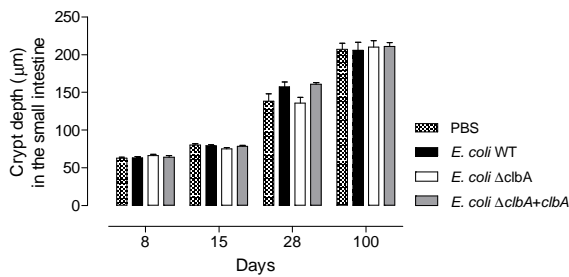
(B) Quantitative analysis of γ H2AX-positive epithelial cells. Pooled data from two independent experiments performed with groups of 3-5 rats are represented and are expressed as the mean \pm SEM. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$. Magnitude used for photomicrographs: x60.

Supplementary Figure 6. Crypt Depth was not Modified by Early Colonization of the Gut with Genotoxic *E. coli* Strains.

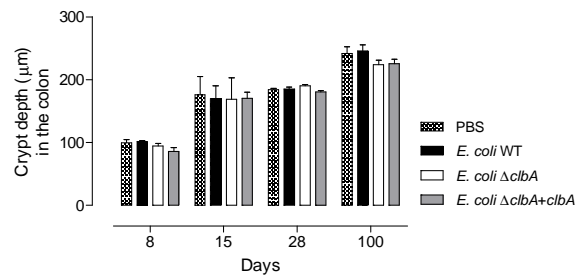
A



B



C



Histological analysis showing crypt depth in gut sections of 100 days-old animals colonized with genotoxic *E. coli* WT, *E. coli* $\Delta clbA$, or non-genotoxic *E. coli* $\Delta clbA+clbA$ maternally acquired at birth. Offspring from mothers treated with PBS were used as control.

(A) Representative H&E-stained distal colonic sections showing crypt morphology in young animals (8-, 15- and 28-days old) and in adult animals (100-days old).

(B-C) Quantitative histological analysis of crypt depth (μm) in the small intestine (B) and in the colon (C). Pooled data from two independent experiments performed with groups of 5-10 rats are represented and are expressed as mean \pm SEM.

DISCUSSION

Grâce à cette étude, nous avons pu développer un modèle expérimental original de colonisation naturelle des nouveau-nés qui mime les premières étapes de transmission et de colonisation des souches bactériennes retrouvées entre la mère et le nouveau-né. Ce modèle nous a permis d'analyser le rôle de la Colibactine dans les étapes de transmission et de persistance de souches de *E. coli* commensales dans le tractus digestif. Les résultats obtenus dans cette étude montre que la production de la Colibactine n'influence ni la transmission ni le maintien de la colonisation par des souches de *E. coli* chez l'animal. Cependant, nous pouvons nous interroger sur le rôle joué par la Colibactine pour la bactérie ? La Colibactine est un composé hybride de polycétides-peptides non ribosomal formé à partir d'une machinerie complexe codée par l'îlot génomique *pks* [270]. Les NRPS et PKS sont des systèmes de synthèse qui produisent de nombreuses molécules pharmacologiques comme les antibiotiques [302]. Nous pouvons donc, dans le cadre de la Colibactine, nous demander si elle pourrait agir comme une molécule antibiotique pour le microbiote commensal. Les premiers résultats préliminaires obtenus sur l'analyse du microbiote intestinal ne semblent pas mettre en évidence un rôle majeur de la Colibactine comme facteur antibiotique.

Dans le cadre de cette étude nous avons pu mettre en évidence pour la première fois l'implication de *E. coli* génotoxiques commensales sur le développement de l'épithélium intestinal de la naissance à l'âge adulte. La colonisation naturelle des animaux par des *E. coli* commensales génotoxiques est capable d'augmenter le nombre de dommages à l'ADN dans les noyaux des entérocytes chez le nouveau-né mais pas à l'âge adulte. L'accessibilité des bactéries génotoxiques aux CEIs, le niveau de colonisation des animaux par les *E. coli* et la maturation de l'épithélium intestinal avec un gel de mucus formé pourrait expliquer l'absence de dommages de l'ADN à l'âge adulte. D'autre part, une augmentation de la prolifération cellulaire, du nombre de cryptes en bifurcation et des cycles BFB chez les animaux adultes colonisés depuis la naissance avec des souches de *E. coli* génotoxiques a été observée. L'augmentation de ces différents paramètres suggère un rôle des souches de *E. coli* dans la cancérogenèse colorectale. De plus, l'équipe a montré que les souches porteuses de l'îlot *pks* étaient capables *in vitro* d'induire une instabilité génétique associée à une augmentation des mutations, mécanismes entrant dans le développement de la cancérogenèse colorectale. Jobin *et al.*, ont récemment mis en évidence dans un modèle artificiel utilisant des animaux axéniques l'association entre l'inflammation chronique de l'intestin et la présence de souches

de *E. coli* génotoxiques dans le CRC [286, 303]. Cependant, l'augmentation de l'apoptose corrélée avec l'augmentation de la migration des entérocytes le long de l'axe crypte-villosité, observées chez les mêmes animaux nous fait penser que la présence de souches génotoxiques de *E. coli* depuis la naissance n'est peut être pas suffisante pour induire le développement du CRC. En revanche, cela pourrait traduire un défaut de fonctionnement de la barrière intestinale et suggère que les souches de *E. coli* génotoxiques seraient impliquées dans le maintien de l'intégrité intestinale.

Ces premiers résultats ont permis de mettre en évidence que l'acquisition à la naissance de souches de *E. coli* génotoxiques et leur persistance dans le tractus digestif tout le long de la vie de l'animal seraient impliquées dans la réponse induite aux dommages à l'ADN et le développement de l'épithélium intestinal.

ETUDE 2 : LE RÔLE DE LA COLIBACTINE DANS LA DIFFÉRENCIATION EPITHÉLIALE ET L'INTÉGRITÉ DE LA BARRIÈRE INTESTINALE

*Dans cette seconde étude nous avons voulu savoir si les effets génotoxiques des souches de *E. coli* pks+ observés chez le nouveau-né et si l'augmentation de la prolifération, de l'apoptose et de la migration des entérocytes influençait la différenciation épithéliale et la fonction de barrière de la muqueuse intestinale.*

*Pour cela, des travaux préliminaires sur d'une part le rôle de la Colibactine sur la différenciation des CEIs et d'autre part sur l'intégrité de la barrière ont été réalisés en utilisant le mode expérimental ci-dessus où les animaux sont colonisés depuis la naissance par des souches de *E. coli* génotoxiques ou non.*

Ils vous sont présentés ci-après.

LA COLONISATION DES NOUVEAU-NÉS PAR DES *ESHERICHIA COLI* GENOTOXIQUES ALTERE LA DIFFÉRENCIATION ÉPITHÉLIALE ET AUGMENTE LA PERMEABILITÉ PARACELLULAIRE.

Payros Delphine, Secher Thomas, Boury Michèle, Menard Sandrine, Salvador-Cartier Christel, Plaisancie Pascale, Theodorou Vassilia, Oswald Eric, Olier Maïwenn

INTRODUCTION

L'épithélium intestinal est formé d'une monocouche cellulaire caractérisée par son renouvellement constant. Les cellules souches pluripotentes, situées au fond des cryptes, se divisent pour donner naissance à une population transitoire hautement proliférative qui se différencie en cellules absorbatives (les entérocytes) ou en cellules sécrétoires : les cellules à mucus, les cellules de Paneth et les cellules entéroendocrines. La différenciation cellulaire est conduite par l'expression ou non de différents facteurs géniques au niveau des cellules progénitrices (Données Bibliographiques - Chapitre I – Figure 6)[4]. De plus, l'épithélium intestinal est à l'interface entre l'environnement extérieur et l'organisme et interagit de manière étroite avec le microbiote intestinal afin de former une barrière physique efficace vis-à-vis de l'environnement extérieur (agressions pathogènes ou xénobiotiques...) [304]. Cependant, le rôle du microbiote ne se limite pas à son effet barrière et influence la différenciation et la maturation de l'épithélium intestinal de l'hôte [176, 177, 181, 182, 305] [184] [306].

Précédemment, nous avons pu mettre en évidence, dans un modèle original de transmission naturelle de souches commensales de *E. coli* de la mère au nouveau-né, une augmentation à la fois des dommages à l'ADN dans les entérocytes et une augmentation de la prolifération ainsi que de la migration cellulaire le long de l'axe crypte-villosités chez les animaux colonisés depuis la naissance par des souches de *E. coli* génotoxiques. De plus, une augmentation de l'apoptose a aussi été décrite chez les animaux adultes colonisés avec la souche de *E. coli* génotoxique. Sachant que le pool de cellules transitoires en prolifération situé dans les cryptes est une des cibles de *E. coli* génotoxiques et est à l'origine de la

différenciation cellulaire dans l'épithélium intestinal, nous pouvons nous demander si la Colibactine produites par les souches de *E. coli* colonisant le tractus GI depuis la naissance n'aurait pas un rôle dans la différenciation et la maturation de l'épithélium intestinal ?

Au cours de cette étude, nous allons tout d'abord essayer de caractériser l'impact de la colonisation précoce des animaux par des souches de *E. coli* génotoxiques sur la différenciation cellulaire des cellules à mucus, des cellules de Paneth et des cellules entéroendocrines chez les animaux adultes. Enfin, nous évaluerons le rôle de bactéries génotoxiques sur l'intégrité de la barrière intestinale en mesurant la perméabilité para- et transcellulaire chez les animaux colonisés de la naissance à l'âge adulte.

MATERIELS ET METHODES

Souches Bactériennes

Voir *Materials and Methods* (Résultats – Partie 1) p. 105 (Payros et al., en préparation)

Modèle expérimental

Les femelles rats gestantes (E15 = jour embryonnaire 15) reçoivent un traitement antibiotique (streptomycine, 5g/L) dans l'eau de boisson jusqu'à la naissance et sont gavées avec 10^9 bactéries à deux reprises (E16 et E20). Après la naissance, les animaux sont sacrifiés à des temps précoces (8, 15 et J28) et à l'âge adulte (100 jours) pour l'analyse de la perméabilité. La différenciation cellulaire est évaluée chez les animaux adultes (100 jours).

Voir *Materials and Methods* (Résultats – Partie 1) p. 88 (Payros et al., en préparation)

Histology and immunohistochemistry

Voir *Materials and Methods* (Résultats – Partie 1) p. 89 (Payros et al., en préparation)

L'analyse des cellules de mucus a été faite à l'aide de l'anticorps Muc2 (1/200, Santacruz). L'observation de la quantité de mucus présente dans l'épithélium intestinal a été réalisée à l'aide d'une coloration avec de l'acide périodique de Schiff à 0.5% pendant 7 min à température ambiante suivie d'un bain dans le réactif de Schiff pendant 15 min à l'obscurité à 4°C. La mesure de l'aire spécifique de marquage sur l'aire totale représentant la muqueuse épithéliale a été déterminée. L'analyse des cellules entéroendocrines a été réalisée par un marquage de la chromogranine A, (CgA, 1/500, Immunostar) et les cellules de Paneth avec un anticorps anti-lysozyme (1/100, Zymed).

PCR quantitative

L'extraction d'ARN a été réalisée à partir de tissus congelés et broyés dans du tampon RLT (Macherey-Nagel) en utilisant le kit de billes Precellys (CK-MIX beads ; Bertin Technologies). Les tubes sont centrifugés dans le Precellys® (Bertin technologies) à 6000 rpm pendant 2 fois 10 secondes avec un intervalle de 10 secondes. L'extraction des ARN est réalisée avec le kit d'extraction Macherey-Nagel. Les ARN (1 µg) sont traités avec de la DNase (Sigma) avant leur conversion en ADNc avec le kit de synthèse iScript cDNA kit (Biorad). Les PCR quantitatives sont réalisées avec le Supermix IQ SYBR Green (Biorad). Les réactions de qPCR sont faites avec l'appareil CFX96™ de Biorad. L'analyse de l'expression génique est normalisée à l'expression d'un gène de ménage Arp.

Perméabilité intestinale paracellulaire

Des fragments de duodénum sont montés en chambres de Ussing (Easy Mount, Physiologic Instruments) et l'aire de la surface exposée est de 0.1 cm². 1 mL de solution de Kreb's (Sigma) oxygénée est ajouté de chaque côté. Les paramètres électriques, incluant la différence de potentiel, l'intensité du courant (Isc) et la résistance électrique totale (R) sont enregistrés à intervalles réguliers pendant deux heures. La résistance transépithéliale (TER), un indicateur de la viabilité tissulaire et des échanges ioniques au niveau paracellulaire est exprimée en Ohm.cm².

Pour mesurer la perméabilité paracellulaire à de petites molécules, du dextran-FITC (4kDa) est ajouté dans le compartiment mucosal à une concentration finale de 2.2mg/mL et le

passage épithélial est analysé. La perméabilité épithéliale aux molécules de dextran-FITC est déterminée en mesurant l'intensité de fluorescence (FI) avec l'utilisation d'un automate, le TECAN.

Perméabilité transcellulaire

De la même manière, pour mesurer la perméabilité transcellulaire aux macromolécules, la protéine HRP («*Horseradish peroxidase*») est ajoutée dans le compartiment mucosal à une concentration finale de 0.4mg/mL. Son passage est analysé deux heures après. La perméabilité intestinale pour la HRP intacte est déterminée par un test enzymatique (Maehly *et al* Methods of biochemical analysis 1954) qui permet de mesurer l'activité de la HRP au TECAN.

RESULTATS

Effets de la colonisation néonatale par des souches génotoxiques sur la différenciation des cellules sécrétoires chez le rat adulte.

Dans un premier temps, nous avons voulu caractériser si la colonisation précoce des nouveau-nés par des souches génotoxiques de *E. coli* avait un impact sur la différenciation absorptive/sécrétoire des CEIs dans les tissus intestinaux (duodénum, côlon proximal et distal) adultes par mesure de l'expression génique de *rath1* (lignage sécrétoire) et *hes1* (lignage absorptif) en PCR quantitative (**Figure 1**). Les premiers résultats obtenus ne révèlent pas de différence significative de l'expression de *rath1* et *hes1* dans les différents groupes.

D'autre part, à ce stade de nos analyses, aucune différence dans la différenciation intestinale n'a été faite aux temps précoces que ce soit au niveau de l'intestin grêle ou du côlon (données non montrées).

La Colibactine n'influence pas la physiologie des cellules à mucus.

L'analyse du facteur de transcription *klf4* (**Figure 2A**), spécifique de la différenciation des cellules à mucus, ou l'analyse du nombre de cellules à mucus (**Figure 2B et 2C**) et de la quantité de mucus produite (**Figure 2C et 2D**) dans les différents tissus intestinaux à l'âge adulte ne révèlent aucune différence que ce soit chez les animaux colonisés avec une souche génotoxique ou non.

La Colibactine augmente le nombre de cellules de Paneth dans le duodénum.

La répartition des cellules de Paneth a été analysée dans l'intestin grêle des animaux adultes colonisés par une souche de *E. coli* génotoxique ou non à l'aide d'un marquage anti-lysozyme qui met en évidence les granules dans les cellules de Paneth (**Figure 3B**). Les résultats obtenus montrent un plus grand nombre de cellules de Paneth chez les animaux colonisés par une souche génotoxique à la fois dans le duodénum et l'iléum (**Figure 3A**). En revanche, l'analyse de l'expression génique du lysozyme suggère une diminution de son expression (non significative) dans le duodénum d'animaux colonisés par une *E. coli* produisant la Colibactine (**Figure 3C**).

La Colibactine augmente le nombre de cellules entéroendocrines à l'âge adulte.

La distribution des cellules entéroendocrines a été examinée à l'aide du marqueur pan-endocrine chromogranine A (CgA). Nous avons observé que les cellules entéroendocrines se retrouvent en plus grand nombre au niveau du duodénum chez les animaux adultes colonisés avec une souche de *E. coli* génotoxique (*E. coli* WT ou *E. coli* $\Delta clbA+clbA$) (**Figure 4A et 4B₁**). En plus de l'augmentation de leur nombre, la distribution des cellules positives pour la chromogranine A est altérée chez les animaux colonisés par les souches de *E. coli* génotoxiques. En effet, alors que les cellules entéroendocrines apparaissent classiquement séparément et non côte à côte, nous observons chez les animaux colonisés par les souches de *E. coli* WT et *E. coli* $\Delta clbA+clbA$ que les cellules entéroendocrines sont parfois clustérisées, suggérant une altération dans le processus de distribution des cellules sécrétoires différenciées (**Figure 4B₂**). Enfin, l'analyse génique de *Ngn3* et *Pdx1*, gènes impliqués dans la

différenciation des cellules entéroendocrines ne révèlent aucune différence entre les différents groupes (**Figure 4C**).

Effets de la colonisation néonatale par des *E. coli* génotoxiques sur la perméabilité intestinale de la naissance à l'âge adulte.

Nous avons précédemment observé chez les animaux adultes colonisés par des souches de *E. coli* génotoxique une augmentation à la fois de la prolifération cellulaire et de l'apoptose corrélée avec une augmentation de la migration cellulaire de l'axe crypte-villosité. Nous nous sommes demandé si cela ne pouvait pas avoir des conséquences sur l'intégrité de la barrière intestinale et plus précisément sur sa fonction ? Etant donné que les effets les plus marqués jusqu'ici ont été observés dans l'épithélium duodéal, nous avons choisi d'étudier la perméabilité sur ces tissus.

La colonisation néonatale des animaux par des souches de *E. coli* génotoxiques ou non n'impacte pas sur la perméabilité paracellulaire aux temps précoces (J8 et J15). En revanche, les résultats montrent une augmentation de la perméabilité paracellulaire (**Figure 5A**) à J28 et à J100 chez les animaux colonisés depuis la naissance par des souches de *E. coli* génotoxiques. Ce résultat est inversement corrélé avec l'observation d'une diminution de la résistance transépithéliale chez les mêmes animaux au même temps (**Figure 5B**).

Cependant, de manière intéressante, la colonisation intestinale des animaux par des souches génotoxiques de *E. coli* ne semble pas affectée la perméabilité transcellulaire que ce soit chez le jeune (D8 à D28) ou l'animal adulte (D100) (**Figure 6**).

DISCUSSION

L'effet de la colonisation précoce des nouveau-nés par des souches de *E. coli* génotoxiques sur la distribution des cellules sécrétoires, notamment les cellules de Paneth et les cellules entéroendocrines suggère que la Colibactine affecte l'équilibre entre les cellules absorbatives et les cellules sécrétoires. Cependant, nos résultats en PCR quantitative de l'expression des gènes *rath1* et *hes1* ne permet pas de mettre en évidence une différence entre les deux lignages au profit des cellules sécrétoires par exemple. Les données expérimentales

en qPCR auraient besoin d'être complétées en analysant plus précisément les mécanismes de différenciation mis en place après l'expansion des cellules transitoires en prolifération. En effet, nous pouvons envisager qu'à l'âge adulte (100 jours), moment de notre analyse, la signalisation génique liée à la différenciation des CEIs est terminée et que l'expression différentielle des facteurs de transcription se fait plus précocément.

Le rôle majeur des cellules entéroendocrines réside dans leur capacité à produire des hormones impliquées dans un grand nombre de processus physiologiques : la motilité, la sécrétion de l'eau et des ions, le métabolisme énergétique lors de la prise alimentaire. Ainsi, une augmentation de leur nombre pourrait avoir un rôle dans le métabolisme énergétique en favorisant la prise alimentaire. D'autre part, il existe plusieurs types de cellules entéroendocrines différentes, du fait de leur localisation dans le tissu intestinal ou de leur capacité à sécréter tel ou tel facteur. Au niveau intestinal, la caractérisation des cellules entérochromaffines majoritaires dans ce tissu ainsi que de leur capacité à sécréter de la sérotonine, un neurotransmetteur majeur impliqué dans la prise alimentaire pourrait nous permettre de mieux comprendre le rôle de ces cellules dans notre modèle.

Les cellules de Paneth produisent des peptides antimicrobiens (tels que le lysozyme, les défensines...) et sont ainsi impliquées dans le maintien de l'homéostasie intestinale [307]. Une augmentation du nombre de cellules de Paneth chez les animaux colonisés avec des souches génotoxiques suggère donc une meilleure capacité à lutter contre les agressions pathogènes et à maintenir l'homéostasie intestinale vis-à-vis du microbiote commensal [295]. Or, inversement nous avons observé une tendance à la diminution de l'expression du lysozyme dans les cellules de Paneth duodénales pouvant au contraire révéler un défaut des cellules de Paneth à produire des agents antimicrobiens. En effet, Martinez-Rodriguez *et al.*, ont montré récemment que l'infection par *Salmonella enterica* (sérotype *Typhimurium*) induit l'expansion des cellules de Paneth tout en diminuant le nombre de granules et l'expression de lysozyme dans la réponse à une infection pathogène suggérant un défaut fonctionnel des cellules de Paneth [308].

Enfin, l'augmentation de la perméabilité paracellulaire dans le duodénum corrèle avec une augmentation significative de l'apoptose suggérant un défaut de la barrière intestinale chez les animaux colonisés par des *E. coli* génotoxiques (étude 1 – p. 101.). Ces observations suggèrent un défaut de fonction de la barrière intestinale chez les animaux colonisés par des *E. coli* génotoxiques pouvant être impliqué dans la réponse de l'organisme à la tolérance orale ou dans le développement de pathologies auto-immune comme l'allergie. En revanche, nous

n'avons pas observé de différence significative lors de l'analyse de la perméabilité transcellulaire par mesure du passage de la HRP du compartiment muqueux vers le compartiment séreux. Cette absence de différence pourrait s'expliquer par le fait que seule la proportion de protéine intacte retrouvée du côté séreux peut être quantifiée (environ 10%) nous privant ainsi de 90% de la réponse.

Ces résultats permettent donc de mettre en évidence un rôle des souches de *E. coli* génotoxiques à la fois dans la différenciation et la fonction de barrière de l'épithélium intestinal.

FIGURES

Figure 1 – La colonisation précoce des nouveau-nés par des *E. coli* génotoxiques ne modifie pas l'expression génique dans les CEIs à l'âge adulte.

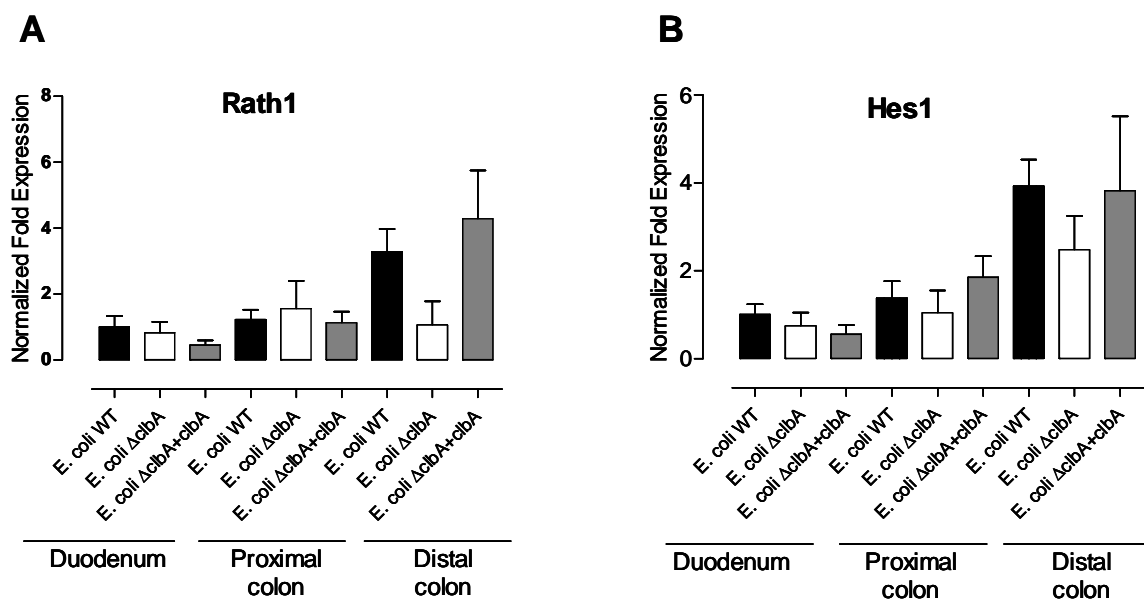


Figure 1 – Effet de la colonisation précoce des nouveau-nés par des *E. coli* génotoxiques sur l'expression génique de *Rath1* et *Hes1* à l'âge adulte. Expression génique de *Rath1* (A) et *Hes1* (B) dans le duodénum, côlon proximal et distal. L'expression génique de chaque gène est normalisée par rapport à l'expression d'un gène de ménage, *arp*. Moyenne +/- SEM, groupes représentant entre 3 et 10 animaux.

Figure 2 – La colonisation précoce des nouveau-nés par des *E. coli* génotoxiques n’altère pas la physiologie des cellules à mucus.

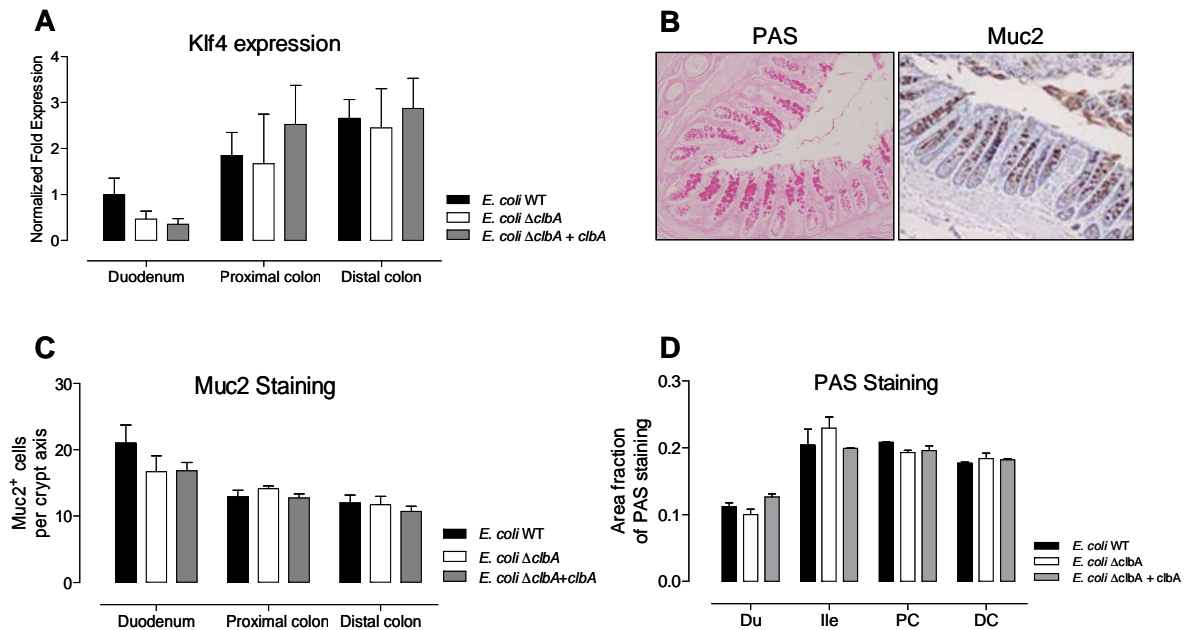


Figure 2 - Effet de la colonisation précoce des nouveau-nés par des *E. coli* génotoxiques sur les cellules à mucus à l’âge adulte. (A) Expression génique du facteur de transcription *Klf4* dans le duodénum, côlon proximal et distal. L’expression génique de chaque gène est normalisée par rapport à l’expression d’un gène de ménage, *arp*. (Moyenne +/- SEM, groupes représentant entre 3 et 10 animaux). (B) Sections de côlon montrant des cellules à mucus marquées avec l’anticorps anti-Muc2 ou avec une coloration à l’acide périodique de Schiff. (C) Analyse quantitative des cellules à mucus Muc2 positives le long de l’axe crypte-villosités dans le duodénum et le côlon (proximal et distal). (D) Analyse quantitative de l’aire de marquage pour le mucus dans l’épithélium de l’intestin grêle (duodénum et iléum) et colique (proximal et distal). Les données sont issues de 3 expérimentations indépendantes et les groupes représentent entre 4 et 10 rats. Moyenne +/- SEM.

Figure 3 – La colonisation précoce des nouveau-nés par des *E. coli* génotoxiques augmente le nombre de cellules de Paneth dans l'intestin grêle.

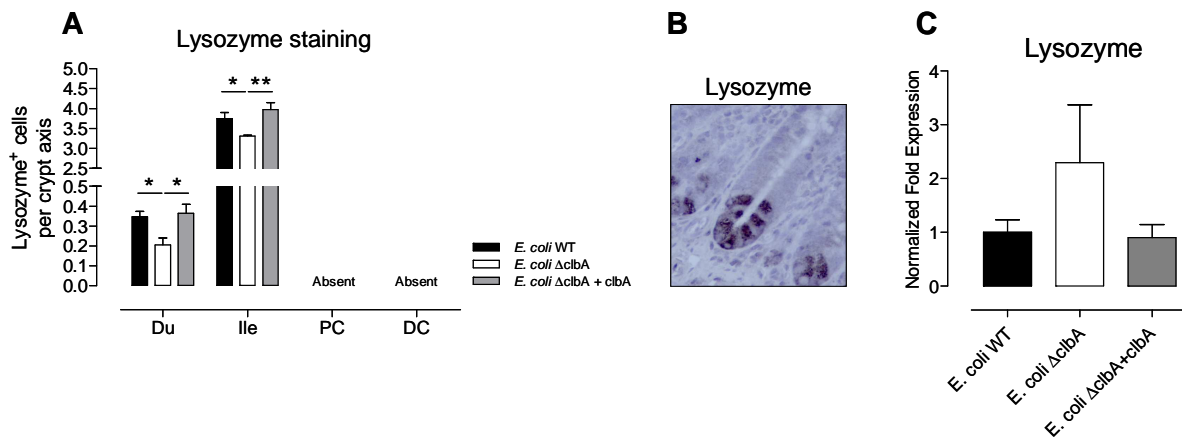


Figure 3 - Effet de la colonisation précoce des nouveau-nés par des *E. coli* génotoxiques sur les cellules de Paneth à l'âge adulte. (A) Analyse quantitative du nombre de cellules de Paneth positives pour le lysozyme dans les cryptes de l'intestin grêle (duodénum et iléum) et le côlon (proximal et distal). (B) Sections d'iléum montrant des cellules de Paneth marquées avec l'anticorps anti-lysozyme. (C) Expression génique du lysozyme dans le duodénum. L'expression génique de chaque gène est normalisée par rapport à l'expression d'un gène de ménage, *arp*. Les données sont issues de 3 expérimentations indépendantes et les groupes représentent entre 3 et 10 rats. Moyenne +/- SEM. ANOVA suivi d'un test Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 4 – La colonisation précoce des nouveau-nés par des *E. coli* génotoxiques augmente le nombre de cellules entéroendocrines dans le duodénum.

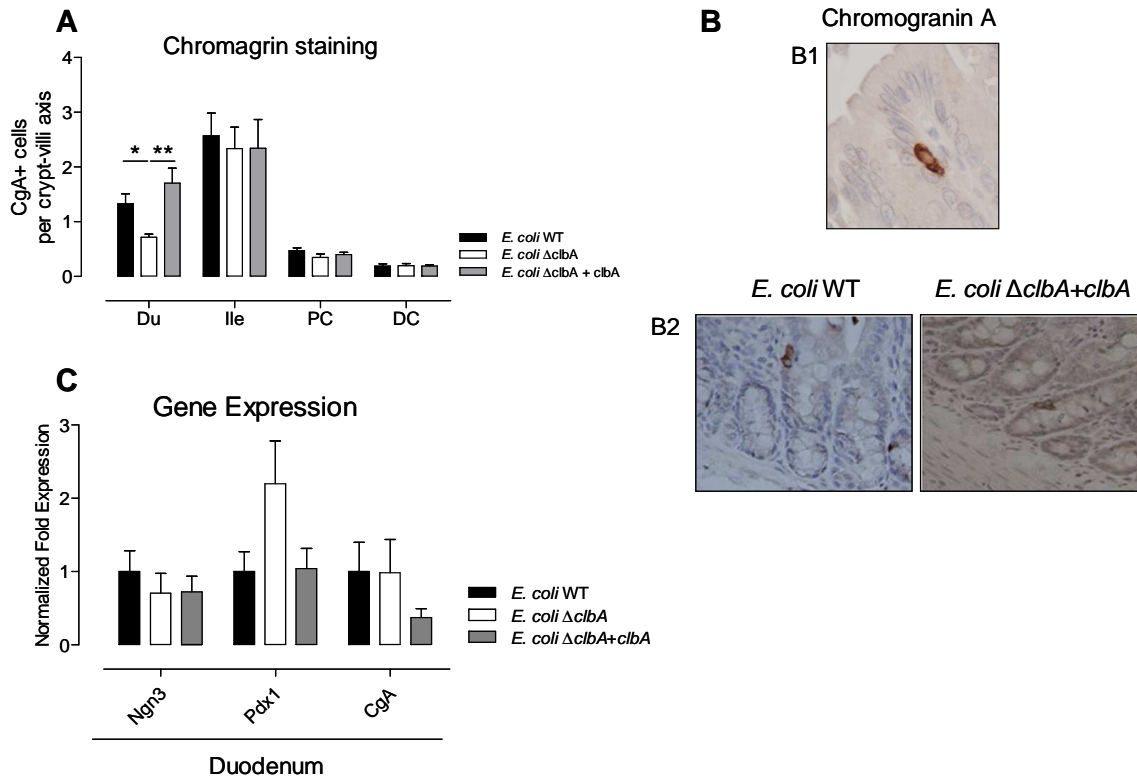
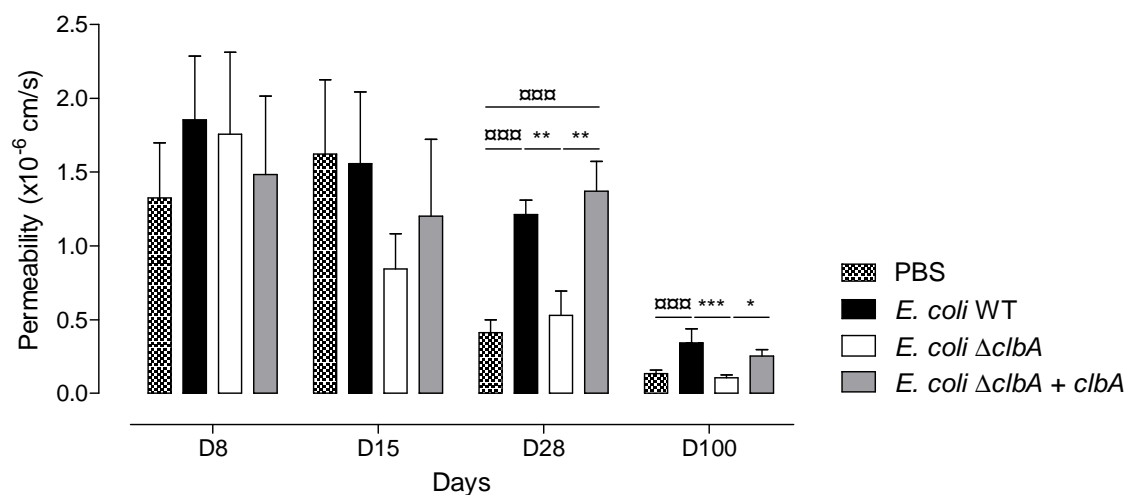


Figure 4 - Effet de la colonisation précoce des nouveau-nés par des *E. coli* génotoxiques sur les cellules entéroendocrines à l'âge adulte. (A) Analyse quantitative du nombre de cellules entéroendocrines CgA-positives le long de l'axe crypte-villosités de l'intestin grêle (duodénum et iléum) et le côlon (proximal et distal) à 100 jours. (B) (B1) - Sections de duodénum montrant des cellules entéroendocrines marquées avec l'anticorps anti-CgA. (B2) Analyse microscopique montrant des cellules entéroendocrines clustérisées chez les animaux colonisés par une souche génotoxique (x40). (C) Expression génique des facteurs de transcription *Ngn3* et *Pdx1* dans le duodénum. L'expression génique de chaque gène est normalisée par rapport à l'expression d'un gène de ménage, *arp*. Les données sont issues de 3 expérimentations indépendantes et les groupes représentent entre 3 et 10 rats. Moyenne +/- SEM. ANOVA suivi d'un test Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 5 - La colonisation précoce des nouveau-nés avec des souches de *E. coli* génotoxiques augmente la perméabilité paracellulaire à l'âge adulte.

A



B

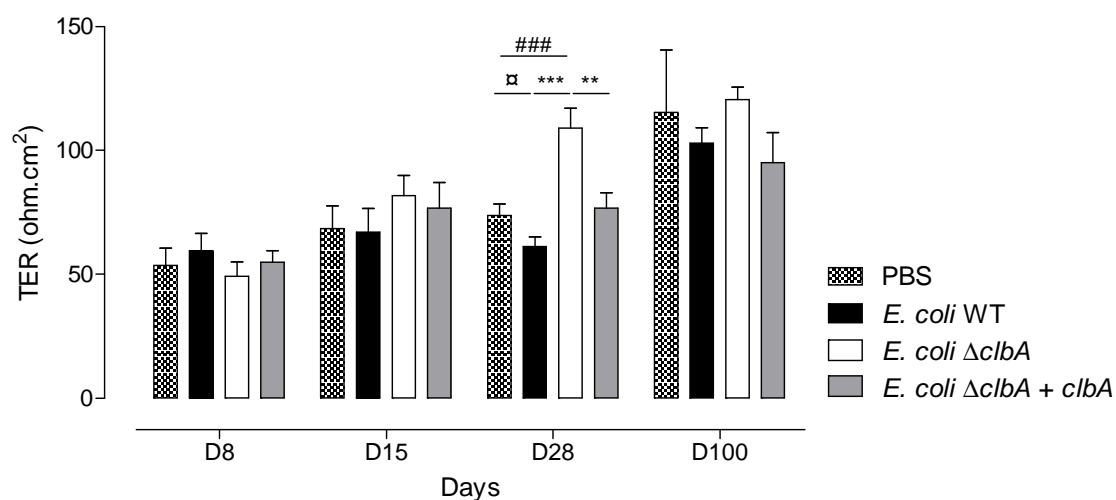


Figure 5 - Effet de la colonisation précoce des nouveau-nés par des *E. coli* génotoxiques sur la perméabilité paracellulaire de la naissance à l'âge adulte. (A) Analyse de la perméabilité paracellulaire en chambre de Ussing par mesure du passage des molécules de Dextran-FITC (4 kDa) du côté muqueux vers le côté séreux au TECAN. (B) Mesure de la résistance transépithéliale chez les mêmes animaux. Les données sont issues de 3 expérimentations indépendantes et les groupes représentent entre 8 et 12 rats. Moyenne +/- SEM, ANOVA suivi d'un test Bonferroni. *[□] p<0.05, ** p<0.01, ***^{□□□}, ****^{□□□□}, ##### p<0.001.

Figure 6 - La colonisation précoce des nouveau-nés avec des *E. coli* génotoxiques n'altère pas la perméabilité transcellulaire.

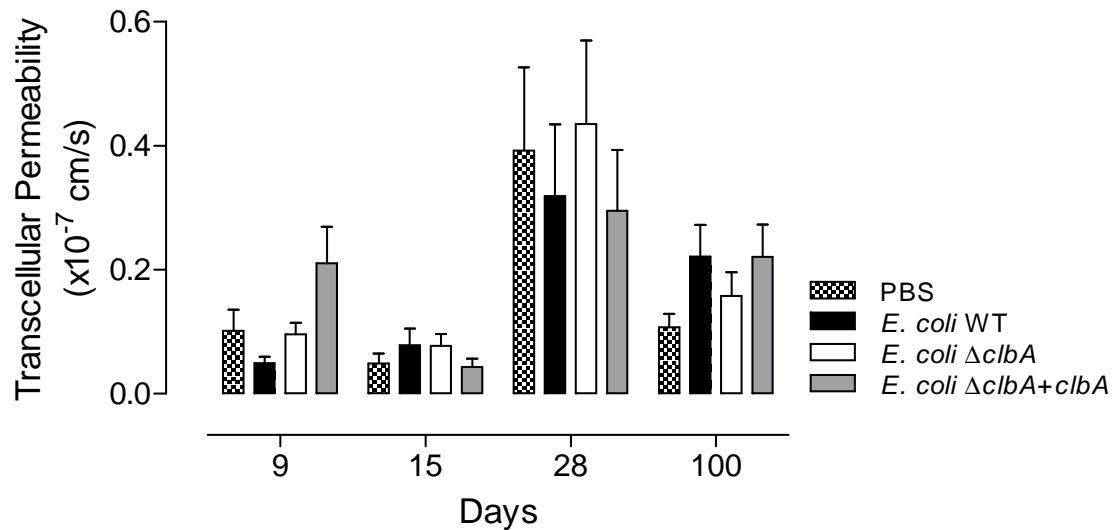


Figure 6 - Effet de la colonisation précoce des nouveau-nés par des *E. coli* génotoxiques sur la perméabilité transcellulaire de la naissance à l'âge adulte. Analyse de la perméabilité transcellulaire en chambre de Ussing par mesure du passage de la protéine HRP (40 kDa) du côté muqueux vers le côté séreux au TECAN. Les données sont issues de 3 expérimentations indépendantes et les groupes représentent entre 8 et 12 rats. Moyenne +/- SEM.

DISCUSSION

CHAPITRE I

LA COLIBACTINE : SON RÔLE AU SEIN DU MICROBIOTE INTESTINAL

1. Développement d'un modèle de colonisation stable et "naturelle" du tractus digestif par des souches commensales de *E. coli*.

Depuis longtemps, plusieurs modèles expérimentaux ; animaux conventionnels, animaux axéniques/gnotobiotiques ou l'utilisation de traitements antibiotiques chez l'animal sont utilisés afin d'étudier le rôle d'une souche ou d'un ensemble de souches bactériennes du tube digestif sur la physiologie de l'hôte. L'utilisation d'animaux conventionnels permet d'étudier les interactions entre un microorganisme exogène, administré oralement et le microbiote intestinal déjà établi et mature. Or ce modèle ne permet pas d'analyser réellement l'impact d'une souche bactérienne naturellement implantée au sein du microbiote intestinal sur la physiologie intestinale. En effet, la colonisation par la souche d'intérêt chez le rongeur conventionnel est dans ce cas-là souvent transitoire et probablement pas ou peu localisée au sein d'une niche écologique pertinente (à priori au minimum chez *E. coli*). La compétition pour les nutriments des souches déjà présentes dans le tube digestif ainsi que la niche écologique déjà occupée par les souches primo-colonisatrices ne permet pas l'implantation et le maintien de la colonisation par d'autres souches bactériennes exogènes [54]. D'autre part, afin de contrôler plus spécifiquement cette relation hôte-bactérie, l'utilisation d'animaux adultes monoxéniques ou gnotobiotiques est largement répandue depuis de nombreuses années. Ce modèle expérimental présente un grand avantage: aucune autre bactérie n'est présente dans le tractus GI d'animaux axéniques et il est possible alors d'analyser l'impact d'une espèce ou d'un faible nombre d'espèces bactériennes sur la physiologie de l'hôte [169, 214, 309]. Cependant, les effets indirects sur la physiologie intestinale relayés par le reste du microbiote sont occultés et l'épithélium intestinal des animaux axéniques devenus mono/gnotobiotiques à l'âge adulte diffère physiologiquement d'un épithélium d'animal conventionnel (défaut dans le développement du système immunitaire, défaut dans la structure de l'épithélium intestinal...) mettant ainsi en évidence l'importance de la présence primordiale d'un microbiote mature pour la physiologie de l'hôte [180, 185]. Enfin, certains modèles expérimentaux consistent à utiliser des animaux qui ont subi un traitement

antibiotique afin d'altérer la microflore endogène et permettre l'implantation et la colonisation massive par d'autres souches d'intérêt. Cependant, il est souvent nécessaire de maintenir le traitement antibiotique afin de conserver un niveau de colonisation stable. De plus, l'utilisation d'un tel modèle ne permet pas de différencier l'effet potentiel direct de l'antibiotique sur la composition du microbiote intestinal (par exemple, le traitement à la streptomycine diminue les populations de bactéries anaérobies facultatives comme les *Entérocoques*, les *Entérobactéries* et les *Lactobacilles...*), du rôle propre de la souche d'intérêt implantée. Ce modèle n'est cependant pas parfait : il est souvent nécessaire de renouveler le gavage par la souche d'intérêt si le traitement antibiotique est interrompu ou de réitérer le traitement antibiotique afin de maintenir un niveau de colonisation stable au cours des expérimentations.

Au cours de mes travaux de recherche, nous avons tout d'abord voulu développer un nouveau modèle animal de colonisation, naturelle mais contrôlée, du tube digestif chez le nouveau-né qui mime les premières étapes de transmission et de colonisation bactériennes mises en place en période périnatale entre la mère et le nouveau-né. Pour cela, les mères gestantes ont reçu un traitement antibiotique (streptomycine) durant leur dernière semaine de gestation et ont été gavées à deux reprises avec des souches commensales de *E. coli* rendues résistantes au même antibiotique. À la naissance, le traitement antibiotique est stoppé et la colonisation par ces souches de *E. coli* a été évaluée à la fois chez la mère et chez la descendance. Grâce à l'utilisation d'un tel modèle expérimental, la souche d'intérêt est transmise à la descendance avec des niveaux de colonisation chez le nouveau-né rat comparables à ceux observés chez l'Homme (1.10^9 cfu/g de tissu). De plus cette colonisation est stable et persiste ensuite chez l'adulte à raison de 1.10^6 cfu/g de fèces, ce qui correspond à ceux retrouvés chez l'Homme [250]. Ainsi, la mise en place de ce protocole expérimental original nous a permis de développer un nouveau modèle expérimental de colonisation stable et pérenne plus "physiologique" que les autres modèles expérimentaux déjà existants.

Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous avons donc pu mettre en place un modèle de colonisation naturelle qui nous permet d'étudier à long terme les conséquences de l'acquisition de souches commensales de *E. coli* à la naissance sur la physiologie de l'hôte tout au long de sa vie. De manière intéressante, ce modèle s'avère être très pertinent pour l'étude d'une bactérie telle que *E. coli* car, comme décrit dans l'introduction (Chapitre IV), *E. coli* est l'une des premières espèces bactériennes à coloniser le tractus digestif des nouveau-nés et à persister durablement dans le tube digestif de l'animal tout au long de sa vie. Ainsi,

nous avons pu adresser la question de la capacité de colonisation des souches de *E. coli* et de leur maintien au cours du temps en réponse à la présence de l'îlot *pks* dans un environnement physiologique (présence des *E. coli* depuis la naissance et tout au long de la vie) et plus réaliste (acquisition et diversité du microbiote intestinal préservé) que dans les autres modèles expérimentaux disponibles.

2. La Colibactine : un facteur favorisant la colonisation intestinale ?

Dans une étude publiée récemment, les auteurs ont analysé l'importance de l'îlot *pks* dans la capacité des souches de *E. coli* à coloniser et à persister dans le microbiote intestinal [281]. L'îlot a été retrouvé majoritairement parmi les souches résidentes de *E. coli* (53% contre 28% pour les souches colonisatrices intermédiaires et 14% pour les souches transitoires). Ces données suggèrent que l'îlot *pks* pourrait être impliqué dans la capacité d'une souche de *E. coli* à coloniser et à persister dans le microbiote intestinal [281].

Cependant, dans notre modèle expérimental où les mères reçoivent deux gavages, la colonisation des animaux aussi bien aux temps précoces (avant le sevrage) qu'à l'âge adulte n'est pas dépendante de la présence de l'îlot *pks*, c'est-à-dire de la production de la Colibactine. En effet, la Colibactine n'influence ni la transmission de la souche, ni le maintien de la souche *E. coli* dans le tractus digestif du nouveau-né et de l'adulte respectivement.

Nous pouvons donc raisonnablement nous demander quel est l'avantage pour la souche *E. coli* d'exprimer l'îlot *pks* et de produire la Colibactine ? Afin de répondre à cette question, nous avons analysé dans des expériences de compétition, la transmission et le maintien de la colonisation par des souches de *E. coli* produisant et ne produisant pas la Colibactine. Pour cela, les mères gestantes sont gavées avec des quantités équivalentes de *E. coli pks+* et de *E. coli pks-*. Après la naissance, la transmission des deux souches est analysée chez le nouveau-né ainsi que le maintien de la colonisation chez le rat sevré (84 jours). Au vu des premiers résultats réalisés sur quatre portées différentes, nous avons pu observer que si les deux souches s'implantent de manière équivalente chez les mères ; chez les nouveau-né seule la souche de *E. coli pks+* est retrouvée à 8 jours dans 75% des portées. Avec le temps, plus de 80% des rats sont exclusivement colonisés par la souche *E. coli pks+*. L'absence de différence dans la colonisation des mères sous antibiotiques par les deux souches avant la naissance mais la présence dès J8, d'une proportion plus importante de *E. coli pks+* chez les nouveau-nés nous

permet d'émettre une hypothèse sur l'effet d'une compétition possible entre les deux souches lors du passage mère/nouveau-né à la naissance.

Ainsi, il semble donc que le rôle de la Colibactine dans la colonisation intestinale par les souches de *E. coli* qui la produisent soit plus complexe que dans notre modèle et procure un avantage sélectif à la souche de *E. coli* qui la produit lorsque la souche se retrouve en compétition avec une autre souche de *E. coli* qui ne la produit pas.

3. Le Colibactine : un antibiotique ?

La Colibactine est un composé hybride de polycétides-peptide non ribosomal formé à partir d'une machinerie complexe codée par l'îlot génomique *pks* [270]. Comme évoqué précédemment dans l'introduction, la biosynthèse des PK et NRP a été principalement observée chez les microorganismes tels que les bactéries et les champignons. Les NRPS et PKS sont des systèmes de synthèse de macromolécules indépendants des ribosomes qui produisent de nombreuses molécules pharmacologiques comme les antibiotiques [302]. La bléomycine qui est un hybride polycétides-peptide et qui est utilisée comme un anticancéreux pour ses propriétés génotoxiques a été d'abord découvert par ses propriétés génotoxiques. La Colibactine pourrait donc aussi agir comme une molécule antibiotique.

Afin d'analyser le potentiel antibiotique de la Colibactine sur la composition du microbiote adulte chez nos animaux, nous avons étudié, en collaboration avec l'équipe de Philippe Langella à Jouy-en-Josas, par qPCR et pyroséquençage la composition du microbiote d'animaux adultes (100 jours) colonisés depuis la naissance par des souches de *E. coli* commensales produisant ou non la Colibactine. Les premiers résultats, basés sur une analyse par qPCR des phyla dominants, ne montrent aucune différence significative dans la composition des grands groupes bactériens entre les différents groupes d'animaux. Ces observations ne nous permettent donc pas de mettre en évidence un rôle majeur de la Colibactine comme facteur antibiotique s'il existe.

Les données obtenues à partir du séquençage à haut débit en technologie Solid nécessitent cependant d'être davantage explorées afin de conclure définitivement sur les perturbations du microbiote potentiellement engendrées par la production de Colibactine. Afin d'aller plus loin dans l'analyse du rôle joué par la Colibactine sur d'autres espèces bactériennes, il serait ainsi intéressant d'aller plus profondément dans l'analyse de certaines

espèces bactériennes plus ciblées, impliquées dans de nombreux processus physiologiques de l'hôte (*B. thetaiotaomicron*, *Faecalibacterium prauznitzii*, SFB...).

CHAPITRE II

LA COLIBACTINE, UN LIEN AVEC LE CANCER ?

1. Colonisation Bactérienne, Dommage à l'ADN et Prolifération, un lien avec le cancer du côlon ?

1.1. Maladies infectieuses et cancer

Le lien entre maladies infectieuses et le développement de cancer a depuis longtemps été mis en évidence chez l'Homme. En effet, plus de 18% des diagnostics tumoraux sont associés à une infection [310]. Parmi les relations entre agents infectieux et cancer les mieux documentés on retrouve les papillomavirus humains (HPV) qui provoquent le cancer du col de l'utérus et les virus de l'hépatite B et C responsables de cancers hépatiques. Plus récemment, le lien entre infections bactériennes et cancer a été établi. Ainsi, la bactérie *Helicobacter pylori* est responsable de l'apparition de cancers et lymphomes gastriques. Les mécanismes liant des mécanismes infectieux et la formation d'un tissu malin restent cependant méconnus. Plusieurs hypothèses pourraient influencer ce développement: l'inflammation chronique, l'évasion du système immunitaire, les dommages à l'ADN, la modification du cycle cellulaire et de la prolifération cellulaire [311].

Dans la suite de mon exposé, je m'intéresserai plus particulièrement au rôle des bactéries dans le cancer colorectal (CRC).

1.2. Bactéries et cancer colorectal

→ *Quel est le rôle joué par le microbiote intestinal dans le CRC ?*

Les deux facteurs principaux contribuant au développement du CRC sont génétiques (15%) et environnementaux [312]. En plus des conditions inflammatoires qui ont été montré comme favorisant le développement du CRC [313], il est connu depuis très longtemps que le

microbiote intestinal joue un rôle dans le développement de cette pathologie et est impliqué dans la susceptibilité au CRC.

→ *Quelles sont les espèces bactériennes impliquées dans le CRC ?*

À l'inverse du rôle connu de *H. pylori* dans le développement de cancers gastriques, peu d'études établissent un lien direct entre une ou plusieurs espèces bactériennes et le développement du CRC. Cependant, plusieurs travaux semblent indiquer que quelques espèces bactériennes seraient impliquées dans le CRC. Plusieurs hypothèses suggèrent que certaines souches bactériennes comme *Enterococcus faecalis* et *Fusobacterium nucleatum* pourraient intervenir dans le développement du CRC.

E. faecalis est une espèce commensale de la flore intestinale humaine qui produit de grandes quantités de radicaux libres oxygénés extracellulaires comme H₂O₂ et O₂^{·-}. Il a été montré qu'*E. faecalis* induisait des CDB dans les CEIs de l'épithélium colique de rats et que ces dommages déclenchaient une instabilité génétique *in vitro*. D'autres études ont montré, dans un modèle murin (souris IL10^{KO}) qu'*E. faecalis* induisait une inflammation chronique de l'intestin aboutissant au développement d'adénocarcinomes [314]. Enfin, une étude rétrospective a montré que 40% des patients souffrant de dysplasies colorectales hébergent dans leur flore intestinale des *Entérocoques* produisant de l'O₂^{·-}. Cependant, aucune association entre la colonisation par *E. faecalis* et la prévalence du CRC n'a été mise formellement en évidence [315].

F. nucleatum est une bactérie anaérobie adhérente et invasive [316-318]. Castellarin *et al.*, ont observé une sur-représentation des *F. nucleatum* dans les tumeurs colorectales mais n'ont pas pu établir un lien de causalité entre l'infection par *Fusobacterium* et le développement de tumeurs [319]. Une autre étude parue très récemment semble confirmer ces résultats et montrer en parallèle une diminution des phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes* dans les tumeurs [320].

Une autre bactérie semble impliquée dans cette pathologie et est un hôte commun du microbiote intestinal : *E. coli*.

1.3. La Colibactine : un facteur intervenant dans le processus de cancérogenèse colorectale ?

L'équipe a montré qu'il existait des souches de *E. coli* génotoxiques [270, 286]. Ces souches de *E. coli* sont porteuses de l'îlot génomique *pks* et sont capables, dans un modèle murin d'anses ligaturées, d'induire des CDB à l'ADN, une instabilité génétique *in vitro* ainsi qu'une augmentation de la fréquence des mutations, mécanismes entrant en jeu dans le développement de la cancérogenèse colorectale [286]. De plus, des études récentes montrent que les nouveau-nés, colonisés très précocement par des souches de *E. coli* sont porteurs de l'îlot *pks* (Branthomme et al., non publié)[280]. Ces données indiquent que des *E. coli* commensales génotoxiques sont présentes dans les flores intestinales humaines et ce dès la naissance, moment où elles colonisent l'Homme de manière pérenne. La colonisation précoce et durable du tractus digestif par des souches commensales de *E. coli* produisant la Colibactine pourrait donc représenter une exposition génotoxique chronique au niveau de l'épithélium intestinal.

Le groupe de Jobin aux Etats-Unis a tout récemment mis en évidence dans un modèle axénique artificiel l'association entre l'inflammation chronique de l'intestin et la présence de souches de *E. coli* génotoxiques (*pks+*) dans le développement de la cancérogenèse colorectale [303]. Dans ce but, ils ont utilisé des souris axéniques IL10^{ko} colonisées à 7 semaines soit par une souche de *E. faecalis* (souche génotoxique, cf ci-dessus) soit par une souche de *E. coli* génotoxique (*pks+*) et traitées à l'AOM (Azoxyméthane), un agent inducteur de tumeurs. Les souris colonisées avec la souche de *E. coli pks+* développent un nombre plus élevé de tumeurs et une invasion tumorale plus grande que les souris IL10^{ko} colonisées avec *E. faecalis*. L'utilisation d'un mutant non génotoxique (construit par délétion de l'îlot *pks*) montre que l'absence de production de la Colibactine n'affectent pas la sévérité de l'inflammation due à la colite dans les souris IL10^{ko}. En revanche, elle induit une diminution significative des lésions néoplasiques chez des souris IL10^{ko} traitées à l'AOM. L'absence de colite inflammatoire chez les souris axéniques WT colonisées par la souche *E. coli pks+* ou délétée pour l'îlot et traitées à l'AOM ne permet d'induire ni le développement, ni l'invasion tumorale suggérant que la bactérie seule n'est pas capable d'induire la cancérogenèse colorectale en l'absence d'inflammation. Au vu de ces résultats, les auteurs ont émis l'hypothèse qu'à la fois l'inflammation chronique de l'intestin et la présence de *E. coli*

génétoxiques agissaient de concert et étaient nécessaires pour créer un microenvironnement favorable à l'induction de dommages à l'ADN et la promotion de la tumorigenèse colorectale.

Ainsi, cette étude met en évidence un lien indirect entre la présence de bactéries génotoxiques et le CRC. Cependant, le modèle utilisé dans cette étude est très artificiel, les souris sont axéniques, colonisées à l'âge adulte par une seule souche bactérienne et traitées avec un agent inducteur de tumeurs, l'AOM. L'utilisation d'un tel modèle ne permet pas d'étudier le rôle de ces bactéries génotoxiques pendant la période critique d'implantation et de colonisation du tractus digestif, la période périnatale. En outre l'effet génotoxique observé par cette équipe américaine reste faible et dépend du niveau d'inflammation.

Dans le cadre de mes travaux de thèse, j'ai pu pour la première fois, mettre en évidence le rôle de *E. coli* génotoxiques commensales sur la physiologie de l'épithélium intestinal de la naissance à l'âge adulte.

Ainsi, nous avons pu montrer que la colonisation naturelle d'animaux par les souches commensales de *E. coli* génotoxiques portées par la mère, est capable dans les premiers jours après la naissance d'augmenter le nombre de CDB de l'ADN dans les noyaux des entérocytes chez le nouveau-né. Dans notre étude nous observons la présence des dommages à l'ADN dans les premiers jours qui suivent la naissance (jusqu'à J15), moment où *E. coli* est une des espèces dominantes du microbiote intestinal et où l'épithélium intestinal est encore immature. En effet, aux temps très précoces, l'épithélium intestinal est immature avec la présence de peu de structures cryptiques, peu de cellules différenciées et en revanche un nombre important de bactéries (10^9 cfu/g de tissu) ayant facilement accès aux cellules épithéliales et pouvant ainsi produire leur effet génotoxique. Aux temps plus tardifs, après J15, les cryptes intestinales sont formées, la différenciation des CEIs est mise en place et le nombre de nos bactéries d'intérêt dans l'intestin diminue au profit des souches bactériennes anaérobies strictes. Les souches *E. coli* génotoxiques sont donc à la fois moins nombreuses et ont moins facilement accès à l'épithélium intestinal les rendant peut être incapables d'induire des dommages à l'ADN dans les CEIs. Ces premiers résultats nous ont permis de mettre en évidence une fenêtre temporelle pendant laquelle les souches de *E. coli* génotoxiques présentes majoritairement dans le tractus digestif seraient capables d'induire leur effet génotoxique. Ces premiers résultats nous ont permis de **mettre en évidence une fenêtre temporelle pendant laquelle les souches de *E. coli* génotoxiques présentes majoritairement dans le tractus digestif seraient capables d'induire leur effet génotoxique.**

D'autre part, nos résultats montrent une augmentation de la prolifération cellulaire associée à un nombre plus important de cryptes en bifurcation ainsi qu'une augmentation des cycles BFB chez les animaux adultes colonisés depuis la naissance avec des souches de *E. coli* génotoxiques. Des études suggèrent qu'une augmentation de la prolifération corrélée avec une augmentation du nombre de cryptes en bifurcation à l'âge adulte sont liées au développement d'adénocarcinome et du CRC [321, 322]. L'augmentation des cycles BFB traduit une instabilité génétique chez les animaux colonisés avec des souches génotoxiques. La présence de ces ponts anaphasiques chez les animaux adultes pourrait témoigner des conséquences d'un stress génotoxique survenu plus tôt et caractérisé chez nos jeunes animaux par une augmentation des CDBs à l'ADN dans les entérocytes. En effet, les *E. coli pks+* induisent des dommages à l'ADN qui équivalent à une irradiation de faible dose de 0.5 Gy ou encore à une infection bactérienne de faible m.o.i.. Dans ces cas-là, les cellules présentant des dommages à l'ADN sont capables de mettre en jeu les systèmes de réparation de l'ADN afin de poursuivre leur cycle cellulaire. Cependant les systèmes de réparation ne sont pas parfaits et des erreurs peuvent être induites conduisant au développement d'une instabilité génétique se traduisant par une augmentation des cycles BFB [286]. Il serait donc intéressant d'analyser si la présence de dommages à l'ADN chez le jeune et d'une instabilité génétique à l'âge adulte due à l'acquisition néonatale de souches de *E. coli* génotoxiques présentes tout au long de la vie ne pourrait pas avoir des conséquences pathologiques sur le long terme et plus particulièrement dans les mécanismes de développement du cancer du côlon (CRC). En effet, des études menées auprès des populations japonaises d'Hiroshima et Nagasaki ont pu établir un lien entre dommages à l'ADN et cancer. Une exposition aux irradiations inférieure à 1 Gy est suffisante pour augmenter les fréquences de cancer et notamment du CRC [323]. Par ailleurs, il est maintenant clairement établi que l'utilisation de thérapies génotoxiques appliquées chez les jeunes enfants augmente le risque pour ces enfants de développer un autre cancer à l'âge adulte [324-326]. Enfin, d'après les données épidémiologiques, plus l'exposition aux dommages génétiques due à une irradiation est précoce chez l'enfant, plus les probabilités de développer un cancer à l'âge adulte sont élevées [327].

Ces résultats sont donc en accord avec les études précédentes pour suggérer un rôle des souches de *E. coli* génotoxiques dans le développement de la cancérogenèse colorectale. En revanche, notre étude a permis de mettre aussi en évidence pour la première fois l'implication d'une période temporelle critique, la période périnatale pour observer les effets génotoxiques de *E. coli*.

1.4. Est-ce que la colonisation à la naissance par des *E. coli* génotoxiques est suffisante pour induire le développement du CRC ?

Si nos résultats suggèrent une augmentation de l'instabilité chromosomique associée à une augmentation de la prolifération et des cryptes en bifurcation, phénomènes liés à la cancérogenèse colorectale, chez les animaux colonisés par des souches génotoxiques, les mécanismes qui entrent en jeu dans le développement de la tumorigenèse sont complexes et nombreux : le mode de vie, l'alimentation, le lieu géographique, le contexte immuno-inflammatoire et les mutations génétiques.... De plus, nos résultats montrent que la colonisation des animaux avec des souches génotoxiques induit une augmentation de l'apoptose dans les entérocytes ainsi qu'une augmentation de la migration cellulaire le long de l'axe crypte villosités. Li *et al.* montre que l'expansion du compartiment prolifératif est associé à une migration plus rapide des entérocytes le long de l'axe crypte/villosités et à une augmentation de l'apoptose. Afin de limiter l'expansion du compartiment prolifératif et donc de promouvoir le développement de lésions pré-cancéreuses, les auteurs suggèrent que l'augmentation de l'apoptose des entérocytes permet de maintenir l'homéostasie tissulaire [328]. La protéine p53 joue un rôle central dans les mécanismes de réponses aux dommages à l'ADN en induisant l'arrêt transitoire du cycle cellulaire et la mort cellulaire [329, 330]. Des mutations dans la protéine p53, protéine suppresseur de tumeurs, ou des gènes impliqués dans les mécanismes de prolifération cellulaire au niveau intestinal comme APC ou β -caténine ont été montré comme étant fortement impliquées dans le développement de la cancérogenèse colorectale [330, 331]. Par ailleurs, le délai entre la première rencontre avec la bactérie et le développement ou le diagnostic de la pathologie peut être très long (années ou dizaines d'années) compliquant les études.

2. La cellule souche, un acteur essentiel de l'homéostasie intestinale

Comme évoqué ci-dessus, nos résultats ont permis de mettre en évidence une fenêtre temporelle particulière pour l'action de la Colibactine. La présence aux temps précoces d'un

grand nombre de *E. coli* génotoxiques proche de l'épithélium intestinal et l'immaturation structurale de l'épithélium à cet âge-là (absence de cryptes et de gel de mucus) suggère que les CSIs pourraient être une des cibles de l'action des *E. coli* génotoxiques.

La CSI est la cellule à l'origine du pool de cellules en prolifération et donc du renouvellement de l'épithélium intestinal en conditions physiologiques. En effet, la CSI donne naissance à la population de cellules transitoires en prolifération qui après migration vers le haut des cryptes vont se différencier en cellules absorbatives ou sécrétoires. Comme évoqué en introduction, deux types de CSIs ont été décrites à ce jour:

- les cellules CBC *lgr5*⁺ retrouvées entre les cellules de Paneth sont résistantes aux irradiations et sont constitutivement en prolifération.
- les cellules LRC +4 *bmi1*⁺ sont présentes juste au dessus des cellules de Paneth, sont très sensibles aux irradiations et sont en quiescence en l'absence de lésions de l'épithélium intestinal.

Les cellules CBC *lgr5*⁺ sont sous le contrôle de la voie de signalisation Wnt. En effet, le gène *lgr5* est une des cibles de l'activation de la voie Wnt [332] et la perte du facteur de transcription *Tcf4* conduit à la perte des cryptes intestinales [15].

Dans nos expérimentations nous avons observé une augmentation du nombre des cellules transitoires en prolifération ainsi qu'une augmentation du renouvellement intestinal chez les animaux colonisés depuis la naissance avec des souches génotoxiques. Ces résultats suggèrent un rôle des CSIs dans l'augmentation du nombre de cellules dans les cryptes. En effet, nous pouvons émettre l'hypothèse que les CSIs sont à l'origine des modifications observées en réponse à la présence de souches génotoxiques. Plusieurs mécanismes pourraient impliquer les cellules souches. Tout d'abord, nous avons constaté, chez les très jeunes animaux, une augmentation de la présence de dommages à l'ADN dans les cellules cryptiques en réponse à la présence de la génotoxine. Un double marquage γ H2AX/*lgr5*⁺ et γ H2AX/*bmi1*⁺ nous permettrait de voir si chez les très jeunes animaux les *E. coli* génotoxiques sont capables d'induire des dommages aux CSIs.

Ainsi, une des hypothèses avancées pour expliquer la présence chez le jeune de dommages à l'ADN aux temps précoces et l'absence de leur détection chez les animaux plus âgés pourrait être que chez les animaux très jeunes, les cellules souches auraient enregistré ces signaux de dommages. En effet, chez le très jeune animal, l'épithélium intestinal est en cours de développement et la niche que forme les CSI est donc facile d'accès pour nos bactéries

génétoxicques qui pourraient induire des dommages à l'ADN très précocement. Cependant, le stress génotoxique subit par les cellules épithéliales correspond à une irradiation de 0.5 Gy, qui conduit à l'apparition d'un nombre de foyers γ H2AX phosphorylée inférieur à 20 foyers/cellule. En dessous de 20 foyers par cellules, la cellule n'entre pas en apoptose et est capable de mettre en place les systèmes de réparation de l'ADN. En revanche, la réparation de ces dommages peut être imparfaite et induire une instabilité chromosomique dans ces cellules. Si les cellules touchées par ces dommages sont les CSI, nous pouvons imaginer que les altérations de l'ADN acquises à ces temps précoces conduisent à des effets à long terme sur la prolifération et le renouvellement de l'épithélium intestinal. D'autre part, un nombre plus important de cellules souches dans les cryptes intestinales pourrait expliquer l'augmentation de la prolifération des CEIs [298, 299]. Enfin, il a été décrit que les cellules de Paneth constituaient une niche préférentielle pour les cellules souches *Igr5+* dans les cryptes intestinales. Les cellules de Paneth en exprimant des facteurs de croissance comme l'EGF ("*Epidermal Growth Factor*"), le TGF α ("*Tumor Growth Factor α* "), des molécules de la signalisation Wnt contribuent à l'homéostasie et à la prolifération des CSIs [36]. Le nombre plus important de cellules de Paneth observé chez nos animaux colonisés avec des souches génotoxiques pourrait peut être jouer un rôle dans le tropisme des cellules souches.

Afin de tester la première hypothèse, nous avons dernièrement réalisé, à partir du modèle de colonisation naturelle, une expérience de colonisation transitoire des animaux par des souches génotoxiques ou non. Cette colonisation transitoire devait nous permettre d'évaluer l'effet de souches génotoxiques présentes pendant les premiers jours de la vie sur l'épithélium intestinal et ensuite d'analyser l'effet à plus long terme de cet empreinte sur le développement des CEIs après élimination des souches génotoxiques du tractus digestif. Les premiers résultats montrent une tendance à l'augmentation du nombre de cellules en mitose chez les animaux colonisés transitoirement à la naissance par la souche de *E. coli* génotoxique en comparaison avec les animaux colonisés transitoirement par la souche de *E. coli* non génotoxique. Ces résultats préliminaires suggèreraient que la présence tout au long de la vie de l'animal de souches de *E. coli* génotoxiques pourrait ne pas être nécessaires afin d'observer les phénomènes d'augmentation de la prolifération. L'empreinte induite au cours des premiers jours de la vie par les souches génotoxiques serait suffisante pour induire l'augmentation de la prolifération, renforçant l'hypothèse d'un effet des souches de *E. coli* génotoxiques sur les CSIs.

3. Mécanisme d'action de la Colibactine sur les CEIs ?

L'homéostasie des cryptes intestinales est régie par un grand nombre de voies de signalisation. Les voies Wnt, Notch, FGFR, TGF- β affectent profondément l'homéostasie des cryptes en contrôlant la localisation des CSIs, en régulant l'auto-renouvellement de l'épithélium et la différenciation aussi bien que la prolifération des cellules transitoires en prolifération.

Nous avons constaté lors de nos expérimentations une augmentation de la prolifération cellulaire dans les cryptes et une augmentation du renouvellement intestinal en réponse à la colonisation précoce des animaux avec des souches de *E. coli* génotoxiques, c'est à dire produisant la Colibactine. Or, comme évoqué dans l'introduction (Chapitre I.2.1.2, p10), la prolifération des CEIs est principalement sous le contrôle de la voie de signalisation Wnt qui est une composante essentielle de l'homéostasie intestinale [16, 21]. En effet l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine conduit à la perte rapide des cellules transitoires en prolifération (2 jours) qui aboutit à la perte totale des cryptes (6 jours) et finalement à la mort de l'animal [16]. Dans le cadre de notre étude, nous pouvons donc émettre l'hypothèse d'une implication de cette voie chez nos animaux en réponse à la colonisation précoce avec des souches génotoxiques. En effet, l'activation de la voie Wnt est caractérisée par des niveaux élevés de β -caténine et de la surexpression de ces gènes cibles. *c-Myc* est l'une des cibles préférentielles de la voie Wnt/ β -caténine et est un facteur de transcription pléiotropique qui régule l'expression de nombreux gènes cibles intervenant dans divers processus cellulaires comme l'apoptose, la progression du cycle cellulaire, la croissance cellulaire et la réplication de l'ADN [333, 334].

En plus du rôle joué par *c-Myc* dans les phénomènes d'homéostasie intestinale et de tumorigenèse, ce facteur de transcription est impliqué dans l'activation d'autres voies de signalisation. En effet, il est capable d'activer la voie de signalisation Akt/mTOR, également impliquée dans les phénomènes de prolifération et dans le contrôle de l'homéostasie intestinale. La voie Akt/mTOR ("*Mammalian target of rapamycin*") est activée par la liaison de facteurs de croissance sur les récepteurs tyrosine kinases situés à la surface de la membrane plasmique des CEIs et conduisant à l'activation de la PI3K de classe I. La PI3K phosphoryle le PIP2 ce qui donne naissance au PIP3. La présence de PIP3 à la membrane plasmique induit le recrutement des kinases Akt et PDK1. Une fois recrutée à la membrane, PDK1 phosphoryle Akt ce qui résulte en l'activation complète d'Akt qui va pouvoir activer de nombreuses cibles

dont mTOR à travers l'inhibition du complexe TSC1/TSC2. L'activation de mTOR induit la phosphorylation des kinases S6 et 4EBP1 qui conduisent à la synthèse protéique de nombreuses cibles impliquées dans la croissance cellulaire et le métabolisme [335]. Tout comme la voie de signalisation Wnt, la voie mTOR est activée chez plus de 40% des patients atteints de CRC tout comme les protéines responsables de l'activation de mTOR (PI3K, Ras, Akt) [335]. D'autre part, la voie mTOR est fortement activée dans les polypes intestinaux retrouvés chez des souris mutées pour le gène APC suggérant une implication de la voie Wnt dans la régulation de la voie mTOR. En effet, lorsque la voie Wnt est inactive la protéine GSK3 va phosphoryler le complexe TSC1/TSC2 qui inactive alors la protéine mTOR. En revanche lorsque la voie Wnt est activée, l'activité de GSK3 est inhibée et le complexe TSC1/TSC2 ne bloque plus l'activation de mTOR conduisant à la croissance cellulaire [335, 336]

Au vu de nos résultats expérimentaux et du rôle joué par les voies de signalisation Wnt et mTOR à la fois dans l'homéostasie intestinale et dans les mécanismes mis en place dans la cancérogenèse colorectale, il serait intéressant d'analyser chez nos animaux colonisés depuis la naissance avec des souches génotoxiques ces voies de signalisation.

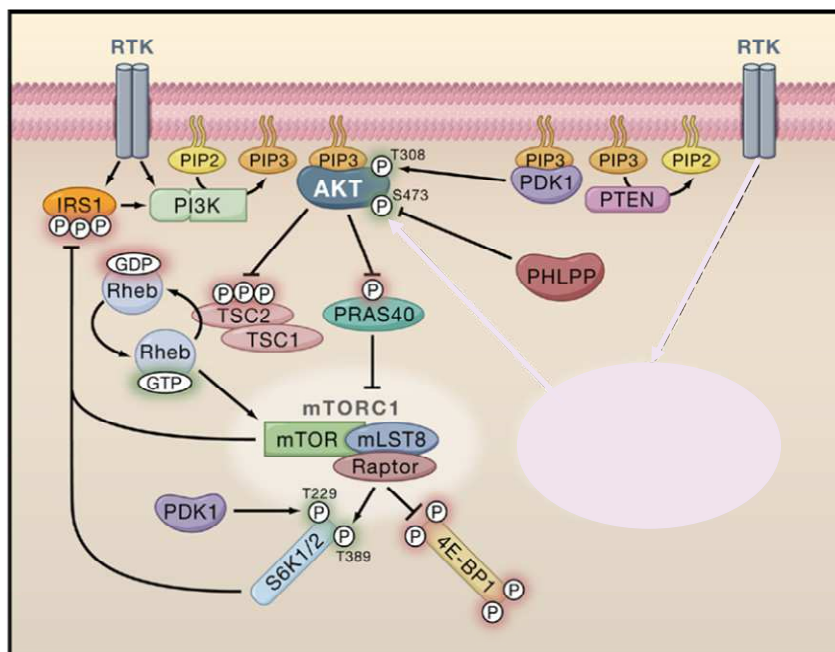


Figure 38 – La voie de signalisation mTOR.

D'après Brendan *et al.*, [336].

L'isolement des cryptes intestinales d'animaux colonisés depuis la naissance avec des souches génotoxiques ou la création d'organoïdes à partir de cryptes isolées [337] ou directement à partir d'une cellule souche intestinale unique [36, 338] nous permettra

d'analyser le rôle de la Colibactine directement sur les cellules cryptiques. En effet, après 7 jours de culture dans des conditions particulières, la cellule souche est capable de reformer une crypte complète avec un compartiment prolifératif et une zone de cellules différenciées. L'utilisation de différentes m.o.i de *E. coli* génotoxiques ou non ajoutées au milieu de culture permettra d'une part d'analyser la réponse des cellules aux dommages à l'ADN et d'autre part de mieux caractériser leurs capacités à se diviser et à recréer un pool de cellules transitoires en prolifération.

CHAPITRE III

DIFFÉRENCIATION ET BARRIÈRE EPITHÉLIALE, LE RÔLE JOUÉ PAR LA COLIBACTINE ?

Nos résultats expérimentaux montrent un rôle de la Colibactine à la fois dans la différenciation de l'épithélium intestinal et la fonction de barrière de l'épithélium. Ainsi, si la physiologie des cellules à mucus n'est pas altérée par la colonisation des animaux par des souches de *E. coli* génotoxiques à l'âge adulte, les animaux présentent un nombre augmenté de cellules entéroendocrines et de Paneth dans l'intestin grêle pouvant contribuer à altérer l'homéostasie intestinale.

L'augmentation du nombre de cellules entéroendocrines suggère un impact sur le métabolisme énergétique de l'hôte [339, 340]. Cependant, aucune différence dans la prise de poids des animaux n'a été observée jusqu'au sevrage des animaux. De plus, le nombre de cellules entéroendocrines chez les jeunes animaux (J8 et J15) ne varient pas suggérant peut être une modification du métabolisme énergétique plus tardive, à l'âge adulte. D'autre part, il existe plusieurs types de cellules entéroendocrines, spécifiques du fait de leur localisation dans le tissu intestinal ou de leur capacité à sécréter tel ou tel facteur. Au niveau intestinal, la caractérisation des cellules entérochromaffines majoritaires dans ce tissu ainsi que l'évaluation de leurs capacités à sécréter de la sérotonine, un neurotransmetteur majeur présent dans ces cellules et impliqué dans la prise alimentaire pourrait nous permettre de mieux comprendre le rôle de ces cellules en réponse à l'action d'une génotoxine. Enfin, les cellules entéroendocrines interviennent dans la défense de l'hôte en permettant la reconnaissance et l'élimination de pathogènes. En effet, ces cellules, à travers l'expression de TLR peuvent sécréter des hormones, chimiokines et défensines et induire une réponse pro-inflammatoire spécifique [341, 342].

Au premier abord, l'augmentation du nombre de cellules de Paneth chez nos animaux colonisés avec des souches génotoxiques suggèrent une meilleure capacité de l'organisme à lutter contre les agressions pathogènes et à maintenir l'homéostasie intestinale vis-à-vis du microbiote commensal [295]. Or, inversement la diminution de l'expression du lysozyme dans les cellules de Paneth duodénales peut au contraire révéler un défaut fonctionnel des cellules de Paneth. En effet, Martinez-Rodriguez *et al.*, montrent récemment que l'infection par *Salmonella enterica* induit une diminution de l'expression et du nombre de granules de

lysozyme dans les cellules de Paneth mais augmente leur nombre suggérant que les cellules de Paneth nouvellement formées ne sont pas encore matures. L'expansion des cellules de Paneth en réponse à une infection avait déjà été démontré [343, 344] et suggère un rôle des cellules de Paneth dans la réponse intestinale inflammatoire similaire à celle induite par les neutrophiles conduisant à la sécrétion de quantité croissante de molécules antimicrobiennes dans la lumière intestinale, une fois la maturation des cellules de Paneth terminée [308].

Au vu de ces résultats, nous pouvons raisonnablement émettre l'hypothèse que l'augmentation du nombre de cellules entéroendocrines et de cellules de Paneth est impliquée dans le maintien de l'homéostasie intestinale et donc de la barrière. Les résultats obtenus sur la perméabilité paracellulaire apportent des éléments supplémentaires pour dire que la colonisation précoce des animaux par des souches de *E. coli* génotoxiques altère la fonction de barrière de l'épithélium intestinal. Ces observations suggèrent qu'un défaut de fonction de la barrière intestinale chez les animaux colonisés par des *E. coli* génotoxiques pourrait être impliqué dans un défaut de la réponse de l'organisme à la tolérance orale. Des expériences menées dernièrement au laboratoire avec Thomas Secher (post-doctorant) ont montré que la colonisation des animaux par des souches de *E. coli* génotoxiques induit, dans un protocole expérimental de tolérance à l'ovalbumine (OVA), une augmentation des IgG spécifiques à l'OVA dans le sérum ainsi qu'une augmentation de la production d'IFN γ . De plus, une diminution du nombre de LT régulateurs FoxP3⁺ a été observée dans les MLN et la rate alors qu'une augmentation des LT effecteurs CD4⁺ et CD8⁺ était faite chez les mêmes animaux. Ces résultats suggèrent qu'en réponse à la colonisation par des souches génotoxiques, les animaux sont plus sensibles à des antigènes (exogènes ou endogènes) et que la réponse immunitaire est exacerbée.

De manière plus générale, nous savons que le microbiote intestinal intervient dans le maintien de la tolérance immune. Si une tolérance immunitaire inappropriée est établie très tôt dans la vie et maintenue tout au long de la vie, cela représente un facteur de risque pour le développement de pathologies inflammatoires, auto-immune et allergique [345]. La colonisation précoce des nouveau-nés par des souches de *E. coli* génotoxiques et pérenne des animaux adultes, pourrait donc influencer les capacités de l'organisme à se défendre contre le développement de telles pathologies en modifiant le développement de l'épithélium intestinal et en altérant l'intégrité de la barrière.

Ces travaux de thèse nous ont permis pour la première fois de mettre en évidence une fenêtre temporelle au cours de laquelle l'épithélium intestinal immature du nouveau-né présente une sensibilité exacerbée à la génotoxicité de souches commensales de *E. coli*. De plus, ces travaux chez le rongeur conventionnel ont permis de mettre en évidence à quel point, à la naissance, la nature des souches bactériennes qui façonnent le futur microbiote intestinal de l'adulte, associée à un « portage », à priori asymptomatique, de cette même souche de *E. coli* tout au long de la vie peut moduler (moduler/contrôler) également aussi bien le développement et la maturation de l'épithélium intestinal que sa fonction de barrière. Ces résultats apportent des éléments de réponse nouveaux quant au rôle de la Colibactine à la fois sur le tropisme de la bactérie *E. coli* mais aussi et surtout, dans la prédisposition à développer des pathologies, aussi bien dans le CRC que dans le développement de pathologies différentes extra-intestinales comme l'auto-immunité ou l'allergie.

Mieux comprendre les mécanismes d'action de bactéries commensales génotoxiques sur l'épithélium intestinal permettra de mieux caractériser la réponse de l'hôte à ses « habitants ».

RÉFÉRENCES

1. Grapin-Botton, A. and D.A. Melton, *Endoderm development: from patterning to organogenesis*. Trends Genet, 2000. **16**(3): p. 124-30.
2. de Santa Barbara, P., G.R. van den Brink, and D.J. Roberts, *Development and differentiation of the intestinal epithelium*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(7): p. 1322-32.
3. Crosnier, C., D. Stamatakis, and J. Lewis, *Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(5): p. 349-59.
4. van der Flier, L.G. and H. Clevers, *Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium*. Annu Rev Physiol, 2009. **71**: p. 241-60.
5. Cheng, H. and C.P. Leblond, *Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types*. Am J Anat, 1974. **141**(4): p. 537-61.
6. Potten, C.S., *Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation*. Nature, 1977. **269**(5628): p. 518-21.
7. Potten, C.S., G. Owen, and D. Booth, *Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 11): p. 2381-8.
8. Yan, K.S., et al., *The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(2): p. 466-71.
9. Humphries, A. and N.A. Wright, *Colonic crypt organization and tumorigenesis*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(6): p. 415-24.
10. Shaker, A. and D.C. Rubin, *Intestinal stem cells and epithelial-mesenchymal interactions in the crypt and stem cell niche*. Transl Res. **156**(3): p. 180-7.
11. Mills, J.C. and J.I. Gordon, *The intestinal stem cell niche: there grows the neighborhood*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(22): p. 12334-6.
12. Clevers, H., *Wnt/beta-catenin signaling in development and disease*. Cell, 2006. **127**(3): p. 469-80.
13. Kuhnert, F., et al., *Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 266-71.
14. Vermeulen, L., et al., *Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment*. Nat Cell Biol. **12**(5): p. 468-76.
15. Korinek, V., et al., *Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4*. Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 379-83.
16. Fevr, T., et al., *Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(21): p. 7551-9.
17. He, T.C., et al., *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway*. Science, 1998. **281**(5382): p. 1509-12.
18. Muncan, V., et al., *Rapid loss of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene c-Myc*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(22): p. 8418-26.
19. Barker, N., et al., *Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5*. Nature, 2007. **449**(7165): p. 1003-7.
20. Blache, P., et al., *SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes*. J Cell Biol, 2004. **166**(1): p. 37-47.
21. Ireland, H., et al., *Inducible Cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract: effect of loss of beta-catenin*. Gastroenterology, 2004. **126**(5): p. 1236-46.

22. Pinto, D., et al., *Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium*. Genes Dev, 2003. **17**(14): p. 1709-13.
23. Fre, S., et al., *Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine*. Nature, 2005. **435**(7044): p. 964-8.
24. Qiao, L. and B.C. Wong, *Role of Notch signaling in colorectal cancer*. Carcinogenesis, 2009. **30**(12): p. 1979-86.
25. Yeung, T.M., et al., *Regulation of self-renewal and differentiation by the intestinal stem cell niche*. Cell Mol Life Sci. **68**(15): p. 2513-23.
26. Jensen, J., et al., *Control of endodermal endocrine development by Hes-1*. Nat Genet, 2000. **24**(1): p. 36-44.
27. Suzuki, K., et al., *Hes1-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**(1): p. 348-52.
28. Noah, T.K., B. Donahue, and N.F. Shroyer, *Intestinal development and differentiation*. Exp Cell Res, 2011. **317**(19): p. 2702-10.
29. Yang, Q., et al., *Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine*. Science, 2001. **294**(5549): p. 2155-8.
30. Katz, J.P., et al., *The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon*. Development, 2002. **129**(11): p. 2619-28.
31. Podolsky, D.K., et al., *Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency*. Gastroenterology, 2009. **137**(1): p. 209-20.
32. Taupin, D. and D.K. Podolsky, *Trefoil factors: initiators of mucosal healing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(9): p. 721-32.
33. Schonhoff, S.E., M. Giel-Moloney, and A.B. Leiter, *Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells*. Endocrinology, 2004. **145**(6): p. 2639-44.
34. Cheng, H. and C.P. Leblond, *Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. III. Entero-endocrine cells*. Am J Anat, 1974. **141**(4): p. 503-19.
35. Chen, C., et al., *Pdx1 inactivation restricted to the intestinal epithelium in mice alters duodenal gene expression in enterocytes and enteroendocrine cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **297**(6): p. G1126-37.
36. Sato, T., et al., *Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 415-8.
37. Bjercknes, M. and H. Cheng, *The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from Paneth cells in the adult mouse*. Am J Anat, 1981. **160**(1): p. 51-63.
38. van Es, J.H., et al., *Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(4): p. 381-6.
39. Bastide, P., et al., *Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium*. J Cell Biol, 2007. **178**(4): p. 635-48.
40. Meyer-Hoffert, U., et al., *Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer*. Gut, 2008. **57**(6): p. 764-71.
41. Salzman, N.H., et al., *Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin*. Nature, 2003. **422**(6931): p. 522-6.
42. Wilson, C.L., et al., *Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense*. Science, 1999. **286**(5437): p. 113-7.
43. Wehkamp, J., et al., *NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression*. Gut, 2004. **53**(11): p. 1658-64.
44. Thornberry, N.A., *Caspases: key mediators of apoptosis*. Chem Biol, 1998. **5**(5): p. R97-103.

45. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik, *Caspases: enemies within*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1312-6.
46. Marchiando, A.M., et al., *The epithelial barrier is maintained by in vivo tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding*. Gastroenterology, 2011. **140**(4): p. 1208-1218 e1-2.
47. Rosenblatt, J., M.C. Raff, and L.P. Cramer, *An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism*. Curr Biol, 2001. **11**(23): p. 1847-57.
48. Slattum, G., K.M. McGee, and J. Rosenblatt, *P115 RhoGEF and microtubules decide the direction apoptotic cells extrude from an epithelium*. J Cell Biol, 2009. **186**(5): p. 693-702.
49. Ferrier, L., et al., *Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice*. Gastroenterology, 2003. **125**(3): p. 795-804.
50. Schulzke, J.D., et al., *Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1072**: p. 288-99.
51. Vereecke, L., R. Beyaert, and G. van Loo, *Enterocyte death and intestinal barrier maintenance in homeostasis and disease*. Trends Mol Med, 2011. **17**(10): p. 584-93.
52. Nieuwenhuijs, V.B., et al., *The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora, bacterial overgrowth, and bacterial translocation in rats*. Ann Surg, 1998. **228**(2): p. 188-93.
53. Scholtens, P.A., et al., *The early settlers: intestinal microbiology in early life*. Annu Rev Food Sci Technol, 2012. **3**: p. 425-47.
54. Sekirov, I., et al., *Gut microbiota in health and disease*. Physiol Rev, 2010. **90**(3): p. 859-904.
55. Atuma, C., et al., *The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(5): p. G922-9.
56. Johansson, M.E., J.M. Larsson, and G.C. Hansson, *The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **108** Suppl 1: p. 4659-65.
57. Johansson, M.E., et al., *The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 15064-9.
58. Xu, J., et al., *A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis*. Science, 2003. **299**(5615): p. 2074-6.
59. McGuckin, M.A., et al., *Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(1): p. 100-13.
60. Kim, Y.S. and S.B. Ho, *Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress*. Curr Gastroenterol Rep. **12**(5): p. 319-30.
61. Van der Sluis, M., et al., *Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection*. Gastroenterology, 2006. **131**(1): p. 117-29.
62. Velcich, A., et al., *Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2*. Science, 2002. **295**(5560): p. 1726-9.
63. Fletcher, S.J. and J.Z. Rappoport, *Moving forward: polarised trafficking in cell migration*. Trends Cell Biol, 2010. **20**(2): p. 71-8.
64. Bareford, L.M. and P.W. Swaan, *Endocytic mechanisms for targeted drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(8): p. 748-58.

65. Fletcher, S.J. and J.Z. Rappoport, *The role of vesicle trafficking in epithelial cell motility*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 5): p. 1072-6.
66. Danielsen, E.M. and G.H. Hansen, *Lipid raft organization and function in the small intestinal brush border*. J Physiol Biochem, 2008. **64**(4): p. 377-82.
67. Heyman, M. and J.F. Desjeux, *Cytokine-induced alteration of the epithelial barrier to food antigens in disease*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **915**: p. 304-11.
68. Turner, J.R., *Intestinal mucosal barrier function in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 799-809.
69. Capaldo, C.T., et al., *Tight junction zonula occludens-3 regulates cyclin D1-dependent cell proliferation*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(10): p. 1677-85.
70. Hermiston, M.L. and J.I. Gordon, *Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin*. Science, 1995. **270**(5239): p. 1203-7.
71. Magalhaes, J.G., I. Tattoli, and S.E. Girardin, *The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens*. Semin Immunol, 2007. **19**(2): p. 106-15.
72. Kanamori, Y., et al., *Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit+ IL-7R+ Thyl+ lympho-hemopoietic progenitors develop*. J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1449-59.
73. Ivanov, II, G.E. Diehl, and D.R. Littman, *Lymphoid tissue inducer cells in intestinal immunity*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **308**: p. 59-82.
74. Ivanov, II, et al., *The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-33.
75. Satoh-Takayama, N., et al., *Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense*. Immunity, 2008. **29**(6): p. 958-70.
76. Sanos, S.L., et al., *RORgammat and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 83-91.
77. Saito, H., et al., *Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches*. Science, 1998. **280**(5361): p. 275-8.
78. Pabst, O., et al., *Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes*. Eur J Immunol, 2005. **35**(1): p. 98-107.
79. Kraehenbuhl, J.P. and M.R. Neutra, *Epithelial M cells: differentiation and function*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 301-32.
80. Rescigno, M., et al., *Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 361-7.
81. Mowat, A.M., *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(4): p. 331-41.
82. Sansonetti, P.J., *To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question*. Mucosal Immunol, 2011. **4**(1): p. 8-14.
83. Munford, R.S. and A.W. Varley, *Shield as signal: lipopolysaccharides and the evolution of immunity to gram-negative bacteria*. PLoS Pathog, 2006. **2**(6): p. e67.
84. Peterson, D.A., et al., *Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(6): p. 417-27.
85. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 44-54.
86. Abreu, M.T., et al., *Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene*

- expression in response to bacterial lipopolysaccharide.* J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1609-16.
87. Naik, S., et al., *Absence of Toll-like receptor 4 explains endotoxin hyporesponsiveness in human intestinal epithelium.* J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2001. **32**(4): p. 449-53.
88. Otte, J.M., E. Cario, and D.K. Podolsky, *Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells.* Gastroenterology, 2004. **126**(4): p. 1054-70.
89. Hausmann, M., et al., *Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation.* Gastroenterology, 2002. **122**(7): p. 1987-2000.
90. Cario, E., et al., *Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium.* Am J Pathol, 2002. **160**(1): p. 165-73.
91. Lotz, M., et al., *Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells.* J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 973-84.
92. Barbalat, R. and G.M. Barton, *MicroRNAs and LPS: developing a relationship in the neonatal gut.* Cell Host Microbe, 2010. **8**(4): p. 303-4.
93. Chassin, C., et al., *miR-146a mediates protective innate immune tolerance in the neonate intestine.* Cell Host Microbe, 2010. **8**(4): p. 358-68.
94. Mazmanian, S.K., J.L. Round, and D.L. Kasper, *A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease.* Nature, 2008. **453**(7195): p. 620-5.
95. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(27): p. 12204-9.
96. Ivanov, II, et al., *Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria.* Cell, 2009. **139**(3): p. 485-98.
97. Dobrindt, U., et al., *Genome dynamics and its impact on evolution of Escherichia coli.* Med Microbiol Immunol, 2010. **199**(3): p. 145-54.
98. Brunn, G.J. and J.L. Platt, *The etiology of sepsis: turned inside out.* Trends Mol Med, 2006. **12**(1): p. 10-6.
99. Ley, R.E., D.A. Peterson, and J.I. Gordon, *Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine.* Cell, 2006. **124**(4): p. 837-48.
100. Whitman, W.B., D.C. Coleman, and W.J. Wiebe, *Prokaryotes: the unseen majority.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6578-83.
101. Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the human intestinal microbial flora.* Science, 2005. **308**(5728): p. 1635-8.
102. Mahowald, M.A., et al., *Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(14): p. 5859-64.
103. O'Hara, A.M. and F. Shanahan, *The gut flora as a forgotten organ.* EMBO Rep, 2006. **7**(7): p. 688-93.
104. Frank, D.N., et al., *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(34): p. 13780-5.
105. Swidsinski, A., et al., *Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice.* World J Gastroenterol, 2005. **11**(8): p. 1131-40.
106. Gaboriau-Routhiau, V., et al., *The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses.* Immunity, 2009. **31**(4): p. 677-89.

107. DiGiulio, D.B., et al., *Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e3056.
108. Jimenez, E., et al., *Is meconium from healthy newborns actually sterile?* Res Microbiol, 2008. **159**(3): p. 187-93.
109. Rautava, S., et al., *Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012.
110. Clemente, J.C., et al., *The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view*. Cell, 2012. **148**(6): p. 1258-70.
111. Fanaro, S., et al., *Intestinal microflora in early infancy: composition and development*. Acta Paediatr Suppl, 2003. **91**(441): p. 48-55.
112. Mackie, R.I., A. Sghir, and H.R. Gaskins, *Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract*. Am J Clin Nutr, 1999. **69**(5): p. 1035S-1045S.
113. Bezirtzoglou, E., *The intestinal microflora during the first weeks of life*. Anaerobe, 1997. **3**(2-3): p. 173-7.
114. Penders, J., et al., *Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy*. Pediatrics, 2006. **118**(2): p. 511-21.
115. Adlerberth, I., et al., *Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(2): p. 343-50.
116. Palmer, C., et al., *Development of the human infant intestinal microbiota*. PLoS Biol, 2007. **5**(7): p. e177.
117. Joly, F., et al., *Drastic changes in fecal and mucosa-associated microbiota in adult patients with short bowel syndrome*. Biochimie, 2010. **92**(7): p. 753-61.
118. Dalby, A.B., et al., *Culture-independent analysis of indomethacin-induced alterations in the rat gastrointestinal microbiota*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(10): p. 6707-15.
119. Yajima, M., et al., *Bacterial translocation in neonatal rats: the relation between intestinal flora, translocated bacteria, and influence of milk*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2001. **33**(5): p. 592-601.
120. Inoue, R. and K. Ushida, *Development of the intestinal microbiota in rats and its possible interactions with the evolution of the luminal IgA in the intestine*. FEMS Microbiol Ecol, 2003. **45**(2): p. 147-53.
121. Tomas, J., P. Langella, and C. Cherbuy, *The intestinal microbiota in the rat model: major breakthroughs from new technologies*. Anim Health Res Rev, 2012. **13**(1): p. 54-63.
122. Dominguez-Bello, M.G., et al., *Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(26): p. 11971-5.
123. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.
124. Martin, R., et al., *Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women*. Res Microbiol, 2007. **158**(1): p. 31-7.
125. Matsumiya, Y., et al., *Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal Lactobacillus species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction*. J Infect Chemother, 2002. **8**(1): p. 43-9.
126. Vaishampayan, P.A., et al., *Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant*. Genome Biol Evol, 2010. **2**: p. 53-66.
127. Morelli, L., *Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition*. J Nutr, 2008. **138**(9): p. 1791S-1795S.

128. Huurre, A., et al., *Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity*. Neonatology, 2008. **93**(4): p. 236-40.
129. Biasucci, G., et al., *Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria*. J Nutr, 2008. **138**(9): p. 1796S-1800S.
130. Chen, J., W. Cai, and Y. Feng, *Development of intestinal bifidobacteria and lactobacilli in breast-fed neonates*. Clin Nutr, 2007. **26**(5): p. 559-66.
131. Salminen, S., et al., *Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children*. Gut, 2004. **53**(9): p. 1388-9.
132. Boehm, G. and G. Moro, *Structural and functional aspects of prebiotics used in infant nutrition*. J Nutr, 2008. **138**(9): p. 1818S-1828S.
133. Walker, A., *Breast milk as the gold standard for protective nutrients*. J Pediatr, 2010. **156**(2 Suppl): p. S3-7.
134. Thurl, S., et al., *Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods*. Br J Nutr, 2011. **104**(9): p. 1261-71.
135. Collado, M.C., et al., *Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR*. Lett Appl Microbiol, 2009. **48**(5): p. 523-8.
136. Martin, R., et al., *Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut*. J Pediatr, 2003. **143**(6): p. 754-8.
137. Heikkila, M.P. and P.E. Saris, *Inhibition of Staphylococcus aureus by the commensal bacteria of human milk*. J Appl Microbiol, 2003. **95**(3): p. 471-8.
138. Haarman, M. and J. Knol, *Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal Bifidobacterium species in infants receiving a prebiotic infant formula*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(5): p. 2318-24.
139. Haarman, M. and J. Knol, *Quantitative real-time PCR analysis of fecal Lactobacillus species in infants receiving a prebiotic infant formula*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(4): p. 2359-65.
140. Rinne, M., et al., *Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses*. J Pediatr, 2005. **147**(2): p. 186-91.
141. Jernberg, C., et al., *Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota*. ISME J, 2007. **1**(1): p. 56-66.
142. Jakobsson, H.E., et al., *Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9836.
143. Fallani, M., et al., *Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics*. J Pediatr Gastroenterol Nutr. **51**(1): p. 77-84.
144. Hussey, S., et al., *Parenteral antibiotics reduce bifidobacteria colonization and diversity in neonates*. Int J Microbiol, 2011. **2011**.
145. Tanaka, S., et al., *Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2009. **56**(1): p. 80-7.
146. Mangin, I., et al., *Amoxicillin treatment modifies the composition of Bifidobacterium species in infant intestinal microbiota*. Anaerobe, 2010. **16**(4): p. 433-8.
147. Droste, J.H., et al., *Does the use of antibiotics in early childhood increase the risk of asthma and allergic disease?* Clin Exp Allergy, 2000. **30**(11): p. 1547-53.
148. Kozyrskyj, A.L., P. Ernst, and A.B. Becker, *Increased risk of childhood asthma from antibiotic use in early life*. Chest, 2007. **131**(6): p. 1753-9.

149. Kummeling, I., et al., *Early life exposure to antibiotics and the subsequent development of eczema, wheeze, and allergic sensitization in the first 2 years of life: the KOALA Birth Cohort Study*. Pediatrics, 2007. **119**(1): p. e225-31.
150. Dethlefsen, L., M. McFall-Ngai, and D.A. Relman, *An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 811-8.
151. Qin, J., et al., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 59-65.
152. Turnbaugh, P.J., et al., *The human microbiome project*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 804-10.
153. Zoetendal, E.G., M. Rajilic-Stojanovic, and W.M. de Vos, *High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota*. Gut, 2008. **57**(11): p. 1605-15.
154. Arumugam, M., et al., *Enterotypes of the human gut microbiome*. Nature, 2011. **473**(7346): p. 174-80.
155. Mandar, R. and M. Mikelsaar, *Transmission of mother's microflora to the newborn at birth*. Biol Neonate, 1996. **69**(1): p. 30-5.
156. Tap, J., et al., *Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core*. Environ Microbiol, 2009. **11**(10): p. 2574-84.
157. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1027-31.
158. Brooks, S.P., et al., *Culture-independent phylogenetic analysis of the faecal flora of the rat*. Can J Microbiol, 2003. **49**(10): p. 589-601.
159. Manichanh, C., et al., *Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake*. Genome Res, 2010. **20**(10): p. 1411-9.
160. Turnbaugh, P.J., et al., *A core gut microbiome in obese and lean twins*. Nature, 2009. **457**(7228): p. 480-4.
161. Wu, G.D., et al., *Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes*. Science, 2011. **334**(6052): p. 105-8.
162. Claesson, M.J., et al., *Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108 Suppl 1**: p. 4586-91.
163. Sullivan, A., C. Edlund, and C.E. Nord, *Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora*. Lancet Infect Dis, 2001. **1**(2): p. 101-14.
164. Dethlefsen, L., et al., *The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing*. PLoS Biol, 2008. **6**(11): p. e280.
165. Sommer, M.O., G. Dantas, and G.M. Church, *Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora*. Science, 2009. **325**(5944): p. 1128-31.
166. Goossens, H., et al., *Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study*. Lancet, 2005. **365**(9459): p. 579-87.
167. Poppe, C., et al., *Characterization of antimicrobial resistance of Salmonella Newport isolated from animals, the environment, and animal food products in Canada*. Can J Vet Res, 2006. **70**(2): p. 105-14.
168. Livesey, G., *Energy values of unavailable carbohydrate and diets: an inquiry and analysis*. Am J Clin Nutr, 1990. **51**(4): p. 617-37.
169. Rul, F., et al., *Impact of the metabolic activity of Streptococcus thermophilus on the colon epithelium of gnotobiotic rats*. J Biol Chem, 2011. **286**(12): p. 10288-96.

170. Delzenne, N.M. and P.D. Cani, *Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition*. *Annu Rev Nutr*, 2011. **31**: p. 15-31.
171. Al-Lahham, S.H., et al., *Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1801**(11): p. 1175-83.
172. Delzenne, N.M. and C.M. Williams, *Prebiotics and lipid metabolism*. *Curr Opin Lipidol*, 2002. **13**(1): p. 61-7.
173. Ge, H., et al., *Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids*. *Endocrinology*, 2008. **149**(9): p. 4519-26.
174. Frankel, W.L., et al., *Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon*. *Gastroenterology*, 1994. **106**(2): p. 375-80.
175. Madsen, K., et al., *Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function*. *Gastroenterology*, 2001. **121**(3): p. 580-91.
176. Ismail, A.S. and L.V. Hooper, *Epithelial cells and their neighbors. IV. Bacterial contributions to intestinal epithelial barrier integrity*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005. **289**(5): p. G779-84.
177. Hooper, L.V. and J.I. Gordon, *Commensal host-bacterial relationships in the gut*. *Science*, 2001. **292**(5519): p. 1115-8.
178. Hooper, L.V., et al., *Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine*. *Science*, 2001. **291**(5505): p. 881-4.
179. Pull, S.L., et al., *Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(1): p. 99-104.
180. Cherbuy, C., et al., *Microbiota matures colonic epithelium through a coordinated induction of cell cycle-related proteins in gnotobiotic rat*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010. **299**(2): p. G348-57.
181. Reikvam, D.H., et al., *Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression*. *PLoS One*, 2011. **6**(3): p. e17996.
182. Stappenbeck, T.S., L.V. Hooper, and J.I. Gordon, *Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(24): p. 15451-5.
183. Lutgendorff, F., L.M. Akkermans, and J.D. Soderholm, *The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastro-intestinal damage*. *Curr Mol Med*, 2008. **8**(4): p. 282-98.
184. Ukena, S.N., et al., *Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity*. *PLoS One*, 2007. **2**(12): p. e1308.
185. Macpherson, A.J. and N.L. Harris, *Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(6): p. 478-85.
186. He, B., et al., *Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL*. *Immunity*, 2007. **26**(6): p. 812-26.
187. Ivanov, II, et al., *Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine*. *Cell Host Microbe*, 2008. **4**(4): p. 337-49.
188. Hall, J.A., et al., *Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses*. *Immunity*, 2008. **29**(4): p. 637-49.
189. Mazmanian, S.K., et al., *An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system*. *Cell*, 2005. **122**(1): p. 107-18.

190. Bouskra, D., et al., *Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis*. Nature, 2008. **456**(7221): p. 507-10.
191. Brandtzaeg, P., *Homeostatic impact of indigenous microbiota and secretory immunity*. Benef Microbes, 2010. **1**(3): p. 211-27.
192. Endt, K., et al., *The microbiota mediates pathogen clearance from the gut lumen after non-typhoidal Salmonella diarrhea*. PLoS Pathog, 2010. **6**(9): p. e1001097.
193. Stecher, B. and W.D. Hardt, *Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut*. Curr Opin Microbiol, 2010. **14**(1): p. 82-91.
194. Hopkins, M.J. and G.T. Macfarlane, *Nondigestible oligosaccharides enhance bacterial colonization resistance against Clostridium difficile in vitro*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(4): p. 1920-7.
195. Gomes, D.A., et al., *Comparison of antagonistic ability against enteropathogens by G+ and G- anaerobic dominant components of human fecal microbiota*. Folia Microbiol (Praha), 2006. **51**(2): p. 141-5.
196. Medellin-Pena, M.J. and M.W. Griffiths, *Effect of molecules secreted by Lactobacillus acidophilus strain La-5 on Escherichia coli O157:H7 colonization*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(4): p. 1165-72.
197. Baez, S. and H.A. Gordon, *Tone and reactivity of vascular smooth muscle in germfree rat mesentery*. J Exp Med, 1971. **134**(4): p. 846-56.
198. Crawford, P.A., et al., *Regulation of myocardial ketone body metabolism by the gut microbiota during nutrient deprivation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(27): p. 11276-81.
199. Gordon, H.A., B.S. Wostmann, and E. Bruckner-Kardoss, *Effects of Microbial Flora on Cardiac Output and Other Elements of Blood Circulation*. Proc Soc Exp Biol Med, 1963. **114**: p. 301-4.
200. Amaral, F.A., et al., *Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 2193-7.
201. Rhee, S.H., C. Pothoulakis, and E.A. Mayer, *Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2009. **6**(5): p. 306-14.
202. Sudo, N., et al., *Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice*. J Physiol, 2004. **558**(Pt 1): p. 263-75.
203. Backhed, F., et al., *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(44): p. 15718-23.
204. Hansen, A.K., et al., *Diabetes preventive gluten-free diet decreases the number of caecal bacteria in non-obese diabetic mice*. Diabetes Metab Res Rev, 2006. **22**(3): p. 220-5.
205. Scott, F.W., *Food-induced type 1 diabetes in the BB rat*. Diabetes Metab Rev, 1996. **12**(4): p. 341-59.
206. Wen, L., et al., *Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1109-13.
207. Calcinaro, F., et al., *Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse*. Diabetologia, 2005. **48**(8): p. 1565-75.
208. Sartor, R.B., *Microbial influences in inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology, 2008. **134**(2): p. 577-94.

209. Andoh, A., et al., *Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis*. J Gastroenterol, 2011. **46**(4): p. 479-86.
210. Manichanh, C., et al., *Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach*. Gut, 2006. **55**(2): p. 205-11.
211. DuPont, A.W. and H.L. DuPont, *The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011. **8**(9): p. 523-31.
212. Seksik, P., et al., *Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon*. Gut, 2003. **52**(2): p. 237-42.
213. Onderdonk, A.B., J.A. Hermos, and J.G. Bartlett, *The role of the intestinal microflora in experimental colitis*. Am J Clin Nutr, 1977. **30**(11): p. 1819-25.
214. Sokol, H., et al., *Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(43): p. 16731-6.
215. Willing, B., et al., *Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(5): p. 653-60.
216. Sobhani, I., et al., *Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e16393.
217. Strachan, D.P., *Hay fever, hygiene, and household size*. BMJ, 1989. **299**(6710): p. 1259-60.
218. Strachan, D.P., *Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis"*. Thorax, 2000. **55 Suppl 1**: p. S2-10.
219. Guarner, F., et al., *Mechanisms of disease: the hygiene hypothesis revisited*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2006. **3**(5): p. 275-84.
220. Schmidt, B., et al., *Establishment of normal gut microbiota is compromised under excessive hygiene conditions*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28284.
221. Noverr, M.C., et al., *Role of antibiotics and fungal microbiota in driving pulmonary allergic responses*. Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 4996-5003.
222. Wills-Karp, M., J. Santeliz, and C.L. Karp, *The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): p. 69-75.
223. Neish, A.S., *Microbes in gastrointestinal health and disease*. Gastroenterology, 2009. **136**(1): p. 65-80.
224. Orskov, F., et al., *Special Escherichia coli serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhoea in adults and children*. Med Microbiol Immunol, 1976. **162**(2): p. 73-80.
225. Orskov, F. and I. Orskov, *Escherichia coli serotyping and disease in man and animals*. Can J Microbiol, 1992. **38**(7): p. 699-704.
226. Ochman, H. and R.K. Selander, *Standard reference strains of Escherichia coli from natural populations*. J Bacteriol, 1984. **157**(2): p. 690-3.
227. Selander, R.K., et al., *Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics*. Appl Environ Microbiol, 1986. **51**(5): p. 873-84.
228. Herzer, P.J., et al., *Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1990. **172**(11): p. 6175-81.
229. Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen, *Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(10): p. 4555-8.

230. Gordon, D.M., et al., *Assigning Escherichia coli strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method*. Environ Microbiol, 2008. **10**(10): p. 2484-96.
231. Jauregui, F., et al., *Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic Escherichia coli strains*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 560.
232. Lecointre, G., et al., *Escherichia coli molecular phylogeny using the incongruence length difference test*. Mol Biol Evol, 1998. **15**(12): p. 1685-95.
233. Jauregui, F., et al., *Effects of intrapartum penicillin prophylaxis on intestinal bacterial colonization in infants*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(11): p. 5184-8.
234. Le Gall, T., et al., *Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group Escherichia coli strains*. Mol Biol Evol, 2007. **24**(11): p. 2373-84.
235. Escobar-Paramo, P., et al., *Large-scale population structure of human commensal Escherichia coli isolates*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(9): p. 5698-700.
236. Nowrouzian, F.L., I. Adlerberth, and A.E. Wold, *Enhanced persistence in the colonic microbiota of Escherichia coli strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells*. Microbes Infect, 2006. **8**(3): p. 834-40.
237. Skurnik, D., et al., *Characteristics of human intestinal Escherichia coli with changing environments*. Environ Microbiol, 2008. **10**(8): p. 2132-7.
238. Nowrouzian, F., et al., *Escherichia coli in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage*. Pediatr Res, 2003. **54**(1): p. 8-14.
239. Nowrouzian, F.L., A.E. Wold, and I. Adlerberth, *Escherichia coli strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants*. J Infect Dis, 2005. **191**(7): p. 1078-83.
240. Gordon, D.M., S.E. Stern, and P.J. Collignon, *Influence of the age and sex of human hosts on the distribution of Escherichia coli ECOR groups and virulence traits*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 1): p. 15-23.
241. Hendrickson, H., *Order and disorder during Escherichia coli divergence*. PLoS Genet, 2009. **5**(1): p. e1000335.
242. Touchon, M., et al., *Organised genome dynamics in the Escherichia coli species results in highly diverse adaptive paths*. PLoS Genet, 2009. **5**(1): p. e1000344.
243. Blattner, F.R., et al., *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12*. Science, 1997. **277**(5331): p. 1453-62.
244. Hayashi, T., et al., *Complete genome sequence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12*. DNA Res, 2001. **8**(1): p. 11-22.
245. Kaper, J.B., J.P. Nataro, and H.L. Mobley, *Pathogenic Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(2): p. 123-40.
246. van Elsas, J.D., et al., *Survival of Escherichia coli in the environment: fundamental and public health aspects*. ISME J. **5**(2): p. 173-83.
247. Kudva, I.T., et al., *Strains of Escherichia coli O157:H7 differ primarily by insertions or deletions, not single-nucleotide polymorphisms*. J Bacteriol, 2002. **184**(7): p. 1873-9.
248. Nowrouzian, F.L., et al., *Phylogenetic group B2 Escherichia coli strains from the bowel microbiota of Pakistani infants carry few virulence genes and lack the capacity for long-term persistence*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15**(5): p. 466-72.

249. Syed, S.A., G.D. Abrams, and R. Freter, *Efficiency of various intestinal bacteria in assuming normal functions of enteric flora after association with germ-free mice.* Infect Immun, 1970. **2**(4): p. 376-86.
250. Tenaillon, O., et al., *The population genetics of commensal Escherichia coli.* Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(3): p. 207-17.
251. Bettelheim, K.A. and S.M. Lennox-King, *The acquisition of Escherichia coli by newborn babies.* Infection, 1976. **4**(3): p. 174-9.
252. Kuhn, I., K. Tullus, and R. Mollby, *Colonization and persistence of Escherichia coli phenotypes in the intestines of children aged 0 to 18 months.* Infection, 1986. **14**(1): p. 7-12.
253. Gauger, E.J., et al., *Role of motility and the flhDC Operon in Escherichia coli MG1655 colonization of the mouse intestine.* Infect Immun, 2007. **75**(7): p. 3315-24.
254. Giraud, A., et al., *Dissecting the genetic components of adaptation of Escherichia coli to the mouse gut.* PLoS Genet, 2008. **4**(1): p. e2.
255. Leatham, M.P., et al., *Mouse intestine selects nonmotile flhDC mutants of Escherichia coli MG1655 with increased colonizing ability and better utilization of carbon sources.* Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 8039-49.
256. Collado, M.C., et al., *Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease.* J Clin Pathol, 2009. **62**(3): p. 264-9.
257. Schwiertz, A., et al., *Microbiota in pediatric inflammatory bowel disease.* J Pediatr, 2010. **157**(2): p. 240-244 e1.
258. Malo, M.S., et al., *Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota.* Gut, 2010. **59**(11): p. 1476-84.
259. Vogel-Scheel, J., et al., *Requirement of purine and pyrimidine synthesis for colonization of the mouse intestine by Escherichia coli.* Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(15): p. 5181-7.
260. Leatham, M.P., et al., *Precolonized human commensal Escherichia coli strains serve as a barrier to E. coli O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine.* Infect Immun, 2009. **77**(7): p. 2876-86.
261. Dobrindt, U., et al., *Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal Escherichia coli isolates by use of DNA arrays.* J Bacteriol, 2003. **185**(6): p. 1831-40.
262. Bergthorsson, U. and H. Ochman, *Distribution of chromosome length variation in natural isolates of Escherichia coli.* Mol Biol Evol, 1998. **15**(1): p. 6-16.
263. Fabich, A.J., et al., *Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal Escherichia coli strains in the mouse intestine.* Infect Immun, 2008. **76**(3): p. 1143-52.
264. Le Bouguenec, C. and C. Schouler, *Sugar metabolism, an additional virulence factor in enterobacteria.* Int J Med Microbiol, 2010. **301**(1): p. 1-6.
265. Miranda, R.L., et al., *Glycolytic and gluconeogenic growth of Escherichia coli O157:H7 (EDL933) and E. coli K-12 (MG1655) in the mouse intestine.* Infect Immun, 2004. **72**(3): p. 1666-76.
266. Poulsen, L.K., et al., *Spatial distribution of Escherichia coli in the mouse large intestine inferred from rRNA in situ hybridization.* Infect Immun, 1994. **62**(11): p. 5191-4.
267. Sweeney, N.J., et al., *The Escherichia coli K-12 gntP gene allows E. coli F-18 to occupy a distinct nutritional niche in the streptomycin-treated mouse large intestine.* Infect Immun, 1996. **64**(9): p. 3497-503.
268. Nougayrede, J.P., et al., *Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle.* Trends Microbiol, 2005. **13**(3): p. 103-10.

269. Oswald, E., et al., *Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression*. *Curr Opin Microbiol*, 2005. **8**(1): p. 83-91.
270. Nougayrede, J.P., et al., *Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells*. *Science*, 2006. **313**(5788): p. 848-51.
271. Dubois, D., et al., *ClbP is a prototype of a peptidase subgroup involved in biosynthesis of nonribosomal peptides*. *J Biol Chem*. **286**(41): p. 35562-70.
272. Kim, B.S., et al., *Biochemical evidence for an editing role of thioesterase II in the biosynthesis of the polyketide pikromycin*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(50): p. 48028-34.
273. Fischbach, M.A. and C.T. Walsh, *Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms*. *Chem Rev*, 2006. **106**(8): p. 3468-96.
274. Austin, M.B. and J.P. Noel, *The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases*. *Nat Prod Rep*, 2003. **20**(1): p. 79-110.
275. Du, L., C. Sanchez, and B. Shen, *Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules*. *Metab Eng*, 2001. **3**(1): p. 78-95.
276. Putze, J., et al., *Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family Enterobacteriaceae*. *Infect Immun*, 2009. **77**(11): p. 4696-703.
277. Johnson, J.R., et al., *Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the Escherichia coli pks genomic island*. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(12): p. 3906-11.
278. Hacker, J., U. Hentschel, and U. Dobrindt, *Prokaryotic chromosomes and disease*. *Science*, 2003. **301**(5634): p. 790-3.
279. Dubois, D., et al., *Cyclomodulins in urosepsis strains of Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. **48**(6): p. 2122-9.
280. Kurokawa, K., et al., *Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes*. *DNA Res*, 2007. **14**(4): p. 169-81.
281. Nowrouzian, F.L. and E. Oswald, *Escherichia coli strains with the capacity for long-term persistence in the bowel microbiota carry the potentially genotoxic pks island*. *Microb Pathog*, 2012. **53**(3-4): p. 180-2.
282. Nowrouzian, F., A.E. Wold, and I. Adlerberth, *P fimbriae and aerobactin as intestinal colonization factors for Escherichia coli in Pakistani infants*. *Epidemiol Infect*, 2001. **126**(1): p. 19-23.
283. Ostblom, A., et al., *Pathogenicity island markers, virulence determinants malX and usp, and the capacity of Escherichia coli to persist in infants' commensal microbiotas*. *Appl Environ Microbiol*, 2011. **77**(7): p. 2303-8.
284. Sancar, A., et al., *Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints*. *Annu Rev Biochem*, 2004. **73**: p. 39-85.
285. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(10): p. 5858-68.
286. Cuevas-Ramos, G., et al., *Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(25): p. 11537-42.
287. Syljuasen, R.G., et al., *Adaptation to the ionizing radiation-induced G2 checkpoint occurs in human cells and depends on checkpoint kinase 1 and Polo-like kinase 1 kinases*. *Cancer Res*, 2006. **66**(21): p. 10253-7.
288. Suzuki, M., et al., *Phosphorylated histone H2AX foci persist on rejoined mitotic chromosomes in normal human diploid cells exposed to ionizing radiation*. *Radiat Res*, 2006. **165**(3): p. 269-76.

289. McClintock, B., *The Association of Mutants with Homozygous Deficiencies in Zea Mays*. Genetics, 1941. **26**(5): p. 542-71.
290. Schultz, M., *Clinical use of E. coli Nissle 1917 in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(7): p. 1012-8.
291. Rembacken, B.J., et al., *Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial*. Lancet, 1999. **354**(9179): p. 635-9.
292. Kruis, W., et al., *Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine*. Gut, 2004. **53**(11): p. 1617-23.
293. Kruis, W., et al., *Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis*. Aliment Pharmacol Ther, 1997. **11**(5): p. 853-8.
294. Olier, M., et al., *Genotoxicity of Escherichia coli Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity*. Gut Microbes, 2012. **3**(6).
295. Vaishnava, S., et al., *Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(52): p. 20858-63.
296. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6640-5.
297. Fenech, M., et al., *Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells*. Mutagenesis, 2011. **26**(1): p. 125-32.
298. Dekaney, C.M., et al., *Expansion of intestinal stem cells associated with long-term adaptation following ileocecal resection in mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **293**(5): p. G1013-22.
299. Dehmer, J.J., et al., *Expansion of intestinal epithelial stem cells during murine development*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27070.
300. Lay, C., et al., *Colonic microbiota signatures across five northern European countries*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(7): p. 4153-5.
301. Furet, J.P., et al., *Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR*. FEMS Microbiol Ecol, 2009. **68**(3): p. 351-62.
302. Walsh, C.T., *Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility*. Science, 2004. **303**(5665): p. 1805-10.
303. Arthur, J.C., et al., *Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota*. Science, 2012.
304. Lievin-Le Moal, V. and A.L. Servin, *The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(2): p. 315-37.
305. Linden, S.K., T.H. Florin, and M.A. McGuckin, *Mucin dynamics in intestinal bacterial infection*. PLoS One, 2008. **3**(12): p. e3952.
306. Martinez Rodriguez, N.R., et al., *Expansion of Paneth cell population in response to enteric Salmonella enterica serovar Typhimurium infection*. Infect Immun, 2012. **80**(1): p. 266-75.
307. Bevins, C.L. and N.H. Salzman, *Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(5): p. 356-68.

308. Martinez Rodriguez, N.R., et al., *Expansion of Paneth cell population in response to enteric Salmonella enterica serovar Typhimurium infection*. Infect Immun, 2011. **80**(1): p. 266-75.
309. Thomas, M., et al., *Carbohydrate metabolism is essential for the colonization of Streptococcus thermophilus in the digestive tract of gnotobiotic rats*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28789.
310. Parkin, D.M., *The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002*. Int J Cancer, 2006. **118**(12): p. 3030-44.
311. Blaser, M.J., *Understanding microbe-induced cancers*. Cancer Prev Res (Phila), 2008. **1**(1): p. 15-20.
312. Bray, F., et al., *Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995*. Eur J Cancer, 2002. **38**(1): p. 99-166.
313. Chambers, W.M., et al., *Cancer surveillance in ulcerative colitis*. Br J Surg, 2005. **92**(8): p. 928-36.
314. Balish, E. and T. Warner, *Enterococcus faecalis induces inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice*. Am J Pathol, 2002. **160**(6): p. 2253-7.
315. Winters, M.D., et al., *Prospective case-cohort study of intestinal colonization with enterococci that produce extracellular superoxide and the risk for colorectal adenomas or cancer*. Am J Gastroenterol, 1998. **93**(12): p. 2491-500.
316. Peyret-Lacombe, A., et al., *TLR2 sensing of F. nucleatum and S. sanguinis distinctly triggered gingival innate response*. Cytokine, 2009. **46**(2): p. 201-10.
317. Swidsinski, A., et al., *Acute appendicitis is characterised by local invasion with Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. Gut, 2011. **60**(1): p. 34-40.
318. Weiss, E.I., et al., *Attachment of Fusobacterium nucleatum PK1594 to mammalian cells and its coaggregation with periodontopathogenic bacteria are mediated by the same galactose-binding adhesin*. Oral Microbiol Immunol, 2000. **15**(6): p. 371-7.
319. Castellarin, M., et al., *Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma*. Genome Res, 2012. **22**(2): p. 299-306.
320. Kostic, A.D., et al., *Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma*. Genome Res, 2012. **22**(2): p. 292-8.
321. Jin, G., et al., *Inactivating cholecystokinin-2 receptor inhibits progastrin-dependent colonic crypt fission, proliferation, and colorectal cancer in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(9): p. 2691-701.
322. Milicic, A., et al., *Ectopic expression of P-cadherin correlates with promoter hypomethylation early in colorectal carcinogenesis and enhanced intestinal crypt fission in vivo*. Cancer Res, 2008. **68**(19): p. 7760-8.
323. Nakachi, K., et al., *Sixty years of follow-up of Hiroshima and Nagasaki survivors: current progress in molecular epidemiology studies*. Mutat Res, 2008. **659**(1-2): p. 109-17.
324. Rice, S.C., et al., *Genotoxicity of therapeutic intervention in children with acute lymphocytic leukemia*. Cancer Res, 2004. **64**(13): p. 4464-71.
325. Brassesco, M.S., et al., *Cytogenetic instability in childhood acute lymphoblastic leukemia survivors*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2011**.
326. Jenney, M.E. and G.A. Levitt, *The quality of survival after childhood cancer*. Eur J Cancer, 2002. **38**(9): p. 1241-50; discussion 1251-3.
327. Cardis, E. and M. Hatch, *The Chernobyl accident--an epidemiological perspective*. Clin Oncol (R Coll Radiol). **23**(4): p. 251-60.

328. Li, P., et al., *Homeostatic control of the crypt-villus axis by the bacterial enterotoxin receptor guanylyl cyclase C restricts the proliferating compartment in intestine*. *Am J Pathol*, 2007. **171**(6): p. 1847-58.
329. Reinhardt, H.C. and B. Schumacher, *The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer*. *Trends Genet*, 2012. **28**(3): p. 128-36.
330. Halazonetis, T.D., V.G. Gorgoulis, and J. Bartek, *An oncogene-induced DNA damage model for cancer development*. *Science*, 2008. **319**(5868): p. 1352-5.
331. Rowan, A.J., et al., *APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits"*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(7): p. 3352-7.
332. Haegerbarth, A. and H. Clevers, *Wnt signaling, lgr5, and stem cells in the intestine and skin*. *Am J Pathol*, 2009. **174**(3): p. 715-21.
333. Dominguez-Sola, D., et al., *Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc*. *Nature*, 2007. **448**(7152): p. 445-51.
334. Pelengaris, S., M. Khan, and G. Evan, *c-MYC: more than just a matter of life and death*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(10): p. 764-76.
335. Fujishita, T., M. Aoki, and M.M. Taketo, *The role of mTORC1 pathway in intestinal tumorigenesis*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(22): p. 3684-7.
336. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. *Cell*, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
337. Sato, T., et al., *Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium*. *Gastroenterology*, 2011. **141**(5): p. 1762-72.
338. Yui, S., et al., *Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5(+) stem cell*. *Nat Med*, 2012. **18**(4): p. 618-23.
339. Samuel, B.S., et al., *Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(43): p. 16767-72.
340. Gniuli, D., et al., *High-fat feeding stimulates endocrine, glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP)-expressing cell hyperplasia in the duodenum of Wistar rats*. *Diabetologia*, 2010. **53**(10): p. 2233-40.
341. Palazzo, M., et al., *Activation of enteroendocrine cells via TLRs induces hormone, chemokine, and defensin secretion*. *J Immunol*, 2007. **178**(7): p. 4296-303.
342. Selleri, S., et al., *Induction of pro-inflammatory programs in enteroendocrine cells by the Toll-like receptor agonists flagellin and bacterial LPS*. *Int Immunol*, 2008. **20**(8): p. 961-70.
343. Kamal, M., et al., *Paneth and intermediate cell hyperplasia induced in mice by helminth infections*. *Parasitology*, 2002. **125**(Pt 3): p. 275-81.
344. McConnell, B.B., et al., *Kruppel-like factor 5 mediates transmissible murine colonic hyperplasia caused by *Citrobacter rodentium* infection*. *Gastroenterology*, 2008. **134**(4): p. 1007-16.
345. McLoughlin, R.M. and K.H. Mills, *Influence of gastrointestinal commensal bacteria on the immune responses that mediate allergy and asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 2011. **127**(5): p. 1097-107; quiz 1108-9.

RESUME

Delphine PAYROS

Etude de l'effet de la colonisation des nouveau-nés par des souches de *Escherichia coli* génotoxiques sur le développement et la fonctionnalité de la barrière intestinale.

Directeur de thèse : Eric OSWALD

Au cours du développement post-natal, le microbiote intestinal interagit intimement avec l'hôte et module à la fois la différenciation de l'épithélium intestinal et la maturation du système immunitaire. Hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'Homme et des animaux à sang chaud, *E. coli* s'établit dans le tractus digestif dès les premières heures ou jours qui suivent la naissance. *E. coli* est alors une des espèces bactériennes dominantes de la flore du nouveau-né avant de devenir la bactérie aérobie facultative prédominante au sein du microbiote adulte. Certaines souches commensales de *E. coli* sont capables d'induire des dommages à l'ADN dans les entérocytes. La génotoxicité de ces souches résulte de la production d'une toxine, la Colibactine, synthétisée à partir de synthèses de polycétides et de peptides non ribosomiaux. Cette voie de biosynthèse est codée par un îlot génomique appelé *pks*. Plusieurs études épidémiologiques récentes montrent que plus de 30% des jeunes enfants âgés de trois jours sont colonisés par des *E. coli* qui portent l'îlot *pks*.

Afin d'analyser les effets à long terme de la colonisation précoce des nouveau-nés par des souches de *E. coli* génotoxiques, nous avons développé un modèle animal expérimental qui mime la transmission naturelle des *E. coli* du microbiote de la mère au nouveau-né. Pour cela, des femelles rats gestantes sont gavées avec une souche commensale humaine génotoxique (*E. coli* WT), son mutant isogénique non génotoxique (*E. coli* $\Delta clbA$) ou le mutant complémenté (*E. coli* $\Delta clbA+clbA$) pour lequel la production de la Colibactine a été restaurée. Après la naissance, la transmission des souches bactériennes et la persistance de la colonisation chez les nouveau-nés ont été évaluées. En parallèle, les dommages à l'ADN occasionnés par ces souches sur l'épithélium intestinal ont été comparés sur une période de 100 jours. Enfin, le développement et la maturation de l'épithélium intestinal ainsi que sa fonction de barrière ont été analysés sur cette même période.

Les souches de *E. coli*, produisant ou non la Colibactine, sont transmises à la descendance et colonisent de manière stable le tractus digestif tout au long de la vie de l'animal. Dès le deuxième jour après la naissance, des cassures double-brin de l'ADN (CDB) ont été observées dans les entérocytes des rats colonisés par la souche de *E. coli* WT ou *E. coli* $\Delta clbA+clbA$ complémentée mais sont absentes chez les nouveau-nés colonisés par le mutant *E. coli* $\Delta clbA$. Si de manière surprenante, aucune CDB n'a été détectée chez ces rats devenus adultes (100 jours), une fraction des cellules en mitose présente en revanche des signes de persistance des CDB : des ponts anaphasiques sont observés chez les animaux adultes colonisés par des souches génotoxiques. L'étude des conséquences du portage à long terme de souches génotoxiques sur le développement de l'épithélium intestinal, a révélé une augmentation significative de la prolifération et de l'apoptose des entérocytes corrélée avec une augmentation de la vitesse de migration de ces cellules épithéliales le long de l'axe crypte-villosité chez les animaux exposés à des souches génotoxiques depuis la naissance. De plus, une augmentation du nombre des cellules endocrines et des cellules de Paneth a été constatée chez ces mêmes animaux. Les répercussions des perturbations précédemment observées sur la fonction de la barrière intestinale ont été analysées *ex vivo* en chambres de Ussing et montrent une augmentation de la perméabilité intestinale chez les rats colonisés depuis la naissance par des souches génotoxiques en comparaison à des animaux colonisés par le mutant non génotoxique.

Ainsi, la colonisation du nouveau-né par des *E. coli* génotoxiques altère non seulement le développement et la maturation de l'épithélium intestinal à l'âge adulte mais également son intégrité. Ces modifications ont clairement des conséquences physiopathologiques pour l'hôte qui dépassent une prédisposition au développement de cancers colorectaux.

Mots clés : *Escherichia coli*, Génotoxine, dommage à l'ADN, Microbiote, Développement et Maturation intestinale

Discipline : Physiologie animale et Microbiologie