



HAL
open science

Etude de la Cytolethal Distending Toxin B des Hélicobacters dans l'inflammation et la carcinogénèse digestive

Christelle Péré-Védrenne

► **To cite this version:**

Christelle Péré-Védrenne. Etude de la Cytolethal Distending Toxin B des Hélicobacters dans l'inflammation et la carcinogénèse digestive. Immunologie. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0404 . tel-01480948

HAL Id: tel-01480948

<https://theses.hal.science/tel-01480948>

Submitted on 2 Mar 2017

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPÉCIALITÉ MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Par Christelle PÉRÉ-VÉDRENNE

**Etude de la Cytolethal Distending Toxin B des
Hélicobacters dans l'inflammation et la carcinogénèse
digestive**

Sous la direction de : Armelle MÉNARD

Soutenue le 16 décembre 2015

Membres du jury :

Mme URDACI, Maria	Professeur, Bordeaux Sciences Agro	Présidente
M. BACKERT, Steffen	Professeur, F. Alexander University Erlangen – Nuremberg	Rapporteur
M. BONNET, Richard	Professeur, Université de Clermont-Ferrand	Rapporteur
Mme MIREY, Gladys	Maître de conférences, Université Paul Sabatier Toulouse	Examinatrice
M. MÉGRAUD, Francis	Professeur, INSERM U853, Université de Bordeaux	Invité

*« C'est impossible, dit la Fierté
C'est risqué, dit L'Expérience
C'est sans issue, dit la Raison
Essayons, murmure le Cœur »*

William Arthur Ward

Remerciements

Bien que cette thèse soit nominative, elle est le fruit d'un travail collaboratif, j'adresse donc toute ma reconnaissance et mes remerciements :

A La Ligue Contre le Cancer et en particulier au comité des Landes qui a financé mes 3 années de thèse et m'a permis d'effectuer ce travail. Un grand merci aux bénévoles et donateurs qui soutiennent les patients et la recherche.

A Monsieur le Professeur Francis Mégraud, pour son accueil chaleureux au laboratoire, pour sa disponibilité et ses encouragements.

A Madame le Docteur Armelle Ménard, pour m'avoir permis de travailler sur le sujet passionnant de la CDT, pour la confiance accordée, sa rigueur scientifique et ses précieux conseils.

Aux membres du jury de cette thèse, qui me font l'honneur de juger ce travail.

A Monsieur le Docteur Bruno Cardinaud pour sa précieuse collaboration pour l'étude de la transcriptomique et ses conseils pour mon avenir professionnel et à Monsieur le Docteur Benoit Rousseau, Muriel Fevre et Coralie Danet, pour leur collaboration et leur aide dans l'expérimentation animale.

A mes collègues et amis de l'unité U853 : à ceux qui ont participé à ce projet : Lucie C, Elodie, Alice, Julien et Madame le Docteur Christine Varon ainsi que tous les autres qui, par leur bonne humeur (Lucie B et son sourire inaltérable !) et leur présence, ont fait de ce laboratoire un cadre de travail très agréable. En particulier un grand merci à Pauline, Sarah et Silvia, pour tous les moments de folies scientifiques ou non. Et Filipa, pour ses conseils avisés et sa gentillesse.

A Madame Lindsay Mégraud pour son aide dans la correction des articles de cette thèse et sa disponibilité.

A Lamia Azzi-Martin et Alban Giese pour leurs conseils et les moments de... Délivrée, Libérée...

A l'équipe des Bleus et en particulier Joël, Maïté, Hélène et Isabelle. Merci d'avoir été là pour comprendre l'invisible et pour votre engagement. Merci à toute l'équipe des plieurs qui ont permis à mes neurones de s'évader des sphères nébuleuses de la recherche.

A Monsieur L. et Monsieur L. Malgré tous les moments difficiles et nos divergences, merci d'avoir su être là et de faire en sorte chaque jour que demain soit encore possible.

A tous mes amis, de Bordeaux (Sarah Psychène, Yoan et les Guigui...) à Nancy en passant par Paris et à mon club de Schtroumpf. Merci à chacun de vous d'avoir été là pour parler de tout et parfois même de sciences. Margaux, le petit fantôme remercie ton humour à toute épreuve !

A Grégory, merci d'être une force et de me porter au-delà de mes rêves.

A Margareth, pour toutes nos excursions du plus profond des océans aux sommets des montagnes, merci d'être toujours là avec ton grain de folie. Et vive la recherche !

Enfin, à mes parents pour leur amour à toute épreuve et pour m'avoir transmis le virus du travail, à ma petite sœur Aurélie (love you ou ou), au clan des 4 pattes poilus et à toute ma famille qui a su être là, accepter ma passion pour les microbes (quoique...) et faire diminuer la pression. Merci de m'avoir permis de garder les pieds sur terre et la tête dans les nuages !

Merci à vous !

SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	6
Liste des Tables	8
Listes des Figures	8
INTRODUCTION GÉNÉRALE et OBJECTIFS	9
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	13
Chapitre I - Hélicobacters entérohépatiques : les cas de <i>H. pullorum</i> et <i>H. hepaticus</i>	14
I. <i>Helicobacter pullorum</i>	14
I.1 Historique.....	14
I.2 Caractères généraux.....	14
I.3 Pathologies associées et pouvoir pathogène	18
I.3.1 Effets pathogènes <i>in vitro</i>	18
I.3.2 Effets chez la volaille	20
I.3.3 Effets chez les rongeurs	21
I.3.4 Effets chez l'Homme	21
II. <i>Helicobacter hepaticus</i>	22
II.1 Historique	22
II.2 Caractères généraux.....	23
II.3 Pathologies associées et pouvoir pathogène.....	25
II.3.1 Effets pathogènes <i>in vitro</i>	26
II.3.2 Effets chez la souris	27
II.3.2 Effets chez l'Homme.....	30
III Méthodes d'identification et éradication.....	32
III.1. Méthodes directes.....	32
III.1.1 Histologie	32
III.1.2 Culture et identification	32
III.1.3 Méthodes moléculaires	34
III.2 Méthode indirecte.....	35
III.2.1 Sérologie.....	35
III.3 Eradication.....	35
IV. Principaux facteurs de virulence.....	37
IV.1 Uréase	37

IV.2 Lipopolysaccharide.....	38
IV.3 Îlot de pathogénicité et système de sécrétion.....	40
IV.4 Toxines cytoléthales.....	43
Chapitre II - "Cytolethal Distending Toxin"	46
I. Premières découvertes et bactéries productrices de CDT.....	46
II. Gènes de la CDT et protéines codées.....	47
II.1 Génétique de la CDT	47
II.2 Structures et fonction des protéines	49
III. Mécanisme d'action	53
III.1 Sécrétion	53
III.2 Internalisation dans la cellule hôte	55
III.3 Transport cytoplasmique et translocation nucléaire.....	56
IV Effets de la Cytolethal Distending Toxin <i>in vitro</i>	57
IV.1 Une toxine cyto-pathogène	57
IV.1.1 Dommages à l'ADN	57
IV.1.2 Arrêt du cycle cellulaire	60
IV.1.3 Remodelage du cytosquelette.....	61
IV.2 Une toxine pro-inflammatoire	62
IV.3 Une toxine pro-apoptotique.....	64
V. Implication dans les pathologies infectieuses	68
V.1 La parodontite.....	68
V.2 Le chancre mou.....	69
V.3 Pathologies intestinales et hépatiques.....	70
VI. CDT et potentiel oncogénique	72
Chapitre III - Toxines bactériennes, inflammation chronique et carcinogenèse digestive	74
I. Toxines bactériennes affectant la signalisation cellulaire	74
II. La Toxine Typhoïde.....	77
II.1 Généralités.....	77
II.2 Effets pathogènes.....	78
III. La Colibactine	80
III.1 Généralités	80
III.2 Effets cyto-pathogènes <i>in vitro</i>	81
III.3 Effets dans les pathologies	82
MATÉRIEL DE LA THÈSE	85
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.....	87

I. Publication n°1	88
II. Publication n°2.....	91
III. Publication n°3	93
CONCLUSION - DISCUSSION.....	96
AUTRES PUBLICATIONS SUR LE SUJET	105
I. Publication n°4	106
II. Publication n°5.....	107
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	108

Liste des abréviations

(non référencées dans le système international)

AB	Active Binding
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFLP	Polymorphisme de Longueur des Fragments Amplifiés
ARN	Acide ribonucléique
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
BFT	<i>Bacteroides fragilis</i> toxin
BN	Brown Norway
CagA	"Cytotoxin-associated gene A"
CAR	Récepteur Constitutif Androstane
CDC25C	cell division cycle 25 C phosphatase
CdK	kinase cycline dépendante
CDT	"Cytotoxic Distending Toxin"
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CNF	"Cytotoxic Necrotizing Factor"
DNase I	Désoxyribonucléase de type I
ELISA	"Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay"
ERK	"Extracellular signal-regulated kinases"
FXR	Récepteur Farnesoid X
GCT	"Granulating Cyto-Toxin"
HA	"Human influenza hemagglutinin"
HEH	Helicobacter entéro-hépatique
HGF	Facteur de croissance des hépatocytes
HHGI1	<i>H. hepaticus</i> Genomic Island 1
HK	histidine kinase
IFN γ	Interféron
IHC	immuno-histochimie
IL-	Interleukine
LPS	lipopolysaccharide
LT	toxine thermolabile
MALT	"mucosa-associated lymphoid tissue"
MICI	maladie inflammatoire chronique de l'intestin
miR	microARN
MOI	"Multiplicity Of Infection" (multiplicité d'infection)
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B (facteur nucléaire kappa B)
NHEJ	"Non-Homologous End Joining"
NRPS	peptides mégasynthase non ribosomaux
ORF	"Open Reading Frame" (cadres ouverts de lecture)
PCR	"Polymerase Chain Reaction" (réaction de polymérisation en chaîne)
PFGE	"Pulse Field Gel Electrophoresis" (électrophorèse en champs pulsés)
Pks	polyketide mégasynthase
Plt	"pertussis-like toxin"
RBS	"Ribosomal Binding Site" (site de fixation pour le ribosome)
RE	réticulum endoplasmique
RH	recombinaison homologue
RR	régulateur de réponse

SCID	"Severe Combined ImmunoDeficiency"
SMO	spermine oxidase
SST	système de sécrétion de type
TGF	"Transforming Growth Factor"
TLR	"Toll-like receptor"
TNF α	"Tumor necrosis factor-alpha"
UFC	Unité Formant Colonie

Liste des Tables

Table 1 : Caractéristiques des Hélicobacters entéro-hépatiques validés par le comité de taxonomie

Table 2 : Bactéries productrices de CDT

Listes des Figures

Figure 1. Arbre phylogénique représentant les différents taxons du genre *Helicobacter*.

Figure 2. *Helicobacter pullorum* (souche NCTC 12827) isolé d'un patient séropositif.

Figure 3. *Helicobacter pullorum* localisé dans la lumière, les cryptes et l'épithélium du caecum.

Figure 4. Effets de l'infection à *H. pullorum*.

Figure 5. *Helicobacter hepaticus* isolé à partir du caecum d'une souris.

Figure 6. Analyse phylogénétique des 3 sous-unités de la toxine CDT (acide aminés).

Figure 7. Modèle de synthèse et de sécrétion de la Cytolethal Distending Toxin d'*Aggegatibacter actinomycetemcomitans*.

Figure 8. Mécanisme général d'internalisation de la Cytolethal Distending Toxin dans la cellule cible.

Figure 9. Effet de la CDT sur le cycle cellulaire.

Figure 10. Effet pro-apoptotique de la CDT.

Figure 11. Mécanisme d'action de la toxine typhoïde.

Figure 12. Structure et synthèse de la Colibactine.

INTRODUCTION GÉNÉRALE et OBJECTIFS

Les infections chroniques sont à l'origine de 18% des cas de cancers dans le monde (Parkin, 2006). Parmi les 118 agents classés cancérigènes de type I pour l'Homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), six virus (Virus de l'Hépatite B, C et D, Virus de l'Immunodéficience Humaine, Papillomavirus...), deux parasites et une bactérie (*Helicobacter pylori*) sont recensés (IARC, 2012).

L'implication des infections bactériennes chroniques dans la cancérogenèse est clairement établie, notamment avec *Helicobacter pylori*, bactérie classée carcinogène de type I. Cet *Helicobacter* est impliqué dans 2 cancers de l'estomac : l'adénocarcinome gastrique et le lymphome gastrique du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT pour "mucosa-associated lymphoid tissue").

Un autre *Helicobacter*, *H. hepaticus*, infecte l'intestin de la souris puis colonise les voies biliaires et le foie, provoquant une hépatite chronique pouvant évoluer vers un hépatocarcinome chez les animaux plus âgés (Fox *et al.*, 1994). Il a aussi été montré que *H. hepaticus* induit des lésions intestinales et une tumorigenèse colique chez les souris immunodéficientes (Berg *et al.*, 1996). A ce titre, *H. hepaticus* constitue un excellent modèle d'étude des processus de carcinogenèse digestive.

Comme de nombreux pathogènes des muqueuses (*Campylobacter*., *Haemophilus ducreyi*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*,...) (Jinadasa *et al.*, 2011), *H. hepaticus* et *Helicobacter pullorum* secrètent une génotoxine dénommée CDT (pour « Cytolethal Distending Toxin ») (Young *et al.*, 2000a, 2000b). Il a été montré que la génotoxine CDT de *H. hepaticus*, via sa sous-unité active CdtB, est pro-inflammatoire. Elle est directement impliquée dans le développement de la carcinogenèse hépatique chez la souris (Ge *et al.*, 2007). D'autres travaux soulignent le potentiel oncogène de cette toxine. En effet, la CDT induit, via sa sous-unité active CdtB, des cassures double-brins de l'ADN déclenchant ainsi un point de réparation comparable à celui induit par les radiations ionisantes (Frisan *et al.*, 2003). Une réparation infidèle de ces cassures peut aboutir à des additions/délétions de bases, voir des réarrangements chromosomiques, à l'origine de cancers. L'exposition chronique à des doses sublétales de CDT de bactéries Gram négatives, comme *H. hepaticus* ou *H. ducreyi* modifie la réponse aux dommages de l'ADN dans différentes cellules, favorise l'instabilité génomique et l'acquisition de propriétés phénotypiques de malignité. La CDT augmente la fréquence de mutation, l'accumulation de la chromatine et les aberrations chromosomiques (Guidi *et al.*, 2013a).

Ainsi, comme la protéine pro-inflammatoire CagA de *H. pylori*, la CDT serait une oncoprotéine potentielle. D'autres toxines, comme la colibactine sécrétée par certains *E. coli*

ou une toxine sécrétée par *Salmonella typhi*, ayant un mécanisme d'action similaire à la CDT, sont également associées à la carcinogenèse digestive (Arthur *et al.*, 2012; Buc *et al.*, 2013; Cougnoux *et al.*, 2014; Cuevas-Ramos *et al.*, 2010; Vogelmann and Amieva, 2007). Ces résultats confortent l'idée que l'infection chronique par des bactéries productrices de toxines et en particulier de CDT peut promouvoir la transformation maligne. Cependant, les mécanismes par lesquels ces bactéries contribuent à l'initiation et la progression tumorale sont encore mal caractérisés.

Bien que la CDT soit largement distribuée chez les bactéries gram négatives pathogènes (Jinadasa *et al.*, 2011), elle reste relativement peu étudiée. Les recherches se heurtent à des difficultés technologiques (culture difficile des Hélicobacters, co-cultures Hélicobacters/cellules eucaryotes fastidieuses, 3 sous-unités nécessaires à l'activité CDT (CdtA, CdtB et CdtC) dans la cellule, activité DNase de la CdtB toxique pour les systèmes d'expression). Afin de contourner ces difficultés, une stratégie basée sur l'utilisation de lentivirus a été développée au laboratoire pour exprimer la sous-unité active CdtB de la toxine CDT directement dans les cellules cibles (Varon *et al.*, 2014).

L'objectif de ce travail était d'étudier le rôle de la sous-unité active CdtB de la génotoxine CDT des Hélicobacters dans l'inflammation et la carcinogenèse digestive. Une approche *in vitro* et une approche *in vivo* chez la souris ont été réalisées.

Dans un premier temps, nous avons développé une nouvelle voie d'exploration des effets de la CDT en transduisant des cellules épithéliales avec des particules lentivales permettant l'expression de la sous-unité active CdtB de la toxine CDT et du mutant correspondant pour le site catalytique de l'activité DNase. Ainsi, l'expression constitutive de la CdtB, via cette stratégie lentivirale, a permis de contourner le verrou technologique dû à sa toxicité. Les travaux ont confirmé la validité de cette approche expérimentale : la CdtB de *H. pullorum* (Varon *et al.*, 2014) et *H. hepaticus* ont été exprimées dans différents types cellulaires et l'effet cyto-pathogène a été validé par comparaison à une protéine témoin fluorescente mais aussi à l'aide des cellules infectées par les bactéries sauvages ou invalidées pour le gène *cdtB* (Δ CdtB).

Une étude globale de l'expression des gènes et des petits ARN régulateurs de gènes (microARN), en réponse à la toxine en utilisant la méthodologie d'Agilent Technologies a été réalisée. Nous avons identifié plusieurs gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et d'autres associés au développement du cancer, dont l'expression varie en réponse à la CdtB.

Une étude approfondie du rôle pro-inflammatoire de la CdtB des Hélicobacters a été effectuée. (Article n°1, en révision pour *The Journal of Infectious Disease*)

Parmi les différents gènes dont l'expression est régulée par la CdtB, l'oncogène MafB, associé au développement de cancer (Yang *et al.*, 2015), a été identifié par l'étude globale des gènes en réponse à la CdtB et a été plus particulièrement étudié. (Article n°2, manuscrit en préparation pour *Oncogene*)

Dans un second temps, nous avons établi plusieurs lignées épithéliales hépatiques et intestinales portant un transgène sous une forme transcriptionnellement silencieuse (RFP, *cdtB* ou *cdtB* mutée dans le site DNase) dont l'expression est inducible. Nous avons ainsi évalué le rôle de la CdtB dans le développement tumoral dans un modèle de xéno greffe chez la souris immunodéficiente. Les lignées de cellules épithéliales intestinales et hépatiques exprimant de façon conditionnelle la protéine témoin RFP, la protéine CdtB de *H. hepaticus* ou son mutant pour l'activité DNase ont été greffées chez des souris immunodéficientes et les effets de la CdtB et de son mutant catalytique ont été analysés après induction. Ce dernier modèle devrait permettre de mieux appréhender le rôle d'une infection chronique où la toxine est produite. (Article n°3, manuscrit en préparation pour *Oncotarget*)

Dans une précédente étude, nous avons montré que la CdtB de *H. pullorum* induit une relocalisation et une surexpression de la cortactine (Varon *et al.*, 2014), une protéine impliquée dans la migration cellulaire et dans le cancer (Kirkbride *et al.*, 2011). Il a été montré que *H. pylori* interagit avec la cortactine par deux voies indépendantes : la déphosphorylation d'une tyrosine et une phosphorylation de sérine permettant de réguler la migration et l'allongement cellulaire (Tegtmeyer *et al.*, 2011). Une collaboration avec le Pr. S. Backert (Friedrich Alexander University Erlangen-Nuremberg, Allemagne) a donc été initiée afin d'étudier les phosphorylations de la cortactine en réponse à la CdtB.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I - Hélicobacters entérohépatiques : les cas de *H. pullorum* et *H. hepaticus*

Le genre *Helicobacter* appartient à la famille des *Helicobacteraceae* de la branche ϵ des Protéobactéries. Ce sont des bacilles Gram négatives et de forme hélicoïdale associés à de nombreuses pathologies digestives. Créé en 1989 (Goodwin *et al.*, 1989), le genre *Helicobacter* regroupe actuellement 36 espèces (Figure 1). En fonction des niches spécifiques auxquelles ils sont associés, les Hélicobacters sont divisés en deux groupes ; les Hélicobacters gastriques comprenant *H. pylori* et *Helicobacter felis* et les Hélicobacters entéro-hépatiques (HEH) comportant 24 espèces, colonisant le tractus gastro-intestinal et les voies biliaires tels que *H. hepaticus*, *Helicobacter bilis* ou *H. pullorum*. Les HEH peuvent infecter l'Homme et de nombreux mammifères, reptiles et oiseaux ; la contamination de l'Homme par certains animaux comme les chiens, chats, rongeurs ou volailles fait de ces infections des zoonoses (Fox, 1997).

I. *Helicobacter pullorum*

I.1 Historique

En 1994, un nouvel organisme a été isolé à partir du caecum et du foie de poules pondeuses présentant des lésions suggérant une hépatite vibriennienne (Stanley *et al.*, 1994), pathologie caractérisée principalement par un gonflement et une nécrose du foie (Berry et Whitenack, 1991). Initialement appelé « Chicken Campylobacter-like Organism », ce bacille entéro-hépatique d'origine aviaire a été renommé *Helicobacter pullorum* après l'analyse phylogénétique du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (Stanley *et al.*, 1994).

I.2 Caractères généraux

H. pullorum est un *Helicobacter* qui colonise majoritairement l'intestin distal. Il est biochimiquement différencié des autres Hélicobacters et son ultrastructure est typique du genre, excepté que le flagelle n'est pas engainé. Il mesure de 3 à 4 μm de long sur 0,3 à 0,5

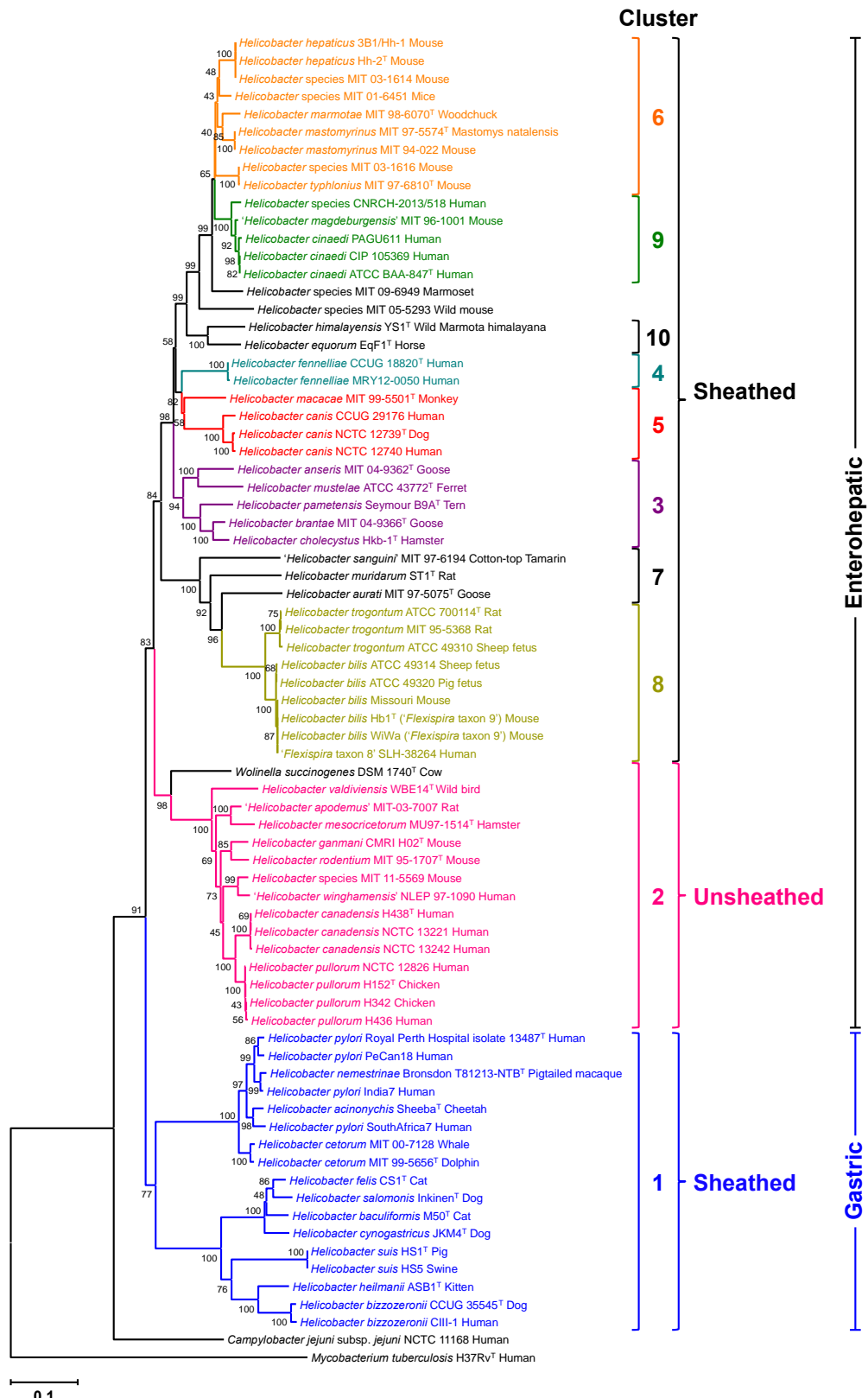


Figure 1. Arbre phylogénique représentant les différents taxons du genre *Helicobacter*.

La phylogénie présentée est basée sur l'alignement d'environ 700 résidus de la protéine GyrA. L'arbre phylogénétique n'est pas enraciné. Il a été réalisé avec la méthode du neighbor-joining. L'arbre optimal avec la somme de la longueur de la branche = 3,81560553 est affiché. Le pourcentage d'arbres répétés dans lequel les taxons associés sont regroupés (1000 répétitions) est indiqué par le test du bootstrap à côté des branches. Toutes les séquences sont indiquées par le genre et l'espèce, suivi du nom de la souche, du numéro de la collection et de l'espèce à partir de laquelle il a été isolé. La séquence de *Mycobacterium tuberculosis* GyrA a été utilisée comme la séquence de groupe externe. Les 8 groupes rapportés pour le gène phylogénie ARNr 23S (Dewhirst *et al.*, 2005), ainsi que de nouveaux groupes sont indiqués à droite de l'arbre. T, souche type. Figure reproduite d'après Ménard *et al.* (2015).

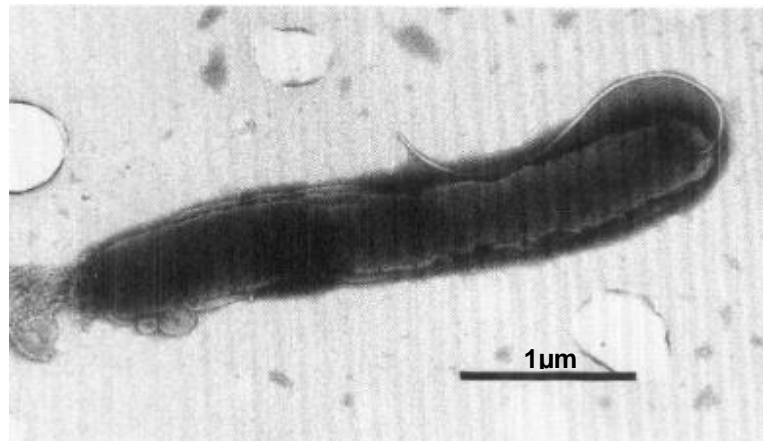


Figure 2. *Helicobacter pullorum* (souche NCTC 12827) isolé d'un patient séropositif. (microscopie électronique) (Stanley *et al.*, 1994)

µm de diamètre, est légèrement incurvé et mobile grâce à son unique flagelle polaire (microscopie électronique, Figure 2) (Stanley *et al.*, 1994). Ce bacille possède une activité oxydase, réduit les nitrates et son activité catalase varie selon les souches (positive ou négative) (Stanley *et al.*, 1994). Il ne produit pas d'indoxyl acetate esterase, d'uréase, d'alkaline phosphatase et n'hydrolyse pas l'hippurate. Enfin, il est gamma-glutamyl transpeptidase négative (Boutin *et al.*, 2010). Il est asaccharolytique et peut croître en présence de 1% de bile mais pas avec 1% de glycine (Zanoni *et al.*, 2007).

H. pullorum croît à 37°C dans une atmosphère microaérobie avec 6% oxygène, 7% dioxyde de carbone et 7% d'hydrogène. Il peut aussi se développer à 42°C sauf pour 22% des souches et n'est pas capable de croître à 25°C (Atabay H.I *et al.*, 1998; Zanoni *et al.*, 2007). Certaines souches peuvent pousser dans une atmosphère anaérobie ou microaérobie sans hydrogène et possèdent une activité alcaline phosphatase (Zanoni *et al.*, 2007).

H. pullorum possède une protéine « Régulatrice de Réponse » (RR) orthologue à celle de *H. pylori*. Chez *H. pylori*, RR est essentielle à la viabilité cellulaire et est associée à une activité histidine kinase (HK). Chez *H. pullorum*, les deux composants du système nommés HK/RR (correspondant aux protéines HPMG439/HPMG440) sont impliqués dans le contrôle du métabolisme de l'azote par la régulation de l'expression de la glutamate déshydrogénase. Cependant le rôle de RR n'est pas restreint à la régulation du métabolisme de l'azote, il est également essentiel pour la croissance de *H. pullorum* en conditions riches en nutriments (Bauer *et al.*, 2013).

Le génome de *H. pullorum* a une taille de 1,95 Mpb et code pour 2008 gènes. Son pourcentage en GC est de 34,14. Il code pour une "cytolethal distending toxin", un système de sécrétion de type VI et ne possède pas de gènes homologues à l'îlot de pathogénicité Cag de *H. pylori* (Borges *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2014).

Récemment, une analyse du sécrétome de *H. pullorum* a permis d'identifier 137 protéines sécrétées dont 33 ont été confirmées par bio-informatique. Parmi ces protéines, la catalase permettant de répondre au stress oxydatif, ainsi que 3 protéines de même fonction ont été identifiées. Plusieurs facteurs potentiels de colonisation et de virulence ont aussi été mis en évidence : une protéase, un système de sécrétion de type VI (SST6), un facteur de liaison cellulaire 2 ainsi qu'une flagelline, composante du flagelle responsable de la mobilité et du chimiotactisme (Hoy *et al.*, 2010).

I.3 Pathologies associées et pouvoir pathogène

H. pullorum, initialement identifié chez la volaille (Stanley *et al.*, 1994), a ensuite été retrouvé chez l'Homme (Burnens *et al.*, 1994) et plus récemment chez les rongeurs (Boutin *et al.*, 2010). Cependant, les liens entre les maladies inflammatoires et *H. pullorum* ne sont pas très bien identifiés. En effet, le pouvoir pathogène et les facteurs de virulence de cette bactérie ont été très peu étudiés. Cependant quelques études témoignent de sa pathogénicité.

I.3.1 Effets pathogènes *in vitro*

H. pullorum a un effet cyto-pathogène. Après 72h de co-culture avec différents types cellulaires, il entraîne la formation de cellules distendues polynucléaires (Young *et al.*, 2000a). Lors de l'infection d'hépatocytes de souris, *H. pullorum* induit une condensation de la chromatine, caractéristique d'une « catastrophe mitotique », suivie d'une nécrose des cellules sans activation de la caspase 3. Les cellules infectées montrent des pseudoinclusions intranucléaires appelés « granules cytoplasmiques » (Ceelen *et al.*, 2009). Ce bacille code pour la protéase HtrA (Shen *et al.*, 2014) qui clive la E-cadhérine perturbant ainsi les jonctions intercellulaires eucaryotes (Hoy *et al.*, 2010). Il est capable d'adhérer aux cellules épithéliales intestinales par l'interaction du flagelle avec les microvillosités. Il a une capacité d'invasion des cellules, provoquant un gonflement des membranes cellulaires de l'hôte, et induit la dégradation des microvillosités et un relargage de débris cellulaires (Sirianni *et al.*, 2013).

Enfin, les souches de *H. pullorum* (d'origine aviaire et humaine) sont pro-inflammatoires. Le bacille est capable d'induire, *in vitro*, la sécrétion d'interleukine 8 (IL-8) par des cellules épithéliales gastriques (AGS) et intestinales (Caco-2 et HT-29). Néanmoins, les surnageants de culture n'induisent pas cette sécrétion, suggérant que l'interaction de la bactérie avec l'hôte est nécessaire pour la production d'IL-8. Il est également capable d'induire l'activation du facteur de transcription NF- κ B ("nuclear factor-kappa B") et sa rapide translocation nucléaire (Varon *et al.*, 2009). Ce bacille contient des ferroxidases (Shen *et al.*, 2014) homologues à celles du gène *napA* de *H. pylori* qui code pour une protéine activatrice des neutrophiles (Evans *et al.*, 1995).

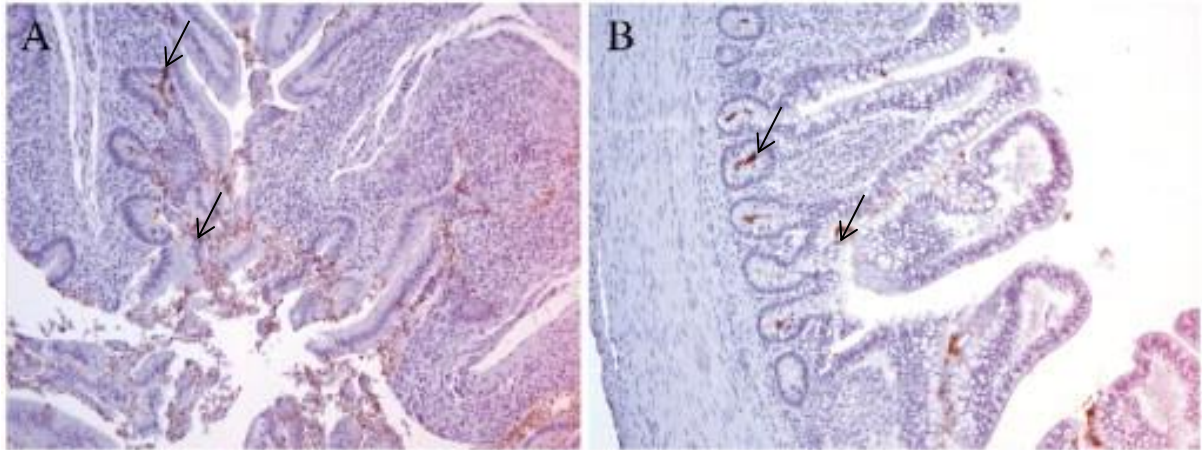


Figure 3. *Helicobacter pullorum* localisé dans la lumière, les cryptes et l'épithélium du caecum (**A**) 15 jours après infection et du colon (**B**) 8 jours après infection. Coloration réalisée par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps anti *H. pylori* réagissant avec *H. pullorum*. (x40) (Ceelen *et al.*, 2007)

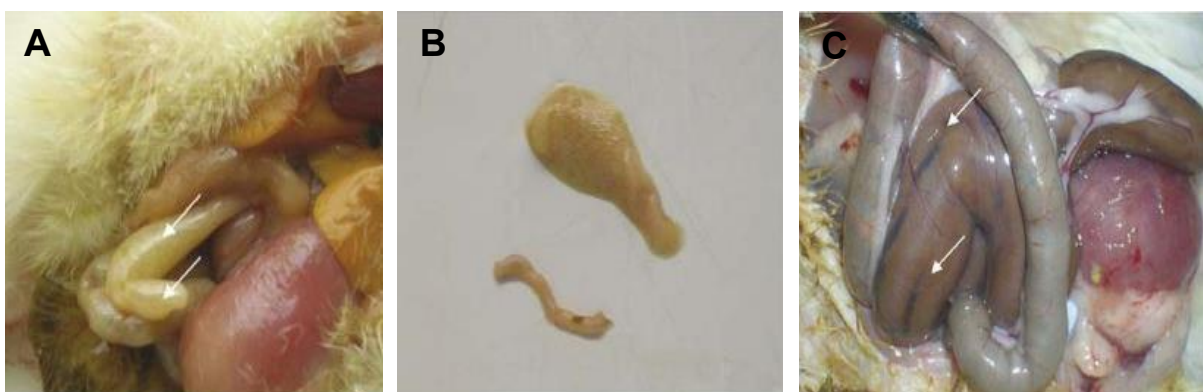


Figure 4. Effets de l'infection à *H. pullorum* **A.** Caecum jaunâtre et mousseux (1 jour après infection). **B** Caecum distendu et mousseux (haut) comparé à un caecum sain (bas), 1 jours après infection. **C.** Caecum brun, enflé avec stries longitudinales noirâtres (flèches), 22 jours après infection. (Ceelen *et al.*, 2007)

I.3.2 Effets chez la volaille

Depuis sa découverte en 1994, *H. pullorum* est fréquemment identifié chez les poules pondeuses, poulets d'engraissement, pintades (Nebbia *et al.*, 2007) et un cas a été reporté dans les fèces d'une perruche (*Psephotus haematogaster*) diarrhéique (Ceelen *et al.*, 2006a). Chez la volaille, la prévalence de *H. pullorum* serait similaire à celle de *Campylobacter jejuni*. Cette prévalence oscille entre 4 et 60% des carcasses de poulets (Atabay H.I *et al.*, 1998; Burnens *et al.*, 1994). *H. pullorum* est présent chez environ un tiers des poulets d'élevage en Belgique (Ceelen *et al.*, 2006b) et dans 93,3% des fermes italiennes testées (Manfreda *et al.*, 2011). Selon les études épidémiologiques, la prévalence de ce bacille varie donc de manière importante. Les différences observées (4, 60 ou 100%) peuvent être attribuées à la méthodologie employée pour le diagnostic, test sur caecum congelé ou frais, mais également aux conditions d'incubation (Zanoni *et al.*, 2007).

En raison de son tropisme pour la volaille, des infections expérimentales ont été réalisées chez des poussins. Après l'infection des poussins, *H. pullorum* (d'origine humaine) a été ré-isolé dans les amygdales intestinales et le caecum de tous les poussins, ainsi qu'au niveau du cœur chez un poussin. Le bacille a été identifié dans le caecum et le côlon (par immunohistochimie, Figure 3) et il a également été identifié dans la vésicule biliaire (PCR). En revanche, aucune bactérie n'a été ré-isolée lorsque la souche était d'origine aviaire, bien que l'ADN du bacille ait été détecté dans le caecum de quelques animaux. Aucune bactérie vivante ou ADN n'a été détecté dans le foie, la rate et le duodénum, confirmant que le premier site de colonisation est l'intestin (Ceelen *et al.*, 2007). Ce résultat a été confirmé par une autre étude qui a mis en évidence l'association des bactéries avec les cellules épithéliales du caecum, bien que de l'ADN de *H. pullorum* ait été retrouvé dans le foie de quelques poussins en fin d'expérience (Neubauer et Hess, 2006).

Dans les deux études, les poulets ne présentaient aucun signe clinique ou maladie apparente (Ceelen *et al.*, 2007; Neubauer and Hess, 2006). Cependant, la nécropsie a montré des lésions au niveau du caecum dès le premier jour d'infection. L'ensemble des animaux présentait un caecum jaunâtre mousseux et distendu (Figure 4A et B) d'intensité plus forte pour les animaux infectés avec des souches de *H. pullorum* d'origine humaine. Dès 22 jours d'infection, le caecum des animaux était brun, enflé et présentait des stries noirâtres sur toute la surface (Figure 4 C) (Ceelen *et al.*, 2007).

La persistance de l'infection a été observée jusqu'à la fin de l'étude et la bactérie a été retrouvée dans les fèces lors de l'autopsie. L'isolement de bactéries vivantes à la fin de l'expérience suggère que *H. pullorum* pourrait entrer dans la chaîne alimentaire et constituer une source de contamination pour l'Homme (Ceelen *et al.*, 2007; Neubauer et Hess, 2006). Cette hypothèse a été confirmée par une étude récente qui a isolé plusieurs souches de *H. pullorum* de viande fraîche de poulet dont 4 ont été séquencées (Borges *et al.*, 2015).

I.3.3 Effets chez les rongeurs

En 2010, lors d'un contrôle microbiologique de routine dans l'élevage « Taconic » à Germantown (New York, NY, USA), des *Helicobacters* ont été détectés par PCR dans les fèces de souris (C57BL/6NTac et C3H/HeNTac) et de rats (Brown Norway ; BN). Les caractéristiques biochimiques et l'analyse des séquences de l'ARNr 16S étaient similaires à celles provenant d'une souche humaine de *H. pullorum*, la souche MIT 98-5489 (99% de similarité) (Boutin *et al.*, 2010).

L'infection naturelle des rats BN a pu être reproduite expérimentalement et a montré que les premiers sites de colonisation de *H. pullorum* étaient le caecum et le côlon (analyses par PCR) (Cacioppo *et al.*, 2012a), confirmant les résultats obtenus chez la volaille (Ceelen *et al.*, 2007). La persistance de l'infection était associée à une réponse IgG spécifique pour ce bacille détectée par ELISA. Néanmoins, après 7 mois et demi d'infection, aucune pathologie intestinale ou hépatique n'a été détectée. Cette infection expérimentale de rongeurs par *H. pullorum* était la première rapportant la colonisation de rats par un HEH infectant également l'Homme. Elle constitue une nouvelle voie d'étude des effets de ce pathogène émergent (Cacioppo *et al.*, 2012a). En revanche, les rats Sprague-Dawley sont résistants à la colonisation gastro-intestinale expérimentale par *H. pullorum* (Cacioppo *et al.*, 2012b).

I.3.4 Effets chez l'Homme

Chez l'Homme, *H. pullorum* a été retrouvé dans les fèces de patients atteints d'entérites et gastroentérites (Burnens *et al.*, 1994), qu'ils soient immunocompétents ou immunodéprimés (Steinbrueckner *et al.*, 1997). Plus récemment, il a été identifié chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), en particulier la maladie de Crohn (Laharie *et al.*, 2009; Veijola *et al.*, 2007), de pathologies hépatiques comme l'hépatite et du carcinome hépatocellulaire (Castéra *et al.*, 2006; Fox *et al.*, 1998;

Rocha *et al.*, 2005; Veijola *et al.*, 2007), ainsi que des voies biliaires ; cholécystite (7% des patients) et cholangite sclérosante primitive (38% des patients) (Fox *et al.*, 1998; Karagin *et al.*, 2010; Nilsson *et al.*, 2003).

Ce bacille a aussi été identifié chez un homme fébrile de 35 ans présentant une bactériémie (Tee *et al.*, 2001). En revanche, *H. pullorum* n'est pas un agent étiologique de la pathogenèse du diverticule de Meckel ou de l'appendicite aiguë (Karagin *et al.*, 2011). *H. pullorum* est considéré comme une bactérie émergente en pathologie digestive humaine.

Chez l'homme, la prévalence de ce bacille serait de 4% chez les patients atteints de gastroentérites mais on le trouve également chez les sujets sains (Ceelen *et al.*, 2005a). Le pourcentage identique dans les deux groupes pourrait remettre en cause l'association de *H. pullorum* avec les maladies gastro-intestinales et hépatiques. Ce bacille pourrait être une bactérie commensale de l'Homme ou sa présence serait consécutive à une contamination par voie alimentaire sans réplication du microorganisme dans le tractus digestif. Enfin, ces hypothèses peuvent être complétées par la possible existence de souches de virulence différentes comme cela est décrit pour d'autres Hélicobacters (Ceelen *et al.*, 2005a). Il représente un potentiel pathogène d'origine alimentaire (Borges *et al.*, 2015) et les espèces aviaires semblent être un réservoir de cet organisme.

II. *Helicobacter hepaticus*

II.1 Historique

Lors d'une étude de la carcinogenèse induite par des agents chimiques en 1992 au National Cancer Institute-Frederick Cancer Research and Development Center (Frederick, MA, USA), les souris A/JCr du groupe témoin ont développé une hépatite chronique active nécrosante d'étiologie inconnue ; ces souris n'étaient pourtant pas infectées par le virus de l'hépatite murine. De nouvelles lésions visibles à l'autopsie ont été décrites et ces lésions, jamais observées auparavant chez les souris, n'étaient pas produites expérimentalement par les agents infectieux murins connus. Les souris les plus âgées présentaient, associées à l'hépatite, une forte prévalence de tumeurs hépatiques (Ward *et al.*, 1994a, 1994b) alors que

l'incidence de tumeurs était connue pour être faible chez les souris présentant ce fond génétique.

Les changements morphologiques semblaient être induits par un contaminant chimique plutôt que par un agent infectieux. Cependant, des essais complémentaires ont montré que l'hépatite était transmissible par une inoculation de suspensions de foie (par voie intrapéritonéale ou orale), mettant en évidence une cause infectieuse. Une nouvelle bactérie pathogène, spiralée a ainsi pu être visualisée (coloration à l'argent) dans le foie et les voies biliaires des souris infectées. La bactérie a pu être cultivée à partir de biopsies du foie, du caecum et du côlon (Ward *et al.*, 1994b). Les tests biochimiques et moléculaires ont permis de la classer comme une nouvelle espèce du genre *Helicobacter* qui fut nommée *H. hepaticus* (Fox *et al.*, 1994). Après 2 à 6 mois d'infection, l'histopathologie des souris a montré une nécrose hépatique locale. Des lésions chroniques apparaissent chez les souris de 6 à 10 mois, avec une hyperplasie des cellules ovoides, une fibrose post-nécrotique, une cholangite, une hépatocytomégalie ainsi que des pseudoinclusions intranucléaires dans les hépatocytes (Ward *et al.*, 1994a, 1994b).

L'inoculation de foie infecté ou d'une suspension contenant *H. hepaticus*, à différentes espèces de souris saines a permis de reproduire expérimentalement l'infection naturelle observée à l'animalerie du National Cancer Institute. Les souris infectées selon les deux conditions développaient des lésions hépatiques similaires à celles préalablement décrites. La bactérie a pu être ré-isolée et remise en culture, validant ainsi les 4 postulats de Koch (Ligon, 2002). Certaines souris sont sensibles à l'infection ; telles que les souris A/JCr, C3H/HeNcr, SJL/Ncr, BALB/cAnNcr et SCID/Ncr tandis que d'autres souris présentant un fond génétique différent (C57B1/6Ncr, B6C3F3 et les souris NUDE) sont résistantes. Enfin, les mâles présentent une pathologie plus sévère que les femelles. (Ward *et al.*, 1994a, 1994b)

II.2 Caractères généraux

H. hepaticus a un diamètre de 0,2 à 0,3 μm et mesure 1,5 à 5 μm de long. Sa structure (taille et forme) est variable suivant les isolats, il peut être courbe ou spiralé (de une



Figure 5. *Helicobacter hepaticus* isolé à partir du caecum d'une souris.
(Fox, 2002)

à plusieurs spirales). Il est mobile grâce à deux flagelles engagés de distribution bipolaire (un à chaque pôle, Figure 5), qui lui confèrent une ciliature amphitriche (Fox *et al.*, 1994). (Figure 4)

Ce bacille croît, à 37°C, préférentiellement dans une atmosphère microaérobie, mais également dans une atmosphère anaérobie. Il ne se développe pas à 25°C et 42°C. Sa surface lisse est dépourvue de fibres périplasmiques, pourtant retrouvées chez d'autres HEH tels que *Helicobacter muridarum*, un autre pathogène de la souris. *H. hepaticus* possède une forte activité uréase, ainsi qu'une activité catalase et oxydase (Fox *et al.*, 1994). Cette bactérie est capable de produire du sulfure d'hydrogène (H₂S) par la réduction des nitrates en nitrites et l'utilisation de l'acétate de plomb. *H. hepaticus* peut se développer en présence de 1,5% de NaCl et 1% de glycine. Il hydrolyse l'indoxyle acetate mais pas l'hippurate. Toutes les souches sont sensibles au métronidazole mais résistantes à la céfalotine et l'acide nalidixique.

Le génome de *H. hepaticus* a une taille de 1,8 Mpb et code pour 1876 gènes. Le contenu en G+C du génome est de 35,9%. Cet Hélicobacter a un cluster de gènes codant pour l'uréase (*ureABIEFGH*) similaire à celui de *H. pylori*, ainsi qu'un cluster de gènes impliqués dans le transport du nickel (*nikAB(C+D)E*) similaire à *E. coli*. La biosynthèse des flagelles est codée par deux flagellines, FlaA et FlaB, sous le contrôle respectif des promoteurs σ^{28} et σ^{54} . Il code également pour une toxine trimérique, la "cytolethal distending toxin" (CdtA, CdtB et CdtC) et ne possède pas de gènes orthologues à la cytotoxine vacuolisante VacA ou à l'îlot de pathogénicité Cag présents chez *H. pylori* (Suerbaum *et al.*, 2003). Enfin, il possède un îlot de pathogénicité nommé HHGI1 qui code pour un système de sécrétion complet de type VI (Bartonickova *et al.*, 2013) et possède quelques gènes similaires à ceux du système de sécrétion de type IV de *H. pylori* (Suerbaum *et al.*, 2003).

II.3 Pathologies associées et pouvoir pathogène

H. hepaticus colonise naturellement l'intestin et les voies biliaires de la souris induisant une hépatite chronique pouvant évoluer en hépatocarcinome chez les animaux plus âgés (Fox *et al.*, 1994; Ward *et al.*, 1994a). Il est depuis fréquemment isolé dans les animaleries (Wasimuddin *et al.*, 2012) et récemment des études ont suggéré sa présence chez l'Homme (Veijola *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2013).

II.3.1 Effets pathogènes *in vitro*

Comme *H. pullorum*, *H. hepaticus* a un effet cytopathogène *in vitro*. Après 3 jours de co-culture, il induit un changement morphologique chez différents types de cellules qui apparaissent élargies et distendues, avec une forte diminution de la viabilité cellulaire, proportionnelle à la quantité de l'inoculum bactérien. (Okoli *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2000b). Une étude du protéome des cellules épithéliales hépatiques (HEp-2) infectées par *H. hepaticus* a permis d'identifier 17 protéines différenciellement exprimées lors de l'infection. Ces protéines ont un rôle dans plusieurs fonctions biologiques incluant le métabolisme énergétique et des acides aminés, la croissance cellulaire et prolifération, la réponse au stress, la liaison cellulaire et des protéines impliquées dans la traduction et la modification cellulaire. Les protéines de croissance (annexine A3 et phosphoprotéine 18) et les protéines impliquées dans la traduction et la modification cellulaires (β -actine, alcaline phosphatase de type 1, Rho GDP dissociation inhibitor et F-actin capping protein subunit (CapZ)) sont sous-exprimées en présence du bacille, probablement en rapport avec l'inhibition de croissance observée pour les cellules infectées. (Okoli *et al.*, 2007)

L'infection par *H. hepaticus* induit une réponse proinflammatoire par la surexpression des gènes codant pour l'interleukine-1-beta (IL1- β), le tumor necrosis factor-alpha (TNF α), l'interleukine-8 (IL-8) et Monocyte chemotactic protein-1 (MCP1) par les hépatocytes primaires humains, dès 24h de co-culture. Le gène codant pour la cyclooxygénase-2 et sa protéine correspondante (prostaglandine E2) sont également augmentés en réponse à l'infection. Après 7 jours de co-culture, il n'est plus détecté d'élévation des gènes codant pour des cytokines. Les gènes codant pour le cytochrome P450 3A4 et l'albumine sont sous exprimés, suggérant que *H. hepaticus* altère la capacité de synthèse des hépatocytes. (Kleine *et al.*, 2014)

Il permet l'activation de la kinase extracellulaire ERK (Extracellular signal-regulated kinases) dans les macrophages sous la dépendance des sous-unités p50/p105 du NF- κ B. L'activation de ERK par *H. hepaticus* permet l'induction du facteur de transcription nucléaire c-Fos, qui inhibe la production d'IL-12 p40. Le défaut d'activation d'ERK, lors de l'infection avec des macrophages déficients pour les sous-unités p50/p105 entraîne une très forte induction de l'IL-12 p40 (Tomczak *et al.*, 2006). Cette cytokine, aussi appelée IL-12B, est impliquée dans la réponse de type Th1 (Hsieh *et al.*, 1993). L'activation d'ERK inhibe la

capacité de *H. hepaticus* à stimuler l'IL-12 p40 et donc à induire une réponse Th1, contribuant à protéger la souris contre le développement de colite (Erdman *et al.*, 2001).

II.3.2 Effets chez la souris

En Europe, *H. hepaticus* est présent chez 37 à 41% des souris des animaleries commerciales et académiques. Il est le 3^{ème} pathogène de la souris le plus fréquemment isolé, après *Helicobacter rodentium* (78% des souris) et *Helicobacter typhlonius* (53%). (Wasimuddin *et al.*, 2012) Depuis sa première identification en 1994 (Ward *et al.*, 1994b), de très nombreuses études ont montré son implication dans les pathologies de la souris. La colonisation et la persistance de l'infection à *H. hepaticus*, dans le côlon et le foie ne sont pas dépendantes de l'uréase (Ge *et al.*, 2008a), mais seraient associées à la présence d'une cholestérol- α -glucosyltransférase, comme pour l'infection à *H. pylori* (Ge *et al.*, 2014) ou encore au système de sécrétion de type VI (Bartonickova *et al.*, 2013).

L'infection à *H. hepaticus* et les pathologies qui lui sont associées sont dépendantes du fond génétique, de l'âge et du sexe des souris (Ihrig *et al.*, 1999; Livingston *et al.*, 2004; Rice, 1995). La variation entre les mâles et les femelles dans la sévérité de la pathologie hépatique pourrait être due à un rôle protecteur des œstrogènes ou un effet négatif de la testostérone (Ward *et al.*, 1994a). Chez certaines souris, la sévérité de la colite est augmentée chez les femelles. La sévérité de la pathologie est moins importante lors de l'absence de récepteurs aux œstrogènes chez les femelles. (Cook *et al.*, 2014)

- Pathologies hépatiques et des voies biliaires

H. hepaticus colonise le côlon et envahit le foie des souris A/JCr provoquant une hépatite chronique active, une typhlocolite proliférative et un hépatocarcinome chez les animaux plus âgés (Fox *et al.*, 1994, 1996a; Rice, 1995; Ward *et al.*, 1994a). Les souris A/JCr infectées (mâles et femelles) développent une inflammation chronique progressive avec une infiltration de neutrophiles, une hyperplasie des cellules ovales, Ito et de Kupffer, une hépatocytomégalie, une élévation du taux d'alanine aminotransférase et une nécrose des hépatocytes. L'aggravation de la pathologie, avec la formation d'adénomes hépatiques est observée chez les mâles 12 à 18 mois après l'infection (Fox *et al.*, 1996a; Rogers *et al.*, 2004). Des souris présentant d'autres fonds génétiques (BALB/CAnNCr, SJL/NCr, B6C3F1, SCID/NCr et C3H/HeNCr) sont également sensibles à l'infection par *H. hepaticus* qui induit le développement d'une hépatite chronique (Fox *et al.*, 1994; Ward *et al.*, 1994b).

Les souris déficientes pour le récepteur nucléaire CAR (Récepteur Constitutif Androstane), récepteur régulant les enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques et endobiotiques (Reschly et Krasowski, 2006), développent une maladie similaire aux souris A/JCr lors de l'infection par *H. hepaticus* avec une inflammation hépatique, corrélée à une élévation de l'acidité de la bile et une augmentation du TNF α et du TLR2 (Toll-like receptor 2). L'évolution de la pathologie vers la dysplasie et la néoplasie est associée à la diminution des enzymes hépatiques P450 (Cyp2b10 et Cyp3a11), suggérant l'importance de la régulation métabolique médiée par CAR dans la prévention de l'inflammation et la carcinogénèse associée à cette infection (García *et al.*, 2011). De même, des souris déficientes pour un autre récepteur nucléaire, le récepteur Farnesoid (FXR), régulant le transport et le métabolisme des acides biliaires (Gonzalez, 2012), ont naturellement une forte incidence de tumeurs hépatiques (Swennes *et al.*, 2014). Après 12 mois d'infection avec *H. hepaticus*, les souris FXR^{-/-} développent une hépatite plus sévère que les souris non infectées et une augmentation de l'enzyme hépatique Cyp2b10 (Swennes *et al.*, 2014), semblables au modèle de souris CAR^{-/-} (García *et al.*, 2011).

L'infection par cet Hélicobacter est utilisée comme modèle d'induction d'hépatite chronique et de cancer du foie (Fox *et al.*, 1996a, 1996b; García *et al.*, 2008, 2011). Il constitue, à ce titre, un excellent modèle d'étude de la pathogénèse de l'infection et de la carcinogénèse hépatique qui semble médiée par différents facteurs : l'inflammation chronique, les hormones sexuelles et le métabolisme.

- Pathologies intestinales

Bien que *H. hepaticus* fut identifié initialement dans le foie de souris, le site primaire de colonisation de la bactérie est l'intestin et le côlon (Fox *et al.*, 1996b). Des souris immunocompétentes (A/JCr et Swiss Webster) peuvent développer des pathologies intestinales comme l'appendicite et l'entérocolite (Fox *et al.*, 1996b; Ward *et al.*, 1994a).

L'infection à *H. hepaticus* est associée au développement de typhlite chronique proliférative, de colite et de prolapsus rectal chez les souris immunodéficientes (NCR-nu/nu, BALB/c, AnNCR-nu/nu, C57BL/6NCR-nu/nu, NF- κ B p50/p105^{-/-} et C.B17/Icr-scid/NCR) (Foltz *et al.*, 1998; Tomczak *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 1996). Bien que *H. hepaticus* soit reconnu par le TLR2, l'absence de ce récepteur chez des souris déficientes n'affecte pas la sévérité de la colite, suggérant l'implication d'un autre récepteur cellulaire pour la reconnaissance de ce bacille (Boulard *et al.*, 2010).

Les souris SCID (Severe Combined Immunodeficiency) sont utilisées comme modèle de MICI grâce au transfert de cellules T CD4⁺ (Claesson *et al.*, 1996). L'infection par *H. hepaticus* dans ce modèle permet d'induire une MICI plus sévère avec une augmentation de l'IFN γ similaire à celle observée chez l'Homme. Cette étude suggère que le développement des MICI chez la souris est la conséquence d'une réponse immune anormale (Cahill *et al.*, 1997).

Des souris déficientes pour l'IL-10 (Burich *et al.*, 2001; Kullberg *et al.*, 1998) ou déficientes pour les récepteurs des cellules T (Burich *et al.*, 2001) ont développé une maladie inflammatoire du côlon, sévère et diffuse, en induisant une réponse de type Th1 avec l'augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , TNF α), alors que les souris immunocompétentes ne développent pas de colite et produisent de l'IL-10 en réponse à l'infection (Burich *et al.*, 2001; Kullberg *et al.*, 1998). L'IL-10 est une cytokine qui inhibe l'activation et la fonction des cellules T, des monocytes et macrophages, permettant de diminuer ou d'inhiber la réponse inflammatoire (Moore *et al.*, 2001).

L'IL-23, produite par des phagocytes mononucléaires, est impliquée dans la sécrétion d'IL-17 (IL-17A/IL-17F) par les cellules T CD4⁺ (Aggarwal *et al.*, 2003). La liaison de l'IL-17, composant de la réponse de type Th17 (Harrington *et al.*, 2005), aux récepteurs des cellules myéloïdes ou endothéliales induit la production d'IL-1, IL-6, IL-8 et de TNF α . Cette sécrétion de cytokines permet le recrutement de neutrophiles et participe à l'inflammation chronique (Kolls et Lindén, 2004). L'IL-23 contribue à l'induction d'une pathologie intestinale sévère lors d'une infection avec *H. hepaticus* (Arnold *et al.*, 2015; Kullberg *et al.*, 2006). Des souris immunodéficientes (IL12p40^{-/-}) sont résistantes à la colite induite par *H. hepaticus* après un traitement anti-IL-10R. Ce traitement est associé à une diminution de l'expression de l'IFN γ et de l'IL-17, suggérant que l'IL-23 plutôt que l'IL-12p40 serait impliquée dans les réponses Th1 et Th17. Les études montrent que l'infection à *H. hepaticus* induit une réponse de type Th1 et Th17 chez les souris déficientes pour l'IL-10 (Kullberg *et al.*, 2006).

La colite peut, chez les animaux sensibles, évoluer en carcinome du côlon (Berg *et al.*, 1996). Ainsi, 50 à 60% des souris SMAD3^{-/-} déficientes pour la voie du TGF β (Transforming growth factor β) développent un adénocarcinome du côlon après une phase inflammatoire caractérisée par l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF α , Cox2), des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et

de l'oncogène c-Myc ainsi que la prolifération des cellules intestinales, des macrophages et des cellules T CD4⁺, (Maggio-Price *et al.*, 2006).

Différents traitements immunologiques peuvent contrecarrer le développement de la pathologie. Ainsi, l'inhibition de la réponse Th1 (par un anti INF γ) induite par les cellules T CD4⁺, permet d'empêcher le développement de la colite (Powrie *et al.*, 1994). Les cellules Treg CD4⁺CD25⁺ peuvent inhiber et traiter l'inflammation innée induite par *H. hepaticus* dans les maladies inflammatoires, de façon dépendante de l'IL-10 (Kullberg *et al.*, 2002). Le transfert de cellules T CD4⁺ CD45RB^{low} dans le modèle de transfert de cellules T inhibe l'inflammation induite par *H. hepaticus* et le développement de cancer (Erdman *et al.*, 2003, 2009). Le développement malin consécutif à l'inflammation peut également être inhibé par des anticorps ciblant le TNF, l'IL-10 ou l'IL-6 permettant la disparition des lésions histologiques et la restauration de l'expression de cytokines et oncogènes à un niveau basal (Erdman *et al.*, 2009; Poutahidis *et al.*, 2007). L'IL-17A aurait également un rôle protecteur contre les maladies du côlon induites par *H. hepaticus* (Morrison *et al.*, 2015). Le traitement des souris adultes avec de l'IL-10 n'est pas curatif mais il atténue la progression de la maladie (Berg *et al.*, 1996).

H. hepaticus altère également la diversité du microbiote intestinal (Ge *et al.*, 2015; Swennes *et al.*, 2014).

L'infection à *H. hepaticus* est donc associée au développement des MICI pouvant évoluer en cancer chez des souris immunodéficiences pour des sous-unités du NF- κ B, les cellules T, l'IL-10, les lymphocytes. Les pathologies peuvent être ralenties ou guéries par des traitements immunologiques, suggérant un rôle majeur du système immunitaire dans la prévention des maladies inflammatoires et la carcinogenèse du côlon.

II.3.2 Effets chez l'Homme

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le premier cancer primitif du foie, responsable de plus de 600 000 décès annuels dans le monde (Kanda *et al.*, 2015). Il se développe généralement à partir d'un nodule tumoral et plusieurs facteurs de risque sont identifiés tels qu'une infection par les virus de l'hépatite B ou C, l'obésité ou la consommation excessive d'alcool (Dhanasekaran *et al.*, 2012). Actuellement, *H. hepaticus* n'est pas un facteur de risque reconnu comme étant associé au développement du CHC ni d'autres pathologies hépatiques ou intestinales chez l'Homme.

Néanmoins, de nombreuses études épidémiologiques ont évalué sa prévalence chez des patients atteints de différentes pathologies digestives. Bien qu'aucun bacille *H. hepaticus* n'ait été isolé par une méthode directe, quelques études témoignent de sa présence chez l'Homme par une identification indirecte. Ceci suggère que l'Homme aurait été contaminé et aurait éliminé l'infection ou que les méthodes directes de mise en culture décrites dans les études (mise en culture après congélation des échantillons à 80°C, parfois à sec) n'étaient pas adaptées à l'identification de cet Hélicobacter.

La prévalence de *H. hepaticus* serait de 50% chez des patients atteints de CHC (sérologie et détection moléculaire). Cette prévalence est significativement plus élevée que celle identifiée chez les patients atteints de tumeur bénigne du foie (7,7%) et dans des tissus hépatiques sains (6,3%). Le gène codant pour la CdtB de *H. hepaticus* a été détecté chez 44% des patients atteints de carcinome hépatocellulaire mais chez aucun des patients ayant une tumeur bénigne (Yang *et al.*, 2013). La présence de *H. hepaticus* chez les patients atteints de CHC suggère que la bactérie pourrait être impliquée dans l'évolution de la pathologie. Dans d'autres études épidémiologiques, *H. hepaticus* a été identifié chez 28% (Veijola *et al.*, 2007) ou 49% (Murakami *et al.*, 2011) des patients atteints de pathologies hépatiques. Par ailleurs, *H. hepaticus* pourrait être un facteur de risque dans la progression de la cirrhose vers le CHC et ce, particulièrement chez les patients infectés par les virus de l'hépatite B et C, pour lesquels la prévalence du bacille atteint 60% (Murakami *et al.*, 2011; Pellicano *et al.*, 2008). Plusieurs études se sont intéressées à la prévalence de *H. hepaticus* dans les maladies des voies biliaires. Il a été mis en évidence dans la bile de patients atteints de calculs biliaires, polypes de la vésicule et cholécystite par différentes méthodes comme la PCR nichée, le Western Blot (IgG), l'histologie (Hamada *et al.*, 2009) et coloration à l'argent (Pradhan et Dali, 2004). Cependant, la mise en culture des échantillons n'a pas permis d'isoler la bactérie. Les analyses *in situ* ont montré que la bactérie était d'apparence coccoïde (Hamada *et al.*, 2009). La prévalence de *H. hepaticus* chez l'ensemble des patients atteints de pathologies des voies biliaires varie de 32 à 82% suivant les études (Pradhan et Dali, 2004). La prévalence augmente pour les patients atteints de calculs biliaires (41%) et de cholécystite associée à un cancer gastrique (36%) (Hamada *et al.*, 2009). Dans une autre étude, la prévalence de *H. hepaticus* chez les patients atteints d'un cancer des voies biliaires est de 38,8 à 87,5% (Pradhan et Dali, 2004; Shimoyama *et al.*, 2010). Elle est 3 à 6,5 fois plus élevée que la prévalence dans les voies biliaires des sujets sains (13,1%) (Shimoyama *et al.*, 2010). Enfin, des études de la prévalence du bacille dans les MICI suggèrent qu'il est présent chez 35,8% des patients (Veijola *et al.*, 2007).

Le rôle de la bactérie dans la pathogénèse est encore mal connu. Des études complémentaires devront déterminer si *H. hepaticus* est un pathogène émergent chez l'Homme et une des causes ou un facteur de risque dans les maladies hépatiques et des voies biliaires.

III Méthodes d'identification et éradication

La combinaison de l'utilisation de marqueurs phénotypique et génotypique devrait permettre de conduire au diagnostic de maladies associées à ces pathogènes et de réaliser des investigations épidémiologiques.

III.1. Méthodes directes

III.1.1 Histologie

Les Hélicobacters peuvent être caractérisés par des méthodes histologiques telles que la coloration de Gram, qui colore les Hélicobacters en rose, ou la coloration au nitrate d'argent de Warthin-Starry, qui colore les bacilles en noir (Pradhan et Dali, 2004). Ils peuvent être mis en évidence au sein des tissus par immuno-histochimie (IHC) (Ceelen *et al.*, 2007) en utilisant des anticorps spécifiques marqués.

Ainsi *H. pullorum* a été détecté, par IHC, dans la lumière et les cryptes du caecum de poussins infectés à l'aide d'anticorps dirigés contre *H. pylori* réagissant avec *H. pullorum* (Ceelen *et al.*, 2007).

H. hepaticus a été visualisé, par IHC (avec des anticorps anti *H. pylori*) et coloration à l'argent, entre les hépatocytes, dans le parenchyme hépatique et notamment au niveau des canalicules biliaires ainsi que dans la vésicule biliaire. Il a également été observé au niveau des cryptes et de la surface de l'épithélium de l'intestin et plus rarement dans le caecum. (Fox *et al.*, 1994; Nam *et al.*, 2013; Ward *et al.*, 1994a)

III.1.2 Culture et identification

La culture des Hélicobacters entéro-hépatique est fastidieuse, néanmoins l'utilisation de milieux spécifiques permet de cultiver une grande partie des espèces.

H. pullorum a été initialement isolé avec un milieu sélectif contenant 5% de sang, avec de la céphalotine (32 mg/l) et de la céfopérazone (64 mg/l) comme agents sélectifs. Il est

sensible à la polymyxine B qui est communément utilisée dans de nombreux milieux de détection des *Campylobacters*, ce qui pourrait sous-estimer sa prévalence par culture (Stanley *et al.*, 1994). Les milieux pour sa culture sont à base de Trypcase soja ou Columbia. Il est également difficile de le différencier de *Campylobacter coli* avec lequel il partage un grand nombre de caractéristiques phénotypiques (excepté la perte la capacité à hydrolyser l'indoxyl acétate) et de *Campylobacter lari* (sauf pour la perte de tolérance à 2% de NaCl et la sensibilité à l'acide nalidixique) (Gibson *et al.*, 1999). L'importance possible de *H. pullorum* en pathologie digestive humaine peut justifier l'utilisation de milieux sélectifs et de tests d'identification complémentaires (Burnens *et al.*, 1994).

H. hepaticus a été isolé à partir de l'intestin, du caecum et du foie des souris par mise en culture sur milieu Colombia, Trypcase soja ou Brucella au sang contenant du triméthopime, de la vancomycine et de la polymyxine B (Fox *et al.*, 1994, 1996a). Les colonies sont observées après 2 à 7 jours d'incubation. La filtration d'une suspension de selles (pores de 0,45 µm) peut aussi être utilisée mais nécessite d'augmenter le temps d'incubation de 1 à 3 semaines (Shames *et al.*, 1995). L'observation des bactéries à l'état frais permet d'observer la forme et la mobilité des bactéries cultivées.

Cependant, les méthodes de détection directe ne sont pas suffisantes à elles seules pour caractériser l'espèce isolée vu qu'elle présente de nombreuses caractéristiques communes avec les autres espèces du genre *Helicobacter*. Ainsi des méthodes complémentaires doivent être employées, en particulier des analyses moléculaires. Les conditions de prélèvement et de stockage des tissus ou des selles sont importantes et peuvent expliquer les différences de prévalence ou de diagnostic mises en évidence pour *H. pullorum* et *H. hepaticus* dans certaines études épidémiologiques, en fonction de la conservation des échantillons (ensemencés frais ou après congélation) (Yang *et al.*, 2013; Zanoni *et al.*, 2007)

L'identification phénotypique est réalisée par des tests de croissance et des tests biochimique tels que le test de l'oxydase, la catalase ou l'uréase, mais aussi la sensibilité aux agents antimicrobiens et l'analyse des acides gras (Melito *et al.*, 2000).

L'analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (« Matrice Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight») est une méthode rapide et sensible pour identifier les micro-organismes. (Alispahic *et al.*, 2010)

Les isolats peuvent aussi être caractérisés phénotypiquement par des méthodes biochimiques comme l'analyse SDS-PAGE en une ou deux dimensions de l'ensemble des

protéines cellulaires, qui montre une haute similarité dans les isolats testés (Zanoni *et al.*, 2007).

La chromatographie en phase liquide à partir d'extraits d'acides gras de bactéries entières permet de discriminer phénotypiquement *H. pullorum* et *C. lari*. La présence de Glucoside Cholesteryl (GC) est une caractéristique du genre *Helicobacter* puisque seulement trois espèces (*Helicobacter pametensis*, *Helicobacter cinaedi* et *H. pullorum*) ont perdu ce groupe de lipide. (Haque *et al.*, 1995; Steinbrueckner *et al.*, 1998).

III.1.3 Méthodes moléculaires

Les Hélicobacters peuvent être identifiés par différentes méthodes moléculaires comme la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) standard, la PCR en temps réel, la PCR explorant le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), ou de longueur des fragments amplifiés (AFLP), la PCR-DGGE (PCR suivie d'une électrophorèse sur gel en gradient dénaturant) ou encore l'électrophorèse en champs pulsé (PFGE). Ainsi, les résultats des analyses d'AFLP et PFGE indiquent un haut degré de diversité génomique pour *H. pullorum*, indépendamment de l'hôte ou de l'origine géographique des souches (Gibson *et al.*, 1999). La similitude des isolats est d'environ 85%, ce qui permet de réaliser des études épidémiologiques (Manfreda *et al.*, 2011). Ces méthodes permettent de déterminer le génotype d'une souche et d'estimer les niveaux de variabilité génétique.

Les analyses du gène codant pour l'ARNr 16S ont montré que *H. hepaticus* était proche de *H. muridarum* (97,8% d'identité), un autre Hélicobacter colonisant l'intestin des souris, mais plus éloigné de *H. pylori* (93,5% d'identité) (Fox *et al.*, 1994). La détection de *H. hepaticus* par PCR ciblant l'ARNr 16S est possible à partir des selles et des tissus frais, congelés ou inclus en paraffine. Les résultats sont corrélés avec les observations histologiques (Battles *et al.*, 1995). Cependant, des méthodes de traitement spécifiques doivent être employées pour l'extraction de l'ADN des selles, en raison de la présence d'inhibiteurs de la Taq polymérase dans les échantillons (Shames *et al.*, 1995). Les résultats de PCR-RFLP sont moins sensibles lorsqu'ils sont réalisés à partir de tissus fixés (depuis moins de 24 h) et inclus en paraffine comparé aux tissus frais. Il est difficile d'identifier *H. hepaticus* dans les tissus fixés et inclus depuis plusieurs semaines (Malarkey *et al.*, 1997). Les différentes données relatives à la prévalence de *H. pullorum* rapportées dans de nombreuses études épidémiologiques confirment que la conservation et le traitement des échantillons ont une

importance majeure pour une bonne identification de ces pathogènes (Ceelen *et al.*, 2006b; Zanoni *et al.*, 2007). Enfin, l'analyse des séquences de l'ARNr 16S n'est pas toujours discriminante entre les différentes espèces du genre *Helicobacter* et l'étude d'autres gènes comme *ureAB*, *gyrA*, *gyrB* ou *cdtB* peut être nécessaire (Dewhirst *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2001; Ménard *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 1998).

III.2 Méthode indirecte

III.2.1 Sérologie

Enfin, l'infection par les bactéries du genre *Helicobacter* peut être mise en évidence par sérologie (Kornilovs'ka *et al.*, 2002). Ainsi le diagnostic de l'infection à *H. hepaticus* chez l'homme ou la souris est couramment réalisé par ELISA ou Western Blot (Fukuda *et al.*, 2009; Livingston *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 2011; Veijola *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2013). Initialement, il était effectué à l'aide d'un sonicat de *H. hepaticus* (Fox *et al.*, 1996a) ou de protéines membranaires obtenues par digestion des bactéries, cette dernière méthode donnant des résultats plus spécifiques (Livingston *et al.*, 1997). Depuis, des anticorps plus spécifiques sont utilisés comme un anticorps IgG anti-*H. hepaticus* (Yang *et al.*, 2013) ou un anticorps monoclonal, HR11-51, isolé d'un hybridome montrant une forte spécificité (97,6%) pour *H. hepaticus*, sans réactions croisées avec d'autres bactéries gastro-intestinales (Fukuda *et al.*, 2009).

III.3 Eradication

H. pullorum est sensible à de nombreuses familles d'antibiotiques : famille des fluoroquinolones (enrofloxacin), pénicillines (ampicilline), phénicolés (chloramphénicol), tétracycline (tétracycline, doxycycline), macrolides (érythromycine, tylosine), lincosamide (lincomycine), aminosides (gentamicine, tobramycine), nitroimidazoles (métronidazole), polypeptides (polymyxine B). Pour l'érythromycine, la ciprofloxacine et l'acide nalidixique, la sensibilité est variable suivant les souches. Tous les isolats ont une résistance naturelle à la céfalotine, la vancomycine et l'amphotéricine B. (Ceelen *et al.*, 2005b; Zanoni *et al.*, 2007)

H. pullorum peut acquérir une résistance aux fluoroquinolones et aux macrolides. Les souches isolées de poulets, résistantes à la ciprofloxacine, ont toutes une substitution au codon 84 du gene *gyrA* (ACA-->ATA (Thr-->Ile)) (Pasquali *et al.*, 2007). Les souches résistantes à la clarithromycine ont une mutation sur le gène codant pour l'ARNr 23S (A2143G) (Shen *et al.*, 2014).

Du fait de la forte prévalence (88%) des *Helicobacters* qui contaminent les souris des animaleries commerciales et académiques d'Europe, d'Asie et des Etats Unis, il est important de traiter l'infection de manière efficace (Taylor *et al.*, 2007). L'infection des souris d'animalerie avec *H. hepaticus* peut perturber les résultats des études immunologiques ou des études de carcinogénèse (Gulani *et al.*, 2009; Ward *et al.*, 1994a). Ce bacille est sensible à l'amoxicilline, au bismuth, au métronidazole, à la néomycine et la tétracycline. L'administration d'une trithérapie (amoxicilline ou tétracycline associée au métronidazole et bismuth) est recommandée pour une meilleure efficacité. En effet, une monothérapie (amoxicilline ou néomycine) ne permet pas d'éliminer l'infection, un mois après traitement bien que la tétracycline et le métronidazole permettent de diminuer la quantité de bactérie (Foltz *et al.*, 1995, 1996). Le traitement peut être administré, trois fois par jour pendant 14 jours par gavage, dans la nourriture ou dans l'eau de boisson (Russell *et al.*, 1995), bien que l'administration dans l'eau ne semble pas toujours efficace (Foltz *et al.*, 1996). Cependant, la trithérapie amoxicilline-métronidazole-bismuth n'a pas permis d'éliminer l'infection des souris immuno-déficientes Rag1^{-/-} (Foltz *et al.*, 1995; Whary et Fox, 2004). Afin d'éradiquer *H. hepaticus* chez ces souris Rag1^{-/-}, une quadrithérapie (amoxicilline, clarithromycine, métronidazole et oméprazole) peut être utilisée. En revanche, les souris traitées, indépendamment de l'infection, présentaient une perte de poids, une hyperkératose gastro-œsophagienne sévère (traduisant une réduction de la consommation de nourriture) et un caecum élargi. L'ensemble de ces effets secondaires a été réversible avec la reprise d'un régime alimentaire standard (Garrett *et al.*, 2014).

Devant l'augmentation de la résistance aux antibiotiques, problème majeur de santé publique, il est important d'identifier de nouvelles méthodes de lutte contre les pathogènes. *Lactobacillus acidophilus*, un probiotique, est capable, *in vitro*, de réduire la viabilité et l'activité uréase de *H. hepaticus* et ce indépendamment du pH du milieu (Zhang *et al.*, 2013). Il sécrète un composé antimicrobien thermo-stable, qui diminue la viabilité de nombreuses bactéries pathogènes Gram positives et négatives (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*...) (Chauvière *et al.*, 1992; Coconnier *et al.*, 1997).

IV. Principaux facteurs de virulence

IV.1 Uréase

L'uréase est une métallo-enzyme dépendante du nickel, qui catalyse l'hydrolyse de l'urée en dioxyde de carbone et en ammoniac. Cette enzyme est constituée de plusieurs sous-unités dont les sous-unités UreA et UreB qui constituent l'apoenzyme. L'activité uréasique nécessite des gènes structurels et fonctionnels *ureE*, *ureF*, *ureG* et *ureH* qui permettent l'assimilation des ions nickel dans l'apoenzyme (Beckwith *et al.*, 2001; Mobley *et al.*, 1995). Enfin, le gène *ureI*, code pour une protéine de membrane qui, en condition acide, transporte l'urée dans le cytoplasme où elle est hydrolysée par l'uréase (Weeks *et al.*, 2000). Ce gène n'est pas impliqué dans l'activité de l'uréase mais il est indispensable à la survie de la bactérie en milieu acide (Skouloubris *et al.*, 1998) .

L'activité uréasique permet aux bactéries de survivre à l'acidité de l'estomac et a un rôle majeur dans la persistance de l'infection de certains Hélicobacters gastriques tels que *H. pylori* (Marshall, 1991). Quelques Hélicobacters entéro-hépatiques tels que *H. hepaticus*, *H. muridarum*, *H. bilis*, bien qu'infectant l'intestin, un milieu non acide ont cependant une activité uréasique (Fox, 2002). Tandis que l'uréase est un important facteur de virulence des Hélicobacters gastriques, son rôle chez les HEH est moins clair.

H. pullorum ne possède pas d'activité uréase (Stanley *et al.*, 1994). En revanche, *H. hepaticus* possède une forte activité uréase, identique à celle de *H. pylori* (Beckwith *et al.*, 2001). Le pourcentage en G+C du cluster de gènes codant pour l'uréase de *H. hepaticus* est de 36%, comme pour le reste du génome. L'uréase de *H. hepaticus* est composée des deux sous-unités UreA et UreB, ce qui est très similaire à celle de *H. mustelae*, *H. felis* et *H. pylori*. Une divergence est observée pour les gènes accessoires et notamment *ureI*, qui perd le résidu histidine 123 (Beckwith *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 1998), important pour l'activation du transport de l'urée chez *H. pylori* (Weeks *et al.*, 2000), suggérant une adaptation des espèces à un environnement acide par rapport à un environnement non acide.

H. hepaticus ne peut pas survivre et croître à un pH de 3, malgré son activité uréase. La supplémentation du milieu en nickel permet d'augmenter de 10 fois l'activité uréase de *H. hepaticus* ou de *H. pylori*, mais l'activité maximale de *H. hepaticus* reste 3 à 5 fois inférieure à celle de *H. pylori* dans les mêmes conditions de culture. L'augmentation de

l'activité uréase n'est pas associée à une augmentation de l'ARNm codant pour l'uréase ou de la protéine associée, suggérant une régulation post-traductionnelle de l'induction du nickel probablement par l'activation de l'apoenzyme préformée. La fonction de l'uréase de *H. hepaticus* diffère donc de celle de *H. pylori* puisqu'elle ne lui permet pas de résister à l'acidité du milieu (Belzer *et al.*, 2005). Des mutants *H. hepaticus* pour *ureE* et *ureG* ont une faible activité uréase qui n'est pas restaurée par l'ajout de nickel dans le milieu. Les protéines accessoires ont donc un rôle important dans la fonction de l'apoenzyme (Benoit *et al.*, 2007).

H. hepaticus possède un régulateur de réponse au nickel NikR. La délétion de ce régulateur permet à la bactérie d'augmenter de 5 à 6 fois son activité uréase suggérant que ce régulateur module l'activité uréase par la répression du transport ou l'internalisation du nickel dans la bactérie. Les souches invalidées pour ce régulateur ont un rendement de croissance deux à trois fois inférieur aux souches sauvages. (Benoit *et al.*, 2013).

Par ailleurs, l'expression de l'uréase de *H. hepaticus* est dépendante du fer et peut être réprimée par le régulateur transcriptionnel Fur. En effet, la restriction en fer dans le milieu de culture a conduit à doubler l'activité uréase de la souche sauvage de *H. hepaticus* associée à une augmentation de la sous unité *ureA* (au niveau du gène et de la protéine) (Belzer *et al.*, 2007).

L'uréase de *H. hepaticus* n'est pas essentielle pour la colonisation intestinale. En effet, il n'y a pas de différence significative de la colonisation de l'intestin de souris mâle A/JCr, 4 mois après infection avec la souche sauvage ou son mutant déficient pour l'activité uréase. En revanche, aucun mutant n'est détecté dans le foie des souris, tandis que tous les animaux sont positifs lorsqu'ils sont infectés avec la souche sauvage. Les souris infectées avec les mutants présentaient une hépatite beaucoup moins sévère, avec un niveau d'ARNm hépatique de cytokines pro-inflammatoire (IFN- γ et TNF- α) plus faible. En comparaison, les souris infectées avec les souches sauvages ont développé de forts taux d'IgG, IgG2 (associé à la réponse Th-1) et IgG1 (associé à la réponse Th-2). L'activité uréase de *H. hepaticus* n'est pas nécessaire à la colonisation intestinale, mais elle semble avoir une fonction indispensable dans la pathologie hépatique (Ge *et al.*, 2008a).

IV.2 Lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide (LPS) est une endotoxine localisée dans la membrane externe des bactéries gram négatives. Il est composé de 3 éléments: une chaîne polysaccharide ayant

une partie constante (« core ») et une autre variable correspondant à l'antigène O et le lipide A. Ce dernier est responsable de l'activité biologique et immunologique du LPS. Il agit comme immuno-modulateur et immuno-stimulateur de la réponse immune de l'hôte. Le « core » et les chaînes O variables semblent avoir un rôle dans la résistance aux antibiotiques et aux stress environnementaux (Raetz et Whitfield, 2002). La réponse immune, induite lors d'une infection, est médiée par les TLR., des récepteurs, permettant aux cellules épithéliales et aux macrophages de reconnaître des pathogènes microbiens variés incluant les bactéries, virus et champignons (Modlin *et al.*, 1999). Les TLR2 et TLR4 sont impliqués dans la reconnaissance du lipide A. Le TLR4 est le récepteur majeur du lipide A, tandis que le TLR2, moins spécifique, reconnaît d'autres composants bactériens (peptidoglycane, lipoprotéines...) (Aderem et Ulevitch, 2000; Raetz et Whitfield, 2002).

Toutes les espèces du genre *Helicobacter* possèdent cette endotoxine qui présente une variabilité macromoléculaire et architecturale. Ainsi le LPS de ce genre présente des différences de phosphorylation du lipide A, une différence dans la composition des acides gras 3-OH ou encore une différence dans la taille des chaînes polysaccharidiques O (Hynes *et al.*, 2004). *H. hepaticus*, *H. bilis* et *Helicobacter canis* ont un LPS dont l'effet mesuré par le test Limule (lysate d'améboocytes de *Limulus polyphemus*) est de 1000 à 10 000 fois inférieur à celui de *H. pylori* (respectivement 7×10^2 , 5×10^3 et 4×10^3 EU/mg). En revanche, le LPS de *H. pullorum* (1 à 4×10^6 EU/mg) est le plus pro-inflammatoire de tous les Hélicobacters ; il est 10 fois supérieur à celui de *H. pylori* alors que celui de *H. hepaticus* est le moins pro-inflammatoire de tous les Hélicobacters (Hynes *et al.*, 2004).

Les différences dans la structure et l'activité des LPS peuvent être dues à une adaptation de la bactérie à sa niche écologique. Malgré ces divergences, tous les LPS des HEH sont capables d'induire l'activation du NF- κ B (Hynes *et al.*, 2004), qui, une fois lié aux sites spécifiques d'ADN, régule l'expression de multiples gènes cibles, induisant la production d'IL-8 (Varon *et al.*, 2009).

La production de cytokines induites par le LPS des Hélicobacters est sous la dépendance du TLR4. En effet, des macrophages déficients pour le TLR4 n'induisent pas de réponse au LPS de *H. pylori*. Le TLR4 n'est pas impliqué dans la reconnaissance des bactéries entières. En revanche, le TLR2 est indispensable pour induire une réponse (induction de cytokines) lors de l'infection avec des Hélicobacters intacts (*H. pylori*,

H. hepaticus et *H. felis*), suggérant le rôle majeur de ce récepteur dans la reconnaissance des Hélicobacters (Mandell *et al.*, 2004).

Une autre étude montre que l'infection à *H. hepaticus* (lysate et le LPS) réduit la réponse immunitaire des cellules intestinales épithéliales médiée par le TLR4. La suppression de la réponse immunitaire par le LPS de *H. hepaticus* pourrait contribuer à la chronicité de l'infection (Sterzenbach *et al.*, 2007), comme c'est le cas pour le LPS de *H. pylori* (Moran, 1996).

IV.3 Îlot de pathogénicité et système de sécrétion

L'analyse du génome de *H. hepaticus* montre la présence d'un îlot génomique de 71kb avec 70 gènes prédits. Le contenu G+C de ces séquences, de 33,2 % est plus faible que celui du reste du génome. Cet îlot, nommé HHGI1 pour « *H. hepaticus* genomic island 1 » contient des éléments suggérant un rôle dans la virulence. Il comprend 3 gènes qui codent pour un homologue du système de sécrétion de type IV (SST4) appelés VirB10, VirB4, et VirD4. Il contient également un gène homologue au gène *hcp* de *Vibrio cholerae* codant pour une protéine sécrétée co-régulée avec l'hémolysine de *V. cholerae* ainsi qu'un cluster de gènes (HH244 à HH251) ayant une forte homologie avec un cluster de gènes (VCA0107 à VCA0115) de fonction inconnue sur le petit chromosome de *V. cholerae* ainsi que dans le génome de *Yersinia pestis* (Suerbaum *et al.*, 2003).

Toutes les souches associées aux pathologies hépatiques possèdent l'îlot génomique complet. En revanche, certaines souches de *H. hepaticus* ont perdu une partie ou l'ensemble des gènes du HHGI1 et ne sont pas associées à des pathologies hépatiques. (Suerbaum *et al.*, 2003) Une autre étude confirme que des souris A/JCr infectées avec des souches ayant perdu partiellement ou totalement le HHGI1 développent une hépatite moins sévère que les souris infectées avec la souche sauvage (Boutin *et al.*, 2005).

Des souris déficientes pour l'IL-10, infectées avec une souche de *H. hepaticus* délétée de 19 gènes de l'îlot HHGI1, ne développent pas de typhlocolite ni d'hyperplasie. Ces souches délétées sont présentes en quantité équivalente à celle des souches sauvages dans le côlon mais sont significativement plus importantes dans le caecum. L'îlot de pathogénicité a un impact sur la réponse Th1, puisque celle-ci est diminuée chez les souris infectées avec la souche mutante comparée aux souches sauvages. L'îlot n'affecte pas la réponse Th2 qui est similaire pour les souris des deux groupes (Boutin *et al.*, 2005). La perte d'une partie de l'îlot

entraîne, lors de l'infection des souris, une diminution de l'expression des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , TNF α et IL-17A) au niveau du caecum et du côlon. Ces résultats suggèrent que les gènes de l'îlot HHGI1 contribuent à la pathogénicité de *H. hepaticus* par la régulation de médiateurs pro-inflammatoires (Ge *et al.*, 2008b).

L'îlot HHGI1 contient également un petit cluster de 13 gènes homologues avec les composants d'un système de sécrétion de type VI (T6SS), incluant *vgrG1*, *hcp*, *vasA*, *vasB*, *vipA*, *vipB*, *icmH*, *icmF*, *pha* et *vasE*. Hcp et VgrG1 sont des composants majeurs du système de sécrétion de type VI (Pukatzki *et al.*, 2009). Hcp (localisé principalement dans le cytoplasme et le périplasma de la bactérie) et VgrG1 (localisé dans le cytoplasme, périplasma et les membranes de la bactérie) sont sécrétés par *H. hepaticus* en présence d'un système de sécrétion de type VI fonctionnel (Bartonickova *et al.*, 2013). La présence de VgrG1 augmente le potentiel colitogénique de *H. hepaticus* dans un modèle de colite avec transfert de cellules T chez des souris C57BL/6 Rag2^{-/-}. En effet, après 5 semaines d'infection, les souris inoculées avec des souches invalidées pour les gènes *icmF* ou *vgrG1* présentaient, respectivement des lésions moins sévères ou une absence de lésions macroscopiques comparées aux souris infectées avec des souches sauvages, qui avaient un côlon moins souple avec des parois épaissies. De même, la densité des bactéries présentes dans le côlon était similaire en fonction des différentes souches. Cependant, la masse bactérienne était significativement augmentée avec les mutants du T6SS dans le caecum, suggérant que le système de sécrétion contribue à la réponse inflammatoire permettant de contrôler le niveau de colonisation. Les protéines VgrG1 et VgrG2 augmentent la réponse pro-inflammatoire en induisant la production d'IL-8 par les TLR4. (Bartonickova *et al.*, 2013)

Comme *H. hepaticus*, certaines souches de *H. pullorum* possèdent un système de sécrétion de type VI complet (Borges *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2014). La protéine Hcp de *H. pullorum* a des similarités structurelles avec les protéines d'enveloppe des vésicules d'endocytose, suggérant que le T6SS, par l'interaction avec les vésicules d'endocytose, serait impliqué dans la perforation et l'invasion des cellules de l'hôte. (Sirianni *et al.*, 2013)

Table 1. Caractéristiques des Hélicobacters entéro-hépatiques validés par le comité de taxonomie

	Hôte	Pathologie associée	Catalase	Uréase	Croissance à 42°C	Nombre de flagelles	Distribution du flagelle	Gaine du flagelle	Fibres périplasmiques	CDT
<i>H. anseris</i>	Oie		-	+	+	2	bipolaire	+	ND	NS
<i>H. aurati</i>	Hamster	Gastrite chronique, Métaplasie intestinale, Typhlite	+	+	+	7 – 10	bipolaire	+	+	NS
<i>H. bilis</i>	Mouton, Porc, Chat, Souris, Homme	Hépatite, typhlite, gastroentérite, cholangiocarcinome	+	+	+	3 - 14	bipolaire	+	+	+
<i>H. brantae</i>	Oie		-	-	+	1	unipolaire	+	ND	NS
<i>H. canadensis</i>	Homme, Oie, Rongeur, Porc	Entérite, bactériémie	+	-	+	1 – 2	uni/bipolaire	-	-	-
<i>H. canis</i>	Chien, Homme, Mouton	Gastroentérite, bactériémie	-	-	+	2	bipolaire	+	-	+
<i>H. cholecystus</i>	Hamster	Pancréatite, fibrose des voies biliaires	+	-	+	1 - 3	uni/bipolaire	+	-	NS
<i>H. cinaedi</i>	Homme, Hamster	Gastroentérite, bactériémie	+	-	-	1 - 2	uni/bipolaire	+	-	+
<i>H. equorum</i>	Cheval		+	-	-	1	unipolaire	+	-	NS
<i>H. fenneliae</i>	Homme, Chien	Gastroentérite, bactériémie	+	-	-	1-2	uni/bipolaire	+	-	+
<i>H. ganmani</i>	Souris		-	-	-	2	bipolaire	-	-	NS
<i>H. hepaticus</i>	Souris	Hépatite chronique, Maladie inflammatoire chronique de l'intestin, Tumeurs hépatocellulaires	+	+	-	2	bipolaire	+	-	+
<i>H. himalayensis</i>	Marmotte sauvage de l'Himalaya		+	-	+	1-2	uni/bipolaire	+	ND	NS
<i>H. macacae</i>	Singe	Colite, adénocarcinome du côlon	+	-	+	2	bipolaire	+	ND	-
<i>H. marmotae</i>	Marmotte d'Amérique, Chat	Hépatite	+	+	-	2	bipolaire	+	-	+
<i>H. mastomyrinus</i>	Rat du Natal, souris	Proctite	+	+	+	2	bipolaire	+	-	+
<i>H. mesocricetorum</i>	Hamster		+	-	+	2	bipolaire	-	-	NS
<i>H. muridarum</i>	Souris, Rat	Gastroentérite, Gastrite, typhlocolite	+	+	-	10 – 14	bipolaire	+	+	+
<i>H. pametensis</i>	Oiseau, Porc		+	-	+	2	bipolaire	+	-	+
<i>H. pullorum</i>	Poulet, Homme, souris, rat	Gastroentérite, Hépatite	+	-	+/-	1	unipolaire	-	-	+
<i>H. rodentium</i>	Souris	Angiocholite, Typhlite	+	-	+	2	bipolaire	-	-	-
<i>H. trogontum</i>	Rat, mouton	Hépatite	+	+	+	5 - 7	bipolaire	+	+	NS
<i>H. typhlonius</i>	Souris, rat	Typhlocolite	+	-	+	2	bipolaire	+	-	+
<i>H. valdiviensis</i>	Oiseau sauvage		+	+/-	+	1	unipolaire	-	-	NS

ND non déterminé NS non séquencé

IV.4 Toxines cytoléthales

Parmi les 24 Hélicobacters entéro-hépatiques validés par le comité de taxonomie (Euzéby, 1997) (Table 1), 11 espèces, dont *H. hepaticus* et *H. pullorum*, possèdent 3 gènes en opéron codant pour la génotoxine CDT (pour « Cytolethal Distending Toxin ») : *cdtA*, *cdtB* et *cdtC*. D'autres espèces proposées mais non validées comme '*Helicobacter apodemus*', '*Helicobacter callitrichis*', '*Helicobacter magdeburgensis*', '*Helicobacter winghamensis*', '*Flexispira rappini*' possèdent aussi les gènes codant pour la CDT. Récemment, le génome de 4 Hélicobacters (*Helicobacter* sp MIT 01-6451, MIT 05-5293, MIT 03-1616 et MIT 03-1614) a révélé la présence des gènes de la CDT.

Cette toxine entraîne, *in vitro*, une distension cellulaire, un remodelage du cytosquelette d'actine avec la formation de fibres de stress ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. (Young *et al.*, 2000a, 2000b) Cependant, la CDT des Hélicobacters a été peu étudiée à la différence de celle d'autres espèces, telles que *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* ou *Haemophilus ducreyi*. Le mécanisme d'action et les effets de cette toxine sont abordés au chapitre suivant.

Par ailleurs, une étude datant de 1995 indique que les souches de *H. hepaticus* produisent un facteur toxique responsable de la formation de granules cytoplasmiques et d'un changement morphologique des cellules de foie de souris (CCL 9.1), qui deviennent rondes, après 48 à 72 h d'exposition. D'autres Hélicobacters produisent aussi ce facteur hépatotoxique, appelé Granulating Cyto-Toxin (GCT) dans les cellules du foie de souris, tels que *H. mustelae* et *H. pylori*. En revanche, *Helicobacter rappini* et *H. muridarum* ne causent pas d'effet cytopathogène. La GCT (100 kDa) est soluble, stable à 56°C pendant 30 min mais est inactivée à 100°C pendant 15 min ou par l'incubation avec de la trypsine. Elle n'induit pas la formation de vacuole dans les cellules HeLa. (Taylor *et al.*, 1995) En 2004, une étude a suggéré que l'activité cyto-pathogène induisant la formation de granules cytoplasmiques pourrait être médiée par la CDT. En effet, la CDT est capable d'induire la formation des granules, et, comme le facteur cytotoxique GCT, elle est présente dans le surnageant de culture de *H. hepaticus* et ses effets sont visibles après 48 à 72 h d'incubation. (Young *et al.*, 2004) Par ailleurs, les auteurs de l'étude de 1995 indiquaient que *H. pylori*, pourtant négatif pour l'activité CDT, était capable d'induire la formation des granules cytoplasmiques. *H. pullorum* est également capable d'induire un effet cytopathogène avec la formation de

granules cytoplasmiques et pseudo-inclusions intranucléaires, dans des cellules de foie de souris, par un facteur aux caractéristiques similaires à la CDT ou GCT, d'une taille supérieure à 50 kDa (Ceelen *et al.*, 2009). Ces pseudo-inclusions intranucléaires ont également été observées, *in vivo*, dans les hépatocytes de souris infectées par *H. hepaticus* (Ward *et al.*, 1994b).

Table 2. Bactéries productrices de CDT

Bactérie	Hôte	Niche	Pathologie associée
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Homme	Poche parodontale / sillon gingival / plaque dentaire	Parodontite
<i>Campylobacter coli</i>	Homme, singe, chat, porc, mouton, poulet	Muqueuse intestinale	Entérocolite
<i>C. fetus subsp. fetus</i>	Homme, chat	Muqueuse intestinale	Entérocolite
<i>C. fetus subsp. venerealis</i>	Homme, chat	Muqueuse intestinale, muqueuse uro-génitale	Entérocolite, infertilité
<i>C. hyointestinalis</i>	Homme, porc	Muqueuse intestinale	Entérocolite
<i>C. jejuni</i>	Homme, singe, chat, chien, furet, mouton, porc, poulet	Muqueuse intestinale	Entérocolite
<i>C. lari</i>	Homme	Muqueuse intestinale	Entérocolite
<i>C. upsaliensis</i>	Homme, chat, chien, porc, poulet	Muqueuse intestinale	Entérocolite/bactériémie
<i>Escherichia albertii</i>	Homme	Muqueuse intestinale	Dysenterie
<i>E. coli (CDT-I à CDT-V)</i>	Homme, poulet, chat, porc	Muqueuse intestinale, muqueuse uro-génitale	Entérocolite, septicémie, infection du tractus urinaire
<i>Helicobacter bilis</i>	Souris, chien	Muqueuse intestinale, voies biliaires	Typhlocolite, hépatite
<i>H. canis</i>	Homme, Chien	Muqueuse intestinale, foie	Bactériémie, entérocolite, hépatite
<i>H. cinaedi</i>	Homme, singe, souris	Muqueuse intestinale, foie	Septicémie, colite, hépatite, typhlocolite
<i>H. fennelliae</i>	Homme, chien	Muqueuse intestinale	Gastroentérite, bactériémie
<i>H. hepaticus</i>	Souris	Muqueuse intestinale	Entérocolite, hépatite, hépatocarcinome
<i>H. pametensis</i>	Oiseau, porc	Muqueuse intestinale	ND
<i>H. marmotae</i>	Marmotte, chat	Foie, muqueuse intestinale	Foie
<i>H. mastomyrinus</i>	Homme	Muqueuse intestinale	Proctite, hépatite
<i>H. muridarum</i>	Rat, souris	Muqueuse intestinale	Gastroentérite, typhlocolite
<i>H. pullorum</i>	Humain, poulet, souris	Muqueuse intestinale	Entérite, hépatite
<i>H. typhlonius</i>	Souris, rat	Muqueuse intestinale	Typhlocolite
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Homme	Organes génitaux externe	Chancres mou
<i>Haemophilus parasuis</i>	Porc	Muqueuse des voies respiratoires supérieures	Septicémie
<i>Salmonella enterica Typhi</i>	Homme	Muqueuse intestinale	Fièvre typhoïde
<i>Shigella dysenteriae</i>	Homme	Muqueuse intestinale	Dysenterie

C. Campylobacter, E. Escherichia, H. Helicobacter ND non déterminé

Chapitre II - "Cytolethal Distending Toxin"

I. Premières découvertes et bactéries productrices de CDT

Une nouvelle toxine a été identifiée pour la première fois en 1987 chez une souche de *Escherichia coli* O55 :K59 associée au développement d'une gastroentérite et d'une encéphalopathie (Anderson *et al.*, 1987) ainsi que chez des Sighelles (Johnson et Lior, 1987)

En 1988, les auteurs mettent en évidence que cette toxine thermolabile (LT) de *E. coli* (43 souches isolées de maladies diarrhéiques) est cytoléthale pour les cellules Vero, HeLa, Hep-2 et CHO, mais pas pour les cellules Y-1. Cette toxine est nommée « **CytoLethal Distending Toxin** » (CDLT puis CDT) pour refléter le changement morphologique progressif (distension cellulaire) et la cytotoxicité mise en évidence dans toutes les cellules sensibles. Elle est différente des autres toxines thermolabiles, thermostables et entérotoxines classiques telles que les vérotoxines (Shiga-toxine) et l'hémolysine. Après 96 h d'incubation avec la CDT, seulement 20 à 30% des cellules demeurent viables.(Johnson et Lior, 1988a)

La toxine, de poids moléculaire supérieur à 30 000, est sensible à la trypsine et perd son activité suite à un traitement à 70°C pendant 15 min ou une dialyse. Contrairement aux autres toxines thermolabiles (LT), le niveau d'AMP cyclique des cellules traitées est optimal à 24h, mais diminue dans les 72 h suivant l'exposition. L'activité de la CDT est également inhibée par un antisérum de lapin préparé à l'aide de souches de *E. coli* sécrétrices d'activité CDT, mais pas par des anticorps contre les toxines du choléra, la toxine thermolabile de *E. coli* ou encore de *Clostridium difficile*. (Johnson et Lior, 1988a)

La même année, la CDT est identifiée chez des *Campylobacter* sp. tels que *C. jejuni*, *Campylobacter fetus* subspecies *fetus*, *C. coli*, *Campylobacter laridis* et des *Campylobacters* ayant une activité catalase faiblement positive voire négative. Parmi les 718 souches testées, 41% des souches isolées de l'Homme ou d'animaux sont positives pour la CDT. La CDT des *Campylobacters* induit les mêmes effets cytopathogènes : distention cellulaire progressive et cytotoxicité (Johnson et Lior, 1988b). La CDT a ensuite été identifiée chez *H. ducreyi* (Purvén et Lagergård, 1992), un bacille provoquant la maladie du chancre mou (Hadley, 1979). La toxine de *H. ducreyi* partage des caractéristiques similaires à la CDT de *E. coli*, partiellement inhibée à 56°C et totalement inhibée à 70°C. Les cellules incubées en présence

de la toxine changent de morphologie et meurent après traitement. La toxine est produite par 60% des souches testées avec une forte activité cytotoxique (Purvén et Lagergård, 1992).

Depuis, la CDT a été identifiée chez de nombreuses autres Protéobactéries (classe epsilon et gamma) Gram négatives pathogènes des muqueuses. Ainsi, la CDT est également produite par *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Sugai *et al.*, 1998), *Haemophilus parasuis* (Yue *et al.*, 2009), *Salmonella enterica* serotype Typhi (Haghjoo et Galán, 2004), *Escherichia albertii* (Maheux *et al.*, 2014), *Avibacterium paragallinarum* (Chen *et al.*, 2014) et des HEH tels que *H. hepaticus* (Young *et al.*, 2000b), *H. pullorum* (Young *et al.*, 2000a), *H. bilis* (Fox *et al.*, 2004a), etc... La CDT n'est pas nécessairement produite par toutes les souches d'une même espèce et son activité peut être plus ou moins toxique (Cope *et al.*, 1997; Eyigor *et al.*, 1999). (Table 2)

Afin de simplifier la désignation des protéines CDT, un système de nomenclature, initialement proposé en 2001 (Cortes-Bratti *et al.*, 2001) a été revu en 2011 (Jinadasa *et al.*, 2011) suite à l'augmentation de la quantité de bactéries productrices de CDT. Le système propose de nommer la CDT d'une bactérie en ajoutant un préfixe avec la première lettre du Genre (en lettre capitale) suivie des trois premières lettres du nom de l'espèce (en minuscule) de la bactérie. Par exemple, la CDT de *H. hepaticus* sera désignée HhepCDT et sa sous unité CdtA sera désignée HhepCdtA. Cette nomenclature a donc été utilisée pour la suite de ce chapitre.

II. Gènes de la CDT et protéines codées

II.1 Génétique de la CDT

L'opéron CDT de *E. coli* a été cloné puis séquencé pour la première fois en 1994, par deux groupes indépendants (Pickett *et al.*, 1994; Scott et Kaper, 1994). L'analyse des séquences de la première CDT de *E. coli* (souche 6468/62 sérotype O86:H34) clonée et séquencée (nommée EcolCDT-I) a montré que la toxine est codée par 3 gènes adjacents sous la dépendance d'un même promoteur. Trois cadres ouverts de lecture (ORF) de 711, 819 et 570 pb ont été identifiés et nommés respectivement *cdtA*, *cdtB* et *cdtC* ; ces gènes codent pour des polypeptides ayant des masses moléculaires prédites de 25,5 kDa, 29,8 kDa et 20,3 kDa.

Chaque ORF a une séquence signal putative et il existe des chevauchements de 4 pb entre les gènes *cdtA* et *cdtB* et entre les gènes *cdtB* et *cdtC*. Les 3 gènes sont nécessaires à l'activité de la toxine. Un site de fixation pour le ribosome (RBS) a été identifié en amont de chaque gène (Scott et Kaper, 1994). Le clonage et le séquençage de la CDT d'une autre souche de *E. coli* (9142-88 sérotype O128:H-), nommée EcolCDT-II, a permis de confirmer la présence de ces 3 ORFs adjacents, codant pour des protéines de taille prédite de 27,75 kDa, 29,53 kDa et 19,94 kDa (Pickett *et al.*, 1994). La comparaison des séquences nucléotidiques obtenues par les 2 groupes indépendants, pour la EcolCDT-I et la EcolCDT-II montre seulement 35, 57 et 33% d'homologie pour les gènes respectifs *cdtA*, *cdtB* et *cdtC*, suggérant une forte variabilité génétique entre les CDT d'une même espèce (Okuda *et al.*, 1995).

Le séquençage d'une troisième CDT de *E. coli* (souche 1404), nommée EcolCDT-III, a montré, pour la première fois, que les 3 gènes codant pour la CDT étaient portés sur un plasmide pVir codant également pour un facteur cytotoxique : le CNF2 (Cytotoxic Necrotizing Factor type 2). Cette EcolCDT-III présente une plus forte similarité avec les 3 protéines constituant la EcolCDTII (de 91 à 96% de similarité) comparé à la EcolCDT-I (de 55 à 69%) ou la CjejCDT (48,6 à 65,6%) (Pérès *et al.*, 1997).

La masse prédite des protéines CdtA, CdtB et CdtC de *C. jejuni* (souche 81-176) est respectivement de 30,11 kDa, 28,98 kDa et 21,15 kDa. Le contenu en G+C de ces protéines est respectivement 34, 36 et 31%, ce qui est typique de l'espèce. La sonde *cdtB* spécifique à la souche *C. jejuni* 81-176 n'hybride pas avec l'ADN d'autres espèces de Campylobacters, telles que *C. fetus*, *C. lari*, *Campylobacter upsaliensis* et *Campylobacter hyointestinalis*, bien que ces bactéries aient une activité CDT et des séquences *cdtB* (test sur cellules HeLa et PCR), confirmant la variabilité des CDT entre bactéries d'un même genre. La CdtB de *C. jejuni* a 59% d'homologie avec la CdtB de *E. coli* (Pickett *et al.*, 1996). La CDT de *H. ducreyi* présente 38%, 51% et 24% d'identité avec les sous unités A, B et C de la EcolCDT-I. La taille prédite des protéines matures est de 23, 29, et 19 kDa (Cope *et al.*, 1997).

Depuis, la CDT de nombreuses autres bactéries a été clonée et séquencée. Les caractéristiques génétiques sont identiques pour les différentes CDT: 3 gènes en opéron sur le chromosome (excepté pour EcolCDT-III), adjacents ou séparés par quelques nucléotides, avec un RBS en amont des gènes, et codant pour 3 protéines : CdtA, CdtB et CdtC. Les trois protéines sont indispensables à l'activité de la toxine (Pickett *et al.*, 1996; Sugai *et al.*, 1998). Comme celle des séquences en nucléotides, la taille prédite pour les sous unités de la CDT

varie respectivement de 23 à 30 kDa, de 28 à 29 kDa et de 19 à 21 kDa pour la CdtA, CdtB et CdtC suivant les espèces bactériennes (Hu et Stebbins, 2006; Okuda *et al.*, 1995; Pickett *et al.*, 1996).

Les variations de CDT inter-espèces sont plus rares. *E. coli* est une des rares espèces bactériennes qui présente une variation de CDT avec cinq variants identifiés ; nommés EcolCDT-I à EcolCDT-V, qui sont répartis suivant le pathotype de la bactérie (Janka *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2007; Tóth *et al.*, 2003). *C. hyointestinalis* possède également deux variants de CDT, nommés ChyoCDT-I et ChyoCDT-II ; qui partagent seulement 25, 56 et 24,8% de similarité entre les 3 sous-unités protéiques. La ChyoCDT-II a été retrouvée principalement chez les bactéries isolées des animaux et une grande partie des souches possédaient un cluster de gènes codant pour les deux variants de CDT (Kamei *et al.*, 2015).

Le pourcentage en G+C (de 38 à 45%) des gènes codant pour EcolCDT-III suggère que l'acquisition de cette toxine est récente chez ce pathogène. Des séquences d'insertion et des éléments phagiques sont identifiés au niveau du locus EcolCDT-III (Pérès *et al.*, 1997). L'analyse des séquences en amont et aval des EcolCDT-I, IV et V a permis d'identifier des gènes de prophage lambdaïde, des homologues des bactériophages P2 et lambda (Asakura *et al.*, 2007; Janka *et al.*, 2003; Tóth *et al.*, 2009). De même, l'analyse des séquences encadrant la HducCDT révèle la présence d'ORFs incomplètes codant pour une protéine ayant 36% d'identité avec la transposase A (TnpA) de *Staphylococcus aureus*, pour deux protéines similaires à IstA et IstB impliquées dans des fonctions de transposition chez *E. coli* (Brown *et al.*, 1996) et pour une ORF complète codant pour une protéine identique à 58% avec une recombinase TnpR de *E. coli* (Cope *et al.*, 1997).

La présence de ces éléments génétiques mobiles et phagiques suggère qu'en complément d'une acquisition par transfert vertical, l'acquisition de la toxine peut être effectuée par un transfert horizontal entre bactéries.

II.2 Structures et fonction des protéines

Les sous unités CdtA, CdtB et CdtC forment un complexe hétéro-trimérique (Cao *et al.*, 2005; Hu and Stebbins, 2006; Lara-Tejero and Galán, 2001). La caractérisation structurelle (par

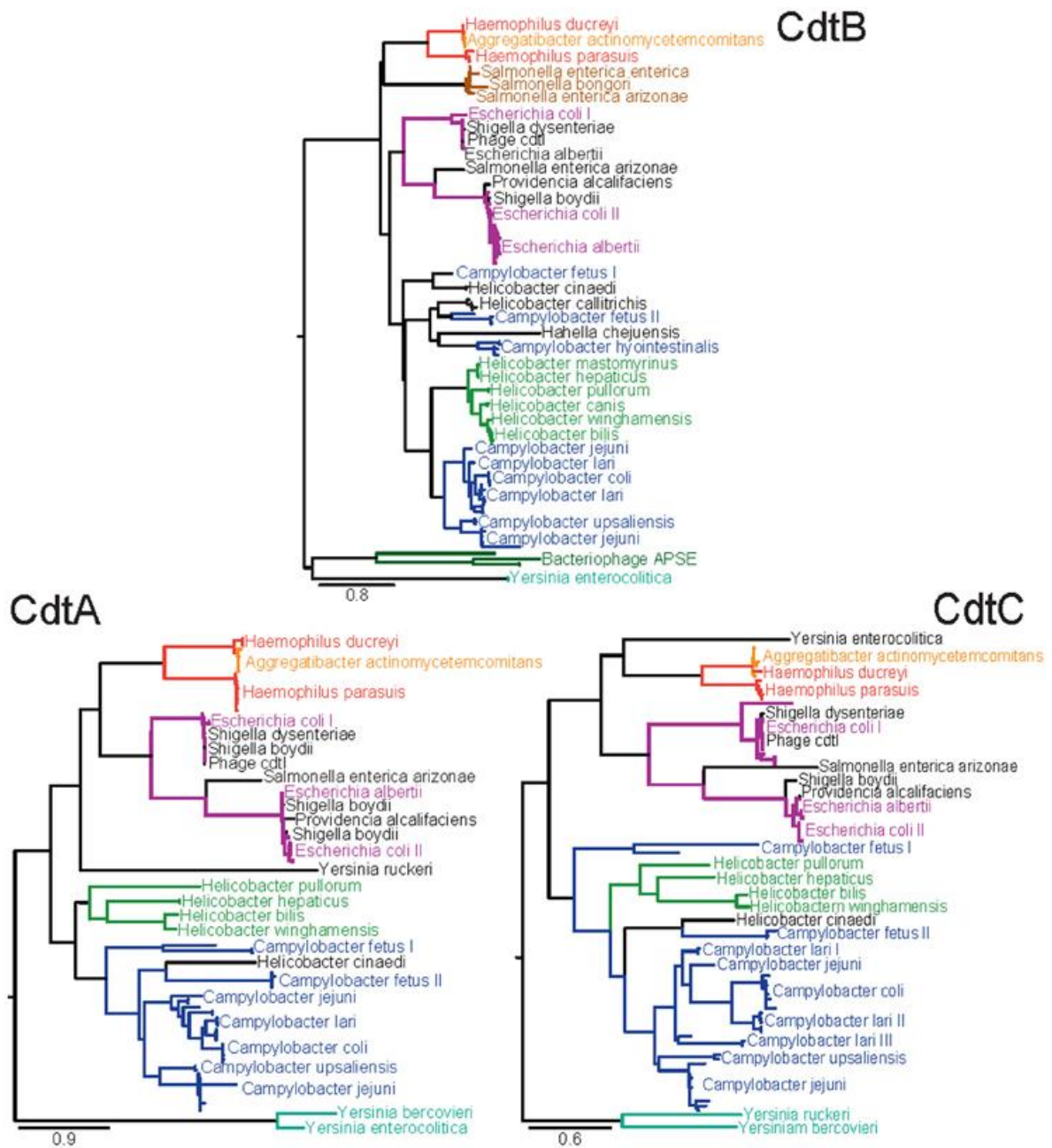


Figure 6. Analyse phylogénétique des 3 sous-unités de la toxine CDT (acide aminés) (Gargi *et al.*, 2012)

cristallographie) (Hu et Stebbins, 2006; Yamada *et al.*, 2006) et fonctionnelle (Lara-Tejero et Galán, 2000, 2001) des sous unités a permis de montrer que la CDT est une toxine de type AB₂ (pour Active/Binding). Les sous unités CdtA et CdtC forment le composant « binding » nécessaire à la fixation aux surfaces des cellules hôtes et permettant le transport de la sous unité *cdtB*. Celle-ci constitue la partie « active ». (Lara-Tejero et Galán, 2001)

Les trois protéines composant la CDT sont indispensables à l'activité CDT de *H. ducreyi* (Lara-Tejero et Galán, 2001; Purvén et Lagergård, 1992), *A. actinomycetemcomitans* (Shenker *et al.*, 2005; Sugai *et al.*, 1998), *C. jejuni* (Pickett *et al.*, 1996; Saiki *et al.*, 2004) et *E. coli* variant V (Taieb *et al.*, 2015). Néanmoins, des études contradictoires indiquent que la CdtA ne serait pas essentielle pour l'activité CDT. Une incubation des cellules avec un mélange CdtB-CdtC de la AactCDT permet d'induire un arrêt du cycle cellulaire (Cao *et al.*, 2005; Hu and Stebbins, 2006; Yamada *et al.*, 2006). De même, des sonicats de souches de *H. ducreyi* mutées pour le gène *cdtA* induisent une activité CDT légèrement réduite par rapport aux souches sauvages tandis que des sonicats de souches mutées pour le gène *cdtB* ou *cdtC* n'induisent pas d'activité toxique (Lewis *et al.*, 2001). Ces résultats ont été confirmés par une autre étude indiquant qu'un complexe recombinant CdtB-CdtC de la CjejCDT est capable d'induire une activité toxique qui est toutefois 4 fois moins importante qu'avec l'hétéro-trimère (Lee *et al.*, 2003).

La micro-injection de CjejCdtB (Lara-Tejero et Galán, 2000) ou l'électroporation de EcolCdtB (Elwell *et al.*, 2001) dans les cellules a permis de reproduire les effets observés avec la CDT complète (distension cellulaire et arrêt du cycle cellulaire), confirmant la fonction active de cette sous unité. La sous-unité CdtB, responsable des effets toxiques, possède une activité désoxyribonucléase de type I (DNase I) (Elwell et Dreyfus, 2000; Lara-Tejero et Galán, 2000) localisée à l'extrémité C-terminale ainsi qu'une activité phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate phosphatase localisée à l'extrémité N-terminale (Shenker *et al.*, 2007). Des mutants CdtB pour le site actif de la DNase n'induisent pas de changement morphologique des cellules (Lara-Tejero et Galán, 2000).

La CdtC est l'un des hétéro-dimères composant le domaine « binding » de la toxine AB. La CdtC a une séquence de 13 acides aminés en N-terminal interagissant avec le site DNase de la CdtB, suggérant une auto-fonction d'inhibition de la toxine (Nesić *et al.*, 2004). Bien que cette sous-unité n'ait pas de fonction active, la transfection de

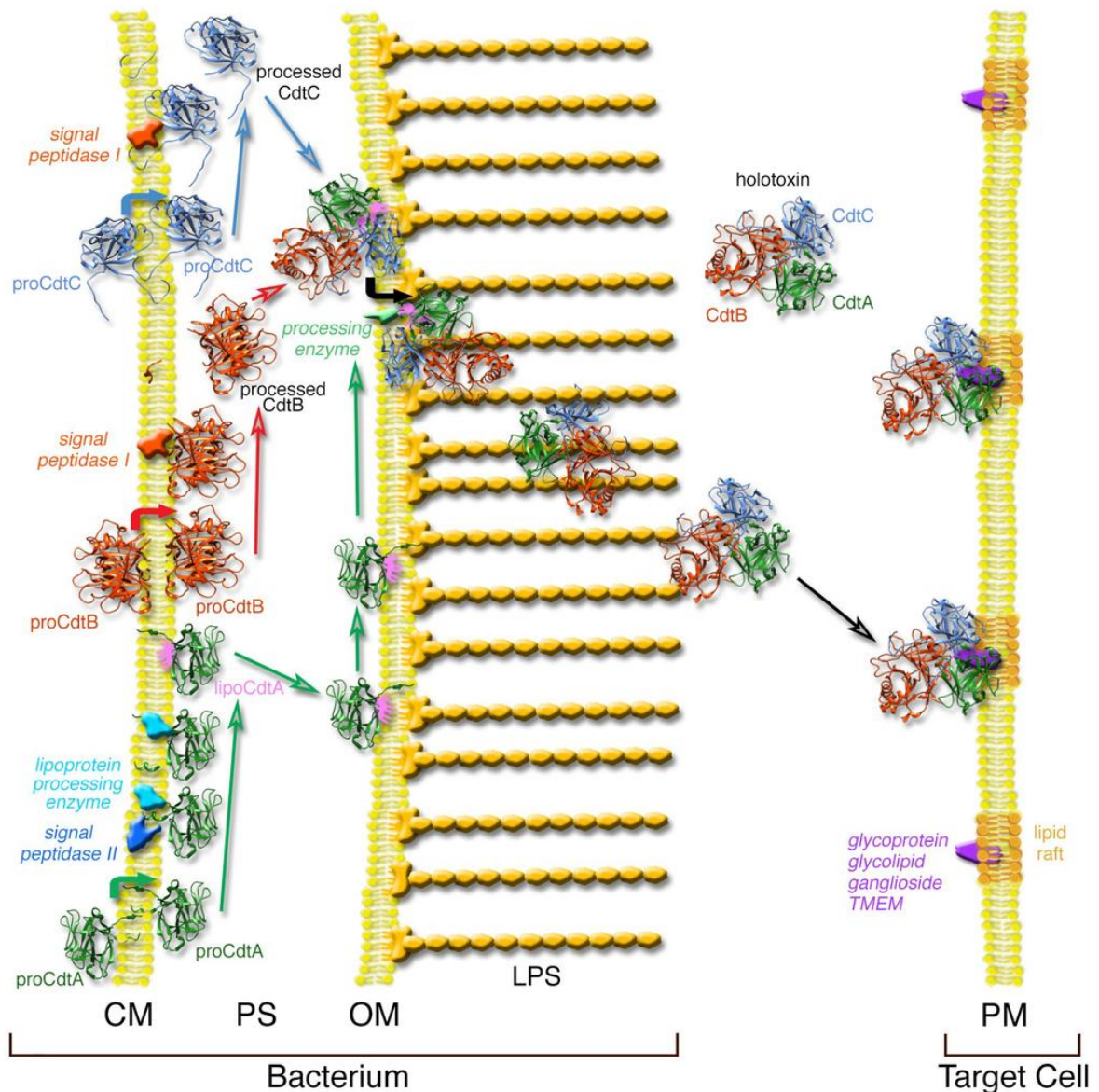


Figure 7. Modèle de synthèse et de sécrétion de la Cytolethal Distending Toxin d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Les 3 sous-unités de la CDT, CdtA, CdtB et CdtC, traversent la membrane cytoplasmique (CM). La CdtA est modifiée par ajout d'un lipide qui lie la protéine à la membrane externe (OM). Les sous-unités s'assemblent dans l'espace périplasmique (PS). L'holotoxine est sécrétée grâce à la perte du lipide de la CdtA, et peut se lier à la surface de la cellule hôte. (DiRienzo, 2014a)

CDT Cytolethal Distending Toxin

CM, membrane cytoplasmique

OM, membrane externe

PM, membrane périplasmique

PS, espace périplasmique

cellules (CHO) avec une AactCdtC recombinante induit une distension et une mort cellulaire (Mao and DiRienzo, 2002).

La sous-unité CdtB est la plus conservée des sous-unités parmi les différentes CDT et particulièrement au niveau du résidu catalytique et du site de liaison à l'ADN dans le domaine DNase (Elwell and Dreyfus, 2000; Hu and Stebbins, 2006; Lara-Tejero and Galán, 2000; Nesić *et al.*, 2004). L'analyse phylogénétique des séquences CDT montre que la toxine et, principalement la CdtB, est plus conservée entre les bactéries d'un même genre et d'une même niche infectieuse, suggérant une adaptation de la bactérie pour la persistance de la colonisation (Figure 6) (Gargi *et al.*, 2012).

III. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'internalisation de la CDT dans la cellule a été bien étudié pour les AactCDT, CjejCDT, EcolCdtB-I, EcolCdtB-II et HducCDT, permettant de proposer un mécanisme d'action général pour cette toxine, bien qu'aucun consensus n'existe actuellement.

III.1 Sécrétion

La CDT est présente principalement dans le cytoplasme bactérien mais également dans le périplasma (entre 20 et 50% de la quantité totale) (Lindmark *et al.*, 2009). Les trois protéines CdtA, CdtB et CdtC possèdent une séquence signal d'adressage qui, une fois clivée, permet leur translocation indépendante du cytoplasme vers le périplasma dans lequel les sous-unités sont assemblées pour former l'holotoxine (Pickett *et al.*, 1994; Scott et Kaper, 1994).

Un modèle de sécrétion a été proposé avec l'étude de la AactCDT (Figure 7). La toxine retrouvée dans le surnageant bactérien est tronquée (de 36 à 43 acides aminés) au niveau N-terminal de la séquence CdtA, devenant CdtA'. La CdtA contient, au niveau de sa séquence signal N-terminale, un domaine consensus de liaison de lipide appelé « lipobox ». La modification post-traductionnelle de la CdtA en CdtA' par la perte d'un lipide permettrait la sécrétion de la CDT dans le milieu extérieur. L'holotoxine excrétée peut ensuite se lier à la surface des cellules cibles (Ueno *et al.*, 2006).

Un autre modèle suggère que la CDT (CjejCDT et AactCDT) pourrait être sécrétée par le relargage des vésicules de la membrane externe des bactéries sous une forme

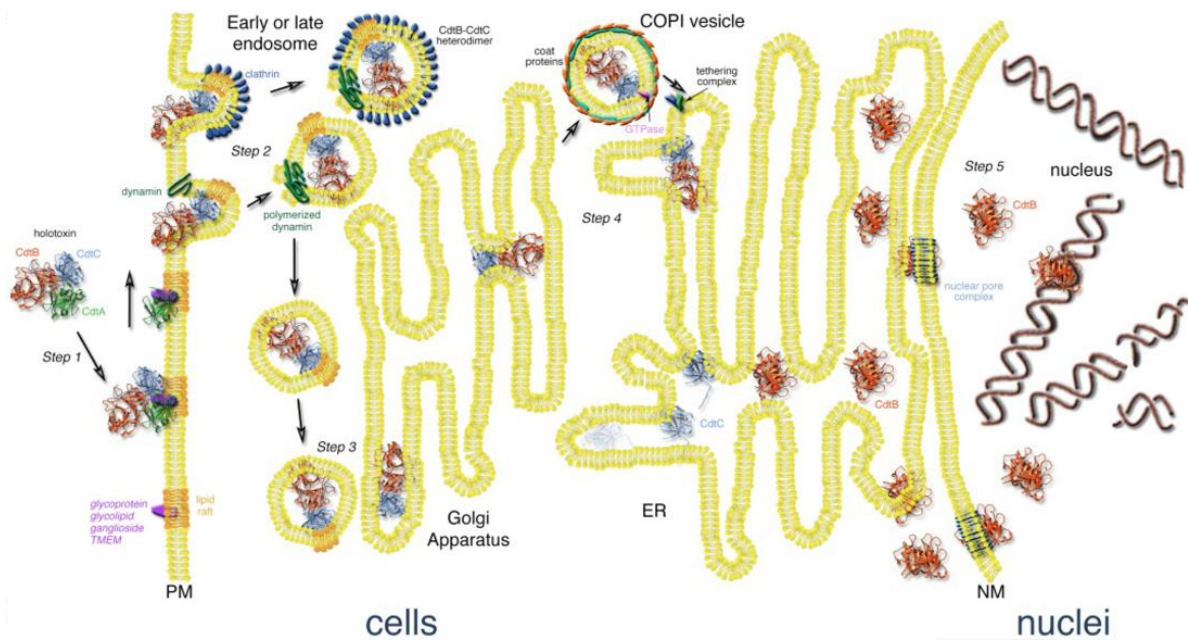


Figure 8. Mécanisme général d'internalisation de la Cytotoxic Distending Toxin dans la cellule cible. Adaptée de (Gargi *et al.*, 2012)

biologiquement active et resterait associée aux vésicules de la membrane externe. (Lindmark *et al.*, 2009; Rompikuntal *et al.*, 2012). Les vésicules de *A. actinomycetemcomitans* sont ensuite internalisées dans l'espace péri-nucléaire de la cellule hôte (Thay *et al.*, 2014).

II.2 Internalisation dans la cellule hôte

Actuellement, il n'y a pas de consensus pour l'existence d'un récepteur commun pour les différentes CDT. Les sous-unités CdtA et CdtC sont responsables de la liaison de la toxine aux cellules hôtes (Figure 8).

Les CdtA et CdtC ont des domaines de type « ricine B leptine » qui peuvent interagir avec le fucose de la membrane cellulaire (Hu et Stebbins, 2006; Lara-Tejero et Galán, 2001; Nesić *et al.*, 2004). Les EcolCDT-II et AactCDT se lient, respectivement, à une glycoprotéine contenant du fucose et un ganglioside GM3 (McSweeney et Dreyfus, 2005; Mise *et al.*, 2005). La liaison aux glycoprotéines nécessite une CdtA fonctionnelle (Cao *et al.*, 2005).

La EcolCDT-I reconnaît une protéine G-associée au récepteur (TMEM181) exprimé à la surface des cellules de la lignée cellulaire de leucémie myéloïde chronique (KBM7). Les lignées cellulaires avec un récepteur non fonctionnel sont résistantes à l'action de la toxine. En revanche, l'activité de l'AactCDT est indépendante du TMEM181 mais nécessite une protéine membranaire : la synaptogyrine 2 intègre (Carette *et al.*, 2009, 2011).

Il a également été montré que les sous-unités CdtA et CdtC (AactCDT, HducCDT) se lient aux radeaux lipidiques des micro-domaines de la membrane de l'hôte, riches en cholestérol et sphingolipides. La perte de cholestérol membranaire protège les cellules de l'arrêt du cycle en phase G2 et réduit la capacité de la toxine à s'associer aux cellules. L'intégrité des radeaux lipidiques est donc indispensable pour l'interaction de la toxine avec l'hôte. (Boesze-Battaglia *et al.*, 2006; Guerra *et al.*, 2005) L'action de la CjejCDT est inhibée en absence de cholestérol cellulaire (Lai *et al.*, 2015).

L'incubation de cellules HeLa avec un complexe CdtA-CdtC avant traitement par la toxine CDT inhibe son action toxique, probablement par une saturation des récepteurs cellulaires. L'ajout de CdtB seule, aux cellules HeLa pré-incubées avec le complexe CdtA-CdtC restaure le phénotype CDT et la mort des cellules épithéliales (Deng et Hansen, 2003). Une autre étude indique qu'il n'existe pas de compétition pour la liaison des CDT (EcolCDT

et HducCDT) de différentes espèces aux cellules hôtes, suggérant que les CDT pourraient être internalisées par différentes voies et interagir avec différents récepteurs (Gargi *et al.*, 2013). La faible conservation des séquences des CdtA et CdtC entre les différentes CDT peut expliquer l'utilisation de différents mécanismes de sécrétion et d'internalisation. De même, les bactéries productrices de CDT ayant des niches écologiques différentes (plusieurs sites digestifs peuvent être colonisés, comme le foie ou les intestins pour une même bactérie, chez différents hôtes infectés comme les mammifères, les reptiles et les oiseaux), l'utilisation de récepteurs différents pourrait refléter une adaptation des CDT aux spécificités des cellules hôtes.

Après la fixation aux récepteurs spécifiques, la CDT pénètre dans la cellule par une endocytose dépendante de puits recouverts de clathrine. L'entrée de la toxine peut être empêchée par une inhibition des puits de clathrine (Cortes-Bratti *et al.*, 1999; Guerra *et al.*, 2005). La sous-unité CdtA est retenue dans la membrane cellulaire en association avec le cholestérol. Les sous-unités CdtB et CdtC sont localisées dans le cytoplasme. Bien que la sous-unité CdtC soit également localisée à la membrane, elle est majoritaire dans le cytoplasme cellulaire, suggérant une fonction chaperonne pour l'entrée de la CdtB dans les cellules (Damek-Poprawa *et al.*, 2012).

L'internalisation de la CdtB est un processus rapide, puisqu'une exposition de seulement deux minutes à la EcolCdtB-II, entraîne une inhibition irréversible de la prolifération cellulaire (CHO) (Aragon *et al.*, 1997).

III.3 Transport cytoplasmique et translocation nucléaire

Après son internalisation par endocytose (Figure 8), la sous-unité CdtB est transportée de façon rétrograde par un système endo-lysosomal vers le réticulum endoplasmique (RE) via l'appareil de Golgi (Guerra *et al.*, 2009). Le transport de toxines de type AB via le RE est suivi de la dégradation du RE, permettant une sortie de la toxine dans le cytosol (Cho *et al.*, 2012). Pour la CDT, le transport est indépendant de Derlin-1, une protéine impliquée dans la dégradation du RE, et n'est pas associée à la dégradation du RE (Cortes-Bratti *et al.*, 2000; Guerra *et al.*, 2005). Par ailleurs, la CDT n'est pas détectée dans le cytosol indiquant qu'elle serait directement transloquée de la lumière du RE au noyau (Guerra *et al.*, 2009). En revanche, une étude a montré que la HducCDT est dépendante des 3 composants majeurs de

la dégradation du RE : Derlin-2, E3 ubiquitin-protein ligase Hrd1 et la AAA ATPase p97 (Eshraghi *et al.*, 2014).

Des micro-injections de CdtB dans le cytoplasme ont mis en évidence un transport actif de la toxine dans le noyau. La détection de la CdtB couplée à la GFP dans le noyau est observée entre deux et trois heures après l'injection, tandis que la GFP n'est pas transloquée au noyau, même 4 heures après injection (Nishikubo *et al.*, 2003). La translocation nucléaire de la CdtB est effectuée grâce à la séquence « Nuclear Localization Signal » localisée à son extrémité N-terminale (McSweeney et Dreyfus, 2004; Nishikubo *et al.*, 2003). Le noyau est le site actif de la toxine, où elle induit des cassures double brin à l'ADN (Lara-Tejero et Galán, 2000).

IV Effets de la Cytolethal Distending Toxin *in vitro*

L'activité toxique de la CDT *in vitro* dépend du temps d'exposition à la toxine (de 2 minutes à plusieurs jours), du temps de latence pour l'observation des résultats (de 4 h à 5 jours post infection), de la dose de toxine administrée et du type de cellules eucaryotes utilisé.

IV.1 Une toxine cyto-pathogène

IV.1.1 Dommages à l'ADN

Les dommages à l'ADN induisent l'activation de point de contrôles. La reconnaissance des dommages par le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs) ou RPA (Protéine Répliquative A), permet l'activation de la voie « Ataxia Telangiectasia Mutated » (ATM) et la mise en place de mécanismes de réparation : la Recombinaison Homologue (RH) ou réparation non homologue : Non-Homologous End Joining (NHEJ). La RH nécessite une séquence homologue pour initier la réparation et intervient en amont de la mitose, pendant les phases S ou G2. La NHEJ prédomine en phase G1 mais peut intervenir au cours de toutes les phases (Ciccio et Elledge, 2010). Les cassures doubles brins peuvent être reconnues par le complexe MRN permettant d'activer la voie ATM et de préparer l'ADN pour la RH (Shibata *et al.*, 2014). La réparation des dommages à l'ADN nécessite l'arrêt du cycle cellulaire et l'activation de p53 ou de p21. Une réparation aberrante peut conduire à une instabilité

génomique. L'échec de la réparation conduit à la mort cellulaire ou à un arrêt irréversible du cycle cellulaire (Ciccia and Elledge, 2010).

L'activité DNase de la CdtB induit des cassures doubles brins à l'ADN de la cellule hôte, similaire aux radiation ionisantes, dans les cellules prolifératives ou non (Frisan *et al.*, 2003; Lara-Tejero et Galán, 2000). Une mutation dans le site catalytique de la DNase abolit les dommages à l'ADN (Fedor *et al.*, 2013; Lara-Tejero et Galán, 2001). Les cellules intoxiquées expriment l'histone phosphorylée γ H2AX témoignant de l'activation de la voie ATM (Bielaszewska *et al.*, 2005; Hassane *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2002; Liyanage *et al.*, 2010). La γ H2AX phosphorylée est indicatrice des dommages à l'ADN, elle est recrutée sur le site des cassures, 1 à 10 min après l'induction des dommages (Bielaszewska *et al.*, 2005; Rogakou *et al.*, 1998). L'activation de γ H2AX n'est pas observée dans les lignées cellulaires déficientes pour la voie ATM (Li *et al.*, 2002).

La microinjection de la HducCdtB induit également une activation de Mre11 (Li *et al.*, 2002) et de RAD50 (Hassane *et al.*, 2003) au point de lésion, confirmant l'activation de la voie ATM par la CDT. Des levures *Saccharomyces cerevisiae* déficientes pour le mécanisme de réparation de l'ADN sont très fortement sensibles à la CjejCDT. Le mécanisme de réparation de l'ADN médié par la voie ATM a un rôle majeur dans la résistance à la toxine et notamment la RH (Kitagawa *et al.*, 2007).

La rapidité d'induction des dommages à l'ADN par la CDT est dose-dépendante. Ainsi, entre une et trois heures après l'intoxication (temps nécessaires pour l'internalisation et la translocation au noyau), les premiers dommages peuvent apparaître à des doses létales (Fedor *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2002). Une dose létale 50 (DL50) ne permet pas d'observer des dommages 6 h après infection, tandis qu'une DL75 ou DL95 induisent des dommages respectivement pour 33 à 51% des cellules. Les dommages à DL50 sont observés plus tardivement à 9 h (pour 22% des cellules) et augmentent progressivement impactant 60% des cellules à 48 h (Fedor *et al.*, 2013). Néanmoins, des essais COMET ont permis de montrer que la EcolCDT à une DL50 était capable d'induire des dommages à l'ADN dès 3 h d'incubation avec les cellules. Ces dommages impliquent le recrutement de la protéine RPA par la CDT (Fedor *et al.*, 2013) ; RPA est une protéine est impliquée dans la RH en réponse aux cassures simples brins (Kitagawa *et al.*, 2007). La CDT pourrait donc induire deux types de dommages : des cassures simples brins, qui non réparées, conduiraient à des cassures doubles brins et des cassures doubles brins immédiates (Fedor *et al.*, 2013).

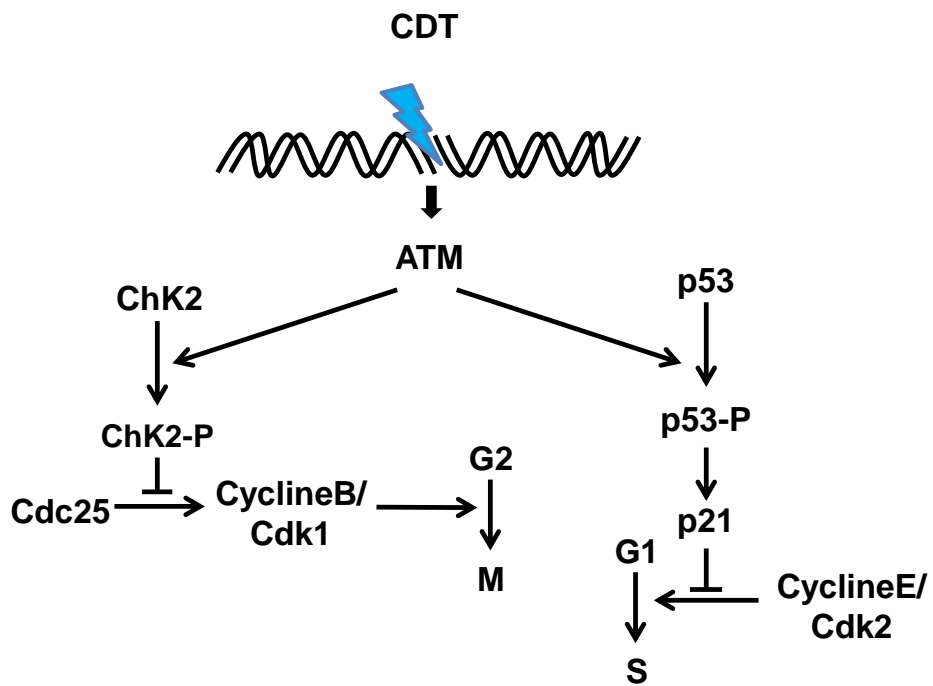


Figure 9. Effet de la CDT sur le cycle cellulaire

L'intoxication par la CDT est suivie d'une fragmentation nucléaire avec condensation de la chromatine suivie de la mort cellulaire pour une majorité des cellules infectées (Bielaszewska *et al.*, 2005; Lara-Tejero and Galán, 2000; Sugai *et al.*, 1998; Whitehouse *et al.*, 1998). En revanche, des cellules intoxiquées avec des doses sub-létales de CDT pendant 30 semaines présentent une augmentation de la fréquence des mutations, une accumulation de la chromatine ainsi qu'une aberration des chromosomes. Cette instabilité génomique n'est pas associée à une diminution de la viabilité cellulaire (Guidi *et al.*, 2013b).

IV.1.2 Arrêt du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un régulateur du développement cellulaire caractérisé par 4 stades ; phase G1 (préparation de la réplication), phase S (réplication), phase G2 (préparation de la mitose) et la phase M (mitose), permettant l'obtention de deux cellules filles. Le passage d'une phase à une autre est sous la dépendance de complexes « cyclin-dépendent kinase » (Cdk)/cycline. La phosphorylation des Cdk permet leur activation. En cas de dommages aux cellules, le cycle cellulaire peut être interrompu en phase G1 ou G2 par l'action des points de contrôles jusqu'à réparation de l'ADN (Elledge, 1996).

La CDT active des points de contrôle du cycle cellulaire confirmant ainsi la mise en place de mécanismes de réparation des dommages à l'ADN. En activant la voie ATM, la CDT induit la phosphorylation/activation de « Checkpoint kinase2 », qui phosphoryle et inactive CDC25C (cell division cycle 25 C phosphatase). Cette phosphorylation empêche ainsi la déphosphorylation du complexe CyclineB/Cycline-dépendent kinase 1 (Cdk1) nécessaire à la transition du cycle cellulaire de la phase G2 à la phase M (Ge *et al.*, 2008c). La voie ATM active p21 un inhibiteur de CdK, conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S, pour 15% des cellules environ (Comayras *et al.*, 1997; Ge *et al.*, 2008c). La CDT est directement impliquée dans la phosphorylation de Cdk1, Cdk2 et p53 ainsi que la surexpression de p21 et p27 par les fibroblastes et les cellules épithéliales (Cortes-Bratti *et al.*, 2001) (Figure 9)

Après 24 h d'exposition permanente à la toxine, 64% des cellules sont bloquées en G2/M, et 97% à 48 h. Le temps d'exposition à la toxine a un impact, puisque 20 min d'incubation avec la CDT suffisent pour induire un arrêt du cycle pour 72% des cellules à 48 h, contre 89% et 97% pour une heure ou une incubation permanente, respectivement

(Whitehouse *et al.*, 1998). De même, les différents variants de CDT ont un impact ; la EcolCDT-III provoque un arrêt en G2/M pour 65-70% des cellules, tandis que les EcolCDT-I et EcolCDT-II bloquent 90-95% du cycle des cellules (Pérès *et al.*, 1997).

Des cellules synchronisées en phase G2 ou en phase M ont été exposées à la toxine. Après 15 h d'exposition, les cellules ont initié un nouveau cycle et étaient bloqués en G2/M, au cycle suivant, 24 h après l'incubation. Lors d'une synchronisation en phase G1/S ou S, les cellules arrêtent leur cycle en G2 sans initier un cycle suivant. La poursuite du cycle lors d'une intoxication en phase G2 et l'arrêt immédiat lors de l'exposition en phase S indiquent un rôle de la phase S dans l'activité de la toxine (Comayras *et al.*, 1997).

L'activité phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate phosphatase de la CdtB induit également l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, qui n'est pas associé à une phosphorylation de γ H2AX (Shenker *et al.*, 2007, 2015a). Les lymphocytes sont 5 fois plus sensibles à l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire que les cellules épithéliales, bien qu'ils ne soient pas distendus. Ce résultat suggère que la distension cellulaire observée n'est pas médiée par la préparation de la cellule pour la mitose (Shenker *et al.*, 1999).

La CDT a donc été définie comme une cyclomoduline capable de moduler le cycle cellulaire et d'inhiber la prolifération cellulaire (Aragon, Chao, et Dreyfus 1997).

IV.1.3 Remodelage du cytosquelette

Le cytosquelette d'actine définit le cadre structural de la cellule. Il est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques comme la division et la motilité cellulaire. L'actine et la tubuline, composants du cytosquelette forment des polymères dynamiques permettant l'organisation des composants intracellulaires (Hall, 1998). La polymérisation de la G-actine (monomérique) en F-actine permet la formation des fibres de stress qui ont un rôle dans l'adhésion et la migration cellulaire (Hall, 1998, 2009).

La CDT induit une distension cellulaire progressive caractérisée par un élargissement du cytoplasme et du noyau des cellules, avec la formation de fibres de stress d'actine, de 48 à 120 h après l'exposition à la toxine (Aragon *et al.*, 1997; Pickett *et al.*, 1996; Sugai *et al.*, 1998). Les cellules distendues sont plus plates, arrondies et ont des jonctions moins apparentes. La distension est progressive, jusqu'à 4 jours après l'infection, puis la taille des

cellules se stabilise. Le diamètre des cellules est environ 3 à 7 fois plus grand que les cellules témoins. La taille du noyau augmente en proportion (x2,5 environ) et quelques cellules apparaissent pluri-nucléées (7 à 20% des cellules) (Aragon *et al.*, 1997; Pérès *et al.*, 1997; Sugai *et al.*, 1998; Whitehouse *et al.*, 1998). Bien que la distension cellulaire soit un effet majeur de la CDT, les lymphocytes intoxiqués ont une taille réduite par l'effet de la toxine (Shenker *et al.*, 2001).

L'activation de la voie ATM par la CDT induit l'activation de la petite protéine GTPase RhoA qui provoque un réarrangement du cytosquelette (Frisan *et al.*, 2003), RhoA étant impliquée dans la formation de fibres de stress d'actine (Ridley and Hall, 1992). Les fibres de stress sont visibles dès 48 h après l'infection et leur nombre est maximal après 4 jours (Aragon *et al.*, 1997). Le réseau de microtubules est également désorganisé pour 28% des cellules (Whitehouse *et al.*, 1998).

La HpuLCDT induit également une distension cellulaire et nucléaire avec un remodelage du cytosquelette d'actine associé à la formation de gros lamellipodes en périphérie des cellules épithéliales intestinales sensibles (Caco-2, HCA7) (Varon *et al.*, 2014). Le lamellipode est une protrusion membranaire, constitué de polymères de F-actine, impliqué dans l'intégrité des jonctions et la migration cellulaire (Schnittler *et al.*, 2014). La lignée cellulaire épithéliale intestinale HT-29 est résistante à l'effet de la HpuLCDT. Néanmoins, le phénotype distendu est observé lors de la transduction de la HpuLCDtB directement dans les cellules par une stratégie lentivirale, suggérant que la résistance à la toxine pourrait être due à une absence de récepteur cellulaire (Varon *et al.*, 2014). La toxine induit également la relocalisation périnucléaire de la vinculine normalement présente dans les plaques focales d'adhérence (Varon *et al.*, 2014), essentielles à l'adhésion (Kim *et al.*, 2015). La HpuLCDT diminue l'adhérence cellulaire et augmente l'expression de la cortactine (Varon *et al.*, 2014); une protéine impliquée dans la formation de lamellipodes, la migration et l'invasion cellulaire (Kirkbride *et al.*, 2011).

IV.2 Une toxine pro-inflammatoire

Les études évaluant le potentiel inflammatoire de la CDT présentent des contradictions, en fonction des conditions expérimentales utilisées (temps d'exposition, dose de la toxine, temps avant l'observation des effets). De nombreuses études évaluent l'inflammation avec des

bactéries entières, contenant d'autres facteurs de virulence, tel que le LPS qui peut masquer l'effet de la toxine et dont l'effet toxique apparaît plus rapidement.

Ainsi, une souche de *C. jejuni* (NCTC 11168) sauvage ou mutante pour la CDT induit la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α et IL-8) après 4 h ou 24 h d'infection (Jones *et al.*, 2003). Les auteurs concluent que la CDT n'est pas impliquée dans cette induction. Néanmoins, le temps après l'infection n'est pas nécessairement suffisant pour observer les effets de la CDT qui, bien qu'apparaissant dès 4 h sont généralement optimaux 48 h après l'exposition. Ce résultat a été confirmé par d'autres études indiquant que la CDT n'est pas impliquée dans la biosynthèse de l'IL-1 β ou du TNF α (Belibasakis and Johansson, 2012; Belibasakis *et al.*, 2005) En revanche, de très fortes concentrations de HducCDT purifiée (1000 ng/ml) induisent une augmentation de la sécrétion d'IL-6 dans les fibroblastes gingivaux dès 24 h (Belibasakis *et al.*, 2005).

Une autre étude indique que la AactCDT induit la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (IL-1 β , IL-6, et IL-8) (Akifusa *et al.*, 2001). La ActCDT modulerait la réponse inflammatoire de l'hôte en inhibant la phagocytose des macrophages et en induisant la production de cytokines (IL-1 β , IL-12 et IL-10) (Ando-Sugimoto *et al.*, 2014). La CjejCDT est pro-inflammatoire et induit la production d'IL-8 par les cellules épithéliales (Hickey *et al.*, 2000). La sécrétion d'IL-8 induite par la CjejCDT est dépendante de l'activation du NF- κ B, mais également des récepteurs TLR (Zheng *et al.*, 2008). L'IL-8 est une cytokine chimiotactique permettant, en réponse à l'infection, le recrutement des neutrophiles et des lymphocytes T. Elle est régulée par divers stimuli tels que le TNF α , l'IL-1 et le NF- κ B (Kunsch and Rosen, 1993). La HducCDT induit une augmentation (par 2) de l'expression du gène et de la protéine RANKL, un activateur du récepteur du NF- κ B, après 24 h d'exposition (mais pas à 6 h) des cellules Jurkat (Belibasakis *et al.*, 2008).

La réponse inflammatoire induite par la CDT implique l'activation de l'inflammasome NLRP3. L'activation de l'inflammasome médiée par la CDT est sous la dépendance de la génération d'espèces réactives de l'oxygène et de l'augmentation des niveaux d'ATP extracellulaires (Shenker *et al.*, 2015b). L'activation de NLRP3 est dépendante de l'activation de la voie du NF- κ B et du niveau d'ATP (Bauernfeind *et al.*, 2009). L'activité PIP3 phosphatase de la CDT induit la production de cytokines (IL-1 β , TNF α et IL-6) (Shenker *et al.*, 2014).

La CDT a une activité pro-inflammatoire qui implique principalement la voie du NF- κ B (Belibasakis *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008). La famille du NF- κ B est composée de cinq sous-unités ; RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 et p52/p100. C'est un facteur de transcription qui, une fois activé par des signaux extracellulaires (stress, cytokines ou radiations), induit la transcription de gènes cibles impliqués dans la réponse inflammatoire (cytokines telles que IL-6, IL-8, TNF), l'apoptose ou la prolifération cellulaire (Prabhu *et al.*, 2014).

IV.3 Une toxine pro-apoptotique

L'apoptose est une mort cellulaire programmée, permettant d'éliminer individuellement des cellules sans induction d'une réponse inflammatoire (Weinrauch et Zychlinsky, 1999).

Elle est induite en réponse à des signaux extérieurs ou lors de l'impossibilité de réparer les dommages à l'ADN. L'apoptose peut être induite par le facteur de transcription suppresseur de tumeur p53 qui est actif sous forme phosphorylée (Yonish-Rouach *et al.*, 1991). La voie de dégradation des mitochondries est une autre voie conduisant à l'apoptose. Elle implique la libération du cytochrome C dans le cytoplasme, ce qui permet la formation d'un complexe pro-apoptotique, dégradé par les phagosomes. Dans ce dernier cas, l'induction d'apoptose est médiée par plusieurs effecteurs ; les caspases ainsi que des gènes pro-apoptotiques (Bax, BiK) ou anti-apoptotiques (Bcl-2) régulés par des phosphorylations post-traductionnelles. Les caspases ont deux fonctions distinctes ; les initiateurs de la cascade des caspases (caspase-2, caspase-8, caspase-9 et caspase-10) et les effecteurs responsables de la dégradation par clivage des substrats cellulaires, (caspase-3, caspase-6 et caspase-7). Les facteurs pro-apoptotiques (Bax) peuvent intervenir dans la mort cellulaire sans activation des caspases et sont impliqués dans la dégradation des mitochondries (Fink et Cookson, 2005).

Une majorité de cellules exposées à la CDT meurent par apoptose après une phase aigüe d'intoxication. La condensation nucléaire et la fragmentation d'ADN, induites par la CDT, sont des caractéristiques majeures de l'apoptose (Ohguchi *et al.*, 1998; Weinrauch et Zychlinsky, 1999). L'induction de l'apoptose par la CDT est dépendante de la dose de toxine, du temps d'incubation et du type cellulaire utilisé, en particulier de son statut p53. L'apoptose est observée dans les cellules primaires (prolifératives ou non), les fibroblastes, les cellules immortalisées endothéliales, hématopoïétiques et épithéliales (Smith et Bayles, 2006; Wising *et al.*, 2005). Ainsi, la HducCDT (100ng/ml) induit, après 48 h d'exposition, une apoptose et

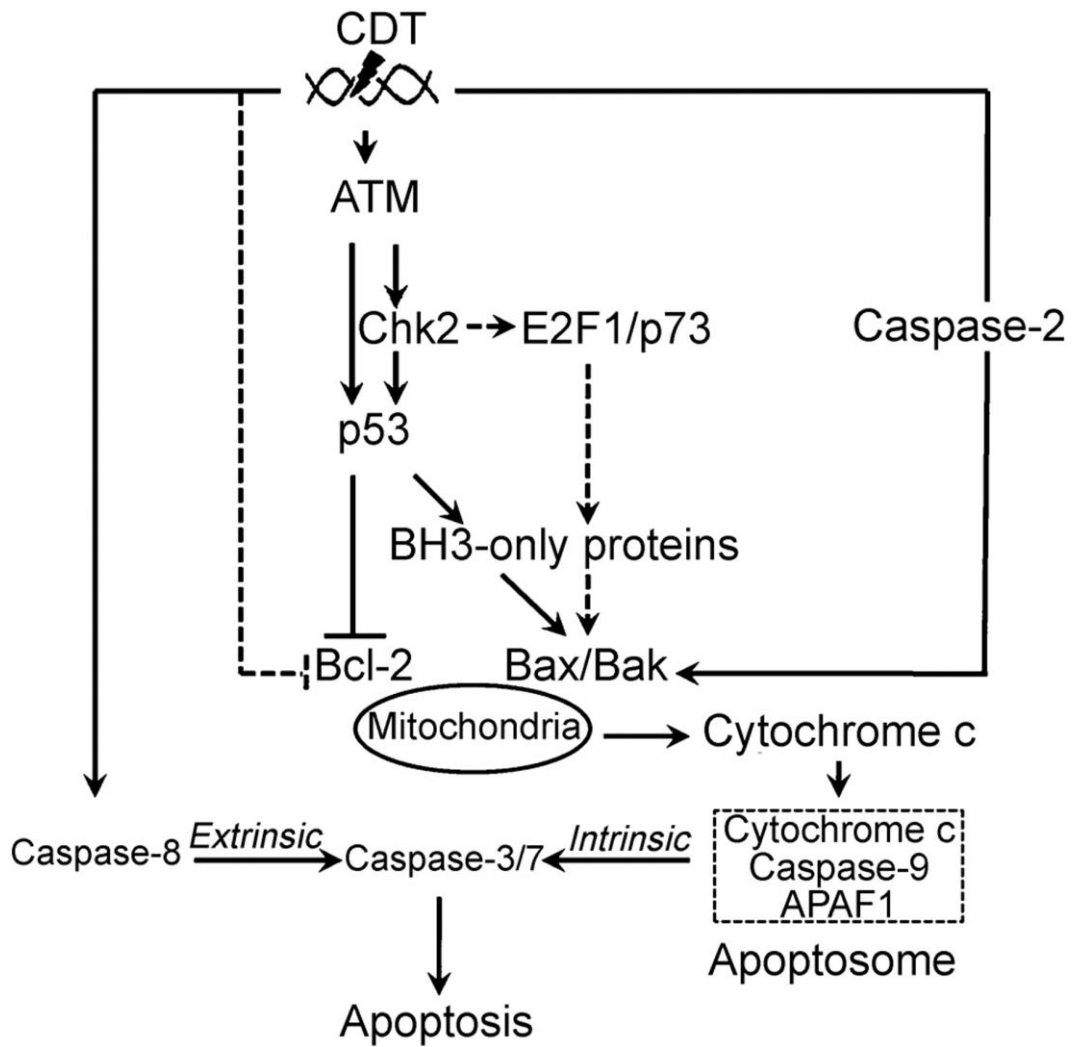


Figure 1. Effet pro-apoptotique de la CDT (Jinadasa *et al.*, 2011)

une nécrose dans 90% des cellules T et monocytes infectées alors qu'elle n'est que de 26-32% pour les cellules épithéliales, kératinocytes et fibroblastes (Wising *et al.*, 2005).

L'apoptose induite par la toxine est médiée principalement par la voie ATM. Le mécanisme peut-être dépendant ou indépendant de l'activation de p53 (Alaoui-El-Azher *et al.*, 2010; Cortes-Bratti *et al.*, 2001; Frisan *et al.*, 2003; Liyanage *et al.*, 2010; Ohara *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2002). Lors de l'apoptose médiée par la voie ATM, la CDT surexprime la protéine p53 phosphorylée (forme active) et l'inhibiteur de la cycline dépendant kinase, p21 (Yamamoto *et al.*, 2004). (Figure 10)

L'apoptose en réponse à la CDT peut également être médiée par la voie des mitochondries de façon dépendante ou indépendante de l'activation des caspases. Cette voie est généralement activée dans les types cellulaires mutés pour p53 (Liyanage *et al.*, 2010; Ohara *et al.*, 2008). La HhepCDT induit, dès 24 h d'exposition, une surexpression de la protéine pro-apoptotique Bax ainsi qu'une sous-expression de Bcl-2. Le cytochrome C est ainsi libéré des mitochondries, ce qui permet l'activation de l'apoptose. La toxine induit également une activation des caspases 3, 7 et 9 sans activation de la caspase 8. La surexpression de Bcl-2, dans ce modèle, permet de ralentir ou d'abolir l'effet pro-apoptotique de la CDT (Liyanage *et al.*, 2010). La AactCDT induit également une apoptose via la voie des mitochondries, par l'activation des caspases 2 et 7. L'inhibition de la voie des caspases réduit la capacité de la CDT à induire l'apoptose (Ohara *et al.*, 2004).

L'activité pro-apoptotique de la CDT contribue à la pathogénicité. L'apoptose induite par la CDT cible préférentiellement les cellules immunitaires (lymphocyte, cellules T) (Wising *et al.*, 2005a) permettant ainsi la persistance de l'infection induite par les bactéries pathogènes. En effet l'élimination des cellules immunitaires permet de diminuer ou d'éliminer la réponse inflammatoire de l'hôte contre l'agent pathogène (Weinrauch et Zychlinsky, 1999; Zychlinsky et Sansonetti, 1997).

L'apoptose n'atteint pas toutes les cellules intoxiquées. Il a été montré que des cellules normales et tumorales (BJ, fibroblastes IMR-90 et WI-38, HeLa, U2-OS) peuvent survivre à la phase aigüe de l'intoxication avec la HducCDT et possèdent des marqueurs de sénescence cellulaire (Blazkova *et al.*, 2010). La sénescence cellulaire peut être une sénescence « répllicative » en réponse au raccourcissement des télomères (Wright et Shay, 2001) lors du vieillissement de la cellule ou une sénescence « prématurée induite par le stress » en réponse à un stress cellulaire, comme les dommages à l'ADN (Di Leonardo *et al.*, 1994), ou à la

présence de l'oncogène Ras (Serrano *et al.*, 1997). Elle se caractérise par un arrêt du cycle cellulaire considéré irréversible, principalement en phase G1 (Di Leonardo *et al.*, 1994; Poêle *et al.*, 2002; Serrano *et al.*, 1997) mais également en phase S ou G2 (Poêle *et al.*, 2002). Les cellules sénescents ont une augmentation de l'activité β -galactosidase (Senescence-Associated β -galactosidase), ainsi qu'une surexpression des inhibiteurs du cycle cellulaire : p21^{Cip}, p53 et p16INK4a (Di Leonardo *et al.*, 1994; Serrano *et al.*, 1997). La sénescence induit une modification morphologique, caractérisée par un cytoplasme vacuolisé (Bischof et Martínez-Zamudio, 2015; Bischof *et al.*, 2009), un élargissement cellulaire avec une augmentation nucléaire (Chang *et al.*, 1999) et une condensation de la chromatine (Narita *et al.*, 2003). L'entrée des cellules en sénescence permet d'empêcher la prolifération cellulaire, *in vitro* (Braig et Schmitt, 2006) et *in vivo* (Prieur et Peeper, 2008), et donc une protection contre la carcinogénèse (Braig et Schmitt, 2006; Krtolica et Campisi, 2003; Prieur et Peeper, 2008). Néanmoins, les cellules sénescents conservent une activité métabolique et sont sécrétrices (Coppé *et al.*, 2010; Kuilman et Peeper, 2009), notamment de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8 et TGF- β), de métalloprotéinases, ainsi que de facteurs de croissance pouvant ainsi induire un environnement pro-inflammatoire et pro-carcinogène (Castro-Vega *et al.*, 2015a; Coppé *et al.*, 2010; Pazolli *et al.*, 2012). Cette activité sécrétrice permet de modifier l'architecture cellulaire et/ou de stimuler la prolifération des cellules voisines (Krtolica et Campisi, 2003).

Les cellules survivantes à l'intoxication par la CDT ont une activation du signal de dommages à l'ADN identifié par des foyers 53BP1/ γ H2AX positifs ainsi qu'une induction de l'activité β -galactosidase et de l'expression de plusieurs cytokines (en particuliers IL-6, IL-8 et IL-24). Ces caractéristiques témoignent de la réplication cellulaire ou d'une sénescence prématurée en réponse à la toxine (Blazkova *et al.*, 2010). L'IL-6 est impliquée dans l'inhibition de p53, facteur pro-apoptotique (Yonish-Rouach *et al.*, 1991). La CDT de *H. ducreyi* induit une sénescence, caractérisée par la présence de foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF) dans 40% des cellules après 12 jours ainsi qu'une augmentation de p16INK4a (Kosar *et al.*, 2011). En revanche, des cellules exposées à des doses sub-létales de CDT ne présentent pas d'altération du cycle cellulaire, de viabilité ou de sénescence jusqu'à 30 semaines après le début de l'étude (Guidi *et al.*, 2013b).

V. Implication dans les pathologies infectieuses

V.1 La parodontite

Aggregatibacter actinomycetemcomitans est un coccobacille, de coloration gram négative, producteur de CDT (Sugai *et al.*, 1998). Cette bactérie orale est également un pathogène opportuniste, responsable de la parodontite agressive localisée (Henderson *et al.*, 2002). Cette pathologie est caractérisée par une inflammation et une destruction rapide des tissus conjonctifs et osseux qui soutiennent les dents, pouvant conduire à la perte de celles-ci (Raja *et al.*, 2014). Ce pathogène est également impliqué dans des méningites, infections urinaires et endocardites (Henderson *et al.*, 2002; Raja *et al.*, 2014).

La AactCDT est présente chez 60 à 78% des isolats cliniques (Ahmed *et al.*, 2001; Fabris *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2014). Elle inhibe la prolifération des cellules du ligament parodontal et des fibroblastes gingivaux humains. Ces cellules sont impliquées dans le développement et la réparation du tissu conjonctif entourant les dents. La CDT pourrait donc contribuer à la maladie parodontale, par l'inhibition de la prolifération cellulaire, qui aurait permis de restaurer l'homéostasie des tissus (Belibasakis *et al.*, 2002).

L'activation du récepteur de NF- κ B (RANKL) par la AactCDT, observée *in vitro*, induit la différenciation des cellules précurseurs d'ostéoclastes mononucléées en ostéoclastes de résorption osseuse multi-nucléées (Belibasakis *et al.*, 2005). L'activation de RANKL dans le cadre de la parodontite agressive localisée induit la maturation des ostéoclastes qui est suivie par la perte de l'os (Belibasakis *et al.*, 2005).

La CDT induit l'apoptose des cellules de l'épithélium gingival, qui est une barrière défensive contre les pathogènes (Belibasakis *et al.*, 2002). Une exposition *ex vivo* à la toxine induit un détachement de la couche externe de kératine et une distension et perturbation des jonctions des cellules de l'épithélium buccal (Damek-Poprawa *et al.*, 2011). Lorsque l'épithélium est endommagé, les bactéries peuvent pénétrer dans le tissu conjonctif et le détruire (DiRienzo, 2014).

Ainsi, la CDT de *A. actinomycetemcomitans* pourrait être un facteur clé dans le développement de la parodontite agressive associée à ce pathogène. L'inhibition de la prolifération des cellules constituant les tissus et l'implication dans la réponse inflammatoire

permettrait la persistance de l'infection. Parallèlement, la production de cytokines pro-inflammatoires induites par la toxine (Akifusa *et al.*, 2001) pourrait contribuer à la pathologie inflammatoire caractéristique de la parodontite (Herbert *et al.*, 2015).

V.2 Le chancre mou

Haemophilus ducreyi est un bacille Gram négatif qui est responsable d'une infection sexuellement transmissible appelée chancre mou (ou chancrille ou chancre de Ducrey) (Hadley, 1979). La pathologie est caractérisée par la présence de petites papules molles, douloureuses qui évoluent en ulcère, plus ou moins profond, et purulent sur les organes génitaux externes (Cope *et al.*, 1997; Hadley, 1979) La CDT de *H. ducreyi* est produite par plus de 80% des isolats cliniques (Ahmed *et al.*, 2001). La toxine provoque, *in vitro*, l'apoptose/nécrose des cellules immunitaires préférentiellement (95%) contre seulement 30% des cellules épithéliales, suggérant un rôle de la toxine dans la modulation de la réponse inflammatoire (Wising *et al.*, 2005a). Une faible quantité de HducCDT (122 ng/ml) peut détruire les kératinocytes et autres cellules épithéliales. Les débris en résultant peuvent être utilisés comme substrat nutritif pour la bactérie (Cortes-Bratti *et al.*, 1999). L'inhibition de la prolifération cellulaire (Svensson *et al.*, 2002; Wising *et al.*, 2005a) pourrait expliquer le retard de cicatrisation observé dans cette pathologie, qui peut persister plusieurs mois (Hadley, 1979).

Une étude a évalué l'implication de la CDT de *H. ducreyi* dans la formation des papules chez l'homme. L'injection de bactéries sauvages ou mutées pour la CDT (30 à 120 UFC : Unité Formant Colonie) n'a pas montré de différence pour l'induction des papules, indiquant que la toxine ne serait pas impliquée dans ce phénotype (Young *et al.*, 2001). Une inoculation intra-dermale de *H. ducreyi* sauvage ou muté pour la CDT a été réalisée chez le lapin avec une quantité plus importante (10^7 UFC) que dans l'étude chez l'homme. Les souches sauvages ont induit une réponse inflammatoire, 4 à 5 jours après l'injection, caractérisée par un érythème et un œdème. La clairance de l'infection a été observée entre 24 et 26 jours, quelque soit la souche bactérienne utilisée (sauvage ou mutée). Les auteurs ont donc conclu que la CDT de *H. ducreyi* n'était pas impliquée dans la persistance de l'infection. En revanche, les bactéries produisant la toxine ont provoqué des lésions de plus grande taille, ainsi que la formation d'ulcères après 4 à 5 jours d'inoculation évoluant en escarres après 11 à

12 jours (Wising *et al.*, 2005b). La CDT de *H. ducreyi* contribue à la sévérité de la pathologie en induisant le développement des ulcères (Wising *et al.*, 2005b), de manière dose dépendante (Wising *et al.*, 2005b; Young *et al.*, 2001), probablement par sa fonction anti-proliférative (Svensson *et al.*, 2002; Wising *et al.*, 2005a).

V.3 Pathologies intestinales et hépatiques

La CDT est produite par de nombreuses bactéries (*E. coli*, Shigelles, Campylobacters, HEH) associées à des maladies intestinales (gastro-entérites, MICI), des voies biliaires (cholécystite) et hépatiques (hépatites, carcinome hépatocellulaire) chez l'Homme et les animaux (Jinadasa *et al.*, 2011).

Des souches de *E. coli* productrices de CDT ou leur surnageant bactérien, injecté dans l'iléon de lapin sont capables d'induire une réponse inflammatoire avec la présence d'infiltrats inflammatoires et la prolifération de l'épithélium (Bouzari *et al.*, 1992; Johnson and Lior, 1988a). Ces souches induisent également la production de selles molles et/ou liquides après 24 h d'infection des souris (Okuda *et al.*, 1997). Dans ce modèle, l'infection des souris avec la CDT de *E. coli* purifiée, induit une diarrhée abondante dès 12 h après l'inoculation ou 24 h après en fonction de la dose administrée (respectivement $8,4 \times 10^5$ et 1×10^4 UFC/ml). La toxine contribue à la sévérité de la pathologie en induisant une nécrose et une hyperplasie du côlon (Okuda *et al.*, 1997).

La HhepCDT est responsable du développement d'une typhlocolite 8 jours après l'infection de souris C57BL/6 IL10^{-/-}. Après 8 mois d'infection, les souris développent une inflammation (modérée à sévère) et une hyperplasie, avec une typhlocolite chronique (modérée à sévère). Les muqueuses des animaux ont des marqueurs d'hyperplasie avec une infiltration de cellules mononucléaires inflammatoires. Les souris infectées avec une souche de *H. hepaticus* déficiente pour la CDT ont éliminé l'infection entre 61 et 115 jours après inoculation. Elles développent une maladie minimale à 8 mois et peu d'inflammation. L'infection avec la HhepCDT induit une réponse de type Th2 (IgG1) (Pratt *et al.*, 2006). Une étude similaire indique que la HhepCDT, dans un modèle de typhlocolite (C57BL/6 IL10^{-/-}), induit une hyperplasie sévère des muqueuses avec une inflammation du tissu conjonctif situé sous l'épithélium, la lamina propria. Les souches de *H. hepaticus* déficientes pour la CDT induisent une pathologie moins sévère sans inflammation de la sous muqueuse (Young *et al.*, 2004).

La HhepCdtB joue un rôle majeur dans le développement de la carcinogenèse hépatique chez la souris immunocompétente en induisant le développement de nodules dysplasiques (Ge *et al.*, 2007). Elle promeut l'évolution de l'hépatite induite par *H. hepaticus* en hépatocarcinome. Après 4 mois d'infection, les souris infectées avec la souche sauvage de *H. hepaticus*, produisant la CDT, ont une surexpression de gènes pro-inflammatoires (TNF α , IFN γ et Cox-2), de facteurs de croissance (IL-6 et TGF α), de gènes anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-X) et une prolifération des hépatocytes comparée aux souris témoins ou infectées avec le mutant pour la CDT. De plus, les souris ont une activation de la voie du NF- κ B, avec une surexpression de RelA (p65), p50, GADD45 β et c-IAP1. Après 10 mois, la voie du NF- κ B reste active, avec la surexpression de cytokines pro-inflammatoires notamment IL-6 (Ge *et al.* 2007).

Les gènes codant pour la CjejCDT sont retrouvés dans 88 à 97% des isolats (Bang *et al.*, 2004). Dans un modèle de colite et d'infection chronique (NF- κ B p50^{-/-} p65^{+/-}), la CjejCDT est responsable du développement d'une gastroentérite chronique active, d'une hyperplasie gastrique, d'une légère dysplasie gastrique et d'une hépatite modérée. La CDT induit également une réponse inflammatoire (Fox *et al.*, 2004b). Les souris infectées avec la souche sauvage ont plus d'apoptose (caspase 3 et 7 activées) que les souris infectées avec le mutant CDT (McAuley *et al.*, 2007). Dans un modèle de syndrome du côlon irritable post infectieux, la CjejCDT est impliquée dans l'altération des selles et provoque une inflammation rectale chronique légère (Pokkunuri *et al.*, 2012).

La CjejCDT et HhepCDT ne sont pas impliquées dans la colonisation bactérienne (Fox *et al.*, 2004b; McAuley *et al.*, 2007; Pokkunuri *et al.*, 2012; Pratt *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2004). Seule une étude indique que la HhepCDT serait importante pour la colonisation de *H. hepaticus* chez des souris immunocompétentes Swiss Webster (Ge *et al.*, 2005). Dans un modèle immunodéficient (C.B-17 SCID-Beige mice, déficient pour les lymphocytes T et B matures), il a été montré que la CjejCDT était impliquée dans la capacité de *C. jejuni* à envahir et coloniser les tissus et le sang (Purdy *et al.*, 2000). Les CjejCDT et HhepCDT sont nécessaires pour la persistance de l'infection bactérienne, elles sont responsables d'une réponse inflammatoire à l'origine de la modulation du système immunitaire de l'hôte, en induisant une réponse de type Th2 en plus de la réponse Th1 induite par la bactérie (Fox *et al.*, 2004b; Pratt *et al.*, 2006).

La CDT des entérobactéries permet l'invasion et la persistance bactérienne (Fox *et al.*, 2004b; Pratt *et al.*, 2006; Purdy *et al.*, 2000). Elle est associée à l'inflammation (Ge *et al.*, 2007), inféodée aux pathologies digestives, et joue un rôle majeur dans la sévérité de la pathologie observée. Elle est pro-inflammatoire et immuno-modulatrice. Enfin, elle est impliquée dans le développement de malignité chez des souris immunocompétentes (Ge *et al.*, 2007) ou immunodéficientes (Fox *et al.*, 2004b; Pratt *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2004).

VI. CDT et potentiel oncogénique

Actuellement, la CDT n'est pas reconnue comme une oncoprotéine, néanmoins plusieurs facteurs témoignent de son potentiel oncogénique.

L'inflammation chronique est un facteur de risque dans l'apparition de cancer (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2009). La CDT est pro-inflammatoire et permet de contribuer aux symptômes dans les pathologies intestinales, hépatiques, génitales et la parodontite, permettant la persistance de l'infection (Guerra *et al.*, 2011a). Elle activerait la voie du NF- κ B (Belibasakis *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2007) qui joue un rôle important dans la prolifération cellulaire, la régulation de l'apoptose et l'invasion/métastase des cellules cancéreuses. La voie du NF- κ B est activée dans 95% des cas de cancer (Prabhu *et al.*, 2014).

En réponse à la toxine, les cellules intoxiquées entrent en apoptose (Shenker *et al.*, 2001; Wising *et al.*, 2005a) ou en sénescence (Blazkova *et al.*, 2010), deux mécanismes anti-cancer (Negrini *et al.*, 2010). Néanmoins, des cellules non apoptiques et non sénescents peuvent persister; elles présentent des aberrations chromosomiques et des mutations (transitions, transversion et délétions) dans le génome (Guidi *et al.*, 2013b). La toxine induit des cassures dans l'ADN génomique (Fedor *et al.*, 2013; Lara-Tejero and Galán, 2000) qui peuvent conduire à une instabilité génomique, mécanisme fortement impliqué dans la carcinogenèse (Smith *et al.*, 2010).

La toxine est également responsable d'un remodelage du cytosquelette d'actine avec la formation de fibres de stress d'actine (Frisan *et al.*, 2003), la formation de gros lamellipodes et la réorganisation de protéines, cortactine et vinculine (Varon *et al.*, 2014), impliquées dans la migration et l'invasion cellulaire (Goldmann *et al.*, 2013; Kirkbride *et al.*, 2011), deux phénotypes associés aux cancers (Negrini *et al.*, 2010). Ces phénotypes sont associés à une

baisse de l'adhérence cellulaire (Varon *et al.*, 2014). Enfin, la CDT est directement associée au développement de l'hépatocarcinome chez la souris (Ge *et al.*, 2007) et à l'évolution maligne dans le cadre de maladies inflammatoires de l'intestin (Fox *et al.*, 2004b; Pratt *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2004).

De nouvelles investigations devraient permettre de préciser son potentiel oncogénique et son rôle dans les maladies humaines et notamment dans le développement des cancers digestifs (côlon, foie et voies biliaires).

Chapitre III - Toxines bactériennes, inflammation chronique et carcinogénèse digestive

L'implication des infections chroniques dans la carcinogénèse est bien établie (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2009), un des exemples étant l'infection à *H. pylori*, bactérie classée carcinogène de classe I par le Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC, 1994; IARC, 2012). Actuellement, il existe deux types de toxines, les toxines affectant la signalisation cellulaire et les toxines causants des dommages à l'ADN. A ce jour, 3 génotoxines bactériennes ont été décrites : la CDT (Johnson and Lior, 1988a), la toxine typhoïde (Haghjoo and Galán, 2004) et la colibactine (Nougayrède *et al.*, 2006). Le mécanisme d'action de la colibactine et de la toxine typhoïde ressemble à celui de la CDT, permettant de fournir des arguments supplémentaires pour le potentiel oncogénique de la CDT.

I. Toxines bactériennes affectant la signalisation cellulaire

Le meilleur exemple de l'association d'une inflammation bactérienne chronique et de l'apparition de cancer est l'infection à *H. pylori*. Cet Hélicobacter est impliqué dans le développement de 90% des cancers gastriques (Malfertheiner *et al.*, 2006; Mégraud *et al.*, 2015). Il possède un îlot de pathogénicité Cag, codant pour un système de sécrétion de type 4 (Al-Ghoul *et al.*, 2004) et CagA, pour « Cytotoxin-associated gene A », la première oncoprotéine bactérienne décrite (Censini *et al.*, 1996). L'infection à *H. pylori* active la voie de la β -caténine, induit une réponse inflammatoire, modifie la structure du cytosquelette et perturbe les jonctions cellulaires (Polk and Peek, 2010). L'infection augmente par 4 le risque de mutation et d'instabilité génomique dans l'épithélium gastrique des souris 6 mois après infection (Touati *et al.* 2003). L'oncoprotéine CagA, après son internalisation cellulaire, peut être phosphorylée sur les motifs EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) (Tammer *et al.*, 2007). L'interaction avec les Src kinases permet la phosphorylation et induit des réarrangements du cytosquelette d'actine, la dispersion et l'élongation des cellules infectées (Backert *et al.*, 2010). Cette modification morphologique est appelée phénotype « colibri » (« hummingbird ») (Segal *et al.*, 1999). Sous sa forme non phosphorylée, CagA active la voie du NF- κ B (Rieder *et al.*, 2005) et interagit avec la E-cadhérine, perturbant ainsi les jonctions

cellulaires (Murata-Kamiya *et al.*, 2007). Elle induit également un phénotype invasif (Bagnoli *et al.*, 2005). La toxine induit également la surexpression de spermine oxidase (SMO), qui produit des dérivés réactifs de l'oxygène, induisant ainsi des dommages à l'ADN (Chaturvedi *et al.*, 2012). La toxine stimule la prolifération cellulaire en interagissant avec la voie PI3-kinase (Nagy *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2009), la voie MEK-ERK (Higashi *et al.*, 2002; Keates *et al.*, 1999) et la voie β -caténine-Wnt (Franco *et al.*, 2005; Murata-Kamiya *et al.*, 2007; Neal *et al.*, 2013). CagA réduit l'apoptose en interagissant avec les suppresseurs de tumeurs p53 (Buti *et al.*, 2011) et RUNX (Tsang *et al.*, 2010). Enfin, la toxine promeut le développement de cancer, *in vivo*, chez des souris transgéniques (Ohnishi *et al.*, 2008) ou chez le poisson zèbre (Neal *et al.*, 2013).

D'autres bactéries et leurs toxines ont montré un potentiel carcinogène, en interagissant comme CagA, avec des voies de signalisation cellulaire.

Le CNF1 (Cytotoxic Necrotizing Factor 1) est une cyclomoduline produite par des souches de *E. coli* pathogènes principalement extra-digestives (Boquet, 2001). Il bloque le cycle cellulaire en G2/M et active les Rho GTPases, ce qui réorganise le cytosquelette d'actine et induit une forte activité de replis des membranes. Le CNF1 provoque une instabilité génomique. Ce facteur affecte plusieurs voies de signalisation impliquées dans la carcinogénèse (Fabbri *et al.*, 2013). Il participe à la dérégulation des jonctions cellulaires, induisant la migration cellulaire (Doye *et al.*, 2002). Le CNF protège les cellules épithéliales contre l'apoptose en surexprimant les membres de la famille anti-apoptotique Bcl-2 (Fiorentini *et al.*, 1998) et en activant la voie pro-inflammatoire Rac1/Akt/NF- κ B (Miraglia *et al.*, 2007).

La toxine BFT (*Bacteroides fragilis* toxin) est produite par les *Bacteroides fragilis* entéro-toxigéniques (Toprak *et al.*, 2006). Elle induit, *in vitro*, une activation de la voie Wnt et du NF- κ B, une augmentation de la prolifération cellulaire, de la sécrétion de molécules pro-inflammatoires, ainsi que des dommages à l'ADN (Sears, 2009). Elle clive la E-cadhérine, perturbant ainsi les jonctions cellulaires (Hwang *et al.*, 2013). Dans un modèle de souris Min (Multiple intestinal neoplasia), la toxine est à l'origine du développement d'une colite. Elle active Stat3, induit une réponse de type Th17 et est responsable de la formation de tumeurs du côlon (Wu *et al.*, 2009). La prévalence de cette toxine est plus importante chez les patients atteints de cancer colorectal (38%) par rapport aux sujets sains (12%) (Toprak *et al.*, 2006).

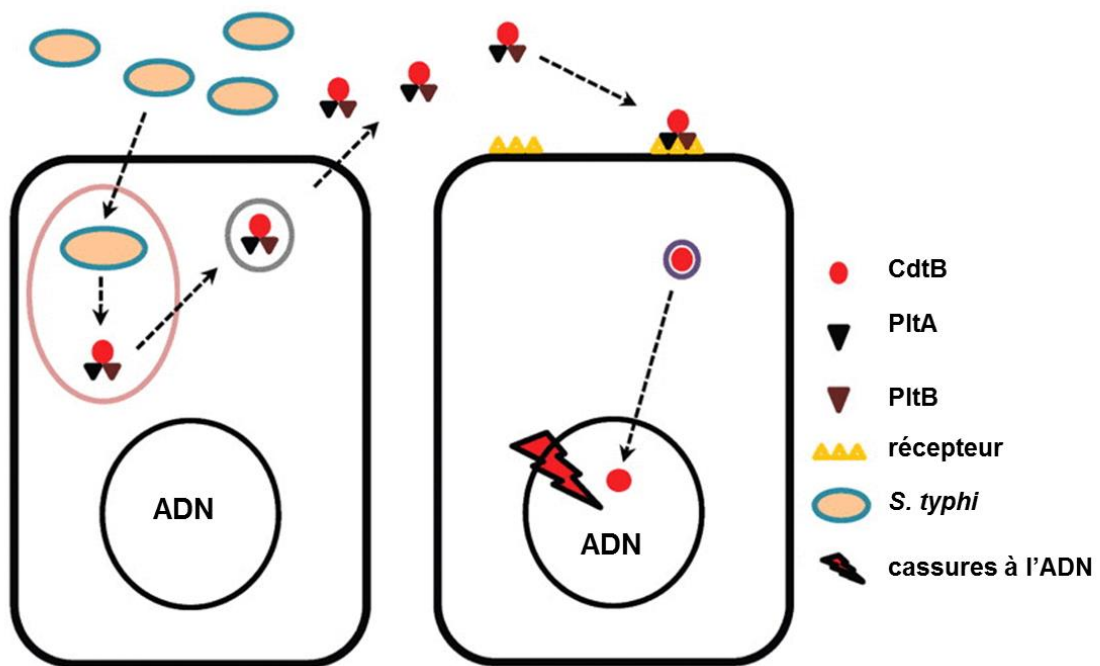


Figure 11. Mécanisme d'action de la toxine typhoïde.

Salmonella enterica serovar *typhi* (*S. typhi*) est internalisée dans des vacuoles à l'intérieur de la cellule. L'internalisation dans les vacuoles est suivie de l'expression des 3 sous-unités de la toxine (CdtB, PltA et PltB), puis de leur sécrétion et de leur assemblage en une holotoxine fonctionnelle. La toxine est ensuite transportée dans des vésicules de transport qui permettent sa sécrétion extracellulaire. La protéine PltB se lie ensuite aux récepteurs de cellules déjà infectées (voie autocrine) ou aux cellules voisines non infectées (voie paracrine). La sous-unité active est internalisée puis transloquée au noyau ou elle induit des dommages à l'ADN. Adaptée de (Jinadasa et al., 2011)

Ces exemples témoignent que l'interaction des toxines avec les voies de signalisation cellulaire permet d'induire une inflammation (Miraglia *et al.*, 2007; Rieder *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2009), une instabilité génomique (Chaturvedi *et al.*, 2012; Fabbri *et al.*, 2013) et la prolifération cellulaire (Buti *et al.*, 2011; Sears, 2009), phénotypes majeurs de la carcinogénèse.

II. La Toxine Typhoïde

II.1 Généralités

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. typhi*) est une entérobactérie qui induit une maladie systémique, la fièvre typhoïde, causant plus de 200 000 décès annuels (Parry *et al.*, 2002). Ce sérotype de *Salmonella enterica* est différent des autres qui causent principalement une gastro-entérite (Butler, 2011).

S. typhi code pour la sous-unité CdtB, localisée sur le chromosome, entourée de séquences d'insertion et d'un gène codant pour une transposase, mais pas pour les gènes CdtA et CdtC (Haghjoo et Galán, 2004). La CdtB de *S. Typhi* est retrouvée sur un îlot de pathogénicité en amont des gènes *pltA* et *pltB*, codant pour une pertussis-like toxin A et B (Spanò *et al.*, 2008). L'hétéro-trimère CdtB, PltA et PltB forme une toxine de type A₂B₅ où la CdtB et PltA constituent la sous-unité active, tandis que 5 monomères de PltB constituent la sous-unité de liaison, B. Cette holotoxine, appelée Toxine typhoïde, a une activité nucléase et ADP ribosyltransférase. (Song *et al.*, 2010, 2013; Spanò *et al.*, 2008)

Les cellules hôtes internalisent *S. Typhi* dans des vacuoles (Figure 11) permettant l'assemblage de la CdtB, PltA et PltB en une toxine typhoïde fonctionnelle. La toxine est sécrétée en dehors de la vacuole dans des « vecteurs » de transport. Le complexe est excrété en dehors de la cellule permettant une ré-infection des cellules contenant déjà la bactérie ou des cellules non infectées suivant, respectivement, un mode autocrine et paracrine. L'internalisation de l'hétérodimère CdtB-PltA est suivie de sa translocation nucléaire induisant des dommages à l'ADN. (Guidi *et al.*, 2013c; Spanò *et al.*, 2008) La CdtB est indispensable à l'activité de la toxine, tandis que l'activité PltA semble accessoire (Song *et al.*, 2013). Une autre Salmonelle, *Salmonella enterica* serovar *Javiana* a le même mécanisme d'action (Mezal *et al.*, 2014). La toxine Typhoïde est également retrouvée chez 11 sérotypes

de Salmonelles non Typhi et principalement *S. enterica* subspecies *enterica* clade B, *S. enterica* subspecies *enterica* serovar Inverness ou encore *S. enterica* subspecies *arizonae* (Rodriguez-Rivera *et al.*, 2015).

II.2 Effets pathogènes

La CdtB de *S. Typhi* induit des dommages à l'ADN, une fragmentation de la chromatine et un arrêt du cycle cellulaire, comme pour la CDT des autres bactéries (Haghjoo and Galán, 2004; Lara-Tejero and Galán, 2000). La toxine affecte un grand nombre de type cellulaires ; des cellules immunitaires (Raw, Jurkat, Ramos) et épithéliales (CHO, MDCK, NIH3T3 et COS1). L'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M est observé en 24 h avec les cellules immunitaires et en 48 h pour les cellules épithéliales (Song *et al.*, 2013).

L'administration de la toxine purifiée chez des souris induit les symptômes décrits lors de la phase aigüe de la fièvre typhoïde, diminution du nombre de cellules de la réponse inflammatoire (lymphocytes, monocytes, neutrophiles), perte de poids et éventuellement décès des souris 5 jours après l'infection. Les souris infectées, bien que ne présentant pas d'augmentation de la température, apparaissent léthargiques. Un mutant pour l'activité PltA n'empêche pas le développement des symptômes, tandis que le mutant CdtB n'induit pas la pathologie attendue. La sous-unité CdtB contribue donc à la pathologie observée lors de la fièvre typhoïde (Song *et al.*, 2013).

Les porteurs de typhoïde chronique, n'ayant pas eu de phase aigüe d'intoxication, ont une prévalence du cancer des voies biliaires augmentée (95% de risque) (Axelrod *et al.*, 1971) mais également du cancer du pancréas (8%) et du côlon (3%) (Caygill *et al.*, 1994; Vogelmann and Amieva, 2007). L'augmentation du risque de développer un cancer des voies biliaires est variable, elle est de 7 à 12 fois plus élevée que les sujets non porteurs (Caygill *et al.*, 1994; Strom *et al.*, 1995). Dans les cas de portage chronique, la bactérie serait localisée dans le foie et excrétée de manière intermittente dans les voies biliaires (Nath *et al.*, 2010).

Similairement à la phase aigüe d'intoxication où la CdtB semble responsable des symptômes de la maladie, la toxine typhoïde pourrait être un facteur de virulence majeur du développement du carcinome des voies biliaires chez les porteurs de typhoïde chronique. Cette hypothèse pourrait également être suggérée pour les CDT de *H. hepaticus* et

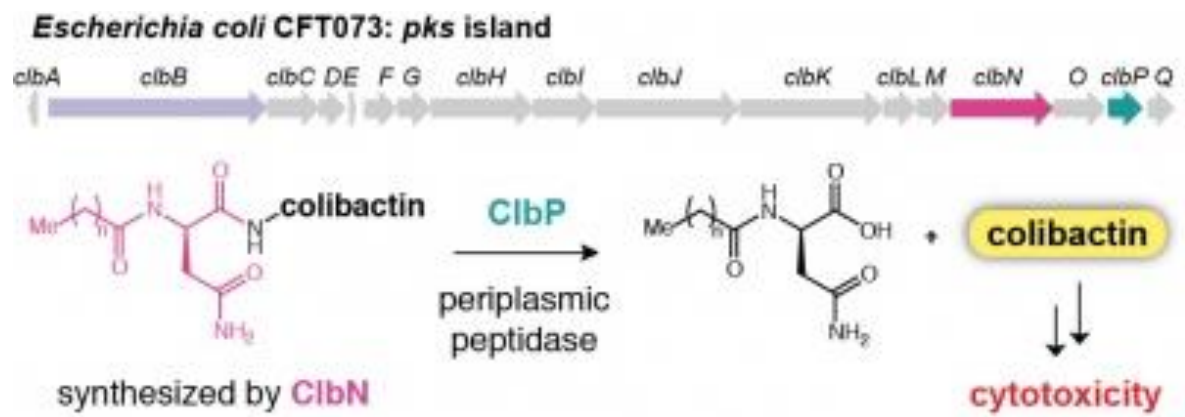


Figure 12. Structure et synthèse de la Colibactine (Brotherton and Balskus, 2013).

H. pullorum dans les pathologies des voies biliaires (Fox *et al.*, 1998; Hamada *et al.*, 2009; Karagin *et al.*, 2010).

III. La Colibactine

III.1 Généralités

La colibactine est une toxine qui a été plus récemment identifiée chez les *E. coli* porteurs de l'îlot génomique appelé *pks* (Nougayrède *et al.*, 2006). Elle est produite par cet îlot de pathogénicité *pks* (*polyketide megasynthase*) de 54 kb contenant 23 gènes putatifs, parmi lesquels 16 sont indispensables à la production de la toxine. Cet îlot code pour des peptides mégasynthase non ribosomiaux (NRPS), des polyketides mégasynthase (PKS), des hybrides mégasynthase NRPS/PKS et 9 enzymes accessoires. L'ensemble de ces gènes permet la synthèse d'un hybride peptide-polyketide appelé colibactine (Figure 12). Les NRPS ClbA, ClbN et ClbB permettent la synthèse et l'assemblage de la pré-colibactine. Le gène *clbP* code pour une d-amino-peptidase nécessaire au clivage et à la maturation de la colibactine. (Dubois *et al.*, 2011; Nougayrède *et al.*, 2006). L'îlot *pks* est également impliqué dans la synthèse de sidérophores avec ClbA, ayant un rôle dans l'acquisition du fer et la capacité des bactéries à survivre dans le sang (Brotherton et Balskus, 2013).

La colibactine, est produite par des souches d'*E. coli* appartenant majoritairement au groupe B2 (Nougayrède *et al.*, 2006) regroupant des souches commensales de l'intestin et des souches extra-intestinales pathogènes (ExPEC), impliquées dans des infections urinaires, méningites et septicémies (Russo et Johnson, 2003). Elle n'est pas produite par la souche de laboratoire K-12, ou par des souches intestinales pathogènes (entéro-invasive, entéro-pathogènes, entéro-hémorragique, entéro-toxigénique et entéro-agrégative). L'îlot *pks* est retrouvé chez 44% des *E. coli* du groupe B2, il est majoritaire pour les isolats des ExPEC (53 à 58%) par rapport aux isolats commensaux (32 à 34%) (Johnson *et al.*, 2008; Nougayrède *et al.*, 2006). Il est également présent chez les isolats hyper-virulents de *Klebsiella pneumoniae* (hvKP) responsables d'abcès du foie pyogènes et d'infections nosocomiales (Conlan *et al.*, 2014; Struve *et al.*, 2015).

La prévalence des souches d'*E. coli* productrices de colibactine est plus importante chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (40%) et de cancer colorectal (66%) comparée aux sujets sains (20%) (Arthur *et al.*, 2012).

L'îlot génomique a été également identifié chez la souche *E. coli* Nissle 1917, (Nougayrède *et al.*, 2006). Cette souche est utilisée comme traitement probiotique pour des troubles intestinaux comme la colite ulcéraire (Rembacken *et al.*, 1999) et la maladie de Crohn (Malchow, 1997). Des gènes codant pour la colibactine ont également été retrouvés chez un autre probiotique, la souche *E. coli* M-17 (Bondarenko et Fialkina, 2012), utilisé chez des patients atteints de colite chronique en Russie sous le nom commercial Bificol (Vil'shanskaia *et al.*, 1977).

L'effet cyto-pathogène de la colibactine est dépendant du contact de la bactérie vivante avec la cellule hôte, sans que l'internalisation bactérienne soit nécessaire. Les bactéries inactivées par lyse, chaleur ou traitement antibiotique (gentamicine) n'induisent pas de pathogénicité (Nougayrède *et al.*, 2006).

III.2 Effets cyto-pathogènes *in vitro*

La colibactine induit une distension cellulaire et nucléaire progressive de 6 h à 72 h après l'exposition de différents types cellulaires (HeLa, CHO, A375, IEC-6 et lymphocytes). Les cellules intoxiquées sont bloquées pour la transition en G2/M. La colibactine active la voie ATM, provoquant l'activation de Chk2. Ce point de contrôle permet la phosphorylation de CDC25C et son accumulation dans le cytoplasme sous forme inactive. L'inactivation de CDC25C induit l'inactivation de Cdk1, ce qui provoque l'arrêt des cellules en phase G2. Des cellules synchronisées en phase G1/S et incubées avec la colibactine s'accumulent en phase S pendant 48 h, puis sont bloquées en G2, tandis que les cellules non exposées à la toxine transitent en phase S pendant 12 h environ avant de poursuivre leur cycle normalement. (Nougayrède *et al.*, 2006)

Les cellules exposées à la toxine (pendant 4 h) présentent une phosphorylation nucléaire de γ H2AX 4 heures après l'infection, témoignant de dommages à l'ADN. Cette phosphorylation est dose-dépendante et atteint une saturation pour une multiplicité d'infection (MOI) de 100. De manière intéressante, après 24 h d'exposition à des faibles doses de toxine

(MOI 20), quelques cellules montrent un bruit de fond pour l'expression de γ H2AX, suggérant des dommages modérés à l'ADN et leur réparation. (Marcq *et al.*, 2014; Nougayrède *et al.*, 2006) La colibactine induit également une réticulation de l'ADN (Vizcaino et Crawford, 2015).

Une exposition unique, courte (4 h) et à faibles doses (MOI 5 ou 20) d'*E. coli* productrice de *pks* dans des cellules épithéliales est suffisante pour induire une réponse transitoire des dommages à l'ADN. Cette exposition brève n'induit pas d'arrêt du cycle cellulaire. Les cellules poursuivent leur division avec des signes de réparation incomplète de l'ADN, tels que des ponts anaphasiques, des micronoyaux, une aneuploïdie (gain ou perte de chromosomes) et des aberrations chromosomiques. Ces effets perdurent jusqu'à 21 jours après infection témoignant de l'instabilité génomique. Les cellules exposées présentent également une augmentation significative de la fréquence des gènes mutés (Cuevas-Ramos *et al.*, 2010).

Les cellules qui survivent à l'intoxication chronique avec des souches d'*E. coli pks* + montrent des signes de sénescence comme des cassures d'ADN double brin, un arrêt du cycle cellulaire prolongé, l'expression de l'activité β -galactosidase (SA- β -Gal), une augmentation de p53 sous forme phosphorylé et de p21, ainsi que des foci d'hétérochromatine associés à la sénescence. Ces marqueurs sont également accompagnés de la production dérivés réactifs de l'oxygène, de la production de cytokine et chemokines pro-inflammatoires (IL6, MMP-3). La sénescence induite par la colibactine est « transmissible » aux cellules voisines, par une voie paracrine (Secher *et al.*, 2013). Les cellules infectées avec la toxine (MOI 60) qui sont en sénescence peuvent induire la prolifération de cellules tumorales humaines non infectées. En revanche, une infection avec une MOI plus élevée ne promeut plus la croissance tumorale (Cougoux *et al.*, 2014; Secher *et al.*, 2013).

III.3 Effets dans les pathologies

L'identification de l'îlot *pks* chez des souches commensales et pathogènes, suggère plusieurs hypothèses quant à son implication dans les pathologies. La quantité de génotoxine produite par les bactéries, ainsi que l'emplacement et la durée de l'infection pourraient avoir un impact dans la pathogénicité.

La toxine est capable d'induire, *in vivo*, des dommages à l'ADN. En effet, des entérocytes de souris infectées présentent une phosphorylation de γ H2AX (Cuevas-Ramos *et al.*, 2010).

L'utilisation d'un modèle de souris déficientes pour l'IL-10 a permis de montrer que la colibactine, couplée à la réponse inflammatoire de l'hôte, permet d'induire un micro-environnement promouvant les dommages à l'ADN et la tumorigenèse. La présence de l'îlot *pks* accélère la progression de la dysplasie vers un carcinome invasif, à condition que l'environnement soit pro-inflammatoire (Arthur *et al.*, 2012).

Dans un modèle murin de septicémie, les souches de *E. coli* productrices de colibactine provoquent une lymphopénie et diminuent les chances de survie des souris (Marcq *et al.*, 2014). La colibactine est nécessaire pour la virulence des ExPEC (Martin *et al.*, 2013; McCarthy *et al.*, 2015), mais également pour la survie de la bactérie *in vivo* (McCarthy *et al.*, 2015).

La présence de l'îlot *pks* permet une persistance à long terme des *E. coli* du groupe B2 dans le tractus gastro-intestinal des nourrissons. La persistance à long terme pourrait être induite par l'induction de mutations génomiques dans l'intestin de l'hôte (Nowrouzian and Oswald, 2012). Le bénéfice de la colibactine pour la persistance de l'infection a également été observé dans un modèle de rats nouveaux nés. (McCarthy *et al.*, 2015)

La stimulation de la croissance tumorale observée *in vitro* a été reproduite *in vivo*. Dans un modèle de xénogreffes de cellules épithéliales, la colibactine (exposition transitoire de 3 h) induit la croissance tumorale, en association avec la surexpression du miR-20a-5p, de p53 phosphorylé et du HGF (facteur de croissance des hépatocytes) ainsi que la diminution de SENP1. *In vitro*, la colibactine diminue la prolifération cellulaire (environ moins 20 %), probablement en raison de l'arrêt du cycle cellulaire, suggérant un effet indirect de la bactérie sur la croissance tumorale. La colibactine active c-Myc, 3 jours après l'infection des cellules. L'activation de c-Myc permet, 48 h après, la surexpression de miR-20a-5p, inhibant SENP1, une protéine régulant la désSUMOylation de p53. Les cellules intoxiquées entrent donc en sénescence. Les cellules sénescents vont sécréter un facteur de croissance des hépatocytes (HGF), 10 jours après l'infection, permettant de stimuler la croissance des cellules environnantes. Ces résultats sont confirmés chez des patients atteints d'adénocarcinome du côlon, le niveau d'expression de γ H2AX, du miR-20a et de HGF est

fortement augmenté tandis que SNP1 diminue pour les porteurs de souches de *E. coli pks+*. (Cognoux *et al.*, 2014)

L'inhibition de la colibactine par un petit composant inhibiteur, interagissant avec ClbP (nécessaire à la maturation de la toxine (Dubois *et al.*, 2011)), permet de supprimer les dommages à l'ADN, prévient la prolifération cellulaire et la promotion tumorale dans un modèle murin de cancer colorectal. Dans ce modèle, le nombre de tumeur est ainsi diminué par 3,5 pour les souris traitées avec l'inhibiteur, témoignant de l'effet pro-tumoral de la colibactine (Cognoux *et al.*, 2015).

Enfin, il a également été montré que la colibactine contribue à la fonction probiotique de la souche de *E. coli* Nissle 1917. L'inactivation du gène ClbA, nécessaire à la synthèse de la colibactine, dans cette souche permet de supprimer les dommages à l'ADN. En revanche cette inactivation annihile l'activité probiotique de la souche *in vitro* et *in vivo*. Chez le rongeur, l'activité génotoxique permet l'amélioration des symptômes de la maladie intestinale et module l'expression des cytokines, suggérant un même mécanisme d'action chez l'homme atteint de maladie inflammatoire chronique de l'intestin. (Olier *et al.*, 2012)

La colibactine, tout comme la CDT, induit une distension cellulaire et nucléaire. C'est une génotoxine pro-inflammatoire et une cyclomoduline. Des faibles doses bactériennes induisent une sénescence cellulaire et une instabilité génomique, induisant la croissance tumorale des cellules non intoxiquées (Secher *et al.*, 2013), suggérant un fort potentiel oncogénique pour cette toxine.

La colibactine est donc une génotoxine et une cyclomoduline (Nougayrède *et al.*, 2006) qui est à l'origine d'une instabilité génomique (Secher *et al.*, 2015), de manière très similaire à la CDT. Elle participe à la virulence de la bactérie et permet la sévérité de la pathologie (Marcq *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2013). La toxine, par sa capacité à induire la sénescence cellulaire permet la promotion de la croissance tumorale. La colibactine a donc un fort potentiel oncogénique puisqu'elle agit au niveau de plusieurs mécanismes de carcinogénèse (instabilité génomique, prolifération), suggérant que les bactéries productrices de colibactine pourraient être un facteur de risque dans le cancer du côlon, dans un contexte de maladie inflammatoire. L'utilisation de probiotiques produisant cette toxine, bien que bénéfiques (Olier *et al.*, 2012) sont donc à utiliser avec précautions en raison des potentiels effets pathogènes au long court. (Cuevas-Ramos *et al.*, 2010; Nougayrède *et al.*, 2006; Olier *et al.*, 2012)

MATÉRIEL DE LA THÈSE

Au cours de mes différents travaux de thèse, j'ai sous-cloné et cloné la sous-unité CdtB de la toxine CDT de plusieurs bactéries dans différents plasmides, plasmides de sous-clonage puis plasmides lentiviraux de transfert. A partir de ces plasmides, des particules lentivirales ont été produites. Elles ont permis de transduire différentes lignées cellulaires afin d'exprimer la sous-unité CdtB de manière constitutive ou conditionnelle. Dans ce dernier cas, plusieurs lignées épithéliales hépatiques et intestinales portant le transgène *cdtB* fusionné à une étiquette HA répétées 3 fois (sous une forme transcriptionnellement silencieuse dont l'expression est inductible) ont été établies.

	<i>C. jejuni</i> <i>cdtB</i> -3HA	<i>H. pullorum</i> <i>cdtB</i> -3HA	<i>H. hepaticus</i>	
			<i>cdtB</i> -3HA	<i>cdtB</i> -H265L-3HA
Plasmids				
pGEM®-T Easy	+	+	+	+
pLVTHM	-	+	-	-
p252	-		+	+
pTRIPz	-	+	+	+
Transgenic cell lines (type)				
HT-29 (intestinal)	-	+	+	+
Caco-2 (intestinal)	-	+	+	+
HCA7 (intestinal)	-	-	+	+
Huh7 (hepatic)	-	-	+	+
Hep3B (hepatic)	-	-	+	+
SNU398 (hepatic)				
THLE-2 (primary normal liver cells by infection with SV40 large T antigen)	-	-	-	-

HA, glycoprotéine antigénique présente à la surface du virus de la grippe.

CdtB mutée dans son site DNase en position 265 : histidine → lysine.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. Publication n°1

The cytolethal distending toxin subunit CdtB of *Helicobacter* is proinflammatory and increases the expression of genes encoding antimicrobial proteins *in vitro*.

Christelle Péré-Védrenne, Bruno Cardinaud, Christine Varon, Iulia Mocan, Alice Buissonnière, Julien Izotte, Francis Mégraud, Armelle Ménard

The Journal of Infectious Disease - Manuscrit en révision

Les Hélicobacters entéro-hépatiques sont associés à plusieurs pathologies digestives chez l'Homme et l'animal. Ainsi, *H. pullorum* et *H. hepaticus* sont pro-inflammatoires et sont impliqués dans différentes pathologies intestinales et hépatiques (Kleine *et al.*, 2014; Varon *et al.*, 2009). Ils possèdent des facteurs de virulence tels que le lipopolysaccharide (LPS) et la Cytotoxine Distendant (CDT). Cette toxine, via sa sous-unité CdtB, est impliquée dans la réponse inflammatoire chronique. Les études concernant l'activité pro-inflammatoire de la CDT sont contradictoires. Ainsi, la toxine ne serait pas impliquée dans la surexpression des gènes pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α et IL-8) (Jones *et al.*, 2003) tandis que d'autres études indiquent que la CDT est associée à la surexpression, *in vitro* et *in vivo*, des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, et IL-8) (Akifusa *et al.*, 2001; Ge *et al.*, 2007; Hickey *et al.*, 2000). Les différences entre ces études peuvent s'expliquer par la présence d'autres facteurs de virulence bactériens (LPS, flagelles) pouvant masquer l'effet de la toxine, ainsi que par le temps d'incubation avec la toxine (aiguë ou chronique) ou encore le temps de latence avant l'observation des effets.

L'objectif de la présente étude était d'évaluer les propriétés pro-inflammatoires globales de la CdtB de *H. pullorum* et *H. hepaticus*, *in vitro*, dans des cellules épithéliales intestinales et hépatiques humaines. Afin de s'affranchir de l'effet d'autres facteurs bactériens de ces Hélicobacters tels que le LPS, les flagelles ou l'uréase, la CdtB a été exprimée, de manière constitutive, directement dans les cellules cibles à l'aide d'une stratégie lentivirale.

La stratégie lentivirale, préalablement utilisée pour la CdtB de *H. pullorum* (Varon *et al.*, 2014), a été validée par l'évaluation de l'expression de l'IL8 impliquée dans la réponse inflammatoire et déjà connue pour être régulée par la CDT d'autres bactéries *C. jejuni* et *A. actinomycetemcomitans*. Les résultats expérimentaux ont permis de confirmer l'intérêt de la stratégie lentivirale. Des résultats similaires ont été obtenus pour les co-cultures avec des souches sauvages ou mutées pour la CDT et les cellules transduites avec la CdtB ou une protéine témoin. Ils ont montré que la CdtB des Hélicobacters induisait la surexpression de l'IL-8 au niveau du gène et de la protéine, confirmant les résultats obtenus pour la CDT des autres bactéries. La CdtB des Hélicobacters induit aussi une translocation nucléaire du NF- κ B.

Une étude globale de l'expression des gènes régulés en réponse à la toxine de *H. hepaticus* a ensuite été réalisée. Les résultats ont mis en évidence que la toxine induisait l'expression de 3 principales familles de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire : des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (HLA-A, HLA-B et HLA-C), des

cytokines et leurs récepteurs (IL-1 β , IL-8, IL-23A, IL-32, IL-7R) ainsi que des chimiokines (CCL20, CCL26, CX3CL1, CXCL1-3, CXCL9-11).

La CdtB régule également une vingtaine de gènes de la voie du NF- κ B (parmi les 75 recherchés). L'activité DNase de la CdtB semble jouer un rôle majeur dans l'activité pro-inflammatoire et dans la régulation des gènes identifiés. La réponse est similaire pour la CdtB de *H. pullorum* et *H. hepaticus* pour un même type cellulaire. Les niveaux de régulation sont en revanche variables en fonction des différentes lignées utilisées. La CdtB induit une réponse inflammatoire de type Th17 et surexprime des gènes codant pour des peptides antimicrobiens et certaines kallikréines.

Les peptides antimicrobiens régulés en réponse à la CdtB sont surexprimés dans le cancer colorectal et sont impliqués dans la prolifération cellulaire, la croissance tumorale, la migration et l'invasion cellulaire. Ces kallikréines surexprimées, notamment KLK5 et KLK7, sont responsables de la maturation de peptides antimicrobiens, associées à la réponse inflammatoire et sont également responsables du clivage excessif des jonctions cellulaires permettant la migration cellulaire.

Cette étude a mis en évidence que, comme la flagelline ou le LPS, la CdtB pouvait induire l'expression de gènes impliqués dans l'activité antimicrobienne et la réponse inflammatoire.

The Journal of Infectious Diseases

The cytolethal distending toxin subunit CdtB of Helicobacter is proinflammatory and increases the expression of genes encoding antimicrobial proteins in vitro --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	The cytolethal distending toxin subunit CdtB of Helicobacter is proinflammatory and increases the expression of genes encoding antimicrobial proteins in vitro
Short Title:	CdtB, inflammation & antimicrobial products
Article Type:	Major Article
Section/Category:	Pathogenesis and Host Response
Keywords:	Helicobacter hepaticus; Helicobacter pullorum; CDT; cytolethal distending toxin; inflammation; antimicrobial; microarray; intestinal; hepatic; kallikrein KLK5 KLK7.
Corresponding Author:	armelle menard, Ph.D Universite Bordeaux Segalen Bordeaux, Gironde FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universite Bordeaux Segalen
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Christelle Péré-Védrenne, PhD student
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Christelle Péré-Védrenne, PhD student Bruno Cardinaud, Associate Professor Christine Varon, Professor associate Iulia Mocan, Post-doctorate Alice Buissonnière, assistant engineer Julien Izotte, assistant engineer Francis Mégraud, Professor MD Phar armelle menard, Ph.D
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	FRANCE
Abstract:	<p>Enterohepatic Helicobacters are associated with several digestive diseases. Helicobacter pullorum is an emerging human foodborne pathogen and Helicobacter hepaticus is a mouse pathogen; both species are associated with intestinal and/or hepatic diseases. They possess virulence factors such as the cytolethal distending toxin (CDT). Data indicates that the CDT may be involved in chronic inflammatory responses, via its active subunit CdtB.</p> <p>In the present study, the proinflammatory properties of the CdtB of H. pullorum and H. hepaticus were assessed on human intestinal and hepatic epithelial cells in vitro. Interleukin 8 expression was evaluated by using wild type strains and their corresponding CdtB isogenic mutants, and by delivering CdtB directly into the cells. NF-κB nuclear translocation and transcriptomics in response to CdtB were also evaluated (Agilent microarrays).</p> <p>The CdtB of these Helicobacters induced NF-κB nuclear translocation and exhibited proinflammatory properties, mainly the expression of Th17-related genes and genes</p>

	<p>encoding antimicrobial products also involved in cancer. The DNase activity of CdtB appeared to play a role in the regulation of most of these genes. As for the flagellin or lipopolysaccharides, CdtB also induced expression of inflammation-associated genes related to antimicrobial activity.</p>
<p>Suggested Reviewers:</p>	<p>Hazel Mitchell , Professor, PhD Director of the department Helicobacter, University of New South Wales h.mitchell@unsw.edu.au Fields of interest: Helicobacter pullorum, virulence, inflammation</p> <p>James G. Fox, Professor, Department of Biological Engineering Director, Division of Comparative Medicine, Massachusetts Institute of Technology Cambridge, USA jgfox@mit.edu Fields of interest: CDT toxin, animal models, Helicobacter, Campylobacter</p> <p>Christine Josenhans, MD PHD Professor and PI team "Cellular Microbiology in the Gastrointestinal Tract", Institute for Medical Microbiology and Hospital Epidemiology - Hannover Medical School – Hannover – Germany josenhans.christine@mh-hannover.de Fields of interest: CDT toxin, CagA toxin, Helicobacter, immunology</p> <p>Bram Flahou , PhD Senior scientist, Ghent University - Faculty of Veterinary - Merelbeke, Belgium bram.flahou@ugent.be Fields of interest: Gastric and enterohepatic non-H. pylori Helicobacter (NHPH) infections in animals and humans; Virulence mechanisms of NHPH; Host-bacteria interactions; The immunological response to NHPH infections; Control strategies for Helicobacter suis infection; The interactions between Helicobacter infection, gastric acid secretion and the gastric microbiota; Diagnostic Veterinary Microbiology</p> <p>Jay V. Solnick, Md PHD Professor, University of California, Davis UC Davis jvsolnick@ucdavis.edu Fields of interest: Helicobacter, inflammation, animal models (monkeys)</p> <p>Steffen Backert , Professor and Chairman of Microbiology at the Depa Director of the department Helicobacter, Friedrich-Alexander-Universität steffen.backert@fau.de Fields of interest: toxin and cell signalling, Host/pathogen interaction, Campylobacter, Helicobacter. Steffen's research interests include diverse aspects of cell signaling, especially related to bacterial pathogen-host interactions and protein interactions mediated by tyrosine-phosphorylated bacterial effector proteins and eukaryotic SH2 domains. The injected bacterial effectors, such as CagA from H. pylori or Tir from EPEC strains, which are targeted by Src, Abl and other kinases, have been among the key topics in these studies. Steffen is also interested in bacterial type IV secretion processes, and signaling of bacteria to certain host cell receptors (fibronectin, integrins, E-cadherin etc.), Rho GTPases (Rac1 and Cdc42) and actin-binding proteins (cortactin and others) which are hijacked by pathogens for different purposes during the infection cycle.</p>

1 **The cytolethal distending toxin subunit CdtB of Helicobacter is**
2 **proinflammatory and increases the expression of genes encoding**
3 **antimicrobial proteins *in vitro***

4
5 Christelle Péré-Védrenne^{1,2}, Bruno Cardinaud^{3,4}, Christine Varon^{1,2}, Iulia Mocan^{1,2}, Alice
6 Buissonnière^{1,2}, Julien Izotte^{1,2}, Francis Mégraud^{1,2}, Armelle Ménard^{1,2*}

7
8 ¹*Université de Bordeaux, Laboratoire de Bactériologie, F33076 Bordeaux, France;*

9 ²*INSERM U853, F33076 Bordeaux, France*

10 ³*Université de Bordeaux, Biothérapies des maladies génétiques et cancers, INSERM U1035,*
11 *F33076 Bordeaux, France*

12 ⁴*Bordeaux Institut National Polytechnique, F-33000 Bordeaux, France*

13

14 **SHORT TITLE (word count: 39)**


15 CdtB, inflammation & antimicrobial products

16

17 ***Corresponding author:** Armelle Ménard  Université de Bordeaux, Carreire

18 Laboratoire de Bactériologie, INSERM U853 - Batiment 2B RDC Case 76 – 146 rue Léo Saignat

19 F33076 Bordeaux, France. Email: Armelle.Menard@u-bordeaux.fr

20  + 33 (0) 5 57 57 12 88

21

1 **Footnotes:**

2 **1)** The sequence of the *cdtB* of *H. hepaticus* strain 3B1 fused at its 3' end to three repeats of the
3 human influenza hemagglutinin (HA) epitope and that of its corresponding mutated *cdtB*
4 sequence (A→T transversion at nucleotide 794 [1]) are available in the GenBank database
5 under the accession numbers KT590046 and KT590047, respectively. The *cdtB* sequence of
6 *H. pullorum* strain H495 fused at its 3' end to three repeats of the human HA epitope is available
7 under the GenBank accession number: JX434689.

8 **2)** The authors report no conflicts of interest. Christelle Péré-Védrenne is the recipient of a
9 predoctoral fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer. The authors wish to thank
10 Christophe Grosset (INSERM UMR1053, Physiopathologie du cancer du foie, University of
11 Bordeaux, France) for supplying the Huh7 cell line. We are grateful to Cathy Staedel (INSERM
12 UMR869, ARN, Régulations naturelle et artificielle, University of Bordeaux, France) for technical
13 support. Lentivirus productions were performed at the “Vectorologie lentivirale” service platform
14 of the Federative Research Structure “TransBioMed” of the University of Bordeaux (Bordeaux,
15 France). We are grateful to Véronique Guyonnet-Duperat for technical assistance. Sequencing
16 experiments were performed at the Genomic & Transcriptomic Facility of Bordeaux (grants from
17 the Conseil Régional d'Aquitaine No. 20030304002FA and 20040305003FA and from the
18 European Union, FEDER No. 2003227).

19 **3)** Funding sources: This work was supported in part by the “Institut National de la Santé et de la
20 Recherche Médicale” (INSERM), the University of Bordeaux and the Federative Research
21 Structure “Biology: from basics to Medicine” (“TransBioMed”) at the University of Bordeaux
22 (2013).

23 **4)** Part of this work was presented as an oral presentation at the XXVth International Workshop
24 on *Helicobacter* and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer
25 (European *Helicobacter* Study Group) in Ljubljana, Slovenia, from September 13-15, 2012.

26

1 **ABSTRACT (word count: 191)**

2 Enterohepatic Helicobacters are associated with several digestive diseases. *Helicobacter*
3 *pullorum* is an emerging human foodborne pathogen and *Helicobacter hepaticus* is a mouse
4 pathogen; both species are associated with intestinal and/or hepatic diseases. They possess
5 virulence factors such as the cytolethal distending toxin (CDT). Data indicates that the CDT may
6 be involved in chronic inflammatory responses, via its active subunit CdtB.

7 In the present study, the proinflammatory properties of the CdtB of *H. pullorum* and *H. hepaticus*
8 were assessed on human intestinal and hepatic epithelial cells *in vitro*. Interleukin 8 expression
9 was evaluated by using wild type strains and their corresponding CdtB isogenic mutants, and by
10 delivering CdtB directly into the cells. NF- κ B nuclear translocation and transcriptomics in
11 response to CdtB were also evaluated (Agilent microarrays).

12 The CdtB of *Helicobacter pullorum* and *Helicobacter hepaticus* induced NF- κ B nuclear
13 translocation and exhibited proinflammatory properties, mainly the expression of Th17-related
14 genes and genes encoding antimicrobial products also involved in cancer. The DNase activity of
15 CdtB appeared to play a role in the regulation of most of these genes. As for the flagellin or
16 lipopolysaccharides, CdtB also induced expression of inflammation-associated genes related to
17 antimicrobial activity.

18

19 **Key words:** *Helicobacter hepaticus*; *Helicobacter pullorum*; CDT; cytolethal distending
20 toxin; inflammation; antimicrobial; microarray; intestinal; hepatic; kallikrein KLK5 KLK7

21

22 **MANUSCRIPT (word count: 3,499)**

23

1 INTRODUCTION

2 Unlike *Helicobacter pylori*, the prevalence of enterohepatic Helicobacter infections in digestive
3 diseases is underestimated because of the difficulties in cultivating these fastidious organisms
4 and the lack of available detection tools. As a result, their virulence has been little studied. Some
5 Helicobacters have nevertheless been associated with various diseases in humans and animals.

6 *Helicobacter pullorum* was initially isolated from the digestive tract of asymptomatic poultry,
7 in which it was later associated with enteritis and vibronic hepatitis [2]. This bacillus is
8 considered an emergent human pathogen implicated in several digestive pathologies, such as
9 gastroenteritis [3], inflammatory bowel disease [4, 5] and chronic liver diseases (reviewed in [6]).
10 Accumulating data have described a high prevalence of *H. pullorum* in poultry flocks and strains
11 were recently isolated from chicken meat, suggesting that this bacterium is a foodborne
12 pathogen [7].

13 Another Helicobacter infects the mouse intestine: *Helicobacter hepaticus* colonizes the bile
14 ducts and liver, causing chronic hepatitis which may progress to hepatocellular carcinoma [8, 9].
15 *H. hepaticus* has also been shown to induce colitis, intestinal lesions and colonic tumourigenesis
16 in susceptible mice (reviewed in [10]).

17 Regarding the pathogenesis of these Helicobacters, they both possess active
18 lipopolysaccharides (LPS) capable of inducing nuclear factor-Kappa B (NF-κB) activation [11].
19 They secrete a cytolethal distending toxin (CDT) [12, 13] and harbour a type VI secretion system
20 [7, 14]. *In vitro* experiments have shown a proinflammatory effect of these Helicobacters [15, 16],
21 which is mainly dependent on bacterial adherence to the cell for *H. pullorum* [16]. *In vivo*, mice
22 infected with *H. hepaticus* exhibit chronic intestinal and liver inflammation [9, 17, 18] and the
23 CDT plays an essential role in the liver inflammation-associated preneoplastic lesions [19]. Apart
24 from the well-characterized effects of the CDTs expressed by a broad range of Gram-negative
25 bacteria (cell distension, actin stress fiber formation, DNA damage and cell cycle arrest within

1 the infected cells), the data indicates that this heterotrimeric toxin may also be involved in
2 chronic inflammatory response [20, 21].

3 In the present study, the proinflammatory properties of the *H. pullorum* and *H. hepaticus*
4 CDT active subunit, CdtB, were assessed on human intestinal and hepatic epithelial cells *in*
5 *vitro*. First, the interleukin 8 (IL8) expression and secretion were analyzed using a two-way
6 method: 1) wild type strains and their corresponding CdtB isogenic mutants in coculture
7 experiments and 2) lentiviral expression systems of the CdtB subunit into the cells, allowing a
8 specific link to be drawn between the effects observed and the toxin. Once the lentiviral
9 expression systems of CdtB were validated in inflammatory experiments, the nuclear
10 translocation of NF- κ B in response to CdtB was evaluated. Then, microarray-based identification
11 of differentially expressed genes involved in inflammation was performed using the lentiviral
12 expression system of the CdtB subunit of *H. hepaticus* in intestinal and hepatic epithelial cells.
13 Finally, the involvement of the DNase activity of CdtB in the regulation of proinflammatory genes
14 was explored upon lentiviral expression of the CdtB of *H. hepaticus* mutated in its catalytic
15 DNase site [1].

16

17

1 MATERIALS & METHODS

2 Reagents, the construction lentivirus plasmids with the various *cdtB* fused at their 3' end to three
3 repeats of the human influenza hemagglutinin epitope, lentivirus production, primer designs,
4 reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and global analysis of
5 the expression of human genes are presented in Supplementary Materials and Methods.

6

7 Cell lines, Helicobacter strains

8 Caco-2 human colon adenocarcinoma cells (DSMZ no. ACC 169, DSMZ collection), HT-29
9 human colorectal adenocarcinoma cells (DSMZ no. ACC 299, DSMZ collection), HCA-7 human
10 colorectal carcinoma cells (colony 29, Sigma-Aldrich collection), and Huh7 human hepatocyte
11 derived cellular carcinoma cells were cultured as previously reported [22, 23].

12 *H. pullorum* strain H495 (CCUG 33840, Burnens 459-94) and *H. hepaticus* strain 3B1
13 (3B1/Hh-1, CIP 104102, ATCC 51449, CCUG 44777) and their corresponding CdtB isogenic
14 mutants [22, 24] were cultivated as previously reported [16, 25]. For coculture experiments,
15 bacterial suspensions were prepared in brucella broth with an optical density at 600 nm,
16 adjusted to 0.6 corresponding to a concentration of 2.6×10^8 colony forming units/ml.

17

18 Coculture and transduction experiments

19 Cells were seeded in 6 or 24 well plates (with or without glass coverslips) at a density of 100,000
20 or 20,000 cells/well 24 h before addition of bacteria or lentivirus preparations to the culture
21 media.

22 For coculture experiments, bacteria in brucella broth were added to each cell culture well for
23 72 h at a multiplicity of infection (MOI) of 100 bacteria/cell.

24 For transduction experiments, the culture medium was removed and volumes corresponding
25 to a MOI of 30 viruses/cell in fetal calf serum (FCS)-free renewed medium were added to each
26 cell culture well for 12 h. Then, FCS was added to a final concentration of 10% for another 12 h.

1 Finally the medium was completely renewed with fresh medium with FCS and incubation was
2 continued for 48 h, corresponding to a final transduction incubation time of 72 h.

3

4 **RESULTS**

5 **Effects of the CdtB of *Helicobacter pullorum* on interleukin 8 expression in human** 6 **epithelial cells**

7 *H. pullorum* regulates the secretion of the proinflammatory cytokine IL8 in both Caco-2 and HT-
8 29 intestinal epithelial cell lines after a 24 h coculture *in vitro*, a secretion requiring bacterial
9 adherence [16]. In order to evaluate the involvement of the CdtB subunit on IL8 secretion, the
10 effect of *H. pullorum* strain H495 (CCUG 33840) was compared to that induced by its
11 corresponding isogenic *cdtB*-mutant strain ($\Delta cdtB$) on HT-29, intestinal HCA-7 and Caco-2 cell
12 lines, but after 72 h of coculture *in vitro*, corresponding to the time required to observe the effect
13 of the CDT. IL8 secretion was also quantified in these cell lines after a 72 h transduction with
14 lentivirus particles expressing the enhanced Green Fluorescent Protein (GFP) or the CdtB
15 subunit of *H. pullorum* strain H495, as previously validated [22].

16 As expected, *H. pullorum* induced a significant stimulation of IL8 secretion on both HT-29
17 and Caco-2 cells [16], and also on HCA-7 cells (Fig. 1A). This effect was significantly reduced
18 after coculture with the $\Delta cdtB$ *H. pullorum* strain as compared to the wild type (WT) strain in the
19 *H. pullorum*-CDT-susceptible cell lines, HCA-7 and Caco-2, while it remained non-significant in
20 the HT-29 cell line [22], reported to be resistant to *H. pullorum* CDT-associated cytopathogenic
21 effects [22].

22 It should be noted that the decreased secretion of IL8 in the HCA-7 and Caco-2 cells
23 infected with the $\Delta cdtB$ *H. pullorum* strain, while significant, is not very important since IL8
24 secretion remained significantly higher compared to uninfected cells. This means that CDT

1 alone is not responsible for all the effects and that other factors, such as LPS, are involved in *H.*
2 *pullorum* induced inflammation, as previously proposed [16].

3 In transduction experiments, IL8 secretion (Fig. 1A) and gene expression (Fig. 1B) were
4 significantly increased in response to the CdtB of *H. pullorum* as compared to GFP. This showed
5 that *H. pullorum* CdtB induces IL8 secretion, thus confirming that some of the effects observed
6 in HCA-7 and Caco-2 coculture experiments were indeed due to CDT via its CdtB active subunit.

7 Interestingly, IL8 secretion and gene expression were increased in *H. pullorum*-CdtB-
8 transduced HT-29 cells while this cell line was not sensitive to the cytopathogenic effects of the
9 CDT when using *H. pullorum* strains in coculture experiments (not shown and [22]). This is in
10 agreement with the fact that the *H. pullorum* CDT effects can be restored in this resistant cell line
11 when expressing the toxin directly into the cell [22].

12

13 **Effects of the CdtB of *Helicobacter hepaticus* on interleukin 8 expression in human**

14 **epithelial cells**

15 Mice infected with *H. hepaticus* show associated intestinal and hepatic pathologies [9, 17, 18].
16 The effect of *H. hepaticus* strain 3B1 (CCUG 44777) on IL8 expression was thus compared to
17 that induced by its corresponding $\Delta cdtB$ strain on intestinal HT-29 and hepatic Huh7 cell lines
18 after a 72 h coculture *in vitro*. Once the lentiviral expression system of the CdtB of *H. hepaticus*
19 strain 3B1 was validated by the observation of the CdtB-associated cytopathogenic effects (Fig.
20 S1: cell distension, enlarged cells with distended nuclei, actin stress fiber formation), IL8
21 stimulation was also quantified in these cell lines. It was not possible to observe changes in IL8
22 protein secretion in the Huh7 cell line since IL8 is constitutively produced at a very high level in
23 these cells [26] while it was possible to examine its IL8 gene regulation.

24 As expected, *H. hepaticus* induced a significant stimulation of IL8 secretion in HT-29 as well
25 as an increase in IL8 gene expression in both cell lines in contrast to its corresponding $\Delta cdtB$
26 strain (Fig. 2). The most significant effect was observed on Huh7 cells with a 72-fold increase in
27 IL8 gene expression. In transduction experiments, IL8 secretion increased in HT-29 cells and IL8

1 gene expression also increased significantly in response to the CdtB of *H. hepaticus* in both cell
2 lines, while no significant variation of IL8 gene expression was observed in response to the
3 tdTomato fluorescent protein (TFP) or the *H. hepaticus* CdtB with the His→Leu mutation at
4 residue 265 involved in the DNase activity (H265L). These results suggest that the DNase
5 activity of *H. hepaticus* CdtB is involved in IL8 expression. Interestingly, a significant CDT-
6 dependent increase in IL8 secretion was induced in coculture experiments with *H. hepaticus* on
7 HT-29 cells but not with *H. pullorum* (Fig. 1A).

8

9 **NF-κB pathway activation**

10 *H. hepaticus* CDT activates the inflammatory NF-κB pathway *in vivo* [19]. NF-κB nuclear
11 translocation was evaluated *in vitro* with regards to the expression of the CdtB subunit of *H.*
12 *pullorum* and *H. hepaticus* in transduction experiments. Immunofluorescence studies were
13 performed using antibodies raised against the NF-κB p65 subunit with subsequent counting of
14 p65-positive nuclei (Fig 3). In these experiments, p65 was found in the cytosol in all of the cell
15 lines, but a strong nuclear translocation of p65 was observed in response to the CdtB, reaching
16 50-80% of the cell nuclei compared to control fluorescent proteins (Fig. 3AB). As compared to
17 the CdtB-associated increase, a strong decrease in p65 nuclear content was observed in
18 response to the *H. hepaticus* CdtB with the H265L mutation (Fig. 3B). However, this decrease
19 did not reach the basal levels observed for the TFP as the percentages of p65-nuclei-positive
20 cells remained quite high in response to the H265L-mutated CdtB: 9% ($p=0.0265$) and 20%
21 ($p=0.0571$) for HT-29 and Huh7, respectively. These results suggest that most of the CdtB-
22 induced NF-κB p65 nuclear translocation is associated to its DNase activity.

23

24 **Expression of human inflammatory associated genes**

25 Since non-CDT bacterial factors can mask the effects of CDT and in order to attribute the
26 effects of the bacteria specifically to the CdtB subunit, the global expression of genes in
27 response to CdtB was quantified using whole genome microarrays upon the expression of *H.*

1 *hepaticus* CdtB versus TFP in transduced epithelial intestinal HT-29 and hepatic Huh7 cells.
2 Genes involved in inflammatory processes whose expression was significantly regulated by
3 CdtB are presented in Fig. 4. Overall, many inflammation-associated genes were either not or
4 very little expressed under the basal conditions of Huh7 cells (microarray data, not shown). Thus
5 more inflammation-associated genes were found to be regulated by CdtB in intestinal HT-29
6 cells than in hepatic Huh7 cells. Regardless of the cell line used, 3 gene families were mostly
7 regulated by CdtB in both cell lines: that of the main genes of major histocompatibility complex
8 class I (HLA-A, HLA-B and HLA-C), that of cytokines (CCL20, CCL26, CX3CL1, CXCL1-3,
9 CXCL9-11), and that of chemokines and their receptors (IL1 β , IL8, IL23A, IL32, IL7R).

10 CdtB mainly induced an increase in Th17-related genes in HT-29 (CCL20, CX3CL1,
11 CXCL1, CXCL2, CSF2, IL1 β , IL17C, IL23A, IL7R, IL8, SOCS3, TNF, TRAF6, JAK1, ICAM1,
12 STAT3, RORA) and Huh7 (CCL20, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6, IL1 β , IL6, IL7R,
13 IL8, IL18, IL23A, JAK1, JAK2, ICAM1, STAT4, RORA) cell lines. Th17 population bridges innate
14 and adaptive immunity to produce a robust antimicrobial inflammatory response. The
15 antimicrobial key molecules involved in epithelial cell defense independently of the
16 peptidoglycan recognition include antimicrobial peptides, elastase inhibitors, S100 proteins, iron
17 metabolism proteins and chemokines [27]. All of these chemokines (CCL20, CXCL9, CXCL10
18 and CXCL11) were upregulated in HT-29 in response to CdtB. In fact, most of the genes
19 encoding antimicrobial products were upregulated in HT-29 cells: SLPI and PI3 genes encoding
20 the antileukoproteinase and elafin, respectively, modulating inflammation through their anti-
21 protease activity; S100A3 and S100A14 genes encoding S100A3 and S100A14 proteins; LCN2
22 encoding lipocalin-2 and CAMP encoding the antimicrobial peptide cathelicidin LL37.
23 Interestingly, KLK5 and KLK7 genes, encoding kallikrein 5 and 7 serine proteases responsible
24 for the cleavage of cathelicidin into the mature antimicrobial peptide LL-37 [28], were also
25 overexpressed with a 8.2 and 10.6 fold increase, respectively. In the Huh7 cell line, most of the
26 genes encoding antimicrobial proteins were not expressed under control conditions. However,

1 the 3 chemokines associated with antimicrobial activity expressed in the Huh7 cell line, CCL20,
2 CXCL9 and CXCL10, were all upregulated.

3 The CdtB activates the nuclear translocation of NF- κ B. The inflammation-associated genes
4 involved in NF- κ B signaling whose expression was regulated by the CdtB are presented in Table
5 1. Among the 75 genes checked, 25 and 20 NF- κ B signaling associated genes were
6 upregulated in response to the CdtB of *H. hepaticus* in HT-29 and Huh7 cells (such as RelB or
7 NFKB2), respectively, most of these genes corresponding to cytokines and chemokines. In
8 addition, the gene encoding the cell surface glycoprotein ICAM1 whose expression is activated
9 by NF- κ B was also upregulated in response to CdtB in both cell lines (Fig. 4AB).

10 Some CdtB-regulated proinflammatory genes were selected and their expression was
11 quantified by RT-qPCR in response to the CdtB of *H. pullorum* and *H. hepaticus* in human
12 epithelial intestinal (HT-29, HCA-7 and Caco-2) and hepatic (Huh7) cells. The overall results
13 were similar for the CdtB of *H. pullorum* and *H. hepaticus* when the same cell type was used
14 (HT-29) while variable levels of regulation were observed for a given CdtB depending on the cell
15 line (Fig. S2). CCL20, CCL26 and IL7R were upregulated in all of the experiments and genes
16 encoding antimicrobial products (S100A3, CAMP) or kallikrein (KLK5) which is responsible for
17 cathelicidin maturation were also upregulated (Fig. S2), with the exception of the Huh7 cell line
18 in which they were not expressed under basal conditions.

19 The involvement of the DNase activity of the *H. hepaticus* CdtB subunit was also explored
20 for some CdtB-regulated proinflammatory genes (Fig. 5). Among the genes whose expression
21 was quantified, the CdtB-induced fold changes were significantly abolished for CCL20, CCL26,
22 CX3CL1, CXL1-2-3, CXCL10 and IL32 genes in both cell lines (HT-29 and Huh7) in response to
23 *H. hepaticus* H265L-mutated CdtB, except for IL1 β , suggesting that the DNase activity of *H.*
24 *hepaticus* CdtB, particularly the histidine residue at position 265, is involved in the regulation of
25 these genes associated with inflammatory processes. The DNase activity also appeared to be
26 involved in the regulation of gene encoding antimicrobial products in cell lines expressing them.

1

2 DISCUSSION

3 Some data point to the involvement of the CDT in inflammation-associated preneoplastic
4 lesions via its active subunit CdtB [19]. However, the direct role of the active CdtB subunit
5 remains less studied. In the present study, the effect of CdtB in inflammation was evaluated in
6 coculture experiments by using wild type strains and their corresponding CdtB isogenic mutants,
7 as well as the CdtB expression in transduced cells. Both *H. pullorum* and *H. hepaticus* triggered
8 IL8 induction *in vitro*, involving the CdtB subunit. A high CDT-independent IL8 induction was
9 however detected in *H. pullorum* coculture experiments, probably corresponding to the
10 previously reported proinflammatory effect that required *H. pullorum* adherence and possibly
11 lipopolysaccharides [16]. Otherwise, this CDT-independent IL8 induction was not observed in *H.*
12 *hepaticus* coculture experiments. The reason could be that *H. hepaticus* LPS does not have a
13 potent proinflammatory effect, which would not be the case for *H. pullorum* LPS which could
14 mask the CDT effects. This hypothesis is supported by the fact that the LPS lysate activity of *H.*
15 *hepaticus* strain 3B1 (CCUG 44777) is 5,700 times less active than that of *H. pullorum* strain
16 H495 (CCUG 33840) with Limulus amoebocyte lysate activities of 7×10^2 and 4×10^6 EU/mg,
17 respectively [11]. In fact, *H. pullorum* and *H. hepaticus* LPS have been described as having the
18 highest and lowest biological activity in the *Helicobacter* genus, respectively [11].

19 As expected, no CDT-associated IL8 induction was observed in the HT-29 cell line infected
20 with *H. pullorum* as this cell line was reported to be resistant to the cytopathogenic effects of the
21 *H. pullorum* CDT [22]. In contrast, a CDT-dependent IL8 induction was observed in coculture
22 experiments with *H. hepaticus* in the same cell line which appeared to be susceptible to the *H.*
23 *hepaticus* CDT-associated phenotype (Fig. S1), but resistant to those of *H. pullorum*. This
24 suggests that 1) the HT-29 cell line may lack the CDT receptor (not yet characterized) or 2) one
25 of the pathways required for the CdtB cellular internalization or traffic is defective, an unlikely
26 assumption unless these toxins have different receptors or internalization/traffic pathways. The

1 fact that the HT-29 cell line responded differently to the CDT of related bacteria is a matter of
2 discussion, especially seeing that the lentiviral expression of the CdtB subunit of these two
3 *Helicobacter* species (sharing 71.4% identity) allowed the observation of similar associated
4 phenotypes. It should be noted that the CdtA and CdtC subunits share only 52% and 48%
5 identity, respectively, in *H. hepaticus* and *H. pullorum*.

6 Previous data obtained during coculture of *H. hepaticus* with primary human hepatocytes
7 [15] showed that this bacillus regulates the expression of genes encoding cyclooxygenase-2,
8 prostaglandin E2, cytochrome P450 3A4, albumin and monocyte chemotactic protein-1, which
9 was not the case in the present study, suggesting that bacterial factors other than CdtB may be
10 responsible for these regulations. In contrast, CdtB is involved in the increase of IL1 β , IL8, TNF
11 and ICAM1 mRNA induced by *H. hepaticus* [15]. CdtB was also associated with an upregulation
12 of genes associated with NF- κ B signaling, in agreement with previous *in vivo* experiments that
13 showed a CDT dependent promotion from inflammation to dysplasia associated with activation
14 of the inflammatory NF- κ B pathway [19].

15 Bacterial-induced inflammation is dependent on IL23 and is associated with Th1 and Th17-
16 cell response [29, 30]. Microarray analysis of the genes related to inflammatory processes that
17 are differentially expressed in response to *H. hepaticus* CdtB pointed to an upregulation of Th17-
18 related genes. Th17 associated cytokines trigger antimicrobial peptide synthesis. The
19 expression of most of the genes involved in the synthesis of antimicrobial key molecules (except
20 those whose expression is dependent on peptidoglycan recognition) was also upregulated upon
21 the expression of *H. hepaticus* CdtB in HT-29 cells. This includes genes encoding lipocalin-2,
22 the 2 elastase inhibitors, SLPI and elafin, S100 proteins and the well-known cathelicidin LL37
23 peptide. In addition, KLK5 and KLK7 genes encoding serine proteases allowing cathelicidin
24 maturation into LL37 antimicrobial peptide [28] were also overexpressed. Similar upregulations
25 were noted upon expression of the CdtB of *H. hepaticus* and *H. pullorum* in HT-29, Caco-2 and
26 HCA-7 cells, but to a lesser extent in Huh7 cells (not expressing most of these genes). It was
27 reported that overexpression of KLK5 and KLK7 may provide a route for metastasis in epithelial

1 carcinoma by excessive cleavage of cell junction proteins [31]. Therefore, besides having
2 microbicidal functions, some of these antimicrobial molecules play multiple roles as a host
3 defense in the immune system; they also have an inflammatory effect and are involved in
4 tumour progression.

5 Within the S100 family of calcium-binding proteins, some proteins are bactericidal [27] and
6 some also enhance invasion and tumourigenesis [32-34] via upregulation of inflammatory
7 pathways [34, 35], especially activation of NF- κ B signaling [36]. The S100A3 and S100A14
8 genes were upregulated in response to CdtB. Both of these genes are overexpressed in human
9 bladder and colorectal cancer [37, 38]. S100A3 leads to tumour growth and invasion [38, 39]
10 and S100A14 overexpression promotes G2/M phase progression cell proliferation, migration,
11 and invasion [40]. As other S400, both of these latter proteins are involved in cancer progression
12 and it was proposed that they could also display antimicrobial activity [41] although their
13 function, as antimicrobial peptides, remains to be confirmed. In fact, some bacterial compounds
14 are strong inducers of antimicrobial peptides, such as flagellin which induces the antimicrobial
15 peptide psoriasin S100A7c or LPS which activates the S100A8/A9 complex (reviewed in [42]). It
16 is therefore tempting to speculate that these S100A3 and S100A14 proteins induced by CdtB
17 may also play an antimicrobial role in addition to their role in cancer progression.

18 In conclusion, the active subunit CdtB of the CDT of *H. pullorum* and *H. hepaticus* exhibits
19 proinflammatory properties on human epithelial intestinal and hepatic cells *in vitro* and induces a
20 strong nuclear translocation of NF- κ B. The CdtB induces the expression of Th17-related genes
21 and that of genes encoding antimicrobial products also known to play a role in cancer, as well as
22 the genes encoding proteases responsible for their maturation. The DNase activity of the CdtB
23 appeared to be involved in the regulation of these genes. This study highlighted for the first time
24 that, like flagellin and LPS, CdtB also induces the expression of genes involved in antimicrobial
25 activity, inflammatory effects and cancer.

1

2 **References**

- 3 1. Avenaud P, Castroviejo M, Claret S, Rosenbaum J, Megraud F, Menard A. Expression and activity of
4 the cytolethal distending toxin of *Helicobacter hepaticus*. Biochemical and biophysical research
5 communications **2004**; 318:739-45.
- 6 2. Stanley J, Linton D, Burnens AP, et al. *Helicobacter pullorum* sp. nov.-genotype and phenotype of a
7 new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. Microbiology **1994**;
8 140:3441-9.
- 9 3. Steinbrueckner B, Haerter G, Pelz K, et al. Isolation of *Helicobacter pullorum* from patients with
10 enteritis. Scand J Infect Dis **1997**; 29:315-8.
- 11 4. Laharie D, Asencio C, Asselineau J, et al. Association between entero-hepatic *Helicobacter* species
12 and Crohn's disease: a prospective cross-sectional study. Alimentary pharmacology & therapeutics
13 **2009**; 30:283-93.
- 14 5. Bohr UR, Glasbrenner B, Primus A, Zagoura A, Wex T, Malfertheiner P. Identification of enterohepatic
15 *Helicobacter* species in patients suffering from inflammatory bowel disease. J Clin Microbiol **2004**;
16 42:2766-8.
- 17 6. Pellicano R, Menard A, Rizzetto M, Megraud F. Helicobacters and liver diseases. Association or
18 causation? The Lancet infectious diseases **2008**; Accepted.
- 19 7. Borges V, Santos A, Correia CB, et al. *Helicobacter pullorum* isolated from fresh chicken meat -
20 antibiotic resistance and genomic traits of an emerging foodborne pathogen. Appl Environ Microbiol
21 **2015**.
- 22 8. Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, et al. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium
23 isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. J Clin Microbiol **1994**; 32:1238-45.
- 24 9. Fox JG, Li X, Yan L, et al. Chronic proliferative hepatitis in A/JCr mice associated with persistent
25 *Helicobacter hepaticus* infection: a model of helicobacter-induced carcinogenesis. Infection and
26 immunity **1996**; 64:1548-58.
- 27 10. Fox JG, Ge Z, Whary MT, Erdman SE, Horwitz BH. *Helicobacter hepaticus* infection in mice: models
28 for understanding lower bowel inflammation and cancer. Mucosal immunology **2011**; 4:22-30.

- 1 11. Hynes SO, Ferris JA, Szponar B, et al. Comparative chemical and biological characterization of the
2 lipopolysaccharides of gastric and enterohepatic helicobacters. *Helicobacter* **2004**; 9:313-23.
- 3 12. Young VB, Knox KA, Schauer DB. Cytolethal distending toxin sequence and activity in the
4 enterohepatic pathogen *Helicobacter hepaticus*. *Infection and immunity* **2000**; 68:184-91.
- 5 13. Chien CC, Taylor NS, Ge Z, Schauer DB, Young VB, Fox JG. Identification of *cdtB* homologues and
6 cytolethal distending toxin activity in enterohepatic *Helicobacter* spp. *J Med Microbiol* **2000**; 49:525-
7 34.
- 8 14. Bartonickova L, Sterzenbach T, Nell S, et al. Hcp and VgrG1 are secreted components of the
9 *Helicobacter hepaticus* type VI secretion system and VgrG1 increases the bacterial colitogenic
10 potential. *Cellular microbiology* **2013**; 15:992-1011.
- 11 15. Kleine M, Worbs T, Schrem H, et al. *Helicobacter hepaticus* induces an inflammatory response in
12 primary human hepatocytes. *PloS one* **2014**; 9:e99713.
- 13 16. Varon C, Duriez A, Lehours P, et al. Study of *Helicobacter pullorum* proinflammatory properties on
14 human epithelial cells *in vitro*. *Gut* **2009**; 58:629-35.
- 15 17. Ward JM, Anver MR, Haines DC, Benveniste RE. Chronic active hepatitis in mice caused by
16 *Helicobacter hepaticus*. *The American journal of pathology* **1994**; 145:959-68.
- 17 18. Ward JM, Fox JG, Anver MR, et al. Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice
18 caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species. *Journal of the National*
19 *Cancer Institute* **1994**; 86:1222-7.
- 20 19. Ge Z, Rogers AB, Feng Y, et al. Bacterial cytolethal distending toxin promotes the development of
21 dysplasia in a model of microbially induced hepatocarcinogenesis. *Cellular microbiology* **2007**;
22 9:2070-80.
- 23 20. Guerra L, Guidi R, Frisan T. Do bacterial genotoxins contribute to chronic inflammation, genomic
24 instability and tumor progression? *The FEBS journal* **2011**; 278:4577-88.
- 25 21. Belibasakis GN, Bostanci N. Inflammatory and bone remodeling responses to the cytolethal distending
26 toxins. *Cells* **2014**; 3:236-46.
- 27 22. Varon C, Mocan I, Mihi B, et al. *Helicobacter pullorum* cytolethal distending toxin targets vinculin and
28 cortactin and triggers formation of lamellipodia in intestinal epithelial cells. *The Journal of infectious*
29 *diseases* **2014**; 209:588-99.
- 30 23. Jalvy-Delvalle S, Maurel M, Majo V, et al. Molecular basis of differential target regulation by miR-96

- 1 and miR-182: the Glypican-3 as a model. *Nucleic acids research* **2012**; 40:1356-65.
- 2 24. Young VB, Knox KA, Pratt JS, et al. *In vitro* and *in vivo* characterization of *Helicobacter hepaticus*
3 cytolethal distending toxin mutants. *Infection and immunity* **2004**; 72:2521-7.
- 4 25. Le Roux-Goglin E, Dubus P, Asencio C, Jutand MA, Rosenbaum J, Megraud F. Hepatic lesions
5 observed in hepatitis C virus transgenic mice infected by *Helicobacter hepaticus*. *Helicobacter* **2013**;
6 18:33-40.
- 7 26. Sakamoto K, Masuda T, Mita S, et al. Interleukin-8 is constitutively and commonly produced by
8 various human carcinoma cell lines. *International journal of clinical & laboratory research* **1992**;
9 22:216-9.
- 10 27. Kolls JK, McCray PB, Jr., Chan YR. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nature*
11 *reviews Immunology* **2008**; 8:829-35.
- 12 28. Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A, et al. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes
13 skin inflammation in rosacea. *Nature Medicine* **2007**; 13:975-80.
- 14 29. Kullberg MC, Jankovic D, Feng CG, et al. IL-23 plays a key role in *Helicobacter hepaticus*-induced T
15 cell-dependent colitis. *The Journal of experimental medicine* **2006**; 203:2485-94.
- 16 30. Morrison PJ, Bending D, Fouser LA, et al. Th17-cell plasticity in *Helicobacter hepaticus*-induced
17 intestinal inflammation. *Mucosal immunology* **2013**; 6:1143-56.
- 18 31. Dong Y, Kaushal A, Brattsand M, Nicklin J, Clements JA. Differential splicing of KLK5 and KLK7 in
19 epithelial ovarian cancer produces novel variants with potential as cancer biomarkers. *Clinical cancer*
20 *research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2003**; 9:1710-20.
- 21 32. Gebhardt C, Nemeth J, Angel P, Hess J. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer.
22 *Biochemical pharmacology* **2006**; 72:1622-31.
- 23 33. Meijer B, Geary RB, Day AS. The role of S100A12 as a systemic marker of inflammation.
24 *International Journal of Inflammation* **2012**; 2012:907078.
- 25 34. Hattinger E, Zwicker S, Ruzicka T, Yuspa SH, Wolf R. Opposing functions of psoriasin (S100A7) and
26 koebnerisin (S100A15) in epithelial carcinogenesis. *Current Opinion in Pharmacology* **2013**; 13:588-
27 94.
- 28 35. Nasser MW, Qamri Z, Deol YS, et al. S100A7 enhances mammary tumorigenesis through
29 upregulation of inflammatory pathways. *Cancer research* **2012**; 72:604-15.
- 30 36. Liu H, Wang L, Wang X, Cao Z, Yang Q, Zhang K. S100A7 enhances invasion of human breast

- 1 cancer MDA-MB-468 cells through activation of nuclear factor-kappaB signaling. World journal of
2 surgical oncology **2013**; 11:93.
- 3 37. Yao R, Lopez-Beltran A, MacLennan GT, Montironi R, Eble JN, Cheng L. Expression of S100 protein
4 family members in the pathogenesis of bladder tumors. Anticancer Research **2007**; 27:3051-8.
- 5 38. Liu B, Sun WY, Zhi CY, et al. Role of S100A3 in human colorectal cancer and the anticancer effect of
6 cantharidinate. Experimental and therapeutic medicine **2013**; 6:1499-503.
- 7 39. Kang M, Lee HS, Lee YJ, et al. S100A3 suppression inhibits in vitro and in vivo tumor growth and
8 invasion of human castration-resistant prostate cancer cells. Urology **2015**; 85:273 e9-15.
- 9 40. Wang X, Yang J, Qian J, Liu Z, Chen H, Cui Z. S100A14, a mediator of epithelial-mesenchymal
10 transition, regulates proliferation, migration and invasion of human cervical cancer cells. American
11 journal of cancer research **2015**; 5:1484-95.
- 12 41. Kizawa K, Takahara H, Unno M, Heizmann CW. S100 and S100 fused-type protein families in
13 epidermal maturation with special focus on S100A3 in mammalian hair cuticles. Biochimie **2011**;
14 93:2038-47.
- 15 42. Donato R, Cannon BR, Sorci G, et al. Functions of S100 proteins. Current molecular medicine **2013**;
16 13:24-57.
- 17 43. Cole AM, Ganz T, Liese AM, Burdick MD, Liu L, Strieter RM. Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC
18 chemokines display defensin-like antimicrobial activity. J Immunol **2001**; 167:623-7.
- 19 44. Hoover DM, Boulegue C, Yang D, et al. The structure of human macrophage inflammatory protein-
20 3alpha /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human
21 beta-defensins. The Journal of biological chemistry **2002**; 277:37647-54.

1 **Table 1.** NF- κ B signaling associated genes upregulated by the CdtB subunit of *Helicobacter hepaticus*

	NF- κ B	HT-29	Huh7
	Regulation	IL1B, TNF	IL1B
	Ligands and Receptors	EGFR, IL1B, IL1R1, TNF	EGFR, IL1B, IL8, TLR1, TLR2, TLR3
	Cytokines & Chemokines	CCL5 (RANTES), CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL10, CSF2 (GM-CSF), IFNB1, IL1B, IL1RN, IL8, LTB, TNF	CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL10, IL1B, IL6, IL8, LTB
	Acute Inflammation	CCL5 (RANTES), IL1B, STAT3	IL1B, IL6
	Other Inflammatory Genes	AGT, CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL10, IL1RN, IL8, TNF	CCR5, CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL10, IL8
NF- κ B targets	Innate Immune Response	IFNB1, TNF	IL6,
	Adaptative Immune Response	ICAM1, IL1B	ICAM1, IL1B
	Other Immunity-Related Genes	IL8, LTB	IL8, LTB
	Type I Interferon-Responsive Genes	ADM, CCL5 (RANTES), CXCL9, CXCL10, IL1RN, NCOA3	CXCL9, CXCL10, IRF1
	Stress Response	ADM, IL1B, PLAUI, TNF	IL1B
	NF- κ B signaling transcription factors	RELB	NFKB2, RELB
	Cytoplasmic sequestering/releasing of NF- κ B	BCL3, NFKBIE	NFKBIE

1 NF- κ B signaling associated genes whose upregulation was found/statistically significant using the microarray ($p < 0.01$) and RT-qPCR ($p < 0.05$)
2 analyses. Complete methods and corresponding histograms are presented in Fig. 4.

3 The colors refer to gene categories: Chemokines & Receptors, Cytokine Production Signaling Molecules, Growth Factors & Receptors, Interferon
4 Signaling, Interleukins & Receptors, NF- κ B pathway, Other NF- κ B, TGF β Superfamily, Toll-Like Receptor Signaling, Transcription Factors.

5

6 Gene abbreviations: ADM, adrenomedullin; AGT, angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8); BCL, B-cell lymphoma/leukemia; CCL,
7 CC-chemokine ligand; CCR, CC-chemokine receptor; CSF2, colony stimulating Factor 2 (Granulocyte-Macrophage); CXCL, CXC-chemokine ligand,
8 EGFR, epidermal growth factor receptor; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1 (CD54); IFN β 1, interferon beta 1; IL, interleukin; IL-R, interleukin
9 receptor; IRF, interferon regulatory factor; LTB, lymphotoxin beta (tumor necrosis factor C); NCOA3, nuclear receptor coactivator 3; NFKB2, nuclear factor-
10 kappa-B p100 subunit; NFKBIE, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer; PLAU, plasminogen activator, urokinase; RELB, v-rel avian
11 reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B; STAT, signal transducer and activator of transcription; TLR, toll-like receptor; TNF, tumour necrosis factor.

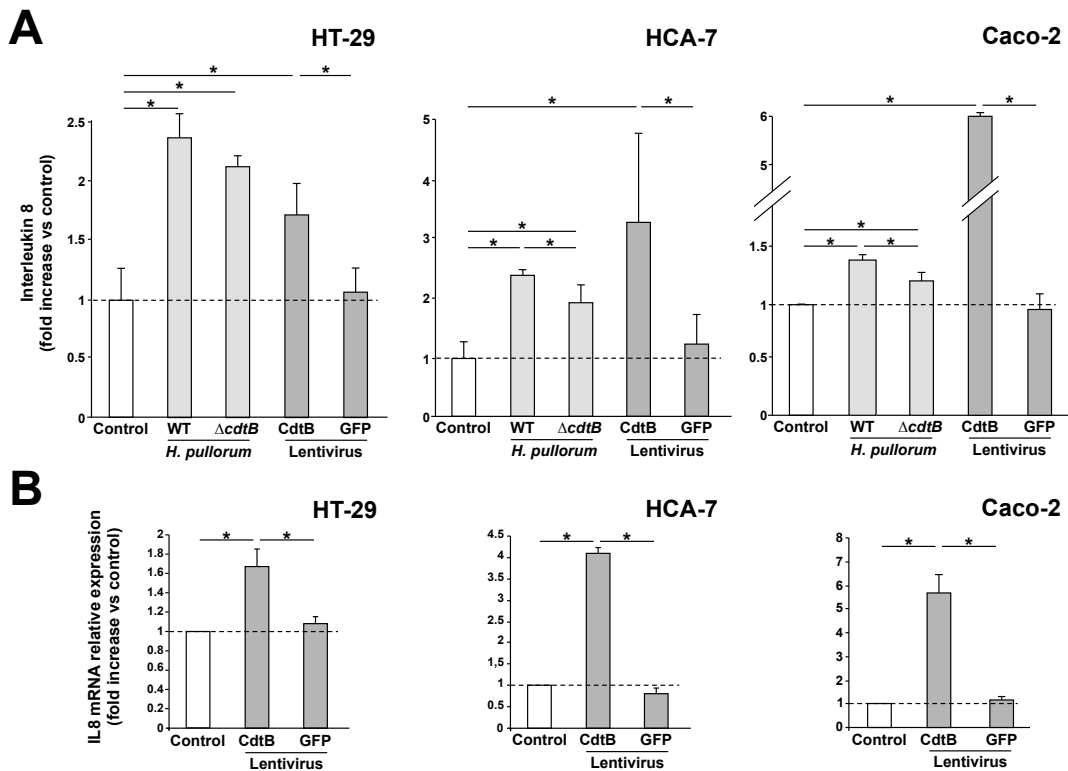


Figure 1. Effects of the cytolethal distending toxin of *Helicobacter pullorum* on interleukin 8 expression in human intestinal epithelial cells.

A) Quantification of IL8 secretion on HT-29, HCA-7 and Caco-2 cell culture supernatants under basal conditions (control, white) and after a 72 h coculture with *H. pullorum* strain H495 (CCUG 33840) and its corresponding isogenic *cdtB* mutant (*DcdtB*) or after a 72 h transduction with lentiviral particles expressing the CdtB of *H. pullorum* strain H495 or the enhanced green fluorescent protein (GFP).

B) Expression of IL8 gene in intestinal epithelial cells HT-29, HCA-7 and Caco-2 after a 72 h transduction with lentiviral particles expressing the CdtB of *H. pullorum* strain H495 or the GFP. The expression of the IL8 gene was measured by real time quantitative RT-qPCR and normalized relative to the reference gene.

The relative expression rate of IL8 protein and gene in response to the CdtB was reported as a fold increase versus cells cultured without *H. pullorum* or lentiviral particles. Results are the means of three independent experiments, each performed in triplicate. The discontinuous line shows the basal rate in control cells.

WT, *H. pullorum* strain H495 (CCUG 33840) = wild type strain

DcdtB, *cdtB* isogenic mutant of *H. pullorum* strain H495

CdtB, CdtB of *H. pullorum* strain H495

GFP, enhanced green fluorescent protein

*: $p < 0.05$.

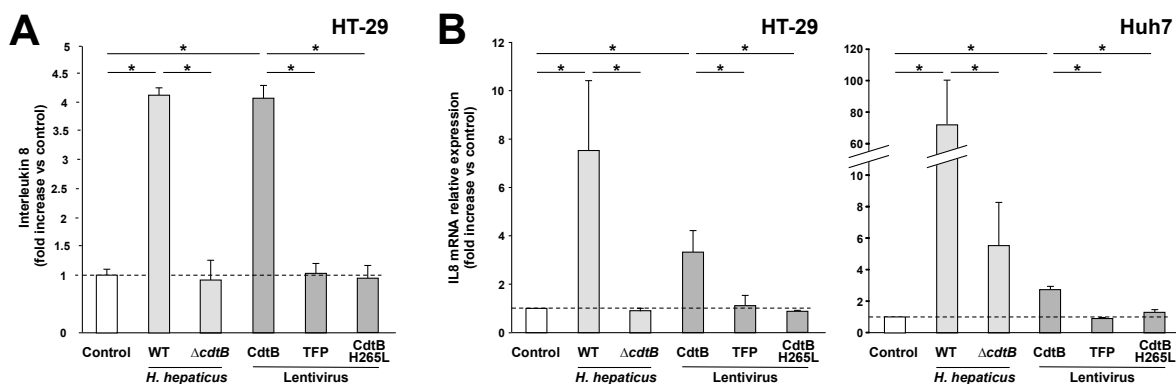


Figure 2. Effects of the cytolethal distending toxin of *Helicobacter hepaticus* on interleukin 8 expression in human epithelial cells.

A) Quantification of IL8 secretion on HT-29 cell culture supernatants under basal conditions (control, white) and after a 72 h coculture with *H. hepaticus* strain 3B1 (CCUG 44777) and its corresponding isogenic *cdtB* mutant (*DcdtB*) or after a 72 h transduction with lentiviral particles expressing the CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1 or the tdTomato fluorescent protein (TFP).

B) Expression of IL8 gene in HT-29 intestinal cells and Huh7 hepatic cells after a 72 h incubation under basal conditions (control, white) and after a 72 h coculture with *H. hepaticus* strain 3B1 and its corresponding *DcdtB* or after a 72 h transduction with lentiviral particles expressing the TFP, the CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1 and the CdtB with the H265L mutation of *H. hepaticus* strain 3B1. The expression of the IL8 gene in cells was measured by real time quantitative RT-qPCR and normalized relative to the reference gene.

The relative expression rate of the IL8 protein and gene in response to CdtB was reported as a fold increase versus cells cultured without *H. hepaticus* or lentiviral particles. Results are the means of three independent experiments, each performed in triplicate. The discontinuous line shows the basal rate in control cells.

WT, *H. hepaticus* strain 3B1 (CCUG 44777) = wild type strain

DcdtB, *cdtB* isogenic mutant of *H. hepaticus* strain 3B1

CdtB, CdtB (*H. hepaticus* strain 3B1)

CdtB H265L, *H. hepaticus* CdtB with the mutation His→Leu at residue 265 involved in DNase activity.

TFP, tdTomato fluorescent protein

*: $p < 0.05$ versus control.

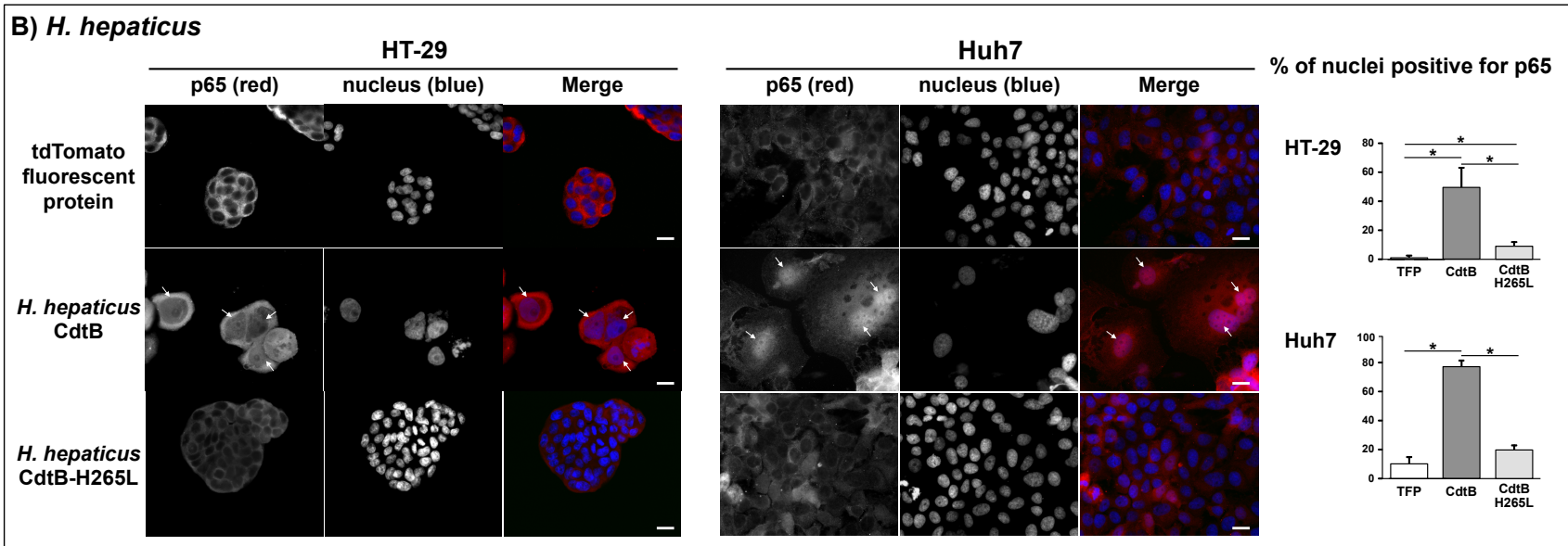
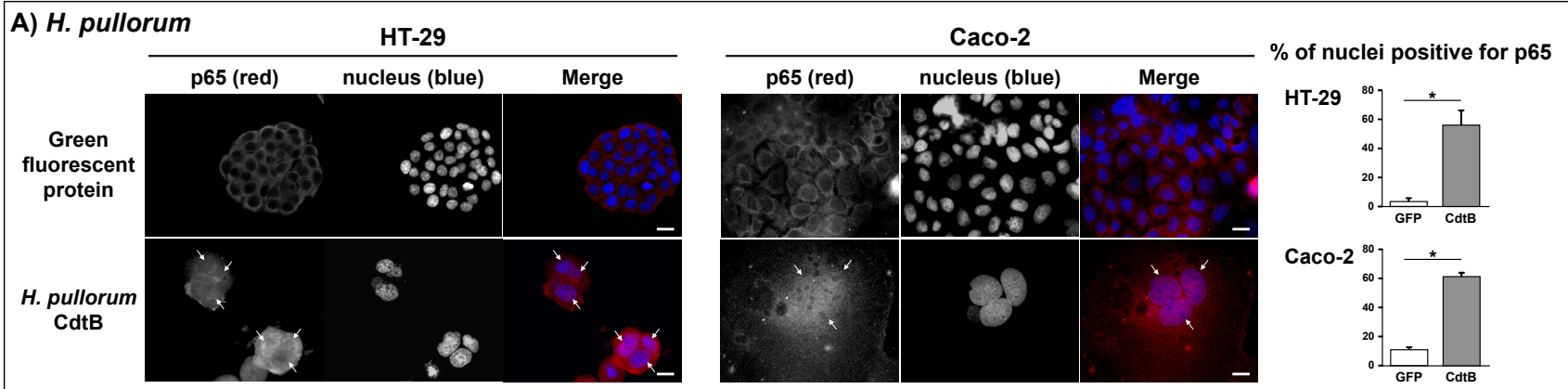


Figure 3. Nuclear translocation of the p65 subunit of NF- κ B in intestinal and hepatic epithelial cells in response to the CdtB of *Helicobacter pullorum* and *Helicobacter hepaticus*. After 72 h of transduction experiments, HT-29, Caco-2 and Huh7 cells were processed for fluorescent staining with DAPI to detect the nucleus (blue) and polyclonal antibodies generated against NF- κ B p65 associated with fluorescent labelled-secondary antibodies (red). The percentage of cells with translocated NF- κ B p65 in the nucleus was determined after immunostaining and subsequent counting. Data represent the mean of double counts in one representative experiment out of 4.

A) Fluorescence staining and percentage of HT-29 cells and Caco-2 cells with translocated NF- κ B p65 in the nucleus after transduction with lentiviral particles expressing the green fluorescent protein (GFP) or the CdtB of *H. pullorum* strain H495.

B) Fluorescence staining and percentage of HT-29 cells and Huh7 cells with translocated NF- κ B p65 in the nucleus after transduction with lentiviral particles expressing the tdTomato fluorescent protein (TFP), the CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1 and the CdtB with the H265L mutation of *H. hepaticus* strain 3B1.

Arrows point to p65 co-localization with the nucleus.

*, $p < 0.05$,

White bar, 10 μ m.

CdtB, CdtB of *H. pullorum* or *H. hepaticus*.

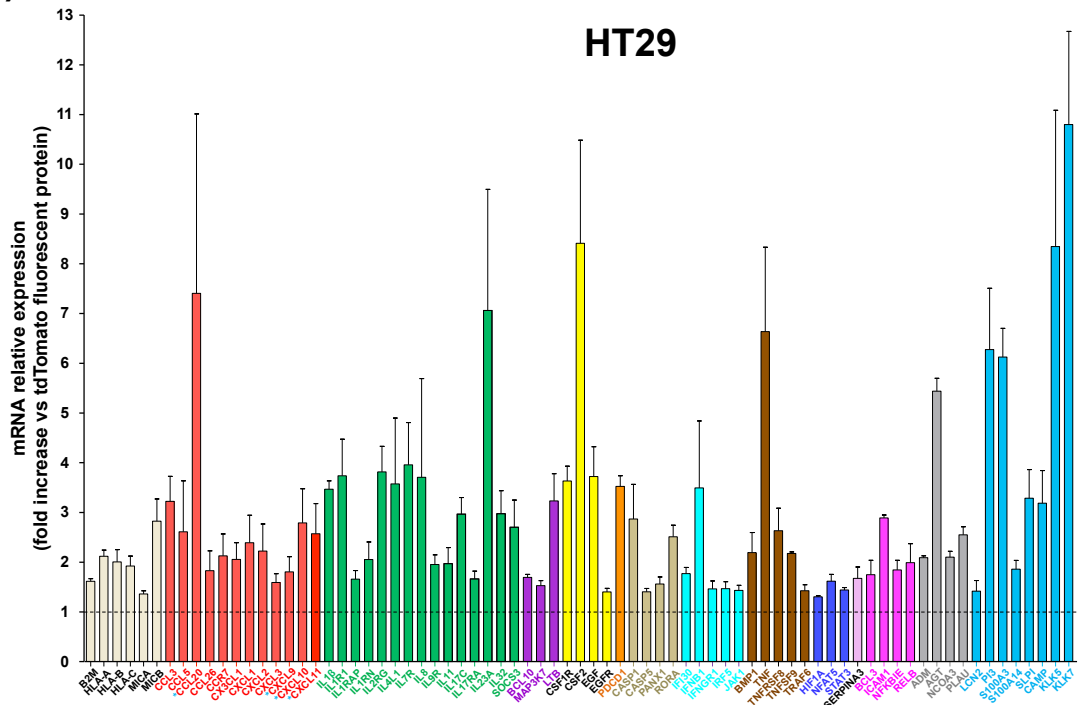
CdtB H265L, *H. hepaticus* CdtB with the mutation His \rightarrow Leu at residue 265 involved in DNase activity.

DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindol.

GFP, enhanced green fluorescent protein.

TFP, tdTomato fluorescent protein.

A)



B)

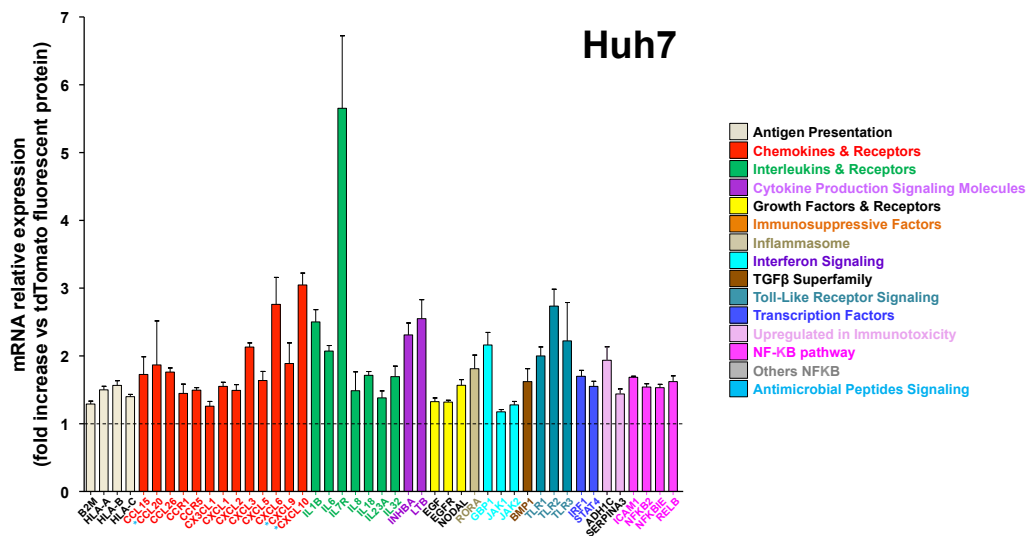


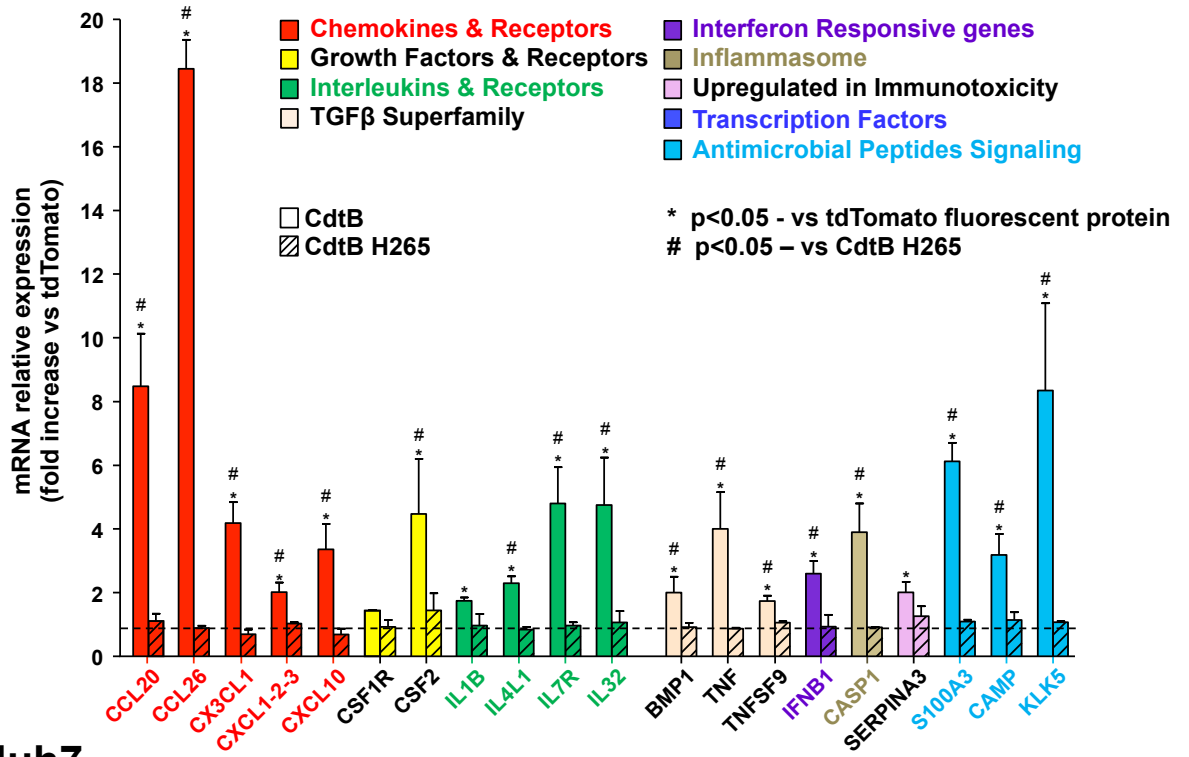
Figure 4. Microarray-based identification of differentially expressed inflammatory associated genes in response to *Helicobacter hepaticus* CdtB in epithelial cells.

The expression of genes was determined in HT-29 intestinal cells (**A**) and Huh7 hepatic cells (**B**) using the Human GE 4x44K v2 Microarray Kit (Agilent Technologies) after a 72 h transduction of with lentiviral particles expressing the CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1 versus the tdTomato fluorescent protein. The relative expression rate of genes in response to CdtB was reported as a fold change versus cells cultured with lentiviral particles expressing the tdTomato fluorescent protein. These significant results are the means of four independent transduction experiments. The discontinuous line shows the basal rate in cells expressing the tdTomato fluorescent protein.

*These chemokines act also as antimicrobial products involved in epithelial cell defense [43, 44].

Gene abbreviations: ADH1C, alcohol dehydrogenase 1C; ADM, adrenomedullin; AGT, angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8); B2M, β -2-microglobulin; BCL, B-cell lymphoma/leukemia; BMP1, bone morphogenetic protein 1; CAMP, cathelicidin antimicrobial peptide; CASP, apoptosis-related cysteine peptidase; CCL, CC-chemokine ligand; CCR, CC-chemokine receptor; CSF1R, colony stimulating factor 1 receptor; CSF2, colony stimulating Factor 2 (Granulocyte-Macrophage); CXCL, CXC-chemokine ligand; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; GBP1, guanylate binding protein 1; HIF1A, hypoxia-inducible factor 1-alpha subunit; HLA, human leukocyte antigen; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1 (CD54); IFI30 interferon, gamma-inducible protein 30; IFNGR1, interferon gamma receptor 1; IFN β 1, interferon beta 1; IL, interleukin; IL-R, interleukin receptor; IL4L1, interleukin 4 induced 1; INHBA, inhibin beta A; IRF, interferon regulatory factor; JAK, Janus kinase; KLK, kallikrein; LCN2, lipocalin 2; LTB, lymphotoxin beta (tumor necrosis factor C); MAP3K7, Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7; MHC, major histocompatibility complex; MICA and MICB, MHC class I polypeptide-related sequence A and B; NCOA3, nuclear receptor coactivator 3; NFAT5, nuclear factor of activated T-cells 5; NFKB2, nuclear factor-kappa-B p100 subunit; NFKBIE, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer; NODAL, nodal growth differentiation factor; PANX1, pannexin 1; PDCD1, programmed cell death 1; PLAU, plasminogen activator, urokinase; RELB, v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B; RORA, RAR-related orphan receptor A; S100A, S100 calcium-binding protein A; SERPINA3, serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin); SLPI, secretory leukocyte protease inhibitor; SOCS3, suppressor of cytokine signaling 3; STAT, signal transducer and activator of transcription; TLR, toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor; TNFRSF8, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8; TNFSF9, tumor necrosis factor ligand superfamily member 9; TRAF 6, TNF receptor-associated factor 6.

A) HT-29



B) Huh7

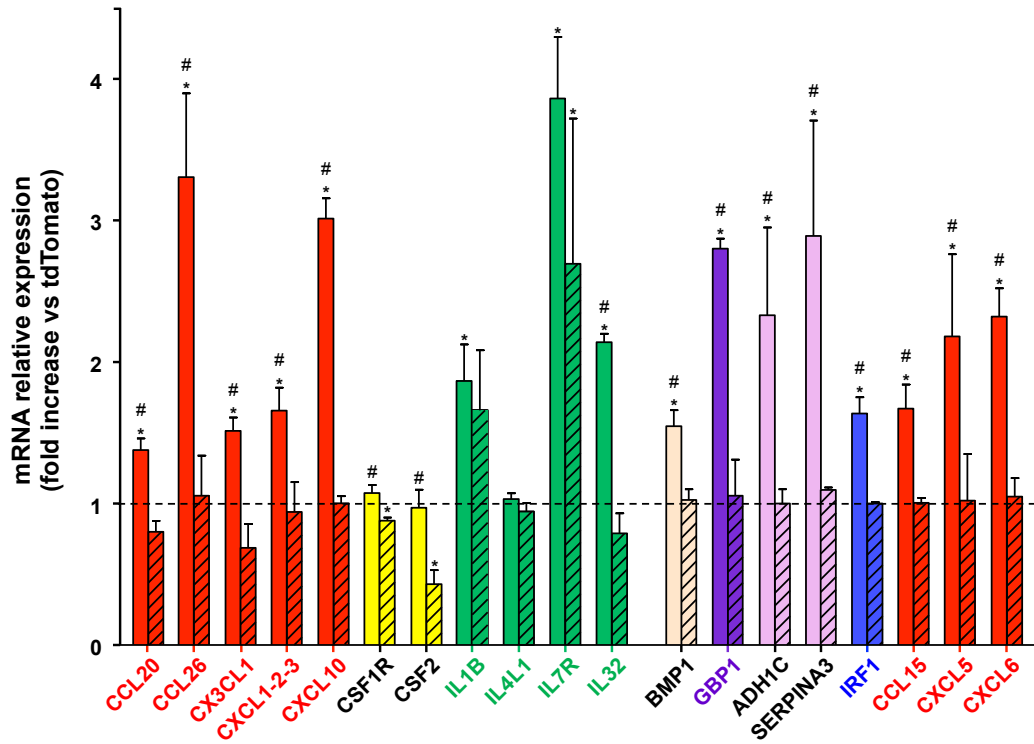


Figure 5. Effect of the DNase activity of CdtB on the expression of proinflammatory genes.

The relative expression of inflammatory genes was quantified using quantitative real time RT-qPCR in intestinal epithelial cells HT-29 **(A)** and hepatic epithelial cells Huh7 **(B)** after a 72 h transduction with lentiviral particles expressing the tdTomato fluorescent protein, the CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1 and the CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1 with the H265L mutation. The relative expression rate of genes in response to the CdtB or the CdtB-H265 was reported as a fold change versus cells cultured with lentiviral particles expressing the tdTomato fluorescent protein. Results are the means of three independent experiments, each performed in triplicate. The discontinuous line shows the basal rate in cells expressing the tdTomato fluorescent protein.

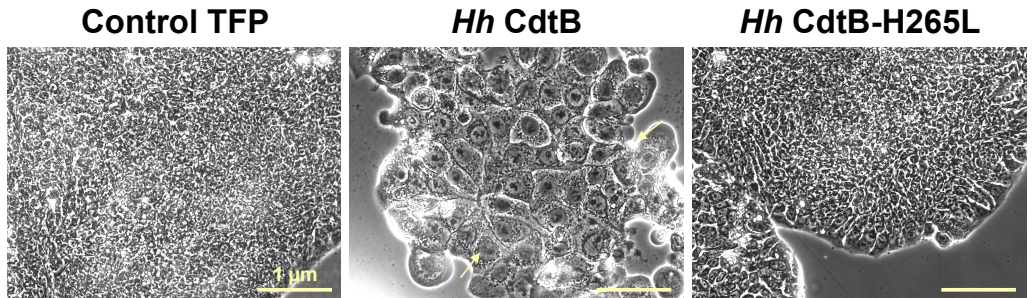
Empty and hatched histograms represent fold change obtained in response to the CdtB subunit of *H. hepaticus* strain 3B1 and its corresponding DNase mutated protein (His→Leu mutation at residue 265), respectively.

CdtB, CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1.

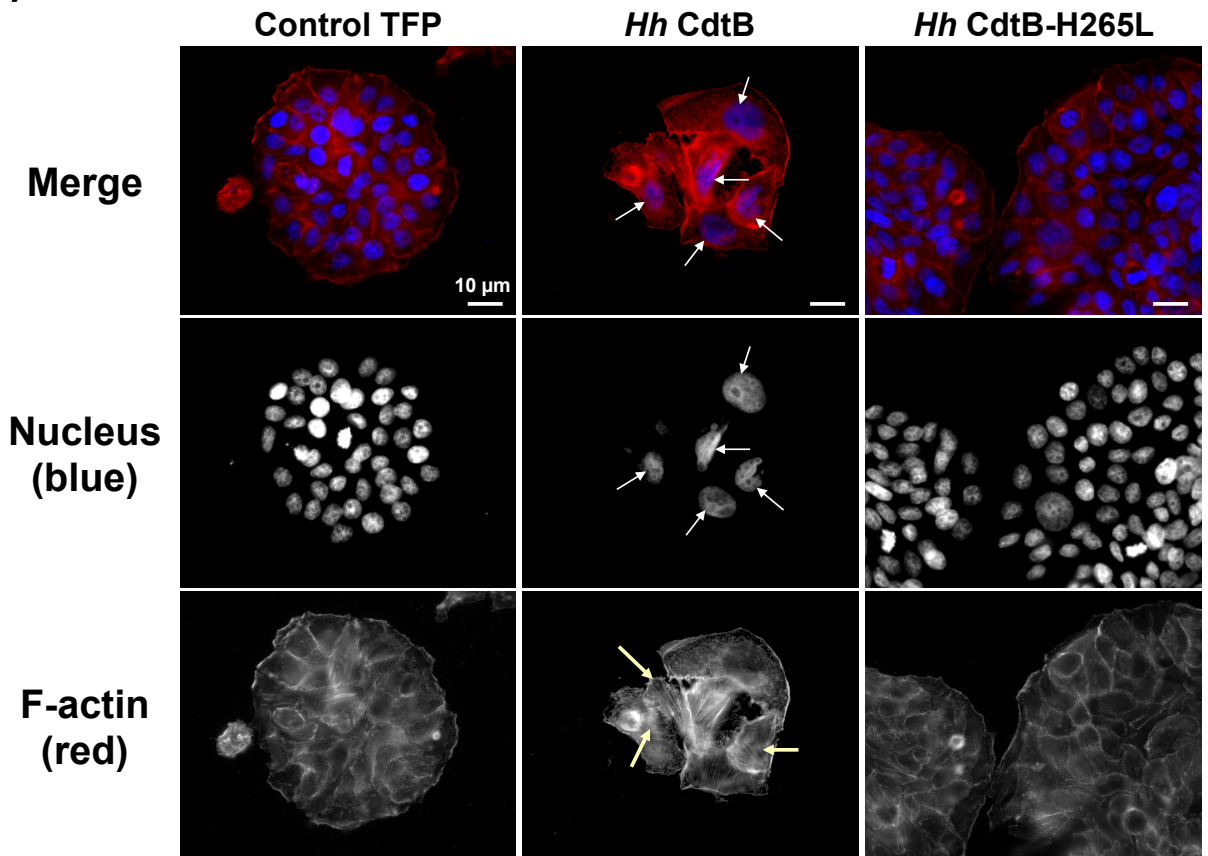
CdtB H265L, *H. hepaticus* CdtB with the mutation His→Leu at residue 265 involved in DNase activity.

Gene abbreviations: ADH1C, alcohol dehydrogenase 1C ; BMP1, bone morphogenetic protein 1 ;CAMP, cathelicidin antimicrobial peptide; CASP, apoptosis-related cysteine peptidase; CCL, CC-chemokine ligand; CSF1R, colony stimulating factor 1 receptor; CSF2, colony stimulating Factor 2 (Granulocyte-Macrophage); CXCL, CXC-chemokine ligand ;GBP1, guanylate binding protein 1 ; IFNβ1, interferon beta 1 ; IL1B, interleukin 1β; IL4L1, interleukin 4 induced 1 ;IRF, interferon regulatory factor ;KLK, kallikrein ; S100A, S100 calcium-binding protein A ; SERPINA3, serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin) ;TNF, tumor necrosis factor ;TNFSF9, tumor necrosis factor ligand superfamily member 9.

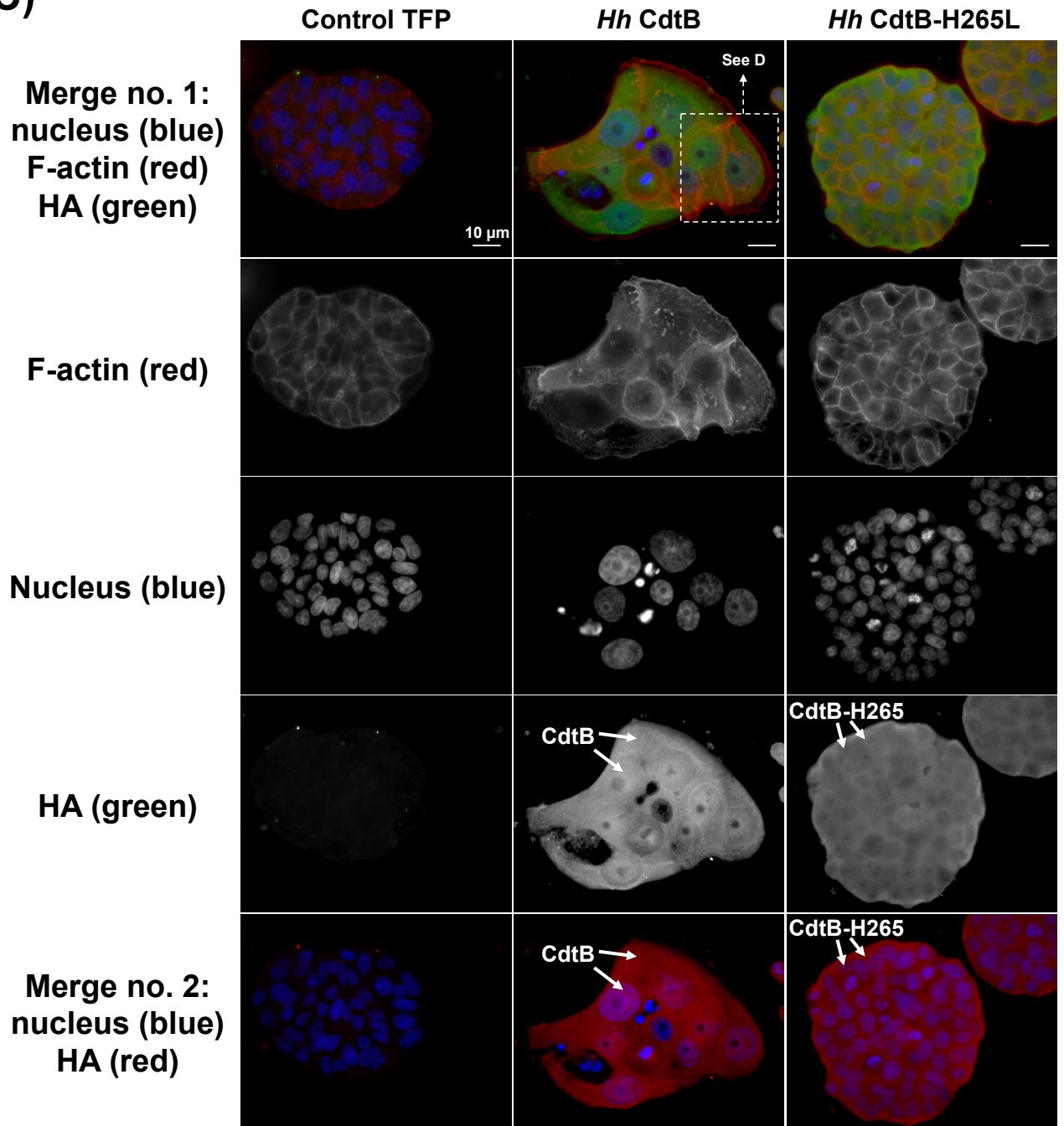
A)



B)



C)



D)

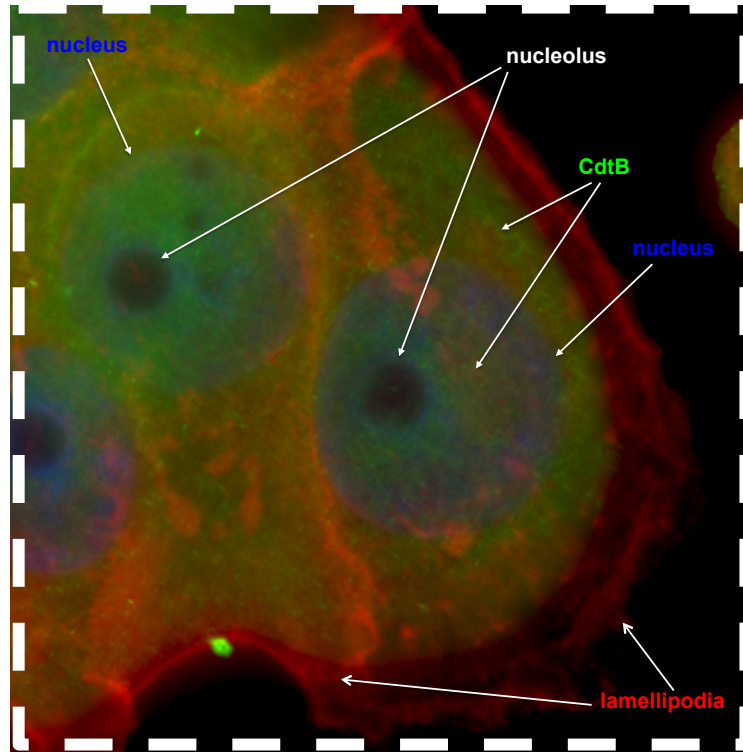


Figure S1. Effects of *Helicobacter hepaticus* CdtB on the cytoskeleton of HT-29 cells.

HT-29 cells were transduced for 72 h with lentiviral particles expressing the tdTomato fluorescent protein (TFP), the CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1 (CdtB) or the CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1 with the H265L mutation (CdtB-H265).

(A) HT-29 cells were observed by phase contrast microscopy. Scale bar, 1 μ m.

(B) HT-29 cells were processed for fluorescent staining with DAPI to detect the nucleus (blue) and fluorescent labelled-phalloidin to detect F-actin (red). The white thin arrows indicate enlarged HT-29 cells with distended nuclei or multinucleated and the yellow thick arrows point to actin stress fiber structures. Scale bar, 10 μ m.

(C) HT-29 cells were processed for fluorescent staining with DAPI to detect the nucleus (blue) and fluorescent labelled-phalloidin to detect F-actin (red). As *cdtB* sequences are fused at their 3' end to three repeats of the human influenza hemagglutinin (HA) epitope, additional immunostaining with primary anti-HA antibody followed by fluorescent labelled-secondary antibodies (green or red in merge no. 2) was used to detect the HA-tagged CdtB and CdtB-H265. Arrows shows the CdtB-3HA in the nuclei. Scale bar, 10 μ m.

(D) enlargement of cells expressing the HA-tagged CdtB boxed in (C). Arrows indicate the CdtB-3HA in the cytoplasm and in the nucleus but not in the nucleolus, as well as enlarged lamellipodia. Scale bar, 10 μ m.

CdtB, CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1.

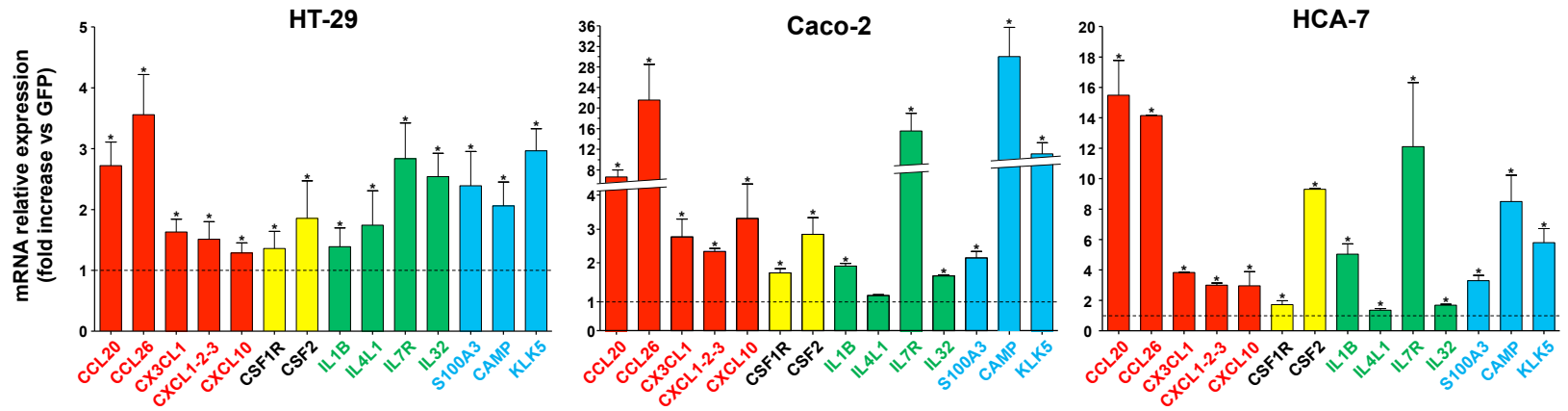
CdtB-H265, *H. hepaticus* CdtB with H265L mutation.

DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindol.

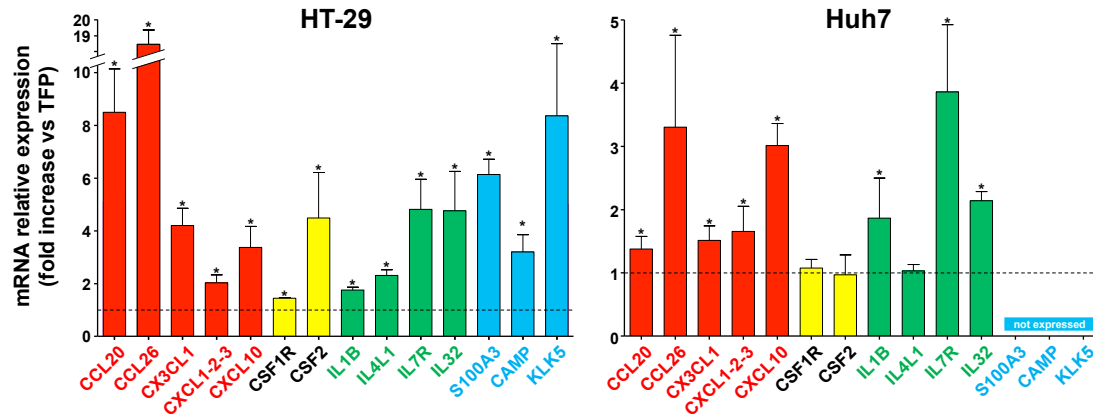
Hh, *H. hepaticus*.

TFP, tdTomato fluorescent protein.

A) *H. pullorum*



B) *H. hepaticus*



* $p < 0.05$ vs GFP (A) or TFP (B)

- Chemokines & Receptors
- Growth Factors & Receptors
- Interleukins & Receptors
- Antimicrobial peptides pathway

Figure S2. Validation of proinflammatory gene upregulation in human epithelial cells in response to cytolethal distending toxin subunit B.

A) The relative expression of selected genes was quantified using quantitative real time RT-PCR in intestinal epithelial cells HT-29, Caco-2 and HCA-7 after a 72 h transduction with lentiviral particles expressing the CdtB of *H. pullorum* versus the green fluorescent protein.

B) The relative expression of selected genes was quantified using quantitative real time RT-PCR in intestinal epithelial cells HT-29 and Huh7 hepatic cells after a 72 h transduction with lentiviral particles expressing the CdtB of *H. hepaticus* versus the tdTomato fluorescent protein.

The relative expression rate of genes in response to the CdtB was reported as a fold change versus cells cultured with lentiviral particles expressing the fluorescent protein. Results are the means of three independent experiments, each performed in triplicate. The discontinuous line shows the basal rate of gene expression by cells cultured with lentiviral particles expressing the control fluorescent protein.

CAMP, KLK5, KLK7 and S100A3 are not expressed in Huh7 cells under basal conditions. *, $p < 0.05$ vs the green fluorescent protein (A) or the tdTomato fluorescent protein (B).

1 SUPPLEMENTARY MATERIALS & METHODS

2 Reagents and antibodies

3 Alexa 488-labeled secondary antibodies and 4',6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI) were
4 purchased from Molecular Probes (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Polyclonal
5 antibodies generated against NF- κ B p65 (clone C20) were from Santa Cruz Biotechnology
6 (Santa Cruz, California, USA).

8 Construction of the plasmids used for the lentivirus production

9 The *cdtB* gene of *H. pullorum* strain CCUG 33840 fused at its 3' end to three repeats of the
10 influenza hemagglutinin epitope (GenBank accession number: JX434689) was cloned into the
11 pLVTHM lentiviral vector instead of the enhanced Green Fluorescent Protein (GFP) gene initially
12 present in this vector [22].

13 The *cdtB* sequence and the corresponding mutated *cdtB* sequence (A→T transversion at
14 nucleotide 794 [1]) of *H. hepaticus* strain 3B1 fused at their 3' end to three repeats of the human
15 influenza hemagglutinin (HA) epitope (*cdtB*-3HA, GenBank accession numbers: KT590046 and
16 KT590047, respectively) were cloned into the p252 lentiviral plasmid (p252=pRRLsin-MND-
17 MCS-hPGK-tdTomato-WPRE supplied by the Structure Fédérative de Recherche TransBioMed,
18 University of Bordeaux, France). The *cdtB*-3HA sequences were amplified by PCR using primers
19 (5'-GCTAGCGTTTAAACCCCGGGATGAGAATACTATTATGCTTTTTA-3' and 5'-
20 TTAATTAAACTAGTTTAAGCGTAATCTGGAACG-3') containing the restriction sites *NheI* and
21 *PacI* (underlined in the primers) from the multiple cloning site of the p252. The 961-bp PCR
22 product was first subcloned into the pGEM-T easy vector System I (Promega, Charbonnières-
23 les-Bains, France). After sequence verification, plasmids from positive clones were extracted
24 using a QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen SAS, Courtaboeuf, France). The pGEM-T-*cdtB*
25 plasmid was digested by the *NheI* and *PacI* restriction endonucleases (New England Biolabs,
26 Evry, France). After migration on a 1% agarose gel, the DNA fragment of interest was recovered

1 using a NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (MACHEREY-NAGEL, Hoerdt, France). Similarly,
2 the p252 plasmid was digested by *NheI* and *PacI* restriction endonucleases and purified. The
3 ligation of the *cdtB*-3HA sequence into the p252 was conducted overnight at 4°C using a molar
4 ratio insert/vector of 3 with 400 U of T4 DNA ligase (Promega) in a final volume of 10 µl.
5 Transformation of the *Escherichia coli* ElectroMAX™ Stbl4™ Competent Cells (Invitrogen) was
6 achieved with 1 µl of the ligation mixture, according to the manufacturer's recommendations.
7 After a maximum of 16 h of incubation on agarose plates supplemented with 100 µg/ml
8 ampicillin at 37°C, the plasmids were extracted using the QIAprep Spin Miniprep kit and
9 digested by several restriction endonucleases (*BamHI*, *EcoRI*, *NotI*, *SmaI* and *SspI*) to verify the
10 absence of recombination events frequently observed when using unstable vectors. The
11 sequence was finally verified using external primers designed from the p252 (5'-
12 GCTCAATAAAAGAGCCCACAA-3' and 5'-AGGGCTGCCTTGGAAAAG-3') and with internal
13 primers designed on the *H. hepaticus cdtB* gene (5'-AGCAAGAAGGGTGAATCTCG-3' and 5'-
14 TCATTGCCGATACGAATACC-3'). The plasmids were stored at -20°C. As the transformed cells
15 cannot be preserved, new transformations of the ElectroMAX™ Stbl4™ Competent were
16 performed prior to each maxi-preparation of plasmid with the NucleoBond Xtra Maxi EF kit
17 (MACHEREY-NAGEL) with the verifications previously described (digestions and sequencing).

18

19 **Lentivirus particle production**

20 The pLVTHM-GFP, pLVTHM-CdtB, p252-tdTomato and p252-CdtB lentiviral vectors were used
21 for stable cellular integration of the GFP, tdTomato fluorescent protein, *H. pullorum cdtB*-3HA,
22 and *H. hepaticus cdtB*-3HA were produced by the service platform for lentiviral vector production
23 of the Structure Fédérative de Recherche TransBioMed of the University of Bordeaux, as
24 previously described [22]. Viral titers of lentiviruses were determined by measuring the p24
25 antigen level [22].

26

27 **Interleukin 8 measurement.**

1 For IL8 measurements, 2×10^4 cells per well were seeded in 24-well plates. On the next day,
2 bacteria were collected in brucella broth and the optical density adjusted to 0.6. The bacterial
3 suspension was added directly to cells or after a 2 h incubation period under optimal bacterial
4 culture conditions and filtration to remove bacteria (0.2 μm pore size, Millex, Millipore, Molsheim,
5 France). For some coculture experiments, bacteria were seeded on semipermeable tissue
6 culture inserts (0.2 μm pore size, Anopore, Nunc, Naperville, IL, USA) fitted into culture wells
7 containing epithelial cells. After a 72 h coculture time, supernatants were collected and
8 centrifuged 10 min at 5,000 g to clarify supernatants which were aliquoted and stored at -80°C
9 for further analysis.

10 IL8 levels were determined in thawed supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay
11 using the D8000C kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's
12 instructions on an ETIMax-3000 reader (DiaSorin, Saluggia, Italy). In these assays, the lower
13 and upper limits of detection were 5 and 4,500 pg/ml, respectively.

14

15 **Immunofluorescence and image analysis**

16 Cell cultures were grown on glass coverslips. When needed, coverslips were mounted on
17 microscope slides with Fluoromount-G (Clinisciences SA, Montrouge, France) and treated as
18 previously reported [16] with minor modifications. NF- κB nuclear translocation was analyzed by
19 immunostaining with polyclonal antibodies generated against NF- κB p65 (dilution 1/100, C-20,
20 Santa Cruz Biotechnology). Double-colour imaging with DAPI compound and Alexa 488-labelled
21 secondary antibodies was obtained using selective laser excitation at 405 and 488 nm,
22 respectively.

23

24 **RT-PCR experiments and quantification of the expression of the genes.**

25 HT-29, Caco-2, and HCA-7 and Huh7 were seeded in 6 well plates at a density of 1×10^5
26 cells/well for 24 h. After 72 h of transduction, cells were washed with serum-free medium and
27 total RNA from cells were extracted with the miRNeasy Mini Kit (Qiagen). The quality and

1 concentration of the purified RNA was verified by optical density. The absence of residual DNA
2 in the samples was verified by real time PCR targeting the glyceraldehyde 3-phosphate
3 dehydrogenase gene (GAPDH) under the PCR conditions described below with the forward (5'-
4 GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3') and reverse primers (5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3').
5 Extracted RNA were kept at -80°C until use.

6 Reverse transcription of total RNA (until 2 µg) into cDNA was achieved using the High Capacity
7 cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) following the
8 manufacturer's recommendations.

9 Real time PCRs for the target and reference (HPRT1 and TBP) cDNA were performed
10 simultaneously under the conditions described below.

11 Each cDNA from untransduced and transduced cells was analyzed in triplicate by real time PCR
12 in a 96-well plate using the LightCycler 480 (Roche Diagnostics). For each PCR, 18 µl of PCR
13 mixture containing 10 ng cDNA per PCR reaction and 12.5 µl of SYBR Green PCR Master Mix
14 (Applied Biosystems) were used per well. Then, 2 µl of forward and reverse primers were added
15 in different wells to a 1 µM final concentration. cDNA was amplified using the following cycling
16 parameters: heating at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of a three-stage temperature
17 profile of 95°C for 10 s, 60°C for 15 s and 72°C for 30 s. At the end of the PCR, a melting step
18 was performed to verify the presence of a single peak at the expected melting temperature
19 confirming the specificity of the PCR and the absence of primer dimers. The option "Absolute
20 Quantification" was chosen for the calculation of threshold cycles (Ct). For each gene, the PCR
21 efficiency (E) was checked using dilutions of the sample to obtain a standard straight line and
22 calculated from the slope of the standard straight line (p) with the following equation:

$$23 \quad E = 10^{-1/p}.$$

24 The relative quantification of expression of the target gene was determined according to that of
25 the HPRT1 and TBP genes used as a reference. The Ct values obtained were used to calculate
26 a ratio with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [14]. For the relative quantification of the target gene, the ratio $2^{-\Delta\Delta Ct}$
27 was calculated from the following equation and was standardized with the HPRT1 gene:

1 $\Delta\Delta Ct = Ct (\text{target gene} - \text{reference gene})_{\text{reference cells}} - Ct (\text{target gene} - \text{reference gene})_{\text{target cells}}$

2

3 **Statistical analysis for real time RT-PCR experiments and quantification**

4 Statistical analysis (ELISA, RT-PCR and NF- κ B nuclear translocation) were performed using
5 GraphPad Prism version 5 (GraphPad software, San Diego, California, USA). The results are
6 presented as the mean \pm standard deviation. The means were compared with non-parametric
7 test; Mann-Whitney- Wilcoxon for comparison between two groups. A difference was considered
8 significant when p was less than 0.05.

9

10 **Transcriptomics**

11 The global analysis of the expression of human genes in response to the CdtB of *H. hepaticus*
12 was quantified using the Human GE 4x44K v2 Microarray Kit (Agilent Technologies Les Ulis,
13 France).

14 Total RNA was extracted with the miRNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the
15 manufacturers protocols. Cyanine-3 (Cy3) labeled cRNA was prepared from 0.2 μ g RNA using
16 the One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis kit (Low Input Quick Amp Labeling,
17 Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions, followed by RNAeasy
18 column purification (Qiagen). Dye incorporation and cRNA yield were checked with a NanoDrop
19 2000 Spectrophotometer. For each sample, a total of 1.65 μ g of cRNA were fragmented and
20 hybridized overnight at 65°C onto Human Gene Expression v2 4x44k Microarray (Agilent
21 Technologies). The slides were washed as recommended by the manufacturer, and scanned on
22 a Agilent G2565CA scanner, at 5 microns resolution and using the 20-bit scan mode (Agilent
23 Technologies). Images were processed with Feature extraction (version 10.7).

24 Statistical and bioinformatic analyses. Data were normalized for inter-array comparisons and
25 analyzed using the BRB-ArrayTools package (version 4.2.0, <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>). As recommended by Agilent, we chose the percentile method for the
26 normalization, and adjusted the 75th percentile of all of the non-control probes to a value of 500.
27

1 We identified genes that were differentially expressed among the two groups using a random-
2 variance t-test (Class Comparison Between groups of arrays Package, BRB-ArrayTools). Gene
3 expression differences were considered statistically significant if they showed $\geq 30\%$ difference in
4 mean expression levels between samples from CdtB versus control conditions (tdTomato
5 fluorescent protein), and if their associated p-value was < 0.01 .

6

1 **TABLE S1. Primers designed for the present study**

Primer names	Primer sequences (5' → 3')	GenBank accession numbers	Agilent probe names
Reference			
genes			
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1			
F2-HPRT1	TGGTCAGGCAGTATAATCCA	NM_000194.2	NDP
R2-HPRT1	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT		
TATA-box-binding protein			
hTBP-for	GGGCATTATTTGTGCACTGAGA	NM_003194.4	NDP
hTBP-rev	GCCCAGATAGCAGCACGGT		
Target genes			
F-ADH1C-P	CCTGCTTCGCTCTGGAAAGA	NM_000669.4	A_23_P81158
R-ADH1C-P	CAAGGGAAGGCATCTGTATTGTT		
F-BMP1	TGGCCCCCACCAGTAC	NM_001199.3	A_24_P129417
R-BMP1-P	CATTGCCCTCTGTCTCAAAGAA		
F-CAMP-P	GAGAAGATTGGCAAAGAGTTTAAAAGA	NM_004345.4	A_23_P253791
R-CAMP-P	GGGTACAAGATTCCGCAAAAAA		
F-CASP1-P	GAATATGCCTGTTCTGTGATGTG	NM_033292.3	A_23_P202978
R-CASP1-P	TCTGGCTGCTCAAATGAAAATC		
F-CCL3	CCAAAGCCACCAGACTGACA	NM_002983.2	A_33_P3316273
R-CCL3-P	GCCGATCACAGCCCTGAA		
F-CCL5-P	TGGAGATGAGCTAGGATGGAGAGT	NM_002985.2	A_23_P152838
R-CCL5-P	GCAAGCAGAAACAGGCAAATT		
F-CCL15	AGTTCAGGATTGCATGAAAAAGC	NM_032965.5	A_33_P3324004
R-CCL15-P	GCTGGCCTCTTTTGTCTCTTTATT		
F1-CCL20-P	TGGCTTTTCTGGAATGGAATTG	NM_004591.2	A_23_P17065

R1-CCL20	CTCCAACCCCAGCAAGGTT		
F1-CCL26-P	CCCAGCGGGCTGTGATAT	NM_006072.4	A_23_P215484
R1-CCL26-P	TCCTTGGATGGGTACAGACTTTC		
F1-CSF1R	CCAAGCAGGAAGCACAAACTC	NM_005211.3	A_23_P110791
R1-CSF1R-P	CCCACGGCGTGA CTGTTAGT		
F1-CSF2	CCAACCCCGGAAACTTCCT	NM_000758.3	A_23_P133408
R1-CSF2-P	AAAGTCCTTCAGGTTCTCTTTGAAAC		
F1-CX3CL1	CCAAGAAGCCCAGGAAAGG	NM_002996.3	A_24_P390495
R1-CX3CL1-P	TGCAGGAGTCTCTGAAGAAGCA		
F1-CXCL1- P3330264	CCACTGCGCCCAAACC	NM_001511.3	A_33_P3330264
R1-CXCL1- P3330264	GCAAGCTTTCGCCCATT		
F1-CXCL2- P257416	CCACTGCGCCCAAACC	NM_002089.3	A_24_P257416
R1-CXCL2- P257416	GAGACAAGCTTTCTGCCCATTC		
F-CXCL3	TTGACTATTTCTTACGAGGGTTCTACTTATT	NM_002090.2	A_24_P183150
R-CXCL3-P	CAGGACTGAGCTATGTTTGATGAAAC		
F-CXCL1-2-3	CCACTGCGCCCAAACC		
R-CXCL1-2-3-S	GAGACAAGCTTTCTGCCCATTC		
F-CXCL5-P	GCGGTAATGAAACCGGTTAGTC	NM_002994.4	A_24_P277367
R-CXCL5	TTCCAAACAAAGGTGAAATAGCTTAA		
F-CXCL6-P	CATCATAAAATTGCCAGTCTTCA	NM_002993.3	A_23_P155755
R-CXCL6-P	TCTTACTGGGTCCAGGGATCTC		
F-CXCL9-P	CCTTGCATCTCACAGGTAGACAGT	NM_002416.2	A_23_P18452
R-CXCL9	TGCTTTGAGAGTGTATGCATGTATG		
F1-CXCL10- P3343175	GAAGAGATGTCTGAATCCAGAATCG	NM_001565.3	A_33_P3343175

R1-CXCL10- P3343175	TAGACCTTTCCTTGCTAACTGCTTT		
F-CXCL11	CCCAAAGGAGTCCAACAATTTAAA	NM_005409.4	A_23_P125278
R-CXCL11-P	GCACTTTGTAAACTCCGATGGTAA		
F-EGF-P	GGTTCCACAATCTCTACGACTAATCA	NM_001963.4	A_23_P155979
R-EGF-P	GCAAACAAAAGCACAACACTACGTATC		
F-GBP1-P	TGTGCAACAAAGATGCATTTACCT	NM_002053.2	A_23_P62890
R-GBP1-P	TCTCCTGAGTGGTACCAGCTTATG		
F-HLA-A- P408353	GGAGGAGGAAGAGCTCAGATAGAA	NM_002116	A_23_P408353
R-HLA-A- P408353	GGCACTGTCACTGCTTGCA		
F-HLA-B	GTGCACTGAGCTGCAACTTCTT	NM_005514	A_33_P3424800
R-HLA-B- P3424800	TCCATCAACCTCTCATAGCAAATATT		
F-HLA-C- P3330109	GCTGCAACTTCTTACTTCCCTAATG	NM_002117 &	A_33_P3330109 &
R-HLA-C-A- P3424803	GCTCTCTCAACTTCTAGGAATTGACTT	XM_003119360	A_33_P3424803
F-ICAM-1	CCCCACCATGAGGACATACAA	NM_000201	A_23_P153320
R-ICAM-1-P	GGCCTCAGCATACCCAATAGG		
F-IFNB1-P	CAGAACATCTTTGCTATTTTCAGACAA	NM_002176.2	A_23_P71774
R-IFNB1-P	CAGGAGGTTCTCAACAATAGTCTCATT		
F1-IL1B	GGGCAAGAAGTAGCAGTGTCTGT	NM_000576.2	A_23_P79518
R1-IL1B-P	AGCACACCAGTCCAAATTGAATT		
F1-IL4L1	GCATGACCTGGCAAAGGAA	NM_172374.2	A_33_P3405424
R1-IL4L1-P	TGGAGAGATAACTGGCCTTGGA		
F-IL7-P	GCCGGTGAGAATAAGAGAGTCATAA	NM_000880.3	A_23_P8961
R-IL7-P	TCTCTTTTAGGTATCTTGGACCTTGTT		

F1-IL7R-P	CTCAACATGAGTCAAGAGCATCCT	NM_002185.3	A_23_P404494
R1-IL7R-P	TGGGTCACCTTAAACCTTGTGA		
F2-IL8	TGGCAGCCTTCCTGATTTCT	NM_000584.3	NDP
R2-IL8	TTAGCACTCCTTGGCAAAACTG		
F-IL11	CAAAGGAGAGAGGTGGGATTGT	NM_000641.3	A_33_P3243887
R-IL11-P	GTGTCATGCAAAATACACAGTCATG		
F-IL15-P	TCCTGCCAGTGTGGAACCA	NM_172174.2	A_23_P29953
R-IL15-P	TTCTTCTCTGTTTGCTATGCTTAGT		
F-IL23A	CCAATACTGACTGACATGTGATGCT	NM_016584.2	A_23_P76078
R-IL23A-P	CCAAATTTCCCTTCCCATCTAAT		
F1-IL32-S1	CCCTGTCCCGGATGTTGAG	NM_001012633	A_33_P3346826
R1-IL32	TCCGTAGGACTTGTACAAAAGC		
F-IRF1-P	CTCCCTCCTTGGGTCATTGA	NM_002198.2	A_23_P41765
R-IRF1-P	CACCACAAGAAAAACCCAGACA		
F-KLK5-P	ACCAAGTGGATCCAGGAAACC	NM_012427	A_23_P153480
R-KLK5-P	TGTGCTGAGTCCTGGGATGA		
F-KLK7-P	CCGATGACCTATGAAGTCAAATTTG	NM_005046	A_23_P39056
R-KLK7-P	CAGGGCATGAGGTTGGTTTAA		
F-LTB	CATGGCAGTGGGAAAAATGTAG	NM_002341.1	A_33_P3248265
R-LTB-P	CCATTCTTTATTTTCATCAGGTTCAA		
F-NFKBIE-P	CCAACCAGTAGGAAGCATGGA	NM_004556.2	A_23_P30655
R-NFKBIE-P	GGTTCTGCTTGCTCCTATTTTCAG		
F-NODAL-P	ACTGGAGTGGTTCTCTGCTAATGA	NM_018055.4	A_33_P3299776
R-NODAL-P	TGGCCCAGGAGAACTAGACAA		
F-RELB-P	GCCCTCCCTCCCCAGACT	NM_006509.3	A_23_P55706
R-RELB-P	CGGAGGCTCAAAAACCTCATCTT		
F-S100A3-P	TCTGGACTTGCCCAGGTCTT	NM_002960	A_23_P104073
R-S100A3-P	TCTCTGGGCCTCCTAGGTAAAA		
F-S100A14	TGTGTAAGAGCCAAAGAATTGGTAGT	NM_020672	A_23_P124619

R-S100A14-P	TTAGTACCAGATATCCAGCCATATTCC		
F-SERPINA3-P2920	GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCC	NM_001085.4	A_23_P2920
R-SERPINA3-P2920	CAGCTGGAGAAGTATGTCGTTCA		
F-SLPI-P	CAGTGTCAGGGAAGAAGAGATG	NM_003064	A_24_P190472
R-SLPI-P	CAACAGGATCCAGGCATTTGA		
F-TLR3-P	CAGATTATAAACTGAACCATGCACTCT	NM_003265.2	A_23_P29922
R-TLR3-P	CCAGTTCAAGATGCAGTGAGATTT		
F-TNF-P	TGCCTTGGCTCAGACATGTTT	NM_000594.3	A_23_P376488
R-TNF	GCTACATGGGAACAGCCTATTGT		
F-TNFSF9	CCACCACACTTGGCTAACTTTTT	NM_003811.3	A_33_P3397763
R-TNFSF9-P	AACAACCTTGGCAACATAGCAA		

-
- 1 These sets of primers were designed using the Primer Express software (version 3.0.1) package
 - 2 (Applied Biosystems) on the Agilent probe sequence used for Microarray analysis (when
 - 3 possible, probe noted P) and were synthesized by Eurofin.
 - 4 All primers are labelled by F (forward) or R (reverse), gene name, and probe number (P), if the
 - 5 primers were located on the Agilent probe.
 - 6 Agilent probe name used for design is written in the primer name in the case where several
 - 7 probes were present on the Agilent chip.
 - 8 NDP, not designed on the Agilent probe.

II. Publication n°2

The cytolethal distending toxin CdtB subunit of *Helicobacter* triggers the expression of the MafB oncoprotein in intestinal and hepatic cell lines.

Christelle Péré-Védrenne, Alice Buissonnière, Julien Izotte, Alban Giese, Bruno Cardinaud, Francis Mégraud, Armelle Ménard

Oncogene - Manuscrit en préparation

La Cytolethal Distending Toxin (CDT) de *Helicobacter hepaticus*, via sa sous-unité active CdtB, a un rôle majeur dans l'inflammation et le développement de l'hépatocarcinome chez la souris (Ge *et al.*, 2007). Cependant le mécanisme associé à l'évolution de l'infection chronique vers le cancer est mal déterminé.

Une étude globale de l'expression des gènes en réponse à la toxine, dans des lignées intestinales et hépatiques a été réalisée *in vitro*. Les résultats ont indiqué que la CdtB de *H. hepaticus*, en plus de la régulation de gènes pro-inflammatoires et des peptides antimicrobiens, régule l'expression de gènes associés au cancer. Ainsi, la CdtB surexprime l'oncogène MafB, un facteur de transcription. Il a été rapporté que l'expression de MafB induit la migration, l'invasion et la prolifération cellulaire *in vitro* et la croissance tumorale dans un modèle murin de xénogreffes, en accord avec les propriétés oncogènes de MafB (Yang *et al.*, 2015).

L'analyse de l'expression du gène codant pour MafB a été réalisée *in vitro* en utilisant 1) la stratégie lentivirale permettant l'expression de la CdtB de *H. hepaticus* et *H. pullorum* dans les cellules cibles et 2) des expériences de co-culture avec la souche de *H. hepaticus* et son mutant isogénique correspondant. L'expression de la protéine MafB a également été étudiée afin de déterminer son expression cellulaire et sa localisation, *in vitro* et *in vivo*, dans un modèle murin de xénogrefe (développé dans la partie III).

Les expériences de transduction lentivirale et de co-culture montrent une surexpression du gène codant pour MafB les CdtB de *H. hepaticus* et *H. pullorum* dans les cinq lignées cellulaires testées (hépatiques et intestinales) après 72h d'exposition à la toxine. Une forte localisation nucléaire et péri-nucléaire a été observée en réponse à la toxine. MafB est également détecté dans quelques lamellipodes, à la périphérie des cellules intoxiquées avec la CdtB. Tous les effets observés sont dépendants de l'activité DNase. Ces résultats indiquent que la sous-unité active CdtB induit la surexpression de l'oncogène MafB et induit sa forte translocation nucléaire. Des expériences complémentaires sont en cours pour évaluer l'expression et la localisation de l'oncogène (Immunohistochimie : IHC et Western Blot) lors d'une exposition chronique à la CdtB (15 jours) dans un modèle murin de xénogrefe. Les résultats préliminaires (non montrés) de ce modèle de xénogreffes montrent une surexpression de MafB en réponse à la toxine avec différentes isoformes correspondantes à différents poids moléculaires (Western Blot). L'oncogène est également localisé dans quelques noyaux des cellules hépatiques en réponse à une incubation chronique avec la CdtB de *H. hepaticus* (IHC).

1 **The cytolethal distending toxin CdtB subunit of Helicobacter triggers the expression**
2 **of the MafB oncoprotein in intestinal and hepatic cell lines**

3

4 Christelle Péré-Védrenne^{1,2}, Alice Buissonnière^{1,2}, Julien Izotte^{1,2}, Alban Giese³, Bruno
5 Cardinaud^{4,5}, Francis Mégraud^{1,2}, Armelle Ménard^{1,2*}

6

7 ¹*INSERM U853, F33076 Bordeaux, France*

8 ²*Université de Bordeaux, Centre National de Référence des Helicobacters et*
9 *Campylobacters, F33076 Bordeaux, France; <http://www.cnrch.u-bordeaux2.fr/>*

10 ³*Université de Bordeaux, Plateforme d'Histologie TBM-Core, EA2406, Histologie et*
11 *Pathologie Moléculaire des Tumeurs*

12 ⁴*Université de Bordeaux, Biothérapies des maladies génétiques et cancers, INSERM U1035,*
13 *F33076 Bordeaux, France*


14 ⁵*Bordeaux Institut National Polytechnique, F33000 Bordeaux, France*


15

16 **SHORT TITLE (Character count with spaces: 42)**

17 **The CdtB subunit increases MafB expression**

18

19 ***Corresponding author:** Armelle Ménard  Université de Bordeaux, Carreire,
20 Laboratoire de Bactériologie, INSERM U853 - Bâtiment 2B RDC Case 76 – 146 rue Léo
21 Saignat, F33076 Bordeaux, France. Email: Armelle.Menard@u-bordeaux.fr

22  + 33 (0) 5 57 57 12 88

23

24 **Key words:** *Helicobacter hepaticus*; *Helicobacter pullorum*; CdtB subunit; cytolethal
25 distending toxin; MafB oncoprotein; DNase activity.

26

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

ABSTRACT (word count: 238)

The cytolethal distending toxin (CDT) of *Helicobacter hepaticus* plays a key role in inflammation and the development of liver cancer in mice via its active subunit CdtB. However, the molecular mechanisms associated with the evolution of this chronic infection toward cancer are poorly understood. Whole genome microarray-based identification of differentially expressed genes was performed *in vitro* on the lentiviral expression of the CdtB subunit of *H. hepaticus* in intestinal and hepatic epithelial cells. It revealed a CdtB-dependent upregulation of the MAFB gene encoding the MafB transcription factor. MAFB gene expression in response to the CdtB was analyzed *in vitro* 1) using lentiviral expression systems of the CdtB subunit of *H. hepaticus* and *H. pullorum* into the cells and 2) in coculture experiments with *H. hepaticus* and its corresponding CdtB isogenic mutant. MAFB protein expression was also investigated to determine its cellular expression and localization. Transduction and coculture experiments showed an upregulation of the MAFB gene in response to the CdtB in all of the cell lines tested. A strong nuclear and perinuclear localization of MafB was observed in response to the CdtB. MafB was also detected at the cell periphery of the CdtB-induced lamellipodia in some intoxicated cells. All of these effects were dependent on the DNase activity of the CdtB. These results show that the active subunit CdtB induces the overexpression of MAFB oncogene, resulting to a high translocation of the MafB oncoprotein in the CdtB-distended nuclei.

Manuscript (word count: 2,129)

1 INTRODUCTION

2 The involvement of chronic bacterial infections in carcinogenesis was first proven with
3 *Helicobacter pylori* infection in the development of two different gastric cancers in humans.
4 Another Helicobacter, *Helicobacter hepaticus*, infects the mouse intestine, then the biliary
5 tract and liver, where it causes chronic inflammatory lesions which may progress to
6 hepatocarcinoma in older animals ^{1, 2}. *H. hepaticus* also induces colitis and colonic
7 carcinoma in susceptible mice (reviewed in ³). The cytolethal distending toxin (CDT) of *H.*
8 *hepaticus*, via its active subunit CdtB, plays a major role in inflammation and the
9 development of liver carcinogenesis ⁴, suggesting that, like the other bacterial oncoprotein,
10 e.g. *H. pylori* CagA ⁵, CdtB exhibits an oncogenic potential.

11 While CDT are widely distributed in many pathogenic Gram negative bacteria, it has not
12 been much studied due to difficulties to produce and purify sufficient amounts of the 3
13 subunits to reconstitute a complete toxin (CdtA, CdtB and CdtC), the CdtB being toxic for
14 numerous expression systems. We reported a lentiviral-based approach to explore the role
15 of the CdtB toxin, in order to overcome these technological barriers ⁶. This system has made
16 possible to deliver the CdtB directly into the cells and thus to attribute the effects observed,
17 specifically to the active CdtB subunit of the CDT. Microarray-based identification of whole
18 genome differentially expressed genes in response to the CdtB subunit of *H. hepaticus* was
19 performed in transduced intestinal and hepatic epithelial cells ⁷. These chip analyses showed
20 a CdtB-dependent upregulation of the MAFB oncogene encoding the MafB transcription
21 factor. In the present study, the effects of the active CdtB subunit on MAFB gene regulation
22 were evaluated on human intestinal and hepatic epithelial cell lines upon constitutive
23 expression of the CdtB subunit of *H. hepaticus* and *Helicobacter pullorum* using lentiviral
24 particles. The involvement of the DNase activity of CdtB was also explored upon expression
25 of the CdtB of *H. hepaticus* mutated in its catalytic DNase site ^{7, 8}. In order to determine
26 whether non-CdtB bacterial factors could be involved in MAFB gene regulation, cells were
27 also infected with *H. hepaticus* and its corresponding CdtB isogenic mutant in coculture

1 experiments ⁹. MAFB protein expression was also investigated to determine its cellular
2 expression and localization.

3

1 RESULTS

2 The MAFB oncogene is upregulated in response to the CdtB

3 The previously reported cytopathogenic effects associated with CdtB^{6,7} were observed in
4 the present study, *i.e.* actin cytoskeleton remodelling associated with cellular distension,
5 enlarged cells with distended nuclei or multinucleated and the formation of cortical actin-rich
6 large lamellipodia (presented in Fig.2 and S1). The global expression of human genes using
7 whole genome microarrays following expression of the CdtB of *H. hepaticus* versus the
8 control tdTomato fluorescent protein (TFP), was quantified in transduced epithelial intestinal
9 HT-29 and hepatic Huh7 cells⁷. This analysis revealed a significant CdtB-dependent
10 upregulation of the MAFB oncogene in both cell lines with 2 different probes targeting the
11 MAFB gene (Fig. 1A) while NRL and other MAF-family genes were not regulated (data not
12 shown), *i.e.* MAF, MAF1, MAFA, MAFF, MAFG and MAFK. RT-qPCR confirmed the
13 microarray data (Fig. 1B) since a significantly higher MAFB gene expression was observed in
14 transduced hepatic (Huh7 and Hep3B) and intestinal (HT-29) cells upon the expression of *H.*
15 *hepaticus* CdtB versus the control TFP (Fig. 1B). It should be noted that microarrays and RT-
16 qPCR experiments revealed that the MAFB gene is expressed at low level under the basal
17 conditions of HT-29 cells whereas its expression is 3 and 20 times higher in hepatic Huh7
18 and Hep3B cells, respectively. No significant increase in MAFB gene expression was
19 observed in response to the *H. hepaticus* CdtB with the His→Leu mutation at residue 265
20 involved in DNase activity (H265L). These preliminary results suggest that the DNase activity
21 of *H. hepaticus* CdtB is involved in MAFB expression.

22 The effect of *H. hepaticus* strain 3B1 (CCUG 44777) on MAFB expression was also
23 compared to that induced by its corresponding isogenic *cdtB*-mutant strain ($\Delta cdtB$) on
24 intestinal HT-29 and hepatic Huh7 cell lines after a 72 h coculture *in vitro*, corresponding to
25 the time required to observe the effect of the CDT, as previously validated^{7,9}. As expected,
26 *H. hepaticus* induced a significant stimulation of MAFB gene expression in both cell lines
27 (Fig. 1C). This effect was significantly reduced after coculture with the $\Delta cdtB$ *H. hepaticus*

1 strain compared to the wild type (WT) strain. It should be noted that the MAFB expression
2 with the $\Delta cdtB$ *H. hepaticus* strain was close to the value determined for non-infected cells,
3 indicating that the CDT alone is mainly responsible for the regulation of the MAFB gene and
4 that other bacterial factors are not involved.

5 The regulation of the MAFB gene was also determined in response to another CdtB, that
6 of *Helicobacter pullorum*. Since *H. pullorum* is an emergent human foodborne pathogen
7 implicated in several intestinal pathologies, MAFB gene expression was quantified in human
8 intestinal epithelial cell lines (HT-29, Caco-2 and HCA7) after a 72 h transduction with
9 lentivirus particles expressing the enhanced Green Fluorescent Protein (GFP) or the CdtB
10 subunit of *H. pullorum* strain H495 (CCUG 33840), as previously validated ⁶. The CdtB
11 subunit of *H. pullorum* also upregulated the MAFB gene in the 3 human intestinal epithelial
12 cells tested. The most significant effect was observed in HCA7 cells with nearly a 15-fold
13 increase in MAFB gene expression (Fig. 1D).

14 MAFB upregulates 14 genes in multiple myeloma patients ¹⁰. None of these genes were
15 significantly regulated by the *H. hepaticus* CdtB in Huh7 cells but microarrays pointed to a
16 significant upregulation of NOTCH2, BLVRA, MYO5A and RND3-RhoE in HT-29 cells in
17 response to the CdtB with 2.6, 1.4, 3.8 and 2 fold increases, respectively. MafB
18 transactivation is repressed by v-Myb transcription factor ¹¹; however, this may not be the
19 case in the presence of the CdtB since v-Myb expression is highly downregulated (0.2 fold
20 increase) while MafB is upregulated.

21

22 **MafB oncoprotein is upregulated and concentrated in the nuclei in response to the** 23 **CdtB**

24 In general, normal intestinal and liver tissues show weak to moderate MafB-nuclear-
25 positivity. To date, the expression and localisation of MafB in intestinal and liver diseases has
26 not been evaluated. MafB localization was evaluated *in vitro* with regards to the expression
27 of the CdtB subunit of *H. pullorum* and *H. hepaticus* in transduction experiments.
28 Immunofluorescence studies were performed using antibodies raised against MafB protein

1 with subsequent counting of MafB-positive nuclei. Particular care was taken with regard to
2 the choice of the anti-MafB to be used: the anti-MafB (NB600-266, Novus Biologicals) does
3 not react with other related-MafB proteins, i.e. MafA and c-Maf.

4 Given that HT-29 cells grow tight together, they form cell bunches of cells. With respect
5 to HT-29 control cells expressing fluorescent proteins, MafB was weakly detected in the
6 cytosol of all cells and in approximately 20% of the nuclei (Fig. 2A,C). These latter MafB-
7 positive nuclear cells were all located at the periphery of the HT-29 cell clusters and were
8 considered to be non-confluent cells. On the other hand, a strong nuclear localization of
9 MafB was observed in response to the CdtB of *H. hepaticus* and *H. pullorum*, reaching 80%
10 of the cells (Fig. 2A,C and Fig. S1). MafB also appeared to be more concentrated in the
11 cytosol around the positive nuclei of these positive cells. Interestingly, MafB was also
12 sometimes detected in the cell periphery large lamellipodia and membrane ruffles in some
13 CdtB-intoxicated cells. As compared to the CdtB-associated increase of MafB-positive nuclei,
14 a strong decrease in MafB nuclear content was observed in response to the *H. hepaticus*
15 CdtB with the H265L mutation (Fig. 2A,C). However, this decrease did not reach the basal
16 levels observed for the TFP as the percentages of MafB-nuclei-positive cells remained quite
17 high in response to the H265L-mutated CdtB. These results suggest that most of the CdtB-
18 induced MafB nuclear translocation is associated to its DNase activity.

19 In hepatic Hep3B cells, the situation was different given that these cells grow in a loose
20 manner and they all expressed MAFB gene under the basal conditions, resulting in a
21 significant detection of MAFB protein in all the cell nuclei. All non-confluent Hep3B cells were
22 MafB-positive regardless of the protein expressed (Fig. 2B) but a more pronounced nuclear
23 MafB labeling was nevertheless observed when the CdtB was expressed: 3.2 fold increase
24 compared to TFP (Fig. 2D). MafB also appeared to be more concentrated in the cytosol
25 around the positive nuclei of these CdtB-distended-positive cells. When Hep3B cells reached
26 confluency, only 5% of the MafB-positive cells nuclei were detected in cells expressing TFP
27 or CdtB-H265L while 100% of the MafB-positive cells were observed in response to the CdtB
28 (not shown).

1 **DISCUSSION**

2 The Maf family encompasses three small and four large leucine-zipper (bZip) proteins
3 that belong to the AP1 superfamily. MafB, also known as V-maf musculoaponeurotic
4 fibrosarcoma oncogene homolog B, is a large bZip transcription factor characterized by the
5 presence of an acidic N-terminal transactivation domain. MafB plays an important role in the
6 regulation of lineage-specific hematopoiesis. It acts as a key regulator in mammalian gene
7 regulation and cell differentiation. MafB is a bona fide oncogene in human cancers that is
8 able to transactivate and transform primary cells (reviewed in ^{12, 13}).

9 In the present study, the CdtB of *H. hepaticus* and *H. pullorum* upregulated the
10 expression of the MAFB gene. Both transduction and infection experiments suggested that
11 exposure to CDT, via the DNase activity of the CdtB subunit, regulates the expression of
12 MAFB. MafB oncoprotein was found in the cytosol mostly around the nuclei but also
13 concentrated in numerous CdtB-induced enlarged nuclei.

14 It should be noted that cell density affects the nuclear localization of MafB in non-
15 distended cells expressing TFP or CdtB-H265L. This is, however, not the case in distended
16 cells expressing the CdtB, as they all contain MafB in their nuclei regardless of the cell
17 density. In confluent non-CdtB distended cells, the most confluent are the cells, least MafB
18 nuclear location is observed. Cell density has already been shown to affect intracellular
19 localization of proteins ¹⁴. This difference between MafB nuclear localization depending on
20 the cell density is a matter of discussion.

21 It was reported that Helicobacter CdtB triggers the formation of cortical actin rich large
22 lamellipodia in intestinal epithelial cells ⁶. In some cells, MafB proteins were also found on the
23 leading edge of the CdtB-induced large lamellipodia. This result is not surprising since MafB
24 was shown to be involved in actin organization in macrophages as well as being associated
25 with lamellipodial extensions ¹⁵.

26 It was reported that MAFB gene expression promotes cell migration, invasion and
27 proliferation *in vitro* and tumor growth in mouse xenograft models, in agreement with the

1 oncogenic properties of MafB ¹⁶. The CdtB also alters the cytoskeleton and focal adhesion,
2 modifying some cellular functions, particularly those linked with epithelial adherence.
3 Adherence regulates the growth, migration, proliferation and cell death. In this context, the
4 CdtB-dependent decreased cellular adherence may be mediated by MafB overexpression.

5 MAFB is subjected to post-translational modifications. It can be phosphorylated by
6 glycogen synthase kinase 3 ¹⁷, enhancing its transforming activity. MafB can be SUMO-1
7 modified on 2 lysine residues. The absence of MafB SUMOylation on these residues
8 increases transcriptional activity and macrophage differentiation, inhibits myeloid progenitor
9 expansion, and represses cell cycle progression (G2M and S cell cycle arrest) ¹¹. As the
10 CdtB of Helicobacter induces G2/M cell arrest both in transduction and infection experiments
11 ⁶, absence of SUMO-1 modification of MafB is therefore expected in response to the CdtB.
12 Western-blot analysis of MafB in response to the CdtB revealed different MafB isoforms
13 corresponding to different Mr. However, in absence of antibodies specifically targeting the
14 different post-translational modifications of MafB, it was not possible to determine what
15 changes were induced by the CdtB.

16 Besides having an oncogenic function, MafB can play a role as a tumor suppressor-like
17 protein, revealing a dual role for MafB in oncogenesis. Another hypothesis is that MafB would
18 merely be overexpressed for its tumor suppressor function to overcome the oncogenic
19 properties of the CdtB. The relation between CdtB-induced overexpression of MafB and
20 these dual roles remains to be elucidated.

21

22

1 MATERIALS & METHODS

2 Hep3B derived human hepatocellular carcinoma cells (ATCC® HB-8064™) were grown in
3 Dulbecco's Modified Eagle's medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented
4 with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Invitrogen) at 37°C in a 5% CO₂ humidified
5 atmosphere. Polyclonal rabbit anti-MafB (NB600-266) came from Novus Biologicals
6 (Littleton, CO). MafB primers (F-MAFB-P3220837 CGCCAAACCGCATAGAGAAC and R-
7 MAFB- P3220837 ACCGTAATAATAAACCCAAACAAAGAC) were designed using the
8 Primer Express software (version 3.0.1) package (Applied Biosystems).

9 Other materials and methods used in this study were previously presented in reference
10 no. ⁷. They include reagents and antibodies, cell lines, Helicobacter strains, the construction
11 of lentivirus plasmids with *cdtB* sequences (available in GenBank database under the
12 accession numbers KT590046, KT590047, and JX434689), lentivirus production, coculture
13 and transduction experiments, primer designs, reverse transcription quantitative polymerase
14 chain reaction (RT-qPCR), statistical analysis, immunofluorescence and image analysis.

15

1 **ACKNOWLEDGMENTS**

2 1) The sequence of the *cdtB* of *H. hepaticus* strain 3B1 fused at its 3' end to three repeats of
3 the human influenza hemagglutinin (HA) epitope and that of its corresponding mutated *cdtB*
4 sequence (A→T transversion at nucleotide 794⁸) are available in the GenBank database
5 under the accession numbers KT590046 and KT590047, respectively. The *cdtB* sequence of
6 *H. pullorum* strain H495 fused at its 3' end to three repeats of the human HA epitope is
7 available under the GenBank accession number: JX434689.

8 2) The authors report no conflicts of interest. Christelle Péré-Védrenne is the recipient of a
9 predoctoral fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer. The authors wish to thank
10 Christophe Grosset (INSERM UMR1053, Physiopathologie du cancer du foie, University of
11 Bordeaux, France) for supplying the Hep3B cell line. Lentivirus productions were performed
12 at the "Vectorologie lentivirale" service platform of the Federative Research Structure
13 "TransBioMed" of the University of Bordeaux (Bordeaux, France). We are grateful to
14 Véronique Guyonnet-Duperat for technical assistance.

15 3) Funding sources: This work was supported in part by the "Institut National de la Santé et
16 de la Recherche Médicale" (INSERM), the University of Bordeaux and the Federative
17 Research Structure "Biology: from basics to Medicine" ("TransBioMed") at the University of
18 Bordeaux (2013).

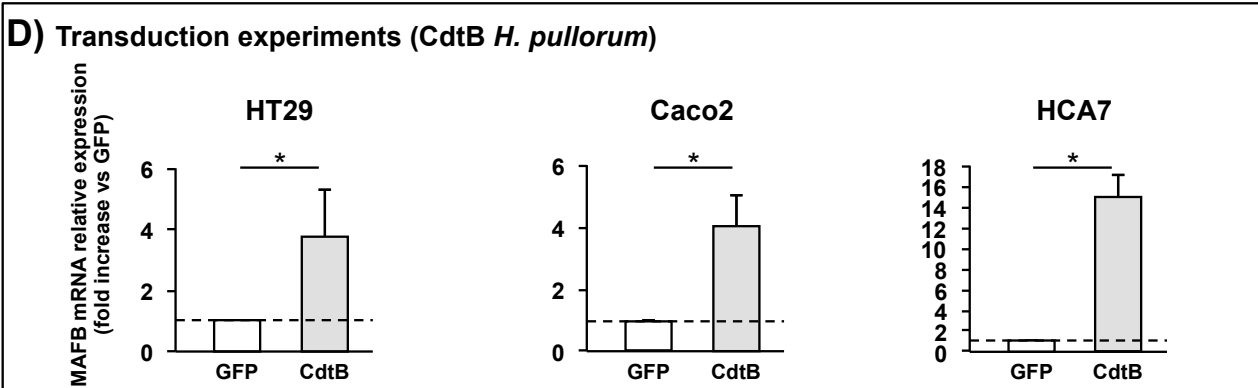
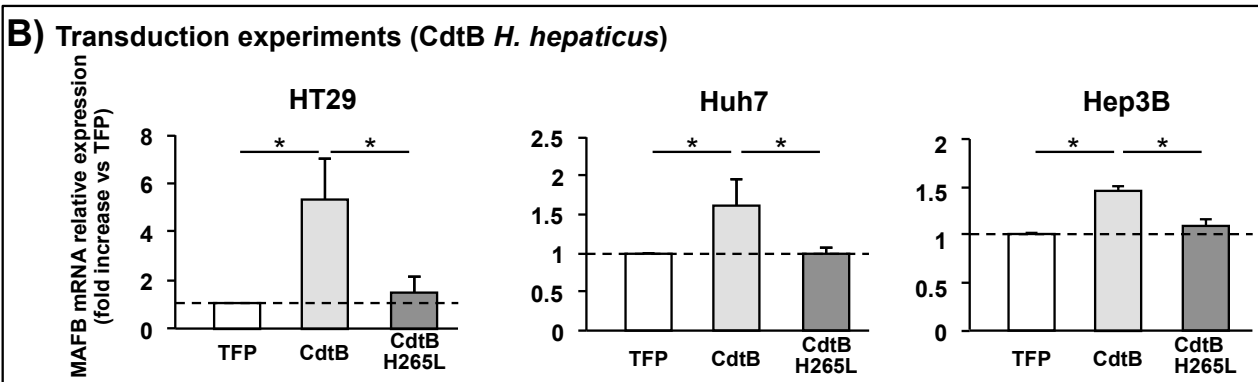
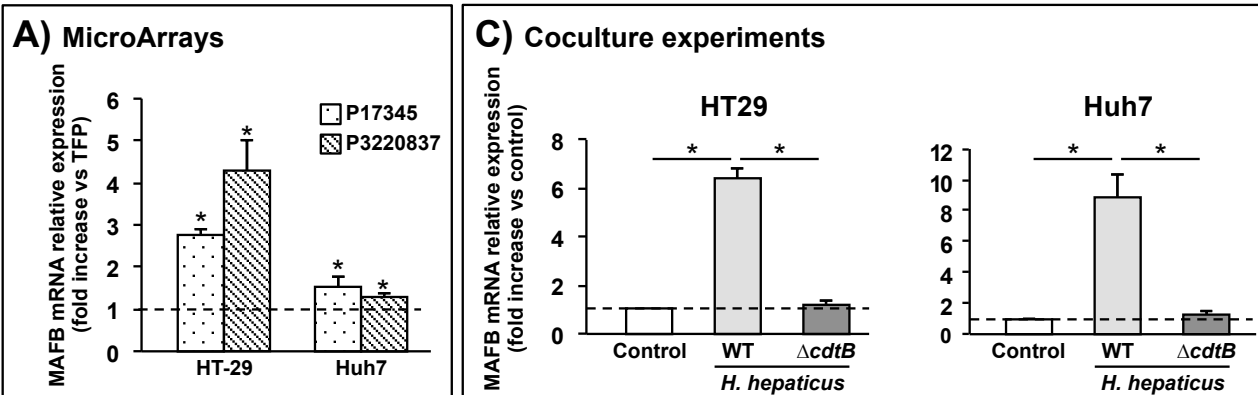
19

20

1 References

- 2 1 Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, Paster BJ, Yan L, Taylor NS *et al.* *Helicobacter*
3 *hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal
4 mucosal scrapings from mice. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1238-1245.
5
- 6 2 Fox JG, Li X, Yan L, Cahill RJ, Hurley R, Lewis R *et al.* Chronic proliferative hepatitis
7 in A/JCr mice associated with persistent *Helicobacter hepaticus* infection: a model of
8 helicobacter-induced carcinogenesis. *Infection and immunity* 1996; 64: 1548-1558.
9
- 10 3 Fox JG, Ge Z, Whary MT, Erdman SE, Horwitz BH. *Helicobacter hepaticus* infection
11 in mice: models for understanding lower bowel inflammation and cancer. *Mucosal*
12 *immunology* 2011; 4: 22-30.
13
- 14 4 Ge Z, Rogers AB, Feng Y, Lee A, Xu S, Taylor NS *et al.* Bacterial cytolethal
15 distending toxin promotes the development of dysplasia in a model of microbially
16 induced hepatocarcinogenesis. *Cellular microbiology* 2007; 9: 2070-2080.
17
- 18 5 Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein.
19 *Nature reviews Cancer* 2004; 4: 688-694.
20
- 21 6 Varon C, Mocan I, Mihi B, Pere-Vedrenne C, Aboubacar A, Morate C *et al.*
22 *Helicobacter pullorum* cytolethal distending toxin targets vinculin and cortactin and
23 triggers formation of lamellipodia in intestinal epithelial cells. *The Journal of infectious*
24 *diseases* 2014; 209: 588-599.
25
- 26 7 Pere-Vedrenne C, Cardinaud B, Varon C, Mocan I, Buissonnière A, Izotte J *et al.* The
27 cytolethal distending toxin subunit CdtB of *Helicobacter* is proinflammatory and
28 increases the expression of genes encoding antimicrobial proteins *in vitro*. *The*
29 *Journal of infectious diseases* 2015; Submitted.
30
- 31 8 Avenaudo P, Castroviejo M, Claret S, Rosenbaum J, Megraud F, Menard A.
32 Expression and activity of the cytolethal distending toxin of *Helicobacter hepaticus*.
33 *Biochemical and biophysical research communications* 2004; 318: 739-745.
34
- 35 9 Young VB, Knox KA, Pratt JS, Cortez JS, Mansfield LS, Rogers AB *et al.* *In vitro* and
36 *in vivo* characterization of *Helicobacter hepaticus* cytolethal distending toxin mutants.
37 *Infection and immunity* 2004; 72: 2521-2527.
38
- 39 10 van Stralen E, van de Wetering M, Agnelli L, Neri A, Clevers HC, Bast BJ.
40 Identification of primary MAFB target genes in multiple myeloma. *Experimental*
41 *hematology* 2009; 37: 78-86.
42
- 43 11 Tillmanns S, Otto C, Jaffray E, Du Roure C, Bakri Y, Vanhille L *et al.* SUMO
44 modification regulates MafB-driven macrophage differentiation by enabling Myb-
45 dependent transcriptional repression. *Molecular and cellular biology* 2007; 27: 5554-
46 5564.
47
- 48 12 Yang Y, Cvekl A. Large Maf Transcription Factors: Cousins of AP-1 Proteins and
49 Important Regulators of Cellular Differentiation. *The Einstein journal of biology and*
50 *medicine* : *EJBM* 2007; 23: 2-11.
51
- 52 13 Eychene A, Rocques N, Pouponnot C. A new MAFia in cancer. *Nature reviews*
53 *Cancer* 2008; 8: 683-693.

1
2 14 Ishibe S, Haydu JE, Togawa A, Marlier A, Cantley LG. Cell confluence regulates
3 hepatocyte growth factor-stimulated cell morphogenesis in a beta-catenin-dependent
4 manner. *Molecular and cellular biology* 2006; 26: 9232-9243.
5
6 15 Aziz A, Vanhille L, Mohideen P, Kelly LM, Otto C, Bakri Y *et al.* Development of
7 macrophages with altered actin organization in the absence of MafB. *Molecular and*
8 *cellular biology* 2006; 26: 6808-6818.
9
10 16 Yang W, Lan X, Li D, Li T, Lu S. MiR-223 targeting MAFB suppresses proliferation
11 and migration of nasopharyngeal carcinoma cells. *BMC cancer* 2015; 15: 461.
12
13 17 Rocques N, Abou Zeid N, Sii-Felice K, Lecoin L, Felder-Schmittbuhl MP, Eychene A
14 *et al.* GSK-3-mediated phosphorylation enhances Maf-transforming activity. *Molecular*
15 *cell* 2007; 28: 584-597.
16
17 18 Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image
18 analysis. *Nature methods* 2012; 9: 671-675.
19
20
21



1 **FIGURE LEGENDS**

2

3 **Figure. 1.** MAFB gene expression in response to the CdtB of *Helicobacter hepaticus* and
4 *Helicobacter pullorum*

5 **A)** The expression of MAFB gene was determined in HT-29 intestinal cells and Huh7 hepatic
6 cells using the Human GE 4x44K v2 Microarray Kit (Agilent Technologies) after a 72 h
7 transduction with lentiviral particles expressing the CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1 versus
8 the tdTomato fluorescent protein (TFP). P17345 and P3220837 represents the 2 probe
9 names used for MAFB mRNA (GenBank accession number: NM_005461) quantification (5'-
10 ATTTTAAAGTTCCCATTTGAAATTGCTGGCGCTGCTGGCCGGATGCATTTTTGAGTTTGT-
11 3' and 5'-
12 TGGCAGCAAGCTGAGGGTCTTTGTTTGGGTTTATTATTACGGTATTTTTGTTTGTAAGTT-
13 3', respectively). These significant results ($p < 0.01$) are the means of four independent
14 transduction experiments.

15 **B)** The expression of MAFB gene was determined by RT-qPCR in epithelial intestinal HT-29
16 cells and hepatic Huh7 and Hep3B cells after new 72 h transductions with lentiviral particles
17 expressing the CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1 versus TFP. Results presented for HT-29 and
18 Huh7 provided from transduction experiments different from those presented in 1A. These
19 results are the means of three independent transduction experiments.

20 **C)** The expression of MAFB gene was determined in HT-29 intestinal cells and Huh7 hepatic
21 cells after a 72 h coculture with *H. hepaticus* strain 3B1 and its corresponding isogenic *cdtB*
22 mutant ($\Delta cdtB$). These results are the means of three independent coculture experiments.

23 **D)** The expression of MAFB gene was determined in intestinal epithelial cells HT-29, Caco-2
24 and HCA-7 after a 72 h transduction with lentiviral particles expressing the CdtB of *H.*
25 *pullorum* strain H495 versus the green fluorescent protein. These results are the means of
26 three independent transduction experiments.

1 The expression of the MafB gene was measured by RT-qPCR and normalized relative to the
2 reference gene, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1). The relative expression
3 rate of genes in response to the CdtB was reported as a fold change versus: cells cultured
4 with lentiviral particles expressing the control fluorescent proteins (TFP or GFP) or non-
5 infected control cells (for coculture experiments). The discontinuous line shows the basal rate
6 in control cells.

7 CdtB, CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1 or *H. pullorum* strain H495

8 CdtB H265L, *H. hepaticus* CdtB with the mutation His→Leu at residue 265 involved in
9 DNase activity

10 $\Delta cdtB$, *cdtB* isogenic mutant of *H. hepaticus* strain 3B1

11 GFP, enhanced green fluorescent protein

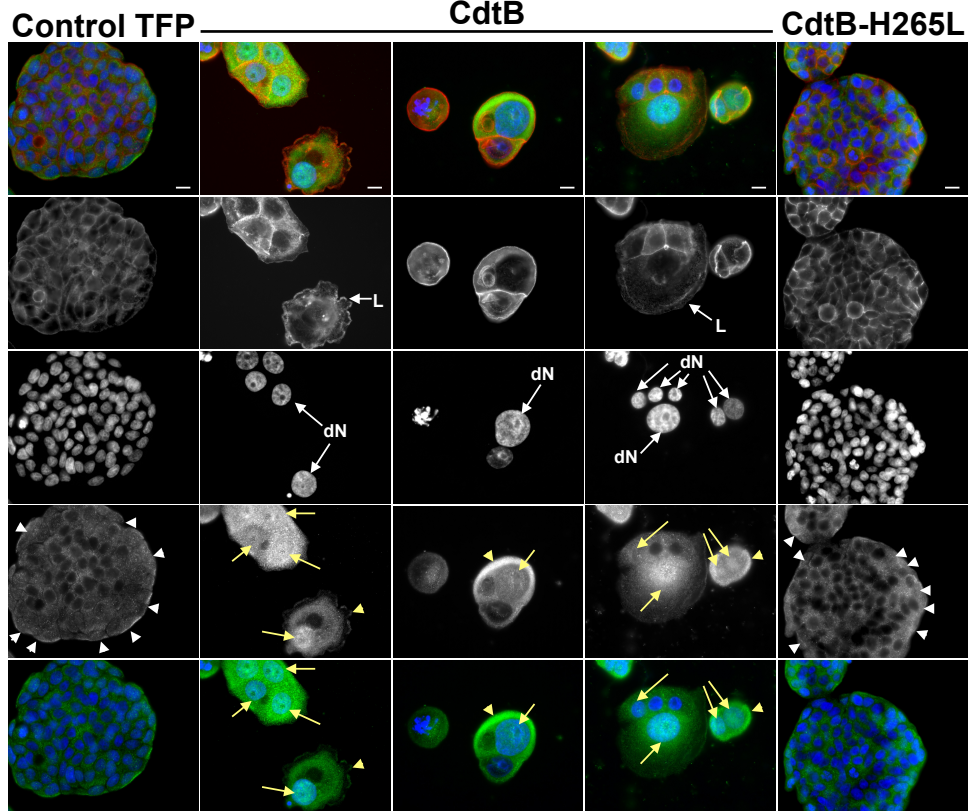
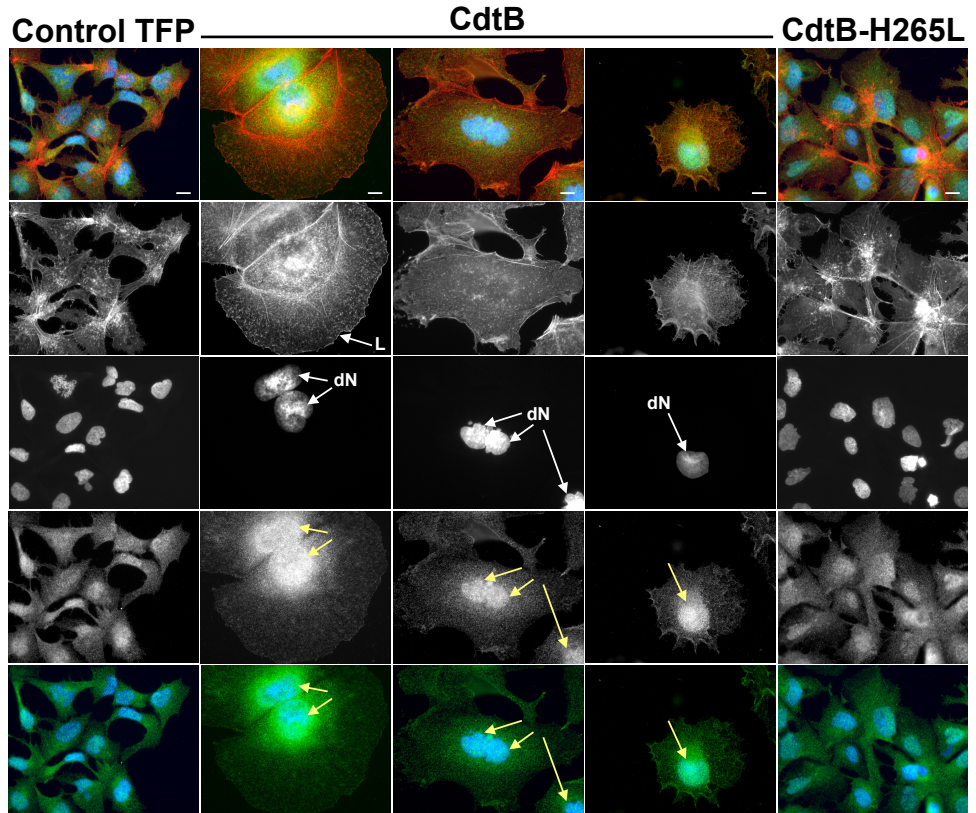
12 TFP, tdTomato fluorescent protein

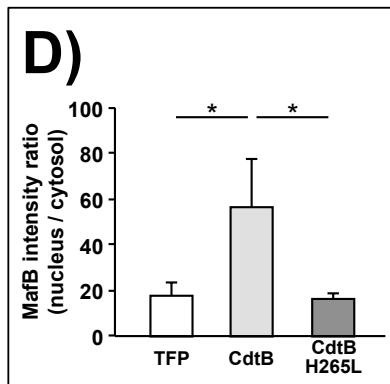
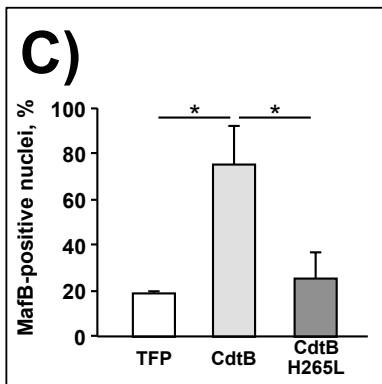
13 WT, *H. hepaticus* strain 3B1 (CCUG 44777) = wild type strain

14 *: $p < 0.01$ in (A) and $p < 0.05$ in (B), (C) and (D).

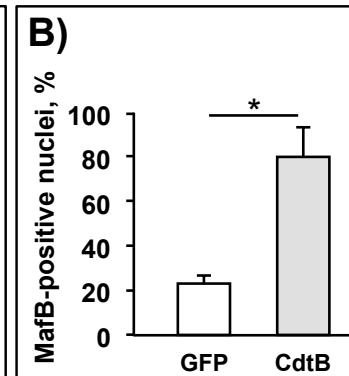
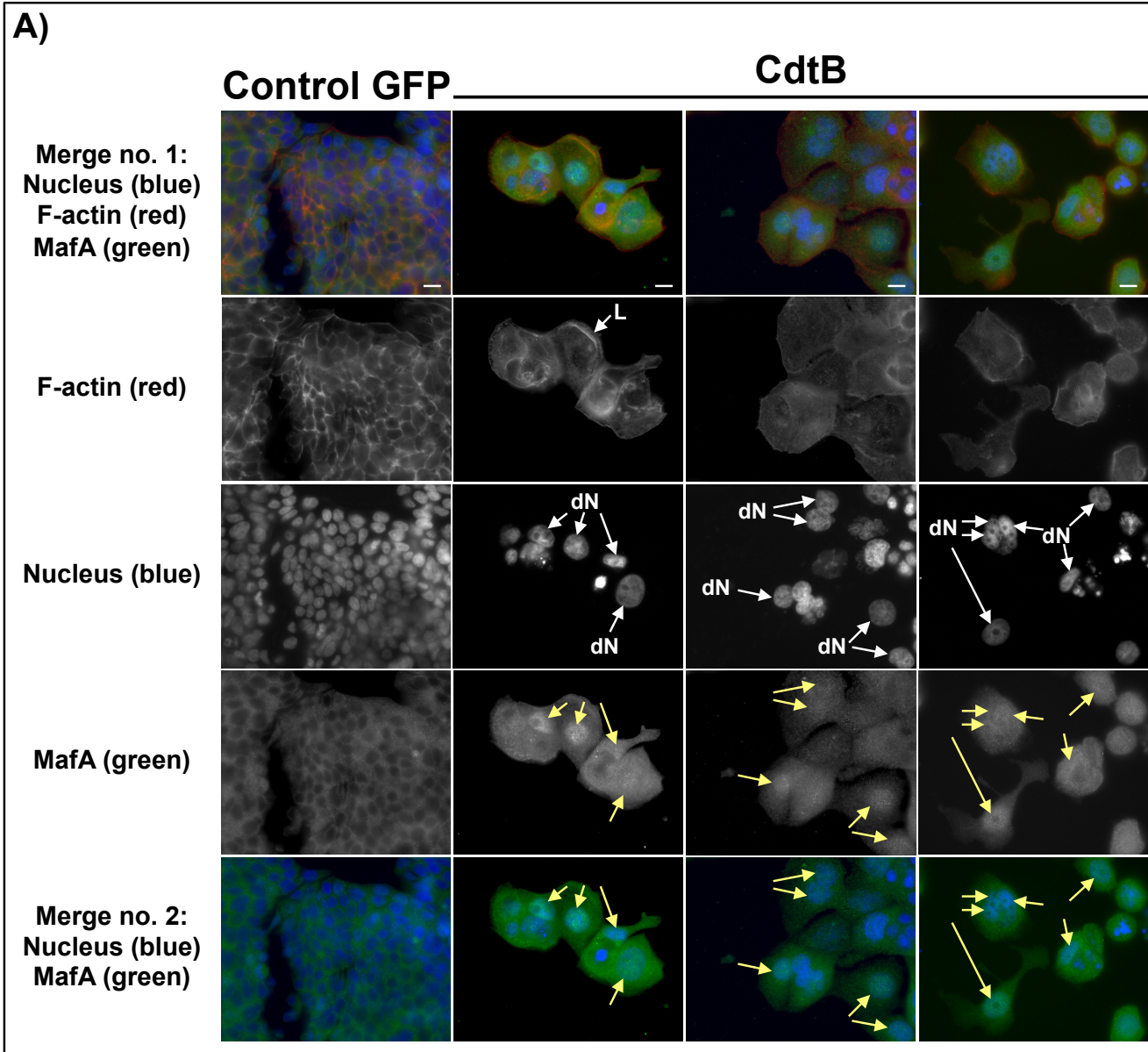
15

16

A)**B)**



1 **Figure. 2.** MafB localization in intestinal and hepatic epithelial cells in response to the CdtB
2 of *Helicobacter hepaticus*.
3 After 72 h of transduction experiments, HT-29 **(A)** and Hep3B **(B)** cells were processed for
4 fluorescent staining with DAPI to detect the nucleus (blue) and fluorescent labelled-phalloidin
5 to detect F-actin (red). Additional immunostaining with primary anti-MafB antibody followed
6 by fluorescent labelled-secondary antibodies (green) was used.
7 **(C)** The percentage of cells with MafB in the nucleus was determined after immunostaining
8 and subsequent counting for HT-29 cells.
9 **(D)** Given that MafB is expressed in Hep3B under basal conditions, nuclear translocation of
10 MafB was quantified after quantifying the intensity of MafB in the nucleus versus the cytosol.
11 For this purpose, the image processing and analysis program "ImageJ" version 1.49¹⁸ was
12 used to scan and analyze black and white images of transduced cells. Nuclear MafB was
13 calculated according to the formula: MafB light intensity in the nuclei / MafB light intensity in
14 the cytosol. Data represent the mean of four counts in one representative experiment out of
15 3.
16 White and yellow arrows show the distended nuclei and MafB in the distended nuclei,
17 respectively. MafB was weakly detected in the nuclei of non-distended HT-29 cells located at
18 the periphery of the HT-29 cell clusters, pointed with white arrowhead.
19 Scale bar, 10 μ m
20 *: p<0.05
21 CdtB, CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1
22 CdtB-H265, *H. hepaticus* CdtB with H265L mutation
23 DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindol
24 dN, distended nuclei
25 L, enlarged lamellipodia/membrane ruffles
26 TFP, tdTomato fluorescent protein
27



1 **SUPPLEMENTARY FIGURE LEGEND**

2 **Figure. S1.** MafB localization in intestinal epithelial cells in response to the CdtB of
3 *Helicobacter pullorum*.

4 **A)** After 72 h of transduction experiments with lentiviral particles expressing the CdtB of *H.*
5 *pullorum* strain H495 versus the green fluorescent protein, HT-29 cells were processed for
6 fluorescent staining with DAPI to detect the nucleus (blue) and fluorescent labelled-phalloidin
7 to detect F-actin (red). Additional immunostaining with primary anti-MafB antibody followed
8 by fluorescent labelled-secondary antibodies (green) was used.

9 The yellow arrows show MafB in the distended nuclei.

10 **B)** The percentage of cells with positive-MafB nuclei was determined after immunostaining
11 and subsequent counting.

12 Scale bar, 10 μ m

13 *: $p < 0.05$

14 CdtB, CdtB of *H. pullorum* strain H495

15 DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindol

16 dN, cells with distended nuclei

17 GFP, enhanced green fluorescent protein

18 L, enlarged lamellipodia

19

III. Publication n°3

The cytolethal distending toxin subunit CdtB of *Helicobacter hepaticus* induces apoptosis, senescence and cell growth in intestinal and hepatic epithelial cell xenograft mouse models.

Christelle Péré-Védrenne, Lucie Chambonnier, Benoit Rousseau, Christine Varon, Elodie Sifré, Pierre Dubus, Francis Mégraud Armelle Ménard

Oncotarget - Manuscrit en préparation

Helicobacter hepaticus est un pathogène de la souris qui colonise les voies biliaires et le foie à partir de l'intestin, où il induit des lésions inflammatoires, une hépatite et, chez certains animaux plus âgés, un carcinome hépatique (Fox *et al.*, 1994). La « Cytolethal Distending Toxin » (CDT) de *H. hepaticus*, via sa sous-unité CdtB, joue un rôle clé dans l'inflammation et le développement du cancer du foie chez la souris. (Ge *et al.*, 2007) *In vitro*, la CDT induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M principalement et en G1/S en 48 à 72 h, qui peut conduire à l'apoptose ou la sénescence cellulaire (Blazkova *et al.*, 2010; Comayras *et al.*, 1997; Wising *et al.*, 2005a). Il est donc difficile d'étudier les effets à moyen terme de la toxine (*in vitro* et *in vivo*). Cependant, certaines cellules, intoxiquées à des doses de CDT sub-léthales, échappent à ces mécanismes antiprolifératifs, réparent leurs lésions à l'ADN et poursuivent leur cycle cellulaire (Guidi *et al.*, 2013b).

Le but de la présente étude était d'évaluer l'effet d'une intoxication chronique à la CdtB sur le développement tumoral et d'identifier les mécanismes de réponse impliqués. Nous avons développé plusieurs lignées de cellules épithéliales intestinales et hépatiques permettant l'expression conditionnelle de la toxine CdtB de *H. hepaticus*, de son mutant pour l'activité DNase (CdtB-H265L) ou de la protéine rouge fluorescente (RFP) utilisée comme témoin. Le gène *cdtB* fusionné à la séquence de l'épitope de l'hémagglutinine du virus humain influenza (3HA) a été cloné sous la dépendance d'un promoteur inductible par la tétracycline. Le transfert des séquences RFP, *cdtB-3HA* et *cdtB-H265L-3HA* dans des cellules HT-29 (adénocarcinome du côlon) et Hep3B (carcinome hépatocellulaire) a été obtenu par transduction lentivirale. Les cellules ayant intégré le transgène ont été sélectionnées en présence de puromycine et l'effet de la CdtB a été validé *in vitro*. Les lignées HT-29 et Hep3B contenant les séquences lentivirales ont ensuite été greffées chez des souris immunodéficiences NSG (n = 60). Le développement tumoral a été suivi deux fois par semaine en mesurant la taille de la tumeur. Après la prise de greffe, les souris ont été traitées de manière permanente avec la doxycycline permettant l'expression des protéines d'intérêt (RFP, CdtB ou CdtB-H265L). Pour les 2 lignées, les résultats préliminaires ont montré une bonne croissance de la tumeur chez les souris témoins (RFP) et CdtB-H265L tandis que la croissance des tumeurs était retardée, mais pas arrêtée pour les cellules exprimant la CdtB. Ainsi, la croissance tumorale journalière des tumeurs dérivant des lignées intestinales et hépatiques était de 100 à 194 mm³ par jour pour les cellules exprimant la RFP contre 34 à 51 mm³ pour les cellules exprimant la CdtB. Ces résultats ont été confirmés par le poids des tumeurs à l'autopsie, les tumeurs étant deux fois plus grosses chez les souris témoins par rapport à celles exprimant la toxine. L'effet cytopathogène de la toxine semble dû à son

activité DNase, puisque le mutant CdtB-H265L présente des résultats similaires à la protéine témoin RFP. Les analyses histologiques préliminaires ont montré la présence de la toxine ou de son mutant majoritairement dans le noyau des cellules. Les cellules exprimant la CdtB étaient « distendues ». Une augmentation de l'expression de la caspase 3 activée en réponse à la CdtB a aussi été observée, suggérant l'apoptose des cellules. Les tumeurs exprimant la CdtB ont également une augmentation de l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21, ainsi que de l'activité β -galactosidase, indiquant que certaines cellules ayant résisté à l'intoxication aiguë, contournent la mort cellulaire par une sénescence cellulaire. Paradoxalement à la mise en place de ces mécanismes d'arrêt de prolifération, le marqueur de prolifération cellulaire Ki67 était également surexprimé en réponse à la toxine, suggérant que la toxine, par une action indirecte pourrait induire un micro-environnement favorisant la croissance tumorale comme cela a été identifié pour la génotoxine colibactine (Cougnoux *et al.*, 2014). La balance apoptose/sénescence/prolifération induite en réponse à la CdtB pourrait expliquer le retard de croissance observé.

Le suivi de la croissance est actuellement limité par la taille maximale que peuvent atteindre les tumeurs en fonction des règles éthiques. Un autre essai de xénogreffe a été réalisé avec 10 fois moins de cellules injectées. Cet essai a permis de suivre la croissance tumorale sur 50 jours et a montré un retard drastique, mais pas un arrêt dans la croissance cellulaire des cellules intoxiquées avec la CdtB. Cependant, l'analyse des tumeurs obtenues au cours de cet essai n'est pas possible en raison du fort niveau de nécrose des échantillons (témoins et toxine) probablement dû au long temps d'incubation chez l'animal.

Ce modèle de xénogreffe de cellules épithéliales chez la souris constitue une nouvelle voie d'étude des effets d'une intoxication chronique avec la Cytolethal Distending Toxin de *H. hepaticus*.

The cytolethal distending toxin subunit CdtB of *Helicobacter hepaticus* induces apoptosis, senescence and cell growth in intestinal and hepatic epithelial cell lines xenograft mouse models


Christelle Péré-Védrenne,^{1,2} Lucie Chambonnier,^{1,2} Benoit Rousseau,³ Christine Varon,^{1,2} Elodie Sifré,^{1,2} Pierre Dubus,⁶ Francis Mégraud,^{1,2} Armelle Ménard,^{1,2*}


¹*INSERM U853, Infection à Helicobacter, inflammation et cancer, F33076 Bordeaux, France*

²*Université de Bordeaux, Centre National de Référence des Helicobacters et Campylobacters, F33076 Bordeaux, France; <http://www.cnrch.u-bordeaux2.fr/>*

³*Université de Bordeaux, Service commun des animaleries, Animalerie A2, F33076 Bordeaux, France*

⁴*Université de Bordeaux, Histologie et Pathologie Moléculaire des Tumeurs, F33076 Bordeaux, France.*

***Corresponding author:** Armelle Ménard  Université de Bordeaux, Carreire, Laboratoire de Bactériologie, INSERM U853 - Bâtiment 2B RDC Case 76 – 146 rue Léo Saignat, F33076 Bordeaux, France. Email: Armelle.Menard@u-bordeaux.fr

 + 33 (0) 5 57 57 12 88

Key words: *Helicobacter hepaticus*; CdtB subunit; cytolethal distending toxin; immunodeficient mice; xenograft, DNase activity, apoptosis, senescence, proliferation, endoreplication, cancer.

ABSTRACT

Cytotoxic distending toxins (CDTs) are usually composed of CdtA, CdtB and CdtC subunits necessary to exert cytopathic effects, via the active CdtB subunit. *In vitro*, CDT induces a G2/M cell cycle arrest in epithelial cells via its CdtB subunit in 48-72 h. It is thus difficult to study longer-term effects of the CDT. In the present study, human intestinal and liver cancer cell lines xenograft mouse models were set up to study the effects of the CdtB subunit of *Helicobacter hepaticus* on tumor growth. Intestinal HT-29 and hepatic Hep3B cell lines were established using a lentiviral strategy to allow the tetracycline-inducible expression of the red fluorescent protein (RFP, used as control), the CdtB subunit of *H. hepaticus*, and the corresponding CdtB mutated in its catalytic DNase site (H265L). These transduced cells were then engrafted into NSG immunodeficient mice (n=40 for HT-29, n=20 for Hep3B) and the tumoral development was followed over time by measuring the tumor size. After successful engraftment, mice were permanently treated with doxycycline to induce the expression of transgenes. For both cell lines, results revealed a delayed but not arrested tumor growth in CdtB expressing tumors compared to control RFP expressing tumors. These results were confirmed by the tumor weight at necropsy. Histology revealed an increase in the cleaved caspase 3 in response to the CdtB, increased β -galactosidase activity as well as an increased expression of p21 and Ki67 nuclear antigens. All of these effects were dependent on the DNase activity of the CdtB, suggesting that the CdtB, via its DNase catalytic site, triggers apoptosis, senescence and cell growth of engrafted cells.

INTRODUCTION

Cytolethal distending toxin (CDT) is widely distributed in many pathogenic Gram-negative bacteria but research on this toxin has been hampered by the toxicity of its active CdtB subunit. As a result, CDT has been little studied due to difficulties to produce and purify sufficient amounts of the 3 subunits to reconstitute a complete holotoxin (CdtA, CdtB and CdtC), the CdtB being toxic for numerous expression systems. To bypass these technological barriers, we previously implemented a lentiviral-based approach to investigate the effects of the CdtB subunit [1, 2]. This system has made it possible to deliver the CdtB of *Helicobacter pullorum* and *Helicobacter hepaticus* directly into the cells and to attribute the effects observed, specifically to the active CdtB subunit of the CDT. However, this latter system, although very useful, does not allow the study of longer-term effects of the CdtB subunit or the possibility to conduct experiments requiring large amounts of biological samples. Indeed, due to the CdtB induced G2/M cell cycle arrest after a 72 h transduction *in vitro* [1], the use of new lentiviral particles is necessary for each new experiment. In addition, because of the toxicity of the CdtB subunit in HEK293T cells used to produce lentivirus, the harvest of the lentiviral particles should be performed early, leading sometimes to low lentiviral titre; consequently the number of experiments must be increased which can become quite expensive. Since constitutive expression of the CdtB subunit was associated with cell cycle arrest, we set up a system for the conditional expression of the CdtB.

H. hepaticus colonizes the mouse intestine, then the biliary tract and liver where it causes chronic inflammatory lesions which may progress to hepatocarcinoma in older animals [3, 4]. This bacillus also induces colitis and colonic carcinoma in susceptible mice (reviewed in [5]). However, the molecular mechanisms associated with the evolution of this chronic infection toward cancer are poorly understood. *H. hepaticus* CDT plays a key role in inflammation and the development of liver cancer in mice via its active subunit CdtB, constituting an excellent model of induction of carcinogenesis.

In the present study, we report the construction of lentiviral vectors which were used to establish stable transgenic cell lines that allowed the induction of the conditional expression of *H. hepaticus* CdtB. Once the lentiviral expression systems of CdtB were validated *in vitro*, cells were engrafted to immunodeficient mice. After successful engraftments, the transgene expression was induced for longer-term study and the effects of *H. hepaticus* CdtB were analysed on tumor growth and cell proliferation, apoptosis and senescence. The involvement of the DNase activity of CdtB was explored upon induction of the expression of *H. hepaticus* CdtB with His→Leu mutation at residue 265 (H265L) involved in DNase activity [6].

MATERIALS & METHODS

Most of materials and methods used in this study are presented in supplementary Materials and Methods. They include cell lines and culture, *H. hepaticus* strain, reagents and antibodies, the construction of lentiviral plasmids with the *cdtB* sequences fused at their 3' end to three repeats of the influenza hemagglutinin epitope (HA) (available in GenBank database under the accession numbers KT590046 and KT590047), lentivirus production, immunofluorescence / image analysis, primer design, RT-PCR experiments and statistical analysis.

Ethics statement for *in vivo* experiments

Approval was obtained from the French Committee of Genetic Engineering (approval number 4608) and the Central Animal Facility Committee at the University of Bordeaux before initiation of the study. All animal experiments were performed in level 2 animal facilities at the University of Bordeaux, in accordance with national institutional guidelines and with the agreement of the local Ethics Committee on Animal Experiments CEEA50 in Bordeaux (agreement number 50120151-A).

Transduction experiments and establishment of stable transgenic cell lines

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 1×10^5 /well and incubated for 24 h. The culture medium was then removed and volumes corresponding to a multiplicity of infection (MOI) of 30 viruses/cell in foetal calf serum (FCS)-free renewed medium were added to each cell culture well for 12 h. Then, FCS was added to a final concentration of 10% for another 12 h. The medium was then completely renewed with fresh medium with FCS and incubation was continued for 3 days. The cells were then seeded in T25 tissue culture flasks. After adherence, the cells were permanently cultured in the presence of puromycin (2 μ g/ml) to specifically select cells having integrated the sequences of interest and to establish a stable cell line carrying the transgenic sequence in a transcriptionally silent form. When required, the transgene expression was induced in the cells from the tetracycline-inducible promoter

by addition of doxycycline (200 ng/ml) to the culture medium and incubation was followed for 72 h.

Mouse xenografts of HT-29 and Hep3B cells

Immunodeficient non-obese diabetous/shi-severe combined immunodeficiency/interleukin-2R γ manull (NSG) mice under 2.5% isoflurane anesthesia (Belamont, Piramal Healthcare, Northumberland, UK) were injected subcutaneously into the right shaved flank with 2×10^6 HT-29 cells or 4×10^6 Hep3B cells resuspended in 100 μ l in culture medium without FCS. HT-29 and Hep3B groups of mice were composed of 40 and 20 mice, respectively, with 3 groups for HT-29 (RFP group n=15, CdtB group n=15 and CdtB-H265L group n=10) and 2 groups for Hep3B (RFP group n=10 and CdtB group n=10). Tumor growth was monitored 3 times per week by measuring the length (L) and width (W) of the tumor with a caliper, and tumor volume was calculated according to the formula $\frac{1}{2} (L \times W^2)$. When the engrafted HT-29 and Hep3B tumors were visible through the animal's skin and reached approximately 100 and 200 mm³, respectively, doxycycline was added constantly at a concentration of 2 mg/ml to the water bottles of all of the mice. At the end of the experiments (4 weeks post-engraftment), mice were sacrificed by cervical dislocation and tumor weight was determined. Tumors were immediately harvested and processed for further analyses; they were divided into 3 pieces. The first part of the tumor was directly snap frozen using liquid nitrogen and stored at -80°C. The second part was fixed immediately in 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for 4 h at room temperature, washed three times with PBS at room temperature and further incubated in 30% sucrose (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) in PBS overnight at 4°C; then the tumor was stored at -80°C in Tissue-Tek® OCT-compound (Sakura, Labonord, Templemars, France). The third part of the tumor was fixed immediately in 4% formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) for 24 h at room temperature and washed three time with PBS; then tissues were subsequently submitted to standard histological processing and paraffin embedding.

RESULTS

Establishment of stable transgenic cell lines

Epithelial intestinal HT-29 and hepatic Hep3B transgenic cell lines were established by lentiviral transduction (see Supplementary Materials and Methods). Briefly, the pTRIPz lentiviral plasmid with two independent promoters was used: the UBC promoter allowed the constitutive expression of the gene for resistance to puromycin, and the tetracycline response element (TRE) promoter was inducible by tetracycline. The *cdtB* sequences of *H. hepaticus* fused to a multi-HA tag were cloned downstream of the TRE promoter in this plasmid instead of the RFP gene initially present in this vector. Cells having the integrated transgene sequence (in a transcriptionally silent form) were selected in the presence of puromycin. Three cell lines were established for HT-29 and Hep3B, each expressing on demand, from the TRE conditional promoter: the enhanced RFP, the CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1 and the CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1 with the His→Leu mutation at residue 265 (H265L) involved in DNase activity [2, 6]. The integration of transgenes in the cells lines was verified by RT-qPCR for each cell line (data not shown). The induction of the cytopathogenic effects of the CdtB was verified by immunofluorescence analyses. In both cell lines (Fig. 1), the *H. hepaticus* CdtB induced the well-known effects of the CDT in all the cells, *i.e.* a cellular and nuclear enlargement, with the formation of cortical actin-rich large lamellipodia [1] and actin stress fibers [7] as well as the nuclear translocation of NF- κ B [2]. Accordingly, the *H. hepaticus* CdtB induced the expected cellular distending phenotype and actin cytoskeleton remodelling. These effects were not observed in control cells expressing the RFP nor in cells expressing the mutated CdtB-H265, showing that the H265L mutation in the catalytic site of the DNase completely abolished the CdtB-dependent effects, as previously reported [2, 6]. Taken together, these results validated the use of these transgenic cell lines established by lentiviral transduction. It should be noted that most of the CdtB expressing cells did not survive beyond 5 days.

The CdtB induced tumor growth delay

Transgenic cells lines were engrafted into NSG immunodeficient mice and the tumoral development was followed over time by measuring the tumor size. After successful engraftment, the expression of the transgenes was induced permanently with *per os* doxycycline (indicated by arrows in Fig. 1). The time required to observe the expression of the transgenes induced by the doxycycline corresponded to approximately 8-10 days; an additional 2-3 days was required to observe the effect of the CDT, and the CdtB effect was expected after 12-15 days of doxycycline treatment. Constant tumor growth was observed in control RFP-mice while the tumor growth was significantly delayed in CdtB-mice for the last two and three tumor measurements for HT-29 and Hep3B, respectively (Fig. 2). The daily tumor growth (determined from the beginning of the doxycycline treatment until the mice were sacrificed) confirmed these results. At necropsy, the average tumor weight for CdtB-mice was at least 2 times lower than that of the RFP-mice for both tumor-derived cell lines. All of these effects were not observed in response to the *H. hepaticus* CdtB with the His→Leu mutation at residue 265 involved in DNase activity (H265L), demonstrating the importance of this activity in tumor growth.

Histology analysis

The effects of CdtB were explored on the tumors by histology. The CdtB induced a cellular and nuclear enlargement (Fig. 3A, tips of arrows). These effects were not observed in the tumors expressing the RFP or the CdtB-H265L. Expression of RFP was visible to the naked eye in both tumor-derived cell lines. Histological analysis revealed that overall the multi-HA tag was detected in both the cytosol and the nuclei of all of the cells comprising the HT-29-derived tumors, thus confirming the expression of the CdtB and CdtB-H265L (Fig. 3B). In Hep3B, HA labeling generated a very significant background noise, preventing analysis of Hep3B-derived tumors. The expression of RFP, CdtB and CdtB-H265 was thus confirmed in RT-PCR experiments (not shown). Taken together, these data show that the

transgenes are transcribed into mRNA and that the corresponding proteins (RFP, CdtB and CdtB-H265) are expressed.

The expression of certain proteins involved in apoptosis, cell proliferation, cell cycle and senescence was analyzed by histology with subsequent quantification of positive cells using the Mercator system image acquisition. The tumor suppressor triggering apoptosis p53 was not very helpful to analyze the tissues since the p53 gene is mutated in HT-29 resulting in a constitutive high level p53 protein expression (see [8] and Fig. S1A). In addition, the p53 gene is partially deleted in Hep3B [9] and the p53 protein was not detected with the antibodies used (Fig. S1B). The detection of the large fragment of activated caspase-3 resulting from cleavage adjacent to Asp175 is indicative of apoptosis. Some positive cells were detected in all of the CdtB-tumors where the CdtB induced a 3-fold increase in cleaved caspase 3 as compared to what has been quantified in RFP and CdtB-H265L tumors (Fig. 4A). These data suggest that the CdtB is associated with an increase in apoptotic cells and that the DNase activity is involved in the CdtB-induced apoptosis.

p21 is a regulator of cell cycle progression mediating growth arrest and cellular senescence. p21 expression was very low in RFP and CdtB-H265L tumors while its expression was increased 7-fold in response to the CdtB (Fig. 4C). Interestingly, the most intense p21 staining was constitutively present in the larger nuclei. As β -galactosidase catalyses the hydrolysis of β -galactosides into monosaccharides only in senescent cells, the detection of β -galactosidase activity was performed to evaluate senescence. High β -galactosidase activity was induced in CdtB-tumors as compared to RFP- and CdtB-H265L-tumors (Fig. 4D). Taken together, these results demonstrate that the *H. hepaticus* CdtB induced a strong senescence. In addition, the DNase activity of the CdtB is involved in the CdtB-induced senescence.

Similarly, the nuclear antigen KI-67, a cell proliferation marker was also detected and quantified in all of the tumor groups (Fig. 4B). Its expression was increased 2-fold in response to the CdtB versus RFP and CdtB-H265L tumors. In the CdtB tumors, Ki67 was mostly detected in enlarged nuclei; more nuclei were bigger and KI67 labeling was more

intense, indicating an activation of the cell cycle in these CdtB-induced enlarged cells. This effect was not observed in CdtB-H265L tumors, suggesting that it was associated to the CdtB DNase activity. These results suggest that the CdtB triggers cell endoreplication with cytokinesis defect, leading to giant polyploid cells (often multinucleated) with increased expression of the cell cycle proliferation marker Ki67 as well as the cyclin-dependent kinase inhibitor 1, p21. p21, can also interact with the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), however PCNA histology revealed an intense labelling in the RFP control tumors which obstructed the visualization of the CdtB effect (Fig. S1B).

DISCUSSION

In the present study, the direct effects of the active CdtB subunit of the CDT were evaluated using several epithelial cell lines allowing the inducible expression of the *H. hepaticus* CdtB. *In vitro*, this lentiviral model reproduced the well-known effects of the *H. hepaticus* CdtB, i.e. major remodelling of the cytoskeleton as well as the nuclear translocation of NF- κ B [2, 7]. The transduced cells were then engrafted into immunodeficient mice and the CdtB subunit was expressed. In this xenograft model, the CdtB expression was associated with a delayed tumor growth, confirmed by the tumor weight at necropsy. Histology results revealed the presence of the CdtB in the nuclei as well as an increase in apoptosis, senescence and both cell cycle inhibitors and cellular proliferation markers.

In vitro, it was shown that primary cells, fibroblasts, endothelial cells, hematopoietic and epithelial cells exposed to CDT undergo apoptosis after the acute phase of CDT intoxication [10, 11]. However, the CDT-induced apoptosis depends on the cell type, in particular its p53 status, the dose of toxin and the incubation time. Indeed, the CDT induces *in vitro* apoptosis and necrosis in 90% of the infected T cells and monocytes, while apoptosis ranged from 26-32% in epithelial cells, keratinocytes and fibroblasts, as demonstrated with the *Haemophilus ducreyi* CDT [11]. The apoptosis induced by the toxin is mainly mediated by the ATM pathway, in a independent or dependent p53 activation manner (reviewed in [12]. In the latter case, CDT overexpresses the active phosphorylated form of p53. The CDT-induced apoptosis can also be mediated via mitochondria, dependently or independently of the activation of caspases; this pathway is usually activated in the mutated p53 cell types [13, 14]. In the present tumor xenograft model, no p53 regulation could be observed since the p53 gene is mutated in both HT-29 and Hep3B cell lines, suggesting that the CdtB-induced apoptosis would be ,in fact, mediated through the mitochondrial-dependent-caspase activation pathway; the increase in activated caspase 3 associated with the expression of the *H. hepaticus* CdtB supports this hypothesis.

Although apoptosis usually occurs in response to the CDT, it was demonstrated that this phenomenon does not affect all of the intoxicated cells since normal and cancer-derived cells can survive the acute phase of intoxication with the CDT *in vitro* and enter cellular senescence. Cancer derived cells exhibit cellular senescence markers, such as an increase in β -galactosidase activity and an overexpression of cell cycle inhibitors such as p21, p53, p16INK4a; as demonstrated for the *H. ducreyi* CDT [15, 16]. Senescence is characterized as a program of restricted proliferative capacity, which is manifested by broad morphological and biochemical changes and by an irreversible cell cycle arrest. In the present xenograft models, senescence undoubtedly occurred, as demonstrated by the increase in β -galactosidase activity and the increased expression of the nuclear cell cycle inhibitor p21. The secreted chemokines and pro-inflammatory cytokines usually associated with senescent cells [17] could not be tested in this xenograft model since the expression of the transgenes was induced with doxycycline, a potent anti-inflammatory agent.

Ki-67 protein is present during all active phases of the cell cycle (G1, S, G2, and mitosis), but is absent from resting cells (G0), making it an excellent marker for cellular proliferation. In the HT-29- and Hep3B-derived tumors, Ki67 was overexpressed or accumulated in the CdtB-induced tumors, suggesting that some cells survive the persistent CdtB effect and could proliferate. The co-expression of both the Ki67 proliferation marker and P21, the main inducer of cell cycle arrest and senescence, suggest that CdtB triggers endoreplication associated to cytokinesis defect and no subsequent cell division, leading to giant polyploid cells as previously observed [1]. In addition, p21 overexpression may not be sufficient at inhibiting replicative DNA synthesis *in vivo* [18]. This is consistent with the delayed tumor growth observed *in vivo*, showing a lack of complete cellular arrest. This last point is a matter of discussion and deserves to be studied in more detail. *In vivo*, increased nuclear labelling of Ki67 was previously reported in *H. hepaticus*-induced liver tumors compared to normal livers [19]. Moreover, in mice infected with the wild type strain of *H. hepaticus*, a 6.5 fold increase in Ki67-positive hepatocytes were observed after 4 months of infection, compared to mice infected with the corresponding *cdtB* isogenic mutant,

demonstrating that the CDT is associated with an increased hepatocyte proliferation [20]. These data show that in certain instances intoxicated cells can survive and proliferate [12]. In the present study, all of the cells are believed to be intoxicated by the CdtB since puromycin selection was maintained *in vitro* for more than 60 days prior to engraftments and histological analysis revealed that the multi-HA tag was detected in all of the cells of the HT-29-derived tumors. Furthermore, the CdtB associated cytopathic effects were present in all of the cells of the Hep3B-derived tumors. In the present xenograft assays, the CdtB-intoxicated cells either underwent apoptosis or entered senescence; the remaining Ki67-positive cells could correspond to cells with a low *cdtB* transgene copy. Indeed, it was recently demonstrated that cells exposed to sub-lethal doses of the *H. hepaticus* or *H. ducreyi* CDT present on one hand genomic instability and altered DNA damage response and on the other hand normal cell cycle distribution with no decrease in viability nor phenomenon of senescence [21], suggesting that chronic CDT intoxication promotes the survival and proliferation of cells carrying impaired mechanisms of detection and repair of DNA damage [22].

A recent xenograft model assessed the proliferation of cells in response to *Escherichia coli* colibactin [23], the second bacterial genotoxin promoting cell cycle arrest and enlargement of the cell body and nucleus [24], effects reminiscent of the effects of the CDT. In this xenograft model, colibactin-producing *E. coli* indirectly enhance cell proliferation and tumor growth by inducing the emergence of senescent cells secreting growth factors [23].

Another xenograft assay was performed over a longer period of doxycycline induction to examine more deeply these CdtB-surviving cells but it was not possible to analyze the tumors due to high levels of necrosis, inherent to the long-engraftment period (not shown). In the meantime, these cancer cell xenograft mouse models constitute a new way of exploring the effects of *H. hepaticus* CdtB.

ACKNOWLEDGMENTS

1) The authors report no conflicts of interest. Christelle Péré-Védrenne is the recipient of a predoctoral fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer. The authors wish to thank Christophe Grosset (INSERM UMR1053, Physiopathologie du cancer du foie, University of Bordeaux, France) for supplying the Hep3B cell line. We are grateful to Murielle Fevre and Coralie Danet (level 2 animal facilities of the University of Bordeaux) for technical support. Lentivirus productions were performed at the “Vectologie lentivirale” service platform of the Federative Research Structure “TransBioMed” of the University of Bordeaux (Bordeaux, France). We are grateful to Véronique Guyonnet-Dupérat for technical assistance. Quantification of histological sections with Mercator was performed at the histology platform of the University of Bordeaux.

2) Funding sources: This work was supported in part by the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (INSERM), the University of Bordeaux and the Federative Research Structure ‘Biology: from basics to Medicine’ (‘TransBioMed’) at the University of Bordeaux (2013).

3) Part of this work was presented as a poster at the XXVIIth International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer (European *Helicobacter* Study Group) in Rome, Italy, from September 10-13, 2014.

REFERENCES

1. Varon C, Mocan I, Mihi B, Pere-Vedrenne C, Aboubacar A, Morate C, Oleastro M, Doignon F, Laharie D, Megraud F and Menard A. *Helicobacter pullorum* cytolethal distending toxin targets vinculin and cortactin and triggers formation of lamellipodia in intestinal epithelial cells. *The Journal of infectious diseases*. 2014; 209(4):588-599.
2. Pere-Vedrenne C, Cardinaud B, Varon C, Mocan I, Buissonnière A, Izotte J, Megraud F and Menard A. The cytolethal distending toxin subunit CdtB of *Helicobacter* is proinflammatory and increases the expression of genes encoding antimicrobial proteins *in vitro*. *The Journal of infectious diseases*. 2015; In revision.
3. Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, Paster BJ, Yan L, Taylor NS, Collins MJ, Jr., Gorelick PL and Ward JM. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J Clin Microbiol*. 1994; 32(5):1238-1245.
4. Fox JG, Li X, Yan L, Cahill RJ, Hurley R, Lewis R and Murphy JC. Chronic proliferative hepatitis in A/JCr mice associated with persistent *Helicobacter hepaticus* infection: a model of helicobacter-induced carcinogenesis. *Infection and immunity*. 1996; 64(5):1548-1558.
5. Fox JG, Ge Z, Whary MT, Erdman SE and Horwitz BH. *Helicobacter hepaticus* infection in mice: models for understanding lower bowel inflammation and cancer. *Mucosal immunology*. 2011; 4(1):22-30.
6. Avenaudo P, Castroviejo M, Claret S, Rosenbaum J, Megraud F and Menard A. Expression and activity of the cytolethal distending toxin of *Helicobacter hepaticus*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004; 318(3):739-745.
7. Young VB, Knox KA and Schauer DB. Cytolethal distending toxin sequence and activity in the enterohepatic pathogen *Helicobacter hepaticus*. *Infection and immunity*. 2000; 68(1):184-191.
8. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV and Lane DP. p53 mutations in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990; 87(19):7555-7559.
9. Bressac B, Galvin KM, Liang TJ, Isselbacher KJ, Wands JR and Ozturk M. Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990; 87(5):1973-1977.
10. Smith JL and Bayles DO. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Critical reviews in microbiology*. 2006; 32(4):227-248.
11. Wising C, Azem J, Zetterberg M, Svensson LA, Ahlman K and Lagergard T. Induction of apoptosis/necrosis in various human cell lineages by *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2005; 45(6):767-776.
12. Guerra L, Cortes-Bratti X, Guidi R and Frisan T. The biology of the cytolethal distending toxins. *Toxins*. 2011; 3(3):172-190.
13. Ohara M, Hayashi T, Kusunoki Y, Nakachi K, Fujiwara T, Komatsuzawa H and Sugai M. Cytolethal distending toxin induces caspase-dependent and -independent cell death in MOLT-4 cells. *Infection and immunity*. 2008; 76(10):4783-4791.
14. Liyanage NP, Manthey KC, Dassanayake RP, Kuszynski CA, Oakley GG and Duhamel GE. *Helicobacter hepaticus* cytolethal distending toxin causes cell death in intestinal epithelial cells via mitochondrial apoptotic pathway. *Helicobacter*. 2010; 15(2):98-107.
15. Blazkova H, Krejcikova K, Moudry P, Frisan T, Hodny Z and Bartek J. Bacterial intoxication evokes cellular senescence with persistent DNA damage and cytokine signalling. *J Cell Mol Med*. 2010; 14(1-2):357-367.
16. Kosar M, Bartkova J, Hubackova S, Hodny Z, Lukas J and Bartek J. Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16(ink4a). *Cell Cycle*. 2011; 10(3):457-468.

17. Chan AS, Mowla SN, Arora P and Jat PS. Tumour suppressors and cellular senescence. *IUBMB life*. 2014; 66(12):812-822.
18. Bates S, Ryan KM, Phillips AC and Vousden KH. Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21Waf1/Cip1 expression. *Oncogene*. 1998; 17(13):1691-1703.
19. Rogers AB, Theve EJ, Feng Y, Fry RC, Taghizadeh K, Clapp KM, Boussahmain C, Cormier KS and Fox JG. Hepatocellular carcinoma associated with liver-gender disruption in male mice. *Cancer research*. 2007; 67(24):11536-11546.
20. Ge Z, Rogers AB, Feng Y, Lee A, Xu S, Taylor NS and Fox JG. Bacterial cytolethal distending toxin promotes the development of dysplasia in a model of microbially induced hepatocarcinogenesis. *Cellular microbiology*. 2007; 9(8):2070-2080.
21. Guidi R, Guerra L, Levi L, Stenerlow B, Fox JG, Josenhans C, Masucci MG and Frisan T. Chronic exposure to the cytolethal distending toxins of Gram-negative bacteria promotes genomic instability and altered DNA damage response. *Cellular microbiology*. 2013; 15(1):98-113.
22. Grasso F and Frisan T. Bacterial Genotoxins: Merging the DNA Damage Response into Infection Biology. *Biomolecules*. 2015; 5(3):1762-1782.
23. Cougnoux A, Dalmaso G, Martinez R, Buc E, Delmas J, Gibold L, Sauvanet P, Darcha C, Dechelotte P, Bonnet M, Pezet D, Wodrich H, Darfeuille-Michaud A and Bonnet R. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut*. 2014; 63(12):1932-1942.
24. Nougayrede JP, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Buchrieser C, Hacker J, Dobrindt U and Oswald E. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*. 2006; 313(5788):848-851.
25. Le Roux-Goglin E, Dubus P, Asencio C, Jutand MA, Rosenbaum J and Megraud F. Hepatic lesions observed in hepatitis C virus transgenic mice infected by *Helicobacter hepaticus*. *Helicobacter*. 2013; 18(1):33-40.
26. Varon C, Duriez A, Lehours P, Menard A, Laye S, Zerbib F, Megraud F and Laharie D. Study of *Helicobacter pullorum* proinflammatory properties on human epithelial cells *in vitro*. *Gut*. 2009; 58(5):629-635.

SUPPLEMENTARY MATERIALS & METHODS

Cell lines and culture, *Helicobacter hepaticus* strain and culture

Cell lines were maintained in culture medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. HT-29 human colorectal adenocarcinoma cells (DSMZ no. ACC 299, DSMZ collection) were cultured in McCoy's 5a medium (Invitrogen). Hep3B human hepatocellular carcinoma cells (ATCC® HB-8064™) were grown in Dulbecco's Modified Eagle's medium (Invitrogen).

H. hepaticus strain 3B1 (3B1/Hh-1, CIP 104102, ATCC 51449, CCUG 44777) was cultured as previously reported [25]. DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen SAS, Courtaboeuf, France).

Reagents and antibodies

Puromycin and doxycycline were purchased from Invitrogen and Sigma Aldrich, respectively and monoclonal mouse anti-human Ki-67 antigen (clone MIB-1) and monoclonal mouse anti-human p53 protein (clone DO-7) from DAKO (Les Ulis, France). Polyclonal rabbit anti-human NF-κB p65 (clone C20), monoclonal mouse anti-HA (clone 16B12), monoclonal rabbit anti-human cleaved caspase-3 (Asp175) (clone 5A1E), monoclonal mouse anti-human p21 (clone 6B6) and monoclonal mouse anti-CDKN2A/p16INK4a antibody (clone 2D9A12) were provided from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Covance (Emeryville, CA, US), Cell Signaling (Danvers, MA, US), BD Pharmingen™/BD Biosciences (Le Pont de Claix, France) and Abcam (Paris, France), respectively.

Alexa 488-labeled secondary antibodies, Alexa fluor 647-labeled phalloidin, and 4',6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI) used for immunofluorescence were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

ImmPRESS™ HRP anti-mouse IgG (peroxidase) polymer detection kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, US) and EnVision+ System- HRP Labelled Polymer anti-rabbit (DAKO, Carpinteria, CA, US) were used as secondary antibodies for histology experiments.

Construction of the plasmids used for the lentivirus production

The *cdtB* sequence and the corresponding mutated *cdtB* sequence (A→T transversion at nucleotide 794 [6] corresponding to the His→Leu mutation at residue 265 involved in the DNase activity) of *H. hepaticus* strain 3B1 fused at their 3' end to three repeats of the human influenza hemagglutinin (HA) epitope (*cdtB*-3HA, GenBank accession numbers: KT590046 and KT590047, respectively) were cloned into the pTRIPz lentiviral plasmid (supplied by the Structure Fédérative de Recherche TransBioMed, University of Bordeaux, France) instead of the enhanced Red Fluorescent Protein (RFP) gene and the shRNAmir cloning site. The *cdtB*-3HA sequences were amplified from p252 lentiviral plasmids, previously described [2], by PCR using primers (5'-GCTAGCGTTTAAACATCGATACCGGCCCCGGGATGAGAATACTATTATGCTTTTTTA-3' and 5'-TTAATTAATCGATGAATTCACGCGTACTAGTTTAAGCGTAATCTGGAACG-3') containing the restriction sites *Age*I and *Mlu*I (underlined in the primers) present in the pTRIPz plasmid. The *cdtB*-3HA-990-bp PCR product was first subcloned into the pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). After sequence verification, plasmids from positive clones were extracted using a QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen SAS). The pGEM-T-*cdtB*, pGEM-T-*cdtB* and the pTRIPz plasmids were digested successively using *Age*I and *Mlu*I restriction endonucleases (New England Biolabs, Evry, France). After migration on a 1% agarose gel, the DNA fragments of interest were recovered using a NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (MACHEREY-NAGEL, Hoerd, France). The ligation of the *cdtB*-3HA sequence into the pTRIPz was conducted overnight at 4°C using a molar ratio insert/vector of 3 with 400 U of T4 DNA ligase (Promega) in a final volume of 10 µl. Transformation of the *Escherichia coli* ElectroMAX™ Stbl4™ Competent Cells (Invitrogen) was achieved with 1 µl of the ligation mixture, according to the manufacturer's

recommendations. After a maximum of 16 h of incubation on agarose plates supplemented with 100 µg/ml ampicillin at 37°C, the plasmids were extracted using the QIAprep Spin Miniprep kit and digested by several restriction endonucleases (*EcoRI*, *NotI*, *PvuII*, *XmaI* and *SspI*) to verify the absence of recombination events frequently observed when using unstable vectors. The sequence was finally verified using external primers designed from the pTRIPz (5'-GAGAACGTATGTCGAGGTAGGC-3') and 5'-GGGCGGAAGGATCAGGAC-3') and with internal primers designed on the *H. hepaticus cdtB* gene (5'-AGCAAGAAGGGTGAATCTCG-3' and 5'-TCATTGCCGATACGAATACC-3'). The plasmids were stored at -20°C. As the transformed cells cannot be preserved, new transformations of the ElectroMAX™ Stbl4™ Competent were performed prior to each maxi-preparation of plasmid with the NucleoBond Xtra Maxi EF kit (MACHEREY-NAGEL) with the verifications previously described (digestions and sequencing).

Production of lentivirus particles

The pTRIPz, pTRIPz-*Hh*-CdtB and pTRIPz-*Hh*-CdtB-H265 lentiviral vectors were used for stable cellular integration of the RFP, *H. hepaticus cdtB*-3HA, and *H. hepaticus cdtB*-3HA sequences. Lentiviral particles were produced from these plasmids by the service platform for lentiviral vector production of the Structure Fédérative de Recherche TransBioMed of the University of Bordeaux, as previously described [1]. Viral titres of lentiviruses were determined by measuring the p24 antigen level [1].

Immunofluorescence and image analysis

Cell cultures were grown on glass coverslips. When needed, coverslips were mounted on microscope slides with Fluoromount-G (Clinisciences SA, Montrouge, France) and treated as previously reported [26] with minor modifications. NF-κB nuclear translocation was analyzed by immunostaining with polyclonal antibodies generated against NF-κB p65 (dilution 1/100). Triple-color imaging with DAPI, phalloidin and Alexa 488-labeled secondary antibodies was obtained using selective laser excitation at 405, 647 and 488 nm, respectively.

Tissue analysis, histology and immunohistochemistry

Tissue sections 3 µm thick were prepared from formalin-fixed paraffin-embedded tissues and submitted to standard hematoxylin staining (Sigma Aldrich) and immunohistochemistry protocols. Primary antibodies were incubated for 30 min (Ki67, dilution 1/75), 1 h (p16INK4a, p21 and p53; dilution: 1/500, 1/50 and 1/200 respectively) or 2 h (cleaved caspase-3 and HA, dilution: 1/100 for both 1/50) at room temperature, followed by a 30 min incubation at room temperature with anti-mouse labeled polymer-HRP DAKO Envision Systems (DAKO). Immunolabeling was revealed after a 10 min incubation in liquid substrate-diaminobenzidine-chromogen (DAKO). Slides were counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted with Eukitt-mounting medium (Labonord, Templemars, France). Histology was examined by an expert pathologist (P. Dubus). Images of the staining were recorded on tissue sections using light microscopy and a x20 objective.

Tissue sections 5 µm thick were prepared from fixed frozen optimal cutting temperature compound (OCT)-embedded tissues and submitted to β-galactosidase staining with the Senescence β-Galactosidase Staining kit (Cell Signaling), according to the supplier's recommendations.

Primer designs

PCR primers were designed using the software "Primer Express 2.0" (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and synthesized by Eurofins MWG Operon (Courtaboeuf, France). The PCR primers used for the reference gene (HPRT1, accession number NM_000194.2) are F-HPRT1: 5'-TGGTCAGGCAGTATAATCCA-3' and R-HPRT1: 5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3'. The PCR primers used for the RFP gene are F1-RFP: 5'-TCAAGGAGGCCGACAAAGAG-3' and R1-RFP: 5'-GTA CTTGGCCACAGCCATCTC-3'; those used for the *cdtB* gene of *H. hepaticus* are F2-Hh-cdtB: 5'-CAAGAGGCTGGCGCTATACC-3' and R2-Hh-cdtB: 5'-CACCGGGCTGAACCATTC-3'.

Real Time-PCR experiments and quantification of the expression of RFP and *cdtB* genes

Total RNA samples were extracted from tumors with the miRNeasy Mini Kit (Qiagen). The quality and concentration of the purified RNA was verified by optical density. The absence of residual DNA in the samples was verified by real time PCR targeting the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) under the PCR conditions described below with the forward (5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3') and reverse primers (5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'). RNA extracts were kept at -80°C until use.

Reverse transcription of total RNA up to 2 µg) into cDNA was achieved using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) following the manufacturer's recommendations. Real time (RT)-PCRs for the target and reference (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, HPRT1) cDNA were performed simultaneously under the conditions described below.

Each cDNA was analyzed in triplicate by RT-PCR in a 96-well plate using the LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France). For each PCR, 18 µl of PCR mixture containing 10 ng cDNA per PCR reaction and 12.5 µl of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) were used per well. Then, 2 µl of forward and reverse primers were added in different wells to a final concentration of 1 µM. cDNA was amplified using the following cycling parameters: heating at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of a three-stage temperature profile of 95°C for 10 s, 60°C for 15 s and 72°C for 30 s. At the end of the PCR, a melting step was performed to verify the presence of a single peak at the expected melting temperature confirming the specificity of the PCR and the absence of primer dimers. The option "Absolute Quantification" was chosen for the calculation of threshold cycles (Ct). For each gene, the PCR efficiency (E) was checked using dilutions of the sample to obtain a standard straight line and calculated from the slope of the standard straight line (p) with the following equation:

$$E = 10^{-1/p}.$$

The relative quantification of expression of the target gene was determined according to that of the HPRT1 gene used as a reference. The Ct values obtained were used to calculate a ratio with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [14]. For the relative quantification of the target gene, the ratio $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was calculated from the following equation and was standardized with the HPRT1 gene:

$$\Delta\Delta Ct = Ct(\text{target gene} - \text{reference gene})_{\text{reference cells}} - Ct(\text{target gene} - \text{reference gene})_{\text{target cells}}$$

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5 (GraphPad software, San Diego, CA, USA). The results are presented as the mean \pm standard deviation. The means were compared using a non-parametric test; the Mann-Whitney test, for comparison between two groups. A difference was considered significant when p was less than 0.05.

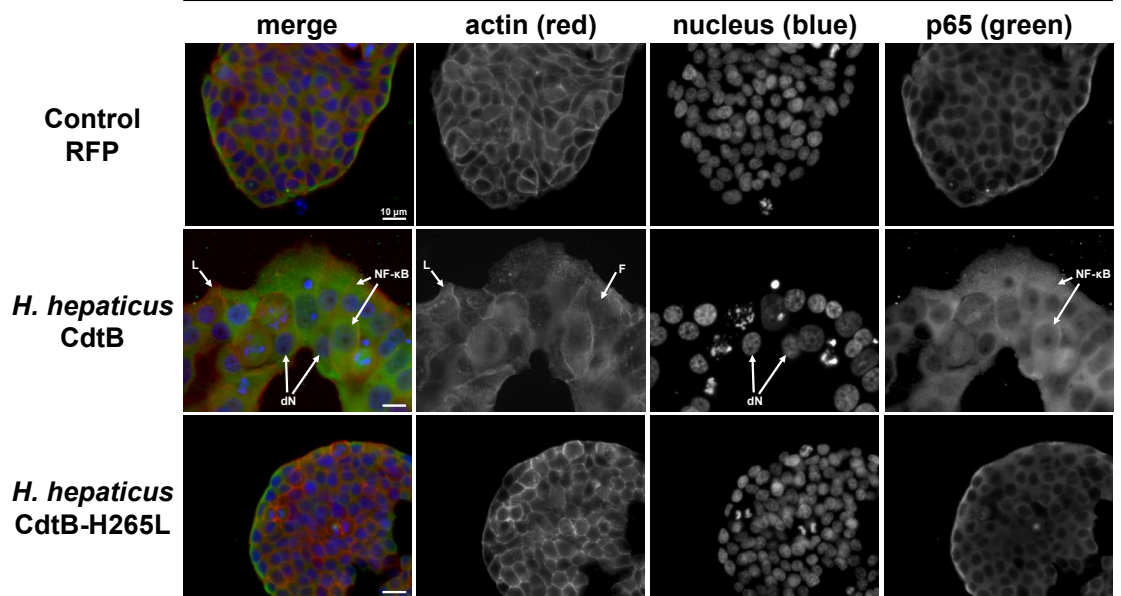
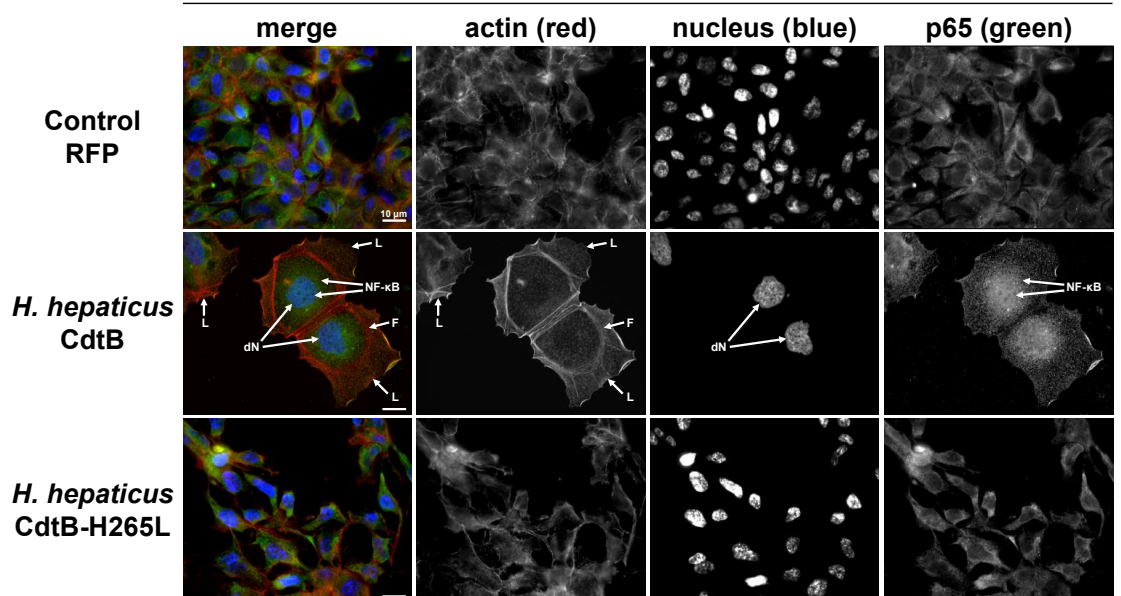
A)**HT-29****B)****Hep3B**

Figure 1. Effects of the CdtB of *Helicobacter hepaticus* CdtB on the cytoskeleton of intestinal and hepatic epithelial cells. Intestinal HT-29 and hepatic Hep3B transgenic cells were cultivated with doxycycline for 72 h to induce the expression of the control Red Fluorescent Protein (RFP), the CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1 (CdtB) or the CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1 with the H265L mutation (CdtB-H265). Cells were then processed for fluorescent staining with fluorescent labeled-phalloidin to detect F-actin (red), DAPI to detect the nucleus (blue) and primary polyclonal antibodies generated against the p65 subunit of the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) associated with fluorescent labeled-secondary antibodies (green).

CdtB, CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1.

CdtB-H265, *H. hepaticus* CdtB with H265L mutation.

DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindol.

dN, cells with distended nuclei

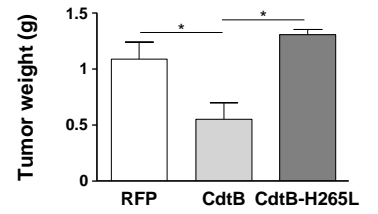
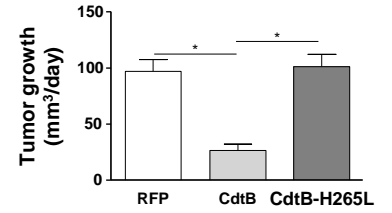
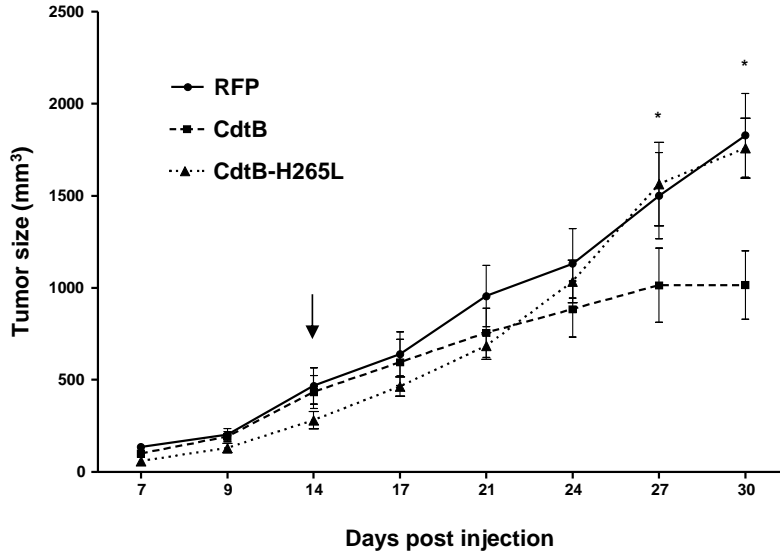
F, actin stress fiber structures

L, enlarged lamellipodia

NF- κ B, nuclear factor-Kappa B

Scale bar, 10 μ m.

A) HT-29



B) Hep3B

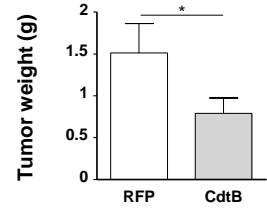
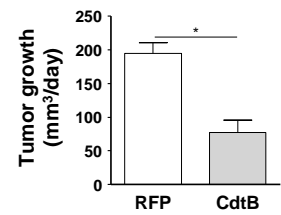
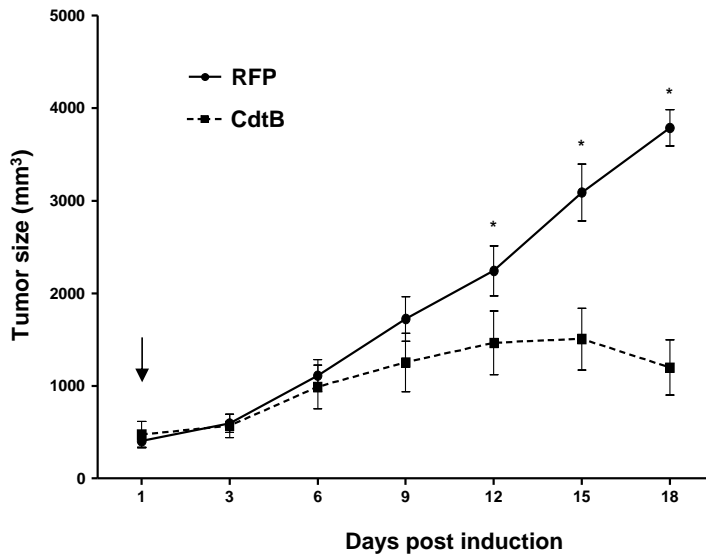


Figure 2. Effects of the CdtB subunit of *Helicobacter hepaticus* CDT on tumor growth

A) HT-29- and **B)** Hep3B-derived tumor growth in mice.

HT-29 (2×10^6 cells) and Hep3B (4×10^6 cells) were injected subcutaneously into the flank of immunodeficient NSG and tumor size was monitored 3 times per week. When the engrafted HT-29- and Hep3B-derived tumors reached approximately 100 and 200 mm³, respectively, doxycycline was administered *per os* permanently to all of the mice.

The curves represent the tumor growth. The daily tumor growth was also determined from the beginning of the doxycycline treatment until the sacrifice of mice. The tumor weight was also measured at necropsy. The arrows indicate the first day of administration of doxycycline.

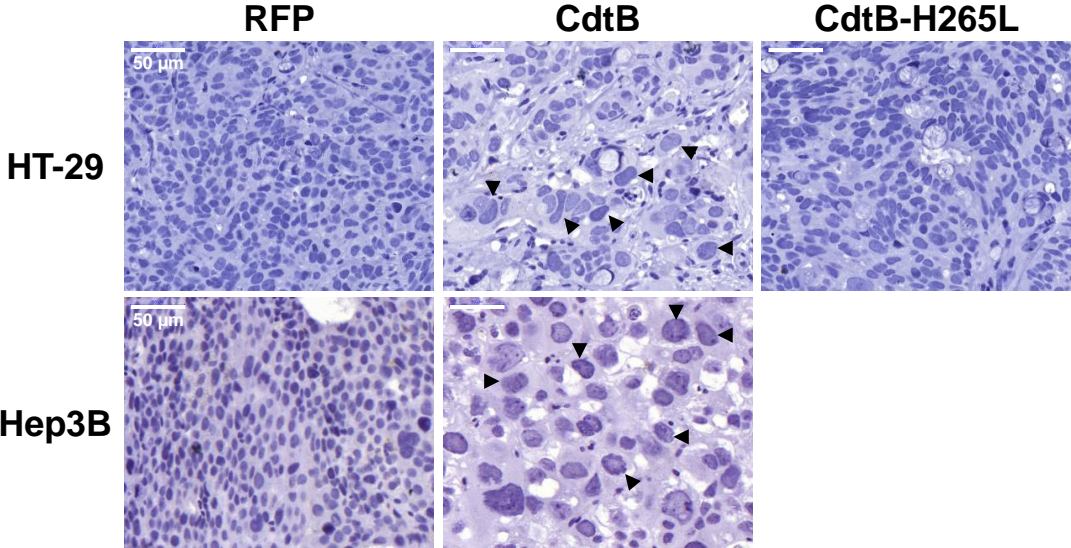
CdtB, CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1.

CdtB-H265, *H. hepaticus* CdtB with H265L mutation.

RFP, red fluorescent protein.

*: $p < 0.05$ versus control.

A) Cells and nuclei distension



B) CdtB & CdtB-H265L localisation (HA)

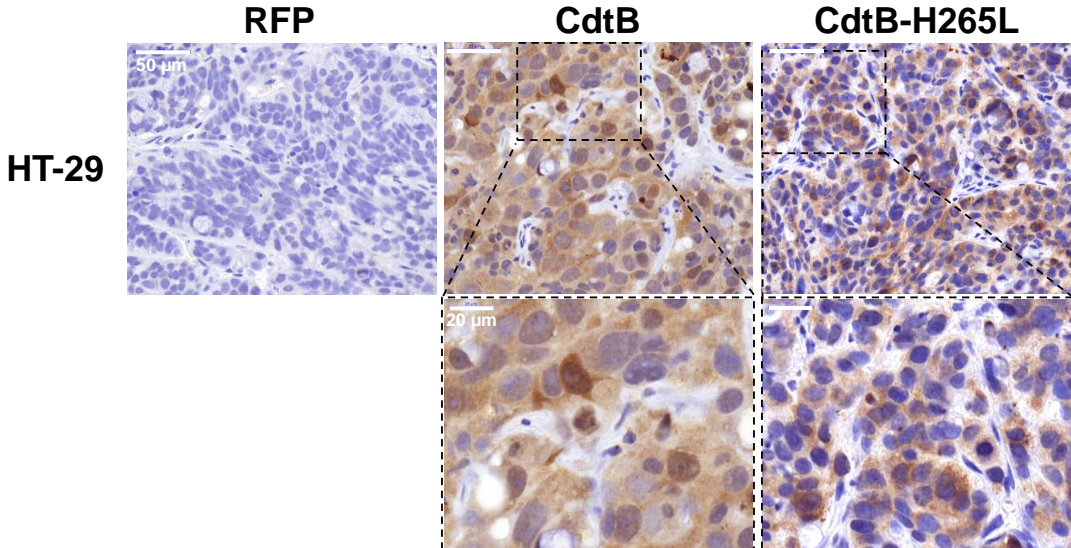


Figure 3. Detection and effect of *Helicobacter hepaticus* CdtB expression in engraft tumors

A) After necropsy, 3 μm -tissue sections of HT-29- and Hep3B-derived tumors prepared from formalin-fixed paraffin-embedded tissues were submitted to standard hematoxylin staining. Tips of arrows indicate distended nuclei as compared to the RFP control tumor. Scale bar, 50 μm .

B) Primary anti-HA antibody was used to detect the HA-tagged CdtB and CdtB H265L in the CdtB and CdtB-H265 groups. The natural fluorescence of the RFP was used in the RFP group. Boxes correspond to enlargement of cells containing the HA-tagged CdtB.

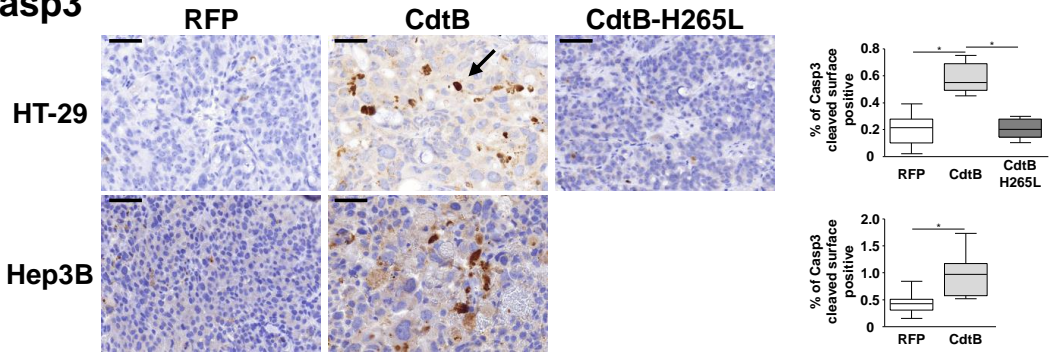
Scale bar, 50 μm and 20 μm for enlargement.

CdtB, CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1.

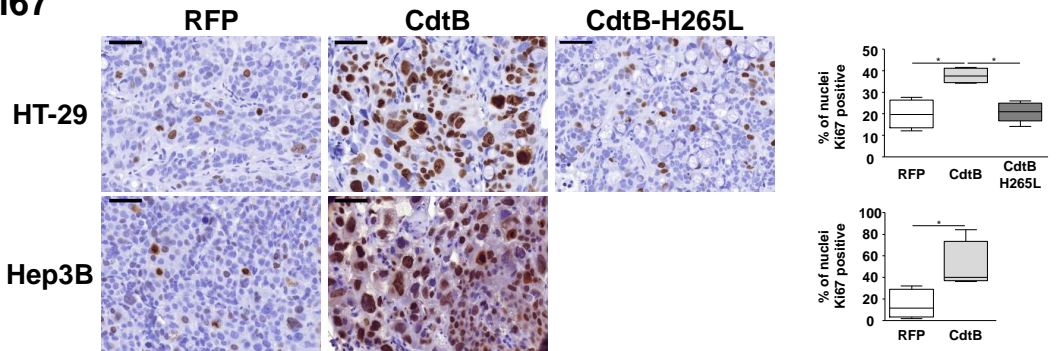
CdtB-H265, *H. hepaticus* CdtB with H265L mutation.

RFP, red fluorescent protein.

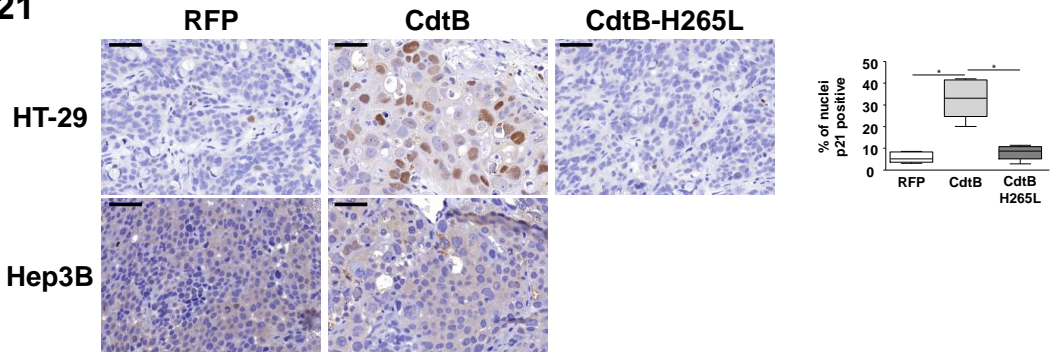
A) Casp3



B) Ki67



C) p21



D) Senescence associated β -galactosidase activity

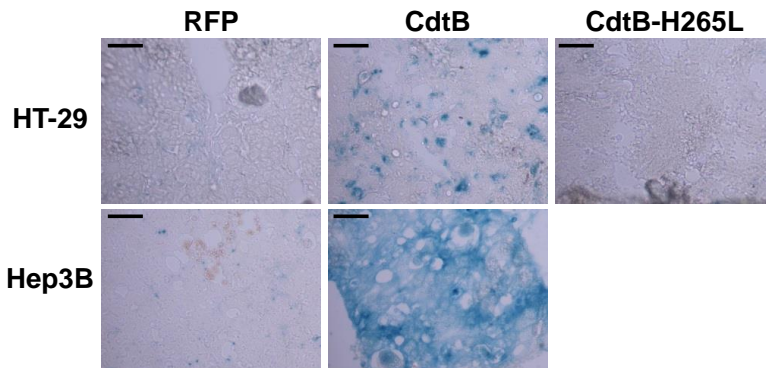


Figure 4. Effect of *Helicobacter hepaticus* CdtB expression in engraft tumors

After necropsy, 3 μm -tissue sections of HT-29- and Hep3B-derived tumors were prepared from formalin-fixed paraffin-embedded tissues and submitted to standard hematoxylin staining and immunostaining raised against various antigens (A to C). Subsequent counting of antigen-positive cells was performed using the Mercator system image acquisition (Explora Nova, La Rochelle, France) for quantification of histological sections. Five μm -tissue sections of HT-29- and Hep3B-derived tumors prepared from OCT-embedded tissues were submitted to β -galactosidase staining (D).

Representative images of immunohistochemistry staining of cleaved caspase-3, Ki67, p21 and detection of the β -galactosidase activity on serial tissue sections of tumor xenografts of intestinal and hepatic epithelial cells.

A) Primary anti-human cleaved caspase-3 was used to detect the caspase-3 cleaved surface protein representing the caspase-3 activation, indicative of apoptosis. Scale bar, 50 μm .

B) Primary anti-human Ki-67 was used to detect the KI-67 antigen, a nuclear protein indicative of cellular proliferation. Scale bar, 50 μm .

C) Primary anti-human p21 was used to detect the cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (also known as CDK-interacting protein 1), a regulator of cell cycle progression involved in growth arrest and mediator of cellular senescence. Scale bar, 50 μm .

D) Detection of the β -galactosidase activity specific of senescent cells. Scale bar, 100 μm .

CdtB, CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1.

CdtB-H265, *H. hepaticus* CdtB with H265L mutation.

RFP, red fluorescent protein.

*, $p < 0.05$

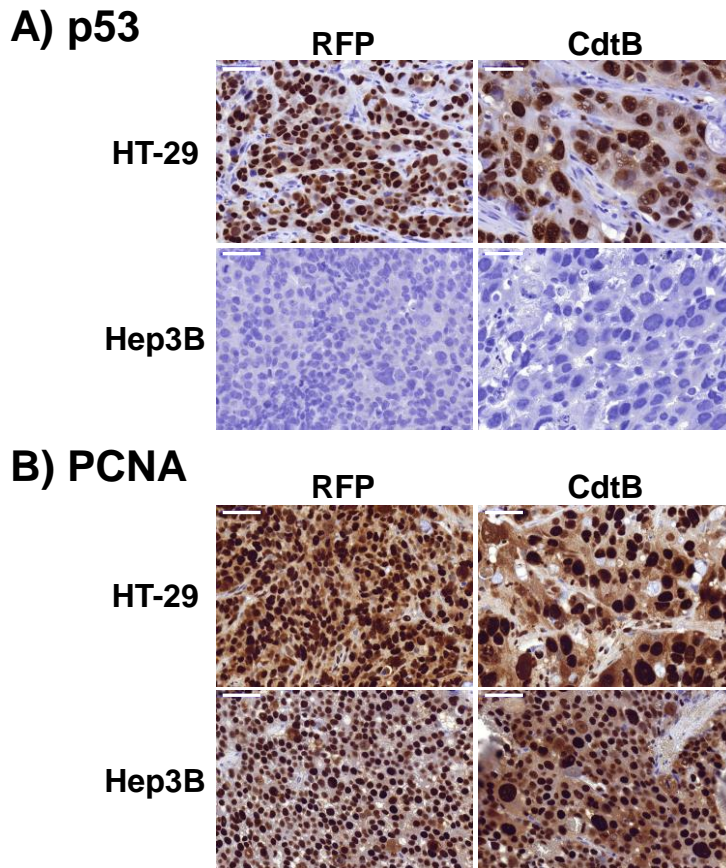


Figure S1. Effect of CdtB of *Helicobacter hepaticus* expression in engraft tumors

After necropsy, 3 μm -tissue sections of HT-29- and Hep3B-derived tumors were prepared from formalin-fixed paraffin-embedded tissues were submitted to standard hematoxylin staining and immunostaining raised against p53 **(A)** and proliferating cell nuclear antigen **(B)**.

Scale bar, 50 μm .

CdtB, CdtB of *H. hepaticus* strain 3B1.

CdtB-H265, *H. hepaticus* CdtB with H265L mutation.

RFP, red fluorescent protein

CONCLUSION - DISCUSSION

L'implication de la CDT dans la carcinogenèse a été mise en évidence, chez la souris, dans le développement de l'hépatocarcinome et dans l'évolution des MICI vers la dysplasie (Berg *et al.*, 1996; Ge *et al.*, 2007).

Plusieurs études ont montré l'implication de la CDT dans l'induction d'une réponse inflammatoire (Belibasakis et Johansson, 2012; Ge *et al.*, 2007; Guerra *et al.*, 2011a). Il a également été montré que la CDT induisait des dommages à l'ADN et des mutations dans le génome à l'origine d'une instabilité génomique (Fedor *et al.*, 2013; Guidi *et al.*, 2013a). Cependant, l'implication directe de la sous-unité active CdtB dans la carcinogenèse reste peu étudiée.

L'objectif de cette étude était d'évaluer le rôle de la sous-unité CdtB de la génotoxine CDT des Hélicobacters dans l'inflammation et la carcinogenèse digestive par une approche *in vitro* et une approche *in vivo*, chez la souris.

Une stratégie lentivirale permettant l'expression constitutive de la toxine ou de son mutant pour l'activité DNase directement dans les cellules cibles a été développée. Cette stratégie a été validée par comparaison avec les résultats obtenus lors des expériences de co-cultures avec les bactéries sauvages ou leurs mutants correspondants mutés pour la CDT. Les transductions lentivirales ont permis d'attribuer les effets observés à la CdtB, en s'affranchissant des effets d'autres facteurs de virulence bactériens.

Dans un premier temps, nous avons étudié la réponse inflammatoire globale induite par la CdtB des Hélicobacters après 72 h d'intoxication chronique des cellules épithéliales intestinales et hépatiques. La CdtB de *H. pullorum* et de *H. hepaticus* induit la surexpression de l'IL-8 confirmant les résultats obtenus par d'autres équipes pour la CDT de *C. jejuni* et *A. actinomycetemcomitans* (Akifusa *et al.*, 2001; Hickey *et al.*, 2000).

Il a été montré que la CDT induit la surexpression de gènes de la voie du NF- κ B, suggérant que la CDT pouvait interagir avec cette voie *in vitro* (Belibasakis *et al.*, 2008) et *in vivo* (Ge *et al.*, 2007). Nos travaux ont montré que la CdtB des Hélicobacters induisait une translocation nucléaire de la sous-unité p65 du NF- κ B, indiquant son activation. L'étude globale du transcriptome a permis de confirmer que la toxine interagissait avec cette voie par la régulation de gènes impliqués en amont et en aval de la voie du NF- κ B (une vingtaine de gènes régulés sur les 75 étudiés). Dans le modèle de carcinogenèse induite par la CDT de *H. hepaticus*, il avait été montré que la toxine induisait une inflammation et la dysplasie, en

provoquant la surexpression de gènes impliqués dans la voie du NF- κ B (Ge *et al.*, 2007). Le blocage de la translocation nucléaire du NF- κ B dans notre modèle pourrait nous permettre de confirmer l'implication de cette voie dans la réponse inflammatoire observée en réponse à la toxine et de voir si d'autres voies sont impliquées.

L'étude de la production de l'IL-8 dans la lignée HT-29 co-cultivée avec *H. pullorum* a montré que la bactérie sauvage ou mutée pour la toxine induisait une sécrétion similaire d'IL-8. Ce résultat suggère que l'induction d'IL-8 était due à d'autres facteurs bactériens plutôt qu'à la CDT. L'utilisation de la stratégie lentivirale dans cette lignée a permis de restaurer les effets bien connus de la toxine et la surexpression de l'IL-8. La résistance des cellules HT-29 à la CDT de *H. pullorum* pourrait être due à l'absence de récepteur cellulaire spécifique, à une déficience dans une voie requise pour l'internalisation ou au transport intracellulaire de la toxine. L'évaluation de la réponse inflammatoire avec *H. hepaticus* dans cette lignée a montré une surexpression de l'IL-8 en réponse à la toxine, indiquant que la lignée HT-29 posséderait un récepteur permettant l'internalisation de la CDT de *H. hepaticus*. Ces résultats peuvent être expliqués par la faible similarité de séquences des sous-unités CdtA et CdtC des deux bactéries, qui ont respectivement 52% et 48% d'identité. Il avait déjà été mis en évidence que la CDT de différents genres bactériens (*E. coli*, *H. ducreyi*) pouvait être internalisée par différentes voies et interagir avec des récepteurs cellulaires différents (Gargi *et al.*, 2013). Nos travaux suggèrent que cette observation pourrait éventuellement être appliquée à des CDT d'un même genre. La déficience d'une voie d'internalisation ou de trafic intracellulaire est une autre hypothèse. Bien que ce mécanisme semble mieux conservé que la liaison de la toxine aux cellules hôtes, pour les différentes CDT, il a été mis en évidence des différences au niveau du réticulum endoplasmique lors de la libération de la toxine (Cortes-Bratti *et al.*, 2000; Eshraghi *et al.*, 2014; Guerra *et al.*, 2005, 2009).

L'analyse globale des gènes, réalisée par « microarrays » (Agilent), a permis d'évaluer la réponse inflammatoire des cellules épithéliales en présence de la toxine. Nos résultats ont montré que la réponse était variable en fonction du type cellulaire utilisé. Néanmoins, nous avons mis en évidence que la CdtB des Hélicobacters induisait la surexpression de gènes codant pour des cytokines, des chimiokines ainsi que des peptides antimicrobiens. L'induction d'une réponse inflammatoire par les cellules épithéliales lors d'une infection bactérienne est bien connue et a un rôle dans l'homéostasie, la réparation des tissus et la survie cellulaire (Muglia *et al.*, 2015; Santana *et al.*, 2015), suggérant que la réponse induite par la toxine contribuerait à la persistance cellulaire.

Nous avons mis en évidence que la toxine régulait des gènes de la famille des S100, qui sont impliqués dans l'invasion et la tumorigenèse (Gebhardt *et al.*, 2006; Meijer *et al.*, 2012). Les gènes S100A3 et S100A14, surexprimés en présence de la CdtB des *Hélicobacters*, sont surexprimés dans les cancers du côlon et de la vessie chez l'homme (Liu *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2007) et également impliqués dans la migration et l'invasion cellulaire (Kang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). La CdtB induit également la surexpression des kallikréines (KLK5 et KLK7), protéases qui ont un rôle dans l'induction des métastases par leur clivage excessif des protéines des jonctions cellulaires. Ces protéines sont d'ailleurs proposées comme biomarqueurs dans le carcinome épithélial (Dong *et al.*, 2003). Leur surexpression en réponse à la CdtB est un argument supplémentaire en faveur du potentiel oncogène de cette toxine.

Ces peptides antimicrobiens et protéines de la réponse inflammatoire induits par la toxine dans les cellules épithéliales sont impliqués dans la réponse immune de type Th17. L'implication de cette réponse avait préalablement été mise en évidence lors d'une infection à *H. hepaticus* chez des souris immunodéficientes (IL10^{-/-}) (Kullberg *et al.*, 2006). Nos résultats suggèrent que l'induction de ce type de réponse lors de l'infection avec *H. hepaticus* serait médiée par la CdtB. La réponse Th17 est impliquée dans l'auto-immunité et a été associée à certains cancers. Une autre toxine bactérienne, la toxine de *Bacteroides fragilis*, interagit avec les voies de signalisation cellulaire et induit une réponse spécifique Th17 qui est associée à la formation de tumeurs du côlon chez la souris (Wu *et al.*, 2009).

Nous avons montré que la CdtB des *Hélicobacters* induisait la surexpression des gènes codant pour l'IL-6 et l'IL-8, des cytokines produites lors de la réponse inflammatoire mais qui peuvent également être sécrétées par les cellules sénescents, ce qui favorise le développement d'un microenvironnement tumoral (Castro-Vega *et al.*, 2015b; Coppé *et al.*, 2010; Pazolli *et al.*, 2012).

De plus, l'étude globale de l'expression des gènes a montré que la toxine induisait la surexpression de plusieurs oncogènes. L'oncogène MafB, un facteur de transcription, a été plus particulièrement étudié. MafB joue un rôle majeur dans l'hématopoïèse, la régulation de gènes et la différenciation cellulaire. Il est capable d'activer et de transformer les cellules primaires (Eychène *et al.*, 2008; Yang and Cvekl, 2007). Il est également associé à un pronostic défavorable dans certains cancers (Stralen *et al.*, 2009). L'étude de cet oncogène a permis de montrer qu'il était surexprimé en réponse à la CdtB des *Hélicobacters* dans toutes les lignées épithéliales intestinales et hépatiques testées. La CdtB induit également une

translocation nucléaire de cet oncogène ou sa surexpression nucléaire. Nous avons également parfois observé la présence de MafB dans les lamellipodes induits en réponse à la toxine. Une relocalisation protéique dans les lamellipodes a aussi été observée pour la cortactine en réponse à la CdtB de *H. pullorum* (Varon *et al.*, 2014) et *H. hepaticus*. Une étude a montré que MafB était impliqué dans l'organisation de l'actine des macrophages et associé aux lamellipodes (Aziz *et al.*, 2006), protrusions impliquées dans la migration cellulaire. Ces résultats suggèrent que la réorganisation du cytosquelette d'actine, déjà médiée par les Rho GTPases en réponse à la CDT (Frisan *et al.*, 2003), pourrait également impliquer MafB. La localisation de cet oncogène dans les lamellipodes, en réponse à la CdtB, pourrait également suggérer son implication dans la migration cellulaire. La surexpression d'oncogènes, en particulier MafB, en réponse à la CdtB des Hélicobacters est un argument en faveur de son potentiel oncogène. L'étude approfondie des fonctions de ce gène (par des expériences de siRNA) devrait permettre d'évaluer son impact dans le phénotype observé en réponse à la toxine.

Les données issues de nos résultats sont des arguments en faveur du potentiel oncogène de la CdtB qui, via son action pro-inflammatoire de type Th17 et son interaction avec des oncogènes, pourrait avoir un rôle dans la carcinogénèse.

Enfin, nous avons déterminé l'implication de la CdtB dans le développement tumoral. Les effets de la CdtB ont été évalués en utilisant des lignées cellulaires inductibles pour l'expression de la CdtB de *H. hepaticus*. *In vitro*, le modèle lentiviral a permis de reproduire les effets de la toxine, un remodelage majeur du cytosquelette et la translocation nucléaire du NF- κ B. Après 5 jours, nous avons noté 100% de mort des cellules exprimant la toxine, tandis que la prolifération des cellules exprimant la protéine témoin ou la CdtB mutée pour l'activité DNase était maintenue.

L'apoptose induite par la toxine est médiée par l'activation de la voie ATM et peut être dépendante ou indépendante de l'activation de p53 (Guerra *et al.*, 2011b). Dans notre modèle de xénogreffes, les lignées cellulaires utilisées (HT-29 et Hep3B) ont une mutation dans le gène codant pour p53, suggérant que l'apoptose induite par la toxine serait médiée par la voie des caspases. Cette voie est fréquemment impliquée dans l'apoptose des cellules déficientes pour p53 (Liyanage *et al.*, 2010; Ohara *et al.*, 2008).

Les cellules transduites ont été greffées chez des souris immunodéficientes et la sous-unité CdtB a ensuite été exprimée. Dans ce modèle de xénogreffes, l'intoxication chronique avec la CdtB induit un retard de croissance qui a été confirmé par le poids des

tumeurs au sacrifice. Les résultats d'histologie nous ont permis de localiser la CdtB et son mutant pour l'activité DNase dans les cellules. Nous avons observé une distension cellulaire et nucléaire en réponse à la toxine, nous permettant de valider ce modèle de xénogreffe pour l'étude de la CdtB.

Nos résultats ont mis en évidence une augmentation de l'apoptose, par la surexpression de la caspase 3 clivée, confirmant les données rapportées *in vitro* (Cortes-Bratti *et al.*, 2001; Kosar *et al.*, 2011; Wising *et al.*, 2005a). Néanmoins, l'ensemble des cellules exprimant la toxine n'étaient pas en apoptose. Ces résultats, obtenus après plus de 7 jours d'exposition à la toxine, sont différents de ceux observés *in vitro*, suggérant que l'environnement pourrait être impliqué dans la viabilité cellulaire. Nous avons également montré que la CdtB de *H. hepaticus* induisait, *in vivo*, une sénescence cellulaire en augmentant l'activité β -galactosidase et l'expression de p21. Les cellules sénescents sécrètent des cytokines et des facteurs de croissance, permettant la prolifération des cellules voisines (Coppé *et al.*, 2010). Une autre génotoxine, la colibactine, induit aussi une sénescence cellulaire, permettant la prolifération des cellules tumorales par un mécanisme de sécrétion associé à la sénescence (Cognoux *et al.*, 2014). Nous avons montré, *in vitro*, que la toxine induisait la surexpression de gènes identifiés dans le sécrétome des cellules sénescents, telles que des cytokines pro-inflammatoires. Dans notre modèle de xénogreffes chez des souris immunodéficientes, l'expression des protéines témoins et de la CdtB est induite par un traitement avec la doxycycline, qui a une action anti-inflammatoire. Nous n'avons donc pas pu étudier la réponse inflammatoire dans ce modèle. Néanmoins, l'expression des facteurs de croissance sera évaluée afin de vérifier si la CdtB induit une réponse similaire à la colibactine.

La protéine Ki-67 est présente durant les phases actives du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M), mais est absente de la phase G0, permettant d'indiquer la prolifération cellulaire. Nos résultats ont également montré la surexpression ou l'accumulation de Ki-67 en réponse à la CdtB, suggérant que les cellules survivent à l'effet de la toxine et pourraient proliférer. L'augmentation de l'expression de Ki-67 avait déjà été rapportée dans les tumeurs induites par l'infection à *H. hepaticus* (Ge *et al.*, 2007). Cette protéine est associée à l'évolution rapide et au mauvais pronostic du carcinome hépatocellulaire (Luo *et al.*, 2015).

Notre modèle de xénogreffe de cellules épithéliales a permis d'observer trois types de réponses médiées par la CDT : l'apoptose, la sénescence et la prolifération cellulaire,

qui peuvent expliquer le retard de croissance observé. Il avait été montré, *in vitro*, que la CDT pouvait induire ces 3 mécanismes cellulaires principalement en fonction du type cellulaire utilisé ou de la dose de toxine. Une infection chronique avec la CDT à des doses sub-léthales induit une instabilité génomique mais permet la survie et la prolifération cellulaire (Guidi *et al.*, 2013a). Nos résultats suggèrent que les cellules qui expriment Ki-67, bien qu'affectées par la CdtB, poursuivent leur cycle cellulaire. L'expression de l'oncogène MafB sera évaluée dans le modèle de xénogreffe afin de mettre en évidence son implication dans les phénotypes observés. L'évaluation des dommages à l'ADN, induits en réponse à la toxine dans le modèle de xénogreffes devrait permettre de vérifier si les cellules ayant échappé à la mort cellulaire ont bien été affectées ou ont mis en place des mécanismes de réparation. L'autophagie, un mécanisme permettant la dégradation et le recyclage des protéines et des organelles endommagées, est impliqué dans la résistance à l'apoptose mais également dans l'augmentation ou la diminution de la tumorigenèse (Fan *et al.*, 2015). L'étude de l'autophagie dans ce modèle, également associée à la reconnaissance des dommages à l'ADN (Qiang *et al.*, 2015), devrait permettre de mieux appréhender les mécanismes conduisant à la mort ou à la persévérance cellulaire en réponse à la CdtB.

Nous avons observé qu'une intoxication, pendant 3 jours, induisait, *in vitro*, 100% de mort cellulaire. En revanche, *in vivo*, les cellules ne sont pas toutes en apoptose, elles peuvent échapper à la mort cellulaire par un phénotype sénescence ou poursuivre la prolifération cellulaire, suggérant l'importance du micro-environnement. Ce modèle de xénogreffes constitue une nouvelle voie d'étude des effets, à moyen-terme, d'une intoxication chronique avec la CdtB. La mise en place de la stratégie lentivirale d'expression conditionnelle permet, en outre, de ne pas être limité par la quantité de matériel. Nous pouvons donc envisager d'étudier la capacité de la CdtB à induire la formation de tumeurs *in vitro* par des essais de tumorsphères. La culture *in vitro* en 3 dimensions permettrait de se rapprocher du modèle de xénogreffes et présenterait l'avantage d'utiliser de faibles concentrations de doxycycline par rapport à celles utilisées dans le modèle de xénogreffes. Ceci nous permettrait d'évaluer la réponse inflammatoire, le sécrétome et protéome des cellules ainsi que leur capacité à former des tumeurs en réponse à la CdtB.

Par ailleurs, l'ensemble de nos résultats indiquent que l'effet cyto-pathogène induit en réponse à la toxine est principalement dû à son activité DNase. En effet, les cellules exprimant la CdtB mutée dans le site catalytique de l'activité DNase ont un phénotype

similaire aux cellules exprimant la protéine témoin. L'activité phosphatase a été décrite pour la première fois en 2007, pour la CDT de *A. actinomycetemcomitans* (Shenker *et al.*, 2007). Elle n'induit pas de changement morphologique des cellules, ni la phosphorylation de γ H2AX, mais est associée à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M des lymphocytes (Shenker *et al.*, 2007, 2015b). Nos résultats confirment l'absence de remodelage du cytosquelette en réponse à l'activité phosphatase. Il avait également été montré que l'activité phosphatase de la CDT induisait la production de cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF α) (Shenker *et al.*, 2014), ce que notre étude n'a pas confirmé. Nos résultats suggèrent que l'activité phosphatase des Hélicobacters aurait une fonction mineure voire inexistante dans les voies évaluées au cours de cette étude ou que la mutation dans le site catalytique de la DNase serait nécessaire. Une autre hypothèse est que les cellules épithéliales seraient moins sensibles que les lymphocytes T à cette activité (Guerra *et al.*, 2011b).

Un modèle de xénogreffes de cellules du cancer de la prostate résistantes aux radiations ionisantes a montré que la toxine permettait une réduction de la taille des tumeurs et augmentait l'efficacité de la radiothérapie. Les auteurs ont proposé l'utilisation de la CDT comme agent thérapeutique dans le traitement du cancer de la prostate résistant aux radiations (Lai *et al.*, 2014). Au vu des résultats de nos travaux, l'utilisation de cette génotoxine comme thérapie présenterait un risque carcinogène pour les patients vu qu'elle induit une réponse inflammatoire, active des facteurs de transcription et induit la surexpression d'oncogènes.

Il n'existe actuellement aucune donnée sur la régulation des microARN par la CDT. Les microARN ont un rôle important dans l'interaction « hôte-agent pathogène », en raison de leur implication dans de nombreux processus physiologiques tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Kloosterman et Plasterk, 2006). Une étude globale de l'expression des microARN (miRnome, « microarrays » Agilent) a été initiée au cours de ces travaux de thèse et l'analyse de ces données devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de régulation géniques de la toxine.

Nos travaux ont montré la CdtB régule l'expression des kallikréines, de la cortactine et de l'oncogène MafB mais aussi la compartimentation cellulaire de la cortactine et de MafB. Les kallikréines, la cortactine et MafB sont des protéines impliquées dans les phénomènes de migration cellulaire. Les perspectives qui font suite à ce travail seraient d'étudier l'effet de la CdtB sur la migration cellulaire. Les kallikréines sont également

impliquées dans le clivage des jonctions cellulaires, nous pourrions donc étudier l'effet de la toxine sur les jonctions.

Par ailleurs, *in vitro*, la CdtB induit une surexpression de l'IL8, une cytokine pro-inflammatoire, qui est également impliquée dans l'initiation et la maintenance de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Long *et al.*, 2015). La TEM est un processus par lequel les cellules épithéliales acquièrent un phénotype mésenchymateux, permettant la progression tumorale et la formation de métastase. *H. pylori*, via son oncoprotéine CagA, est capable d'induire la TEM et augmente la migration cellulaire, l'invasion et la capacité de formation de tumorsphères (Bessède *et al.*, 2014). La CdtB est responsable d'une diminution de l'adhérence cellulaire et induit la relocalisation de protéines impliquées dans la migration cellulaire (Varon *et al.*, 2014). Dans ce contexte, l'étude des marqueurs de la TEM pourrait indiquer si la toxine est impliquée dans la TEM et aurait un rôle dans la migration et l'invasion cellulaire. Le gène codant pour S100A14, surexprimé en réponse à la CdtB, est impliqué dans la TEM (Wang *et al.*, 2015), confirme l'intérêt d'évaluer cette voie dans notre modèle.

De plus, un nouveau modèle de xénogreffes, combinant 80% de cellules exprimant la toxine avec 20% de cellules tumorales exprimant un marqueur (comme la protéine rouge fluorescente), pourrait permettre de déterminer l'effet de la CDT sur la croissance des cellules tumorales voisines, grâce au suivi de la fluorescence (imagerie du petit animal) et de la croissance tumorale.

Il reste donc un grand travail d'investigation, *in vitro* et *in vivo*, à réaliser sur cette toxine méconnue et relativement encore peu étudiée. Les différentes méthodologies développées au cours de ce travail de thèse ont permis de faire sauter le verrou technologique inhérent à la toxicité de la CDT et devraient permettre des avancées rapides. Indépendamment de leur importance du point de vue physiopathologique dans le cancer du foie ou du colon, les résultats de nos travaux pourraient s'appliquer à d'autres CDT et servir de base à l'élaboration de nouveaux traitements curatifs contre l'infection par des bactéries sécrétant ce type de toxine.

AUTRES PUBLICATIONS SUR LE SUJET

I. Publication n°4

Helicobacter pullorum Cytolethal Distending Toxin Targets Vinculin and Cortactin and Triggers Formation of Lamellipodia in Intestinal Epithelial Cells

Christine Varon, Iulia Mocan, Belgacem Mihi, Christelle Péré-Védrenne, Anriette Aboubacar, Christine Moraté, Mónica Oleastro, François Doignon, David Laharie, Francis Mégraud, and Armelle Ménard

The Journal of Infectious Diseases 2014;209:588–99

Helicobacter pullorum Cytolethal Distending Toxin Targets Vinculin and Cortactin and Triggers Formation of Lamellipodia in Intestinal Epithelial Cells

Christine Varon,^{1,3} Iulia Mocan,^{1,3} Belgacem Mihi,^{1,3} Christelle Péré-Védrenne,^{1,3} Anriette Aboubacar,^{1,3} Christine Moraté,^{1,3} Mónica Oleastro,⁴ François Doignon,² David Laharie,^{1,3} Francis Mégraud,^{1,3} and Armelle Ménard^{1,3}

¹Université de Bordeaux, Laboratoire de bactériologie, Centre National de Référence des Campylobacters et Hélicobacters and ²Université de Bordeaux, Laboratoire de Biogenèse Membranaire UMR-CNRS 5200, and ³INSERM U853, Bordeaux, France; and ⁴Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional Saúde Dr Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal

Helicobacter pullorum, a bacterium initially isolated from poultry, has been associated with human digestive disorders. However, the factor responsible for its cytopathogenic effects on epithelial cells has not been formally identified. The cytopathogenic alterations induced by several human and avian *H. pullorum* strains were investigated on human intestinal epithelial cell lines. Moreover, the effects of the cytolethal distending toxin (CDT) were evaluated first by using a wild-type strain and its corresponding *cdtB* isogenic mutant and second by delivering the active CdtB subunit of the CDT directly into the cells. All of the *H. pullorum* strains induced cellular distending phenotype, actin cytoskeleton remodeling, and G2/M cell cycle arrest. These effects were dependent on the CDT, as they were (1) not observed in response to a *cdtB* isogenic mutant strain and (2) present in cells expressing CdtB. CdtB also induced an atypical delocalization of vinculin from focal adhesions to the perinuclear region, formation of cortical actin-rich large lamellipodia with an upregulation of cortactin, and decreased cellular adherence. In conclusion, the CDT of *H. pullorum* is responsible for major cytopathogenic effects in vitro, confirming its role as a main virulence factor of this emerging human pathogen.

Keywords. isogenic mutant; epithelial cells; lentivirus; lamellipodia; actin; *Helicobacter pullorum*; cytolethal distending toxin; cortactin; vinculin; adherence.

Helicobacter pullorum is a bile-resistant *Helicobacter* species that was isolated initially from the liver, duodenum, and cecum of asymptomatic poultry [1]. This enterohepatic *Helicobacter* species has also been isolated from patients with gastroenteritis [1–4] and may be associated with inflammatory bowel disease [5–7], as well as with chronic liver disease [8–13].

As for other enterohepatic *Helicobacter* species, very few data are currently available on the pathogenesis of *H. pullorum*, mainly because of difficulties in cultivating this fastidious organism. In addition, no transformation of *H. pullorum* has yet been reported, and no mutant has been described. However, in vitro coculture experiments on gastric and intestinal epithelial cells show upregulation of the proinflammatory cytokine interleukin 8 by *H. pullorum*, requiring bacterial adherence and involving the nuclear factor- κ B pathway, probably via its lipopolysaccharide, as shown by a high Limulus test reactivity [14, 15]. Recent results suggest that *H. pullorum* possesses a type VI secretion system that may interact with endocytic vesicles and may trigger adherence to intestinal epithelial cells [16]. In addition, in vitro and in vivo data indicate that some enterohepatic *Helicobacter* species, such as *Helicobacter hepaticus*, *Helicobacter bilis*, *Helicobacter canis*, *Helicobacter*

Received 6 February 2013; accepted 22 April 2013.

Presented in part: XXVth International Workshop on *Helicobacter* and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer, 13–15 September 2012, Ljubljana, Slovenia; 15th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter*, and Related Organisms, Niigata, Japan, 2–5 September 2009.

Correspondence: Armelle Ménard, PhD, INSERM U853, Université de Bordeaux, Laboratoire de Bactériologie, Bat. 2B RDC Zone Nord, 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux cedex, France (armelle.menard@u-bordeaux2.fr).

The Journal of Infectious Diseases 2014;209:588–99

© The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/infdis/jit539

marmotae, *Helicobacter winghamensis*, *Helicobacter mastomyrinus*, *Helicobacter cinaedi*, and *H. pullorum*, secrete a common bacterial virulence factor, cytolethal distending toxin (CDT) [17–22]. Studies in mouse models revealed that the CDT of *H. cinaedi* and *H. hepaticus* promotes colitis in interleukin 10-deficient mice [23, 24] and that the CDT of *H. hepaticus* induces liver inflammation via its CdtB subunit and promotes the development of dysplasia in A/JCr mice [25].

Currently, 2 studies on the pathogenic role of *H. pullorum* CDT are available, both of which were performed with crude bacterial sonicates [21, 26]. In fact, research concerning the pathogenicity of CDT encounters difficulties in the production, purification, and penetration of the toxin into the target cell. Indeed, it is necessary to produce and purify sufficient amounts of the CdtA, CdtB, and CdtC subunits to reconstitute a complete active toxin. Unfortunately, an adequate quantity of the active CdtB subunit is difficult to produce as a recombinant protein because of its toxicity in numerous recombinant expression systems. Even the cell-free protein expression system for CdtB, which we previously described [27], did not yield acceptable quantities, because the DNase activity of the neosynthesized CdtB hydrolyzed the vector used for its production. Moreover, *H. pullorum* culture makes it hard to achieve large-scale production of this slow-growing bacterium. These problems constitute a technological barrier that limits the work on this toxin.

The present study aimed to evaluate the cytopathogenic effects of the CDT of *H. pullorum* by developing a 2-way original system composed of (1) a *cdtB* isogenic mutant *H. pullorum* strain and (2) a lentivirus-based system for expressing CdtB subunit directly into the epithelial cells. This latter system attributed the observed effects specifically to the toxin. In both systems, cellular proliferation, the cell cycle, remodeling of the actin cytoskeleton, the microtubule network, and focal adhesions were evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and *H. pullorum* strains, reagents and antibodies, the sequencing of the *cdtB* locus of *H. pullorum*, the construction of the *H. pullorum cdtB* isogenic mutant, the construction of the plasmid used for the lentivirus production, lentivirus production, May-Grünwald Giemsa and immunofluorescence staining, cell proliferation, G2/M transition and adherence assays, Western blotting, primer designs, real-time polymerase chain reaction (PCR), and statistical analyses are described in the [Supplementary Materials](#).

Coculture and Transduction Experiments

Caco-2, HCA-7, and HT-29 cells were seeded on culture plates or glass coverslips 24 hours before addition of bacteria or lentivirus preparations to the culture medium at a density defined

for each experiment (see the Supplementary Materials). For coculture experiments, the culture medium was removed, a volume corresponding to a multiplicity of infection (MOI) of 100 bacteria/cell in renewed medium with fetal calf serum (FCS) was added, and incubation was continued for 72 hours. For some coculture experiments, bacteria were seeded on semi-permeable tissue culture inserts (pore diameter, 0.2 μm ; Anopore, Nunc, Naperville, IL) fitted into culture wells containing epithelial cells. For lentivirus-based transductions, the culture medium was removed, and volumes corresponding to a MOI of 30 viruses/cell in FCS-free renewed medium were added to each cell culture well for 12 hours. Then, FCS was added to a final concentration of 10% for another 12 hours, medium was completely renewed with fresh medium with FCS, and incubation was continued for 48 hours, corresponding to a final transduction incubation time of 72 hours.

RESULTS

Effects of *H. pullorum* on Cell Morphology

The effect of 10 *H. pullorum* strains of human ($n = 5$) and avian ($n = 5$) origin was evaluated in coculture experiments (72 hours) with the human intestinal epithelial cell lines HT-29, Caco-2, and HCA-7. All *H. pullorum* strains induced similar changes in the morphology of the Caco-2 and HCA-7 cells, which appeared enlarged with distended or multiple nuclei after 72 hours of coculture (Figure 1A and 1B). The cell cycle analysis revealed an increase in the percentage of cells in G2/M phase only in *H. pullorum*-infected cells (human NCTC 13157 and avian CCUG 33840 strains; Figure 1C), the increase being more important for the human strain NCTC 13157. The percentage of cells blocked by the CDT during the G2/M phase was low but corresponds to that previously reported [26]. None of these effects was observed in HT-29 cells (data not shown). The distending phenotype was also observed after treatment with a filtered bacterial culture supernatant or after coculture in a Transwell system preventing contact between bacteria and cells but allowing the diffusion of soluble factors (Figure 1D). These results suggest that the bacterial factor responsible for the distending phenotype is a soluble factor secreted by *H. pullorum*.

Two soluble factors involved in cytotoxic activity were reported in *H. pullorum*: the CDT toxin [21, 26] and a soluble toxic factor, still unidentified, causing a mitotic catastrophe resulting in primary necrosis of hepatic cells [28]. Thus, the presence of the *cdtB* gene (825 bp) in these 10 *H. pullorum* strains was confirmed by sequencing (GenBank accession numbers available in [Supplementary Materials](#)), suggesting that all of these strains encode a putative CdtB protein of 274 residues. As expected, the CdtB protein of *H. pullorum* was the most closely related to those of other *Helicobacter* species (*H. winghamensis*, *H. bilis*, *H. hepaticus*, and *H. mastomyrinus*), with 69%–75%

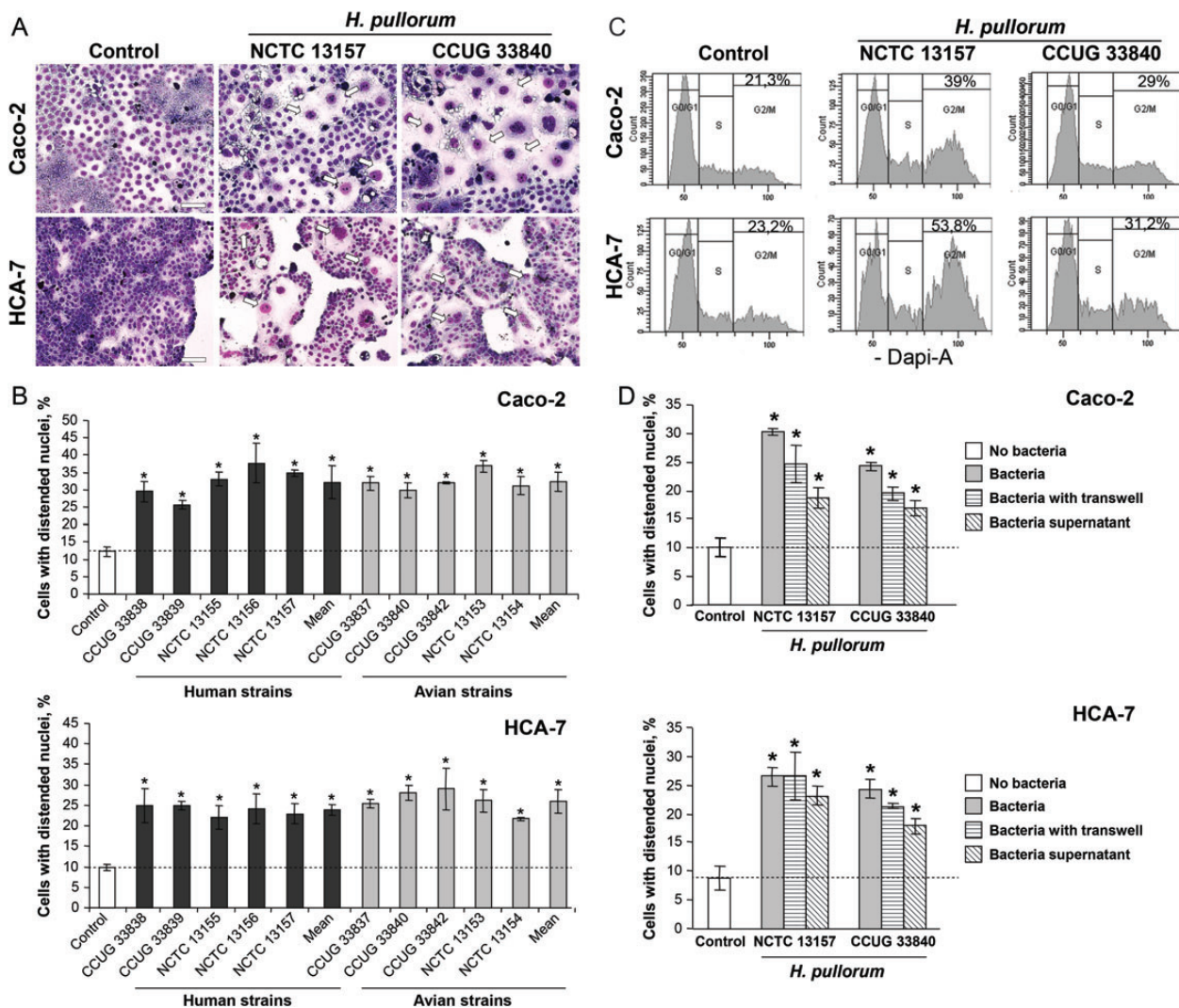


Figure 1. Effects of *Helicobacter pullorum* on human intestinal epithelial cells. All the data were obtained after a 72-hour coculture with *H. pullorum*. *A*, Morphological changes induced by *H. pullorum* strains NCTC 13157 (human origin) and CCUG 33840 (avian origin) on Caco-2 and HCA-7 cells revealed by May Grünwald-Giemsa staining. Arrows indicate enlarged Caco-2 and HCA-7 cells with distended nuclei or multinucleated. Scale bar, 50 μ m. *B*, Quantification of Caco-2 and HCA-7 cells displaying a distended phenotype without (control, white) or with *H. pullorum* strains of human ($n=5$, black) and avian ($n=5$, grey) origin. Data represent the percentage of cells with distended nuclei determined after labeling with the Hoechst 33342 compound, as well as the mean results obtained with human and avian strains. *C*, Analysis of DNA contents of Caco-2 and HCA-7 cells incubated without (control) or with *H. pullorum* strains NCTC 13157 (human origin) and CCUG 33840 (avian origin). Cells were fixed and labeled with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindol) and analyzed by flow cytometry. *D*, The same experiment as in panel *B* was performed with *H. pullorum* strains NCTC 13157 (human origin) and CCUG 33840 (avian origin) in the presence or absence of Transwell inserts or with filtered bacterial culture supernatants of the same strains. Strain information and GenBank accession numbers of the *cdtB* sequences are presented in the [Supplementary Materials](#). *A* and *C*, Data represent 1 representative experiment of 3. *B* and *D*, Data represent the mean of triplicates in 1 representative experiment out of 2. The discontinuous line shows the basal percentage of cells with distended or multiple nuclei under control conditions. * $P < .05$ versus control.

identity, whereas those of *H. cinaedi* (51% identity) and *Campylobacter* species (52%–57% identity) showed less sequence identity. When comparing the sequence of the *cdtB* gene among the *H. pullorum* strains, including the MIT98–5489 strain, some nucleotide polymorphisms were observed. However, these polymorphisms did not cluster according to the geographical or host origin of the strains ([Supplementary](#)

[Figure 1A](#)). In addition, most of the polymorphisms observed at the gene level correspond to “synonymous” substitution rates. In conclusion, the CdtB is highly conserved at the protein level among *H. pullorum* strains ([Supplementary Figure 1B](#) and [1C](#)), with identity ranging from 99% to 100% (over 274 residues), explaining the similar percentages of cells with distended nuclei obtained in response to these strains ([Figure 1B](#)).

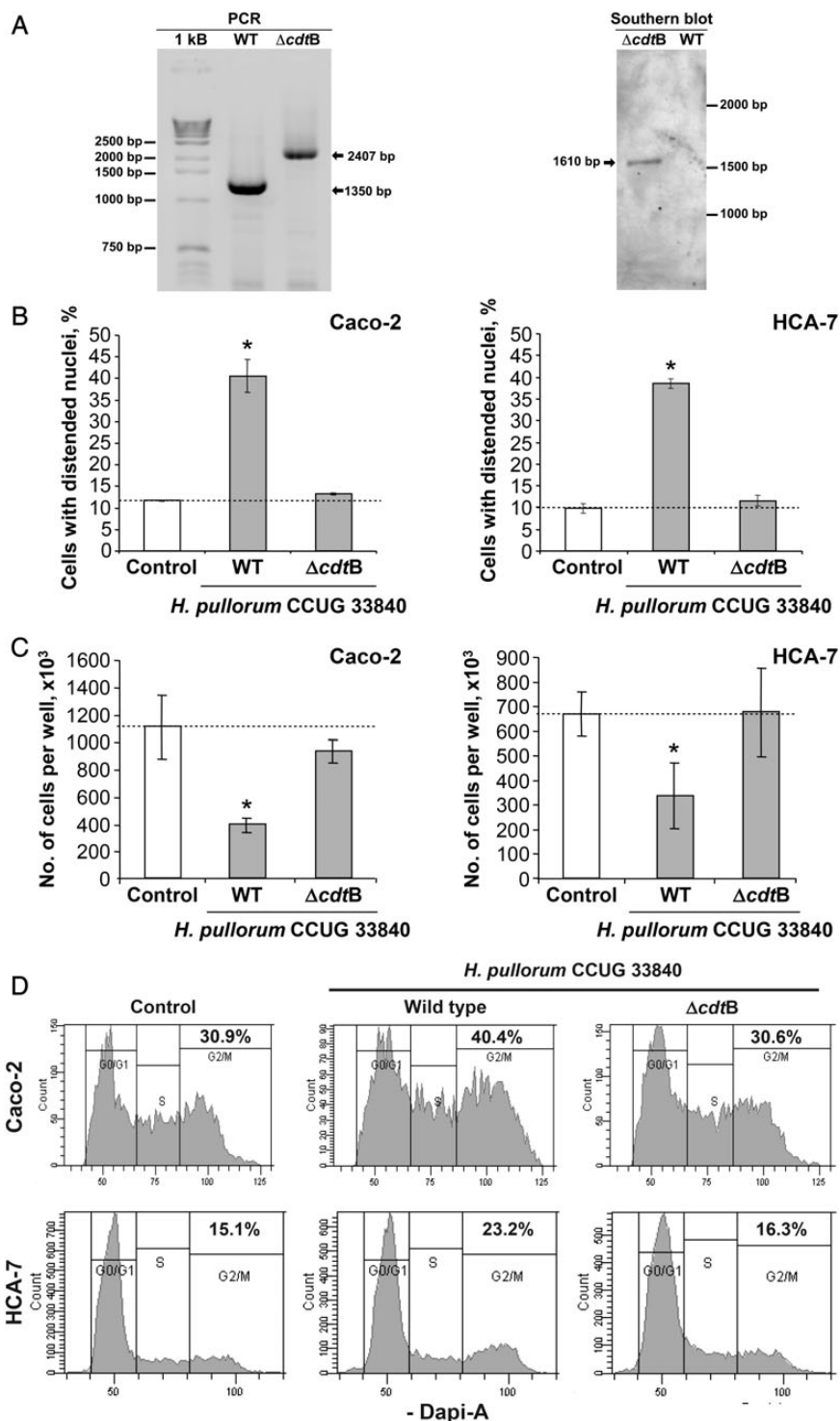


Figure 2. Effects of inactivation of the *cdtB* gene on *Helicobacter pullorum*-induced cytodistending phenotype and on cell proliferation. **A**, Analysis of *H. pullorum*-transformed strain CCUG 33840 (avian origin) by polymerase chain reaction (PCR) and Southern blot hybridization (Supplementary Materials). The correct insertion of the kanamycin cassette at the expected locus of the *H. pullorum* genome was first confirmed by PCR with external primers, with subsequent analysis of the PCR products on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. Then, the unique insertion of the kanamycin cassette into the *H. pullorum* genome was verified by Southern blotting. *SspI*-digested genomic DNA was separated on a 0.8% agarose gel, and Southern blotting was performed with a 172-bp labeled probe designed from the kanamycin gene *aphA-3*. A 1-kb DNA ladder (Invitrogen) was used. **B**, The percentage of cells displaying a distended phenotype was determined by fluorescence microscopy after labeling with the Hoechst 33342 compound after 72-hour coculture of Caco-2 and HCA-7 cells without (control, white) or with (grey) *H. pullorum* wild-type strain CCUG 33840 (avian origin) and the corresponding isogenic *cdtB* mutant. Data represent the percentage of Caco-2 and HCA-7 cells with distended nuclei (enlarged or multinucleated). **C**, Cell proliferation of Caco-2 and HCA-7 cells was determined after 48 hours (for HCA-7) or 72 hours (for Caco-2) of coculture without (control, white) or with (grey) *H. pullorum* wild-type

To attribute the observed cytopathogenic effects to CdtB and to evaluate a possible cytopathogenic effect induced by the unidentified factor reported in *H. pullorum* [28], 2 types of experiments were performed. First, a *cdtB* knockout (KO) strain was constructed, and the effects induced by this KO strain were compared to those induced by the wild-type (WT) strain. Second, a lentivirus vector was produced to deliver the CdtB subunit of *H. pullorum* directly into host cells.

Construction of a *cdtB* Isogenic Mutant of *H. pullorum*

A construction containing the *cdtB* gene truncated by a kanamycin resistance cassette was integrated into the *H. pullorum* chromosome by double homologous recombination in natural transformation experiments (Supplementary Materials). Among the 10 *H. pullorum* strains tested, only the avian strain CCUG 33840 was recovered after transformation. An isogenic mutant for the *cdtB* gene was obtained for this strain with both a plasmid and PCR products. Approximately 500 bp in the flanking regions on each side of the kanamycin cassette (1243 bp) were sufficient to allow the insertion of the cassette in the *H. pullorum* genome. PCR and sequencing of the CDT locus indicated that the insertion was accurate, with no substitution, insertion, deletion, nor mutation (Figure 2A; sequence not shown). In addition, Southern blot hybridization confirmed that no illegitimate insertion of the kanamycin cassette occurred elsewhere in the *H. pullorum* genome, since the expected unique 1610-bp band was observed (Figure 2A).

Consequence of Inactivation of the *cdtB* Gene on *H. pullorum*-Induced Cytopathogenic Effects

Coculture experiments revealed that the increased nuclear distension induced by *H. pullorum* CCUG 33840 WT strain on Caco-2 and HCA-7 cells was not observed with the corresponding *cdtB* KO strain (Figure 2B). Similarly, the inhibition of cellular proliferation and the increase of cells in G2/M phase induced by *H. pullorum* were not observed with the corresponding *cdtB* KO strain (Figure 2C and 2D). In conclusion, none of the effects reported for the WT strain were observed with the *cdtB* KO strain, suggesting that CdtB induces these cytopathogenic effects.

Effects of CdtB Expressed Via a Lentivirus-Based Strategy on Cellular Morphology

The *cdtB* gene of *H. pullorum* strain CCUG 33840 fused at its 3' end to 3 repeats of the influenza virus hemagglutinin (HA) epitope (CdtB-3HA) was cloned into pLVTHM instead of the enhanced green fluorescent protein (GFP) gene initially present in this vector. Both plasmids allowed the production of the

lentivirus particles PV-CdtB and PV-GFP that were used to transduce Caco-2 and HCA-7 cells at a MOI of 30. Transduction efficiency was analyzed by flow cytometry (GFP fluorescence), Western blot, and fluorescence microscopy (HA and GFP immunodetection). The results of flow cytometry obtained on Caco-2 and HCA-7 cells revealed high percentages of GFP-positive cells after 48 hours ($94\% \pm 3\%$ for both cell lines) and 72 hours ($>96\%$ for both cell lines) of transduction with PV-GFP. Both GFP and CdtB expression was detected at the expected Mr by Western blotting in the respective transduced cells (Figure 3A). As expected, immunofluorescence experiments revealed that CdtB was detected mainly in the nucleus and especially around the nucleolus (Figure 3B). Interestingly, CdtB was also detected at the cell periphery lamellipodia and membrane ruffles (Figure 3B). Microscopy analysis of Caco-2 and HCA-7 cells (Figure 4A) revealed distending phenotypes similar to those observed with *H. pullorum* in coculture experiments (Figures 1A, 1B, and 2B) but at higher percentages (Figure 4B). Similarly, a significant inhibition of the proliferation (Figure 4C) and increase in the percentage of cells in G2/M phase (Figure 4D) were observed in response to CdtB in both cell lines, also at higher percentages as compared to those observed with *H. pullorum* in coculture experiments (Figure 2C and 2D). Together, these results suggest that lentivirus expression of CdtB in epithelial cells induces effects similar to those observed with *H. pullorum*, thus confirming that the effects observed in coculture experiments are due to CdtB.

Interestingly, similar effects were observed in PV-CdtB-transduced HT-29 cells (Supplementary Figure 2), whereas this cell line was not susceptible to CdtB when using *H. pullorum* strains in coculture experiments.

Effect of CdtB of *H. pullorum* on the Actin Cytoskeleton

The effects of CdtB on the actin cytoskeleton were explored on Caco-2 cells by immunofluorescence microscopy. Infection with *H. pullorum* WT strain (Figure 5A) or transduction with PV-CdtB (Figure 5B) induced a cellular and nuclear enlargement, with the formation of cortical actin-rich large lamellipodia and an increased staining intensity of vinculin that appeared delocalized from focal adhesions to the perinuclear region in the cytosol. These effects were not observed in the respective controls and in cells infected with the *cdtB* KO strain or transduced with the PV-GFP. α -tubulin staining revealed a moderate polarization disturbance of the microtubule network inside the cellular body (Figure 5A and 5B). Similar results were obtained in response to 2 other strains of human origin (CCUG 33839 and NCTC 13157; Supplementary Figure 3A)

Figure 2 continued. (WT) strain CCUG 33840 (avian origin) and the corresponding isogenic mutant. D, Analysis of DNA contents of Caco-2 and HCA-7 cells after 72-hour coculture without or with *H. pullorum* strain CCUG 33840 (avian origin) and the corresponding *cdtB* isogenic *H. pullorum* strain ($\Delta cdtB$). Cells were fixed and labeled with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindol) and analyzed by flow cytometry. Data represent 1 representative experiment of 3. B and C, Data represent the mean of triplicates in 1 representative experiment of 3. The discontinuous line shows the basal rate in control cells. * $P < .05$ vs control.

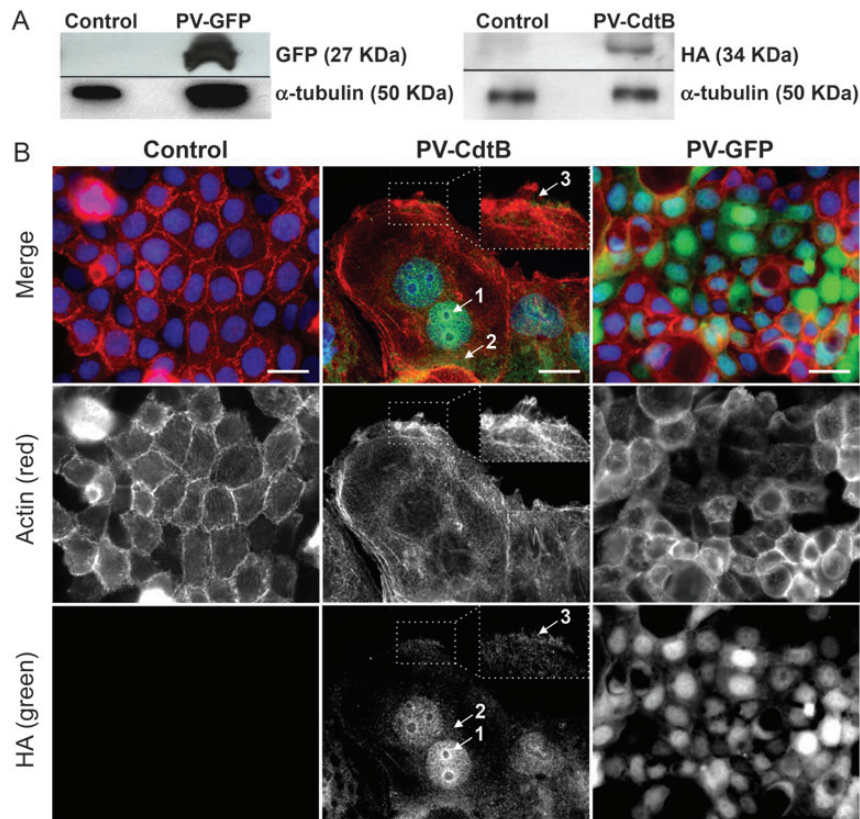


Figure 3. Detection and effects of CdtB expression in human intestinal epithelial cell line Caco-2. The data were obtained after 72-hour transduction of Caco-2 cells without (control) or with the lentivirus particles used to express the enhanced green fluorescent protein (PV-GFP), or the lentivirus particles used to express the CdtB fused to 3 repeats of the human influenza virus hemagglutinin (HA) epitope (PV-CdtB). *A*, Western blot analysis of Caco-2 cells. α -tubulin (50 kDa) was used as a reference protein and was detected under all the conditions tested. The GFP (27 kDa) and HA epitope expression (34 kDa corresponding to the expected Mr of CdtB fused to 3 repeats of the HA epitope) was detected only in cells transduced with PV-GFP and PV-CdtB, respectively. *B*, Fluorescence staining of Caco-2 cells. Cells were processed for fluorescence staining with fluorescent-labeled phalloidin to detect F-actin (red) and with the Hoechst 33342 compound to detect the nucleus (blue). Primary anti-HA antibody followed by fluorescent labeled-secondary antibodies (green) was used to detect the HA-tagged CdtB in the PV-CdtB-transduced cells, and the natural fluorescence of the GFP was used in the PV-GFP-transduced cells. Boxes correspond to enlargement of actin ruffles containing the HA-tagged CdtB. Arrows 1, 2, and 3 indicate CdtB-3HA in the nucleus, the cytoplasm, and the lamellipodia at the front edge of the cell, respectively. Scale bar, 10 μ m.

and also in HCA-7 cells (Supplementary Figure 3B). Moreover, cortactin, a component of the cortical actin-rich lamellipodia and membrane ruffle structures, was mainly localized at the leading edge of the cells forming large lamellipodia in response to CdtB (Figure 5A and B).

Despite cytoskeleton remodeling, Western blot analysis did not reveal differences in β -actin, α -tubulin, or vinculin expression levels under all the conditions tested (Figure 6A and 6B and data not shown), suggesting that the influence of CdtB was mainly on the localization of these proteins. Nevertheless, cortactin expression increased significantly in response to CdtB in coculture and transduction experiments at both the gene and protein levels (Figure 6). On the basis of these results, the effects of CdtB were evaluated on cellular adherence. The PV-CdtB-transduced cells presented a significant reduced number

of adherent cells after 6 hours as compared to the control or PV-GFP-transduced cells (Figure 7). These results suggest that an alteration of the cytoskeleton and focal adhesion by CdtB modifies some cellular functions and particularly those linked with epithelial adherence.

DISCUSSION

H. pullorum, a bacterium to which humans are exposed via poultry consumption, is an emerging pathogen in digestive diseases that has been little studied [1–13]. In the present study, the effects of 10 *H. pullorum* strains were evaluated using 3 intestinal epithelial cell lines. A similar cytopathogenic effect, mediated by a secreted factor, was observed for all of the strains independently of their human or avian origin in Caco-2 and

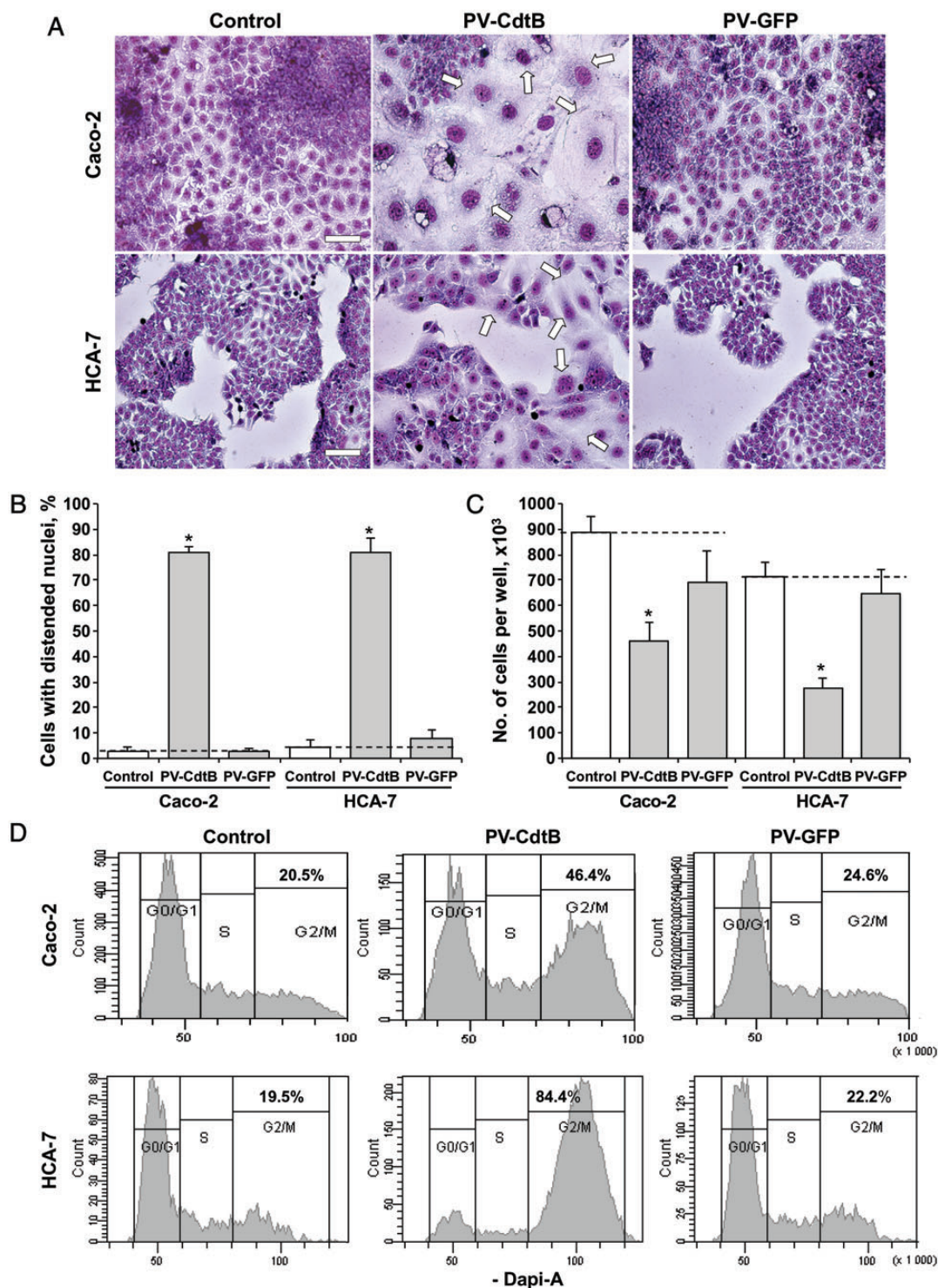


Figure 4. Effects of CdtB on human intestinal epithelial cell morphology. The effects were determined 72 hours after the transduction of Caco-2 and HCA-7 cells without (control) or with the lentivirus particles used to express the enhanced green fluorescent protein (PV-GFP), or the lentivirus particles used to express the CdtB fused to 3 repeats of the human influenza virus hemagglutinin epitope (PV-CdtB). *A*, Cellular morphological changes of Caco-2 (top line) and HCA-7 (bottom line) cells revealed by May Grünwald-Giemsa staining. Arrows indicate enlarged Caco-2 and HCA-7 cells with distended or multiple nuclei. Scale bar, 50 μ m. *B*, Percentage of cells displaying a distended phenotype (ie, those with enlarged or multiple nuclei). *C*, The cellular proliferation was determined after 48 hours (for HCA-7) or 72 hours (for Caco-2) of transduction. *D*, Analysis of DNA contents of Caco-2 and HCA-7 cells. Cells were fixed and labeled with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindol) and analyzed by flow cytometry. Data represent 1 representative experiment of 3. *B* and *C*, white and grey bars represent untransduced cells (control) or cells transduced with PV-GFP or PV-CdtB, respectively. Data represent the mean of triplicates in 1 representative experiment of 3. The discontinuous line shows the basal rate in control cells. * $P < .05$ vs control.

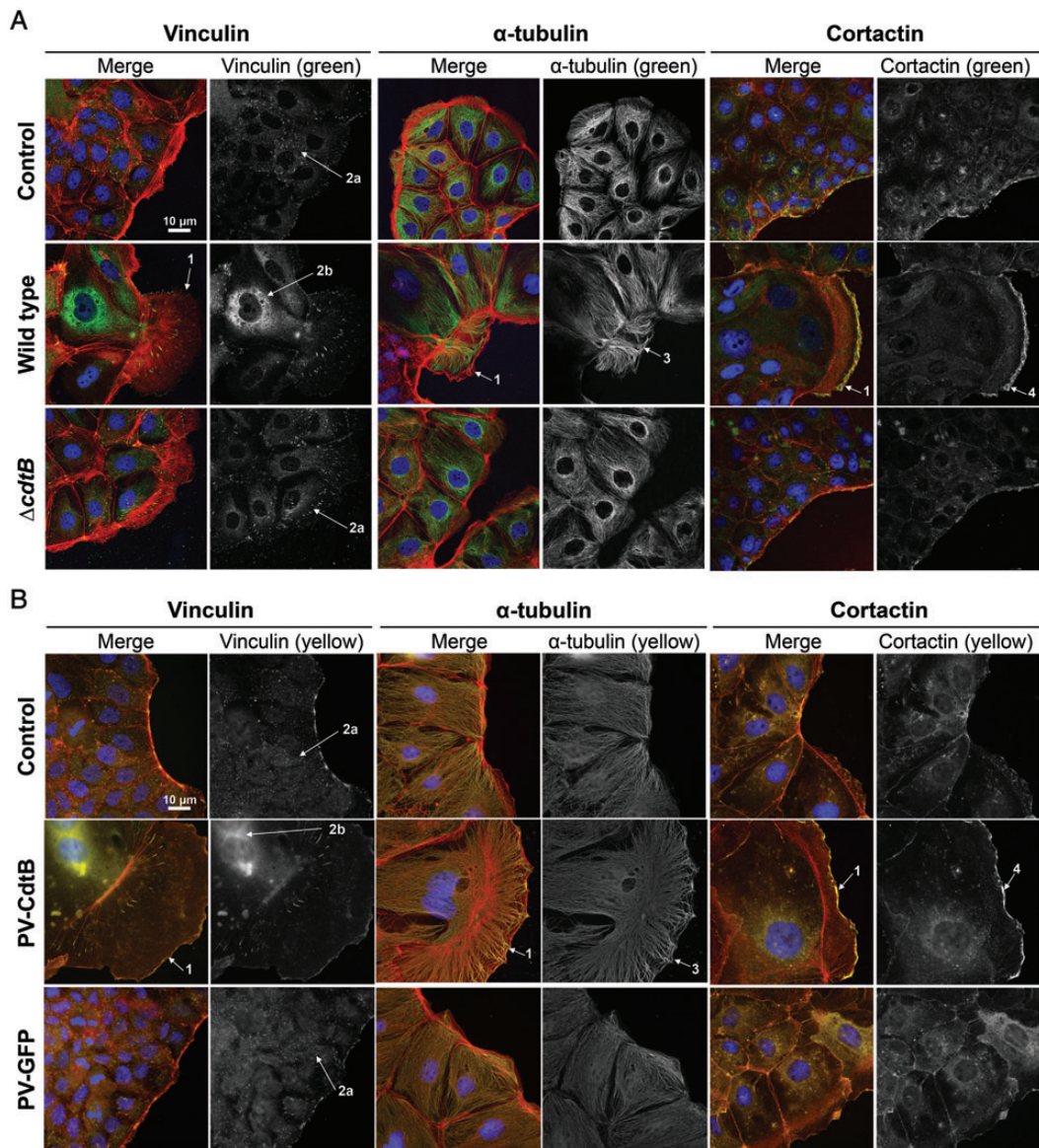


Figure 5. Effects of *Helicobacter pullorum* CdtB on the cytoskeleton of Caco-2 cells. After 72 hours of coculture or transduction experiments, Caco-2 cells were processed for fluorescent staining with fluorescent-labeled phalloidin to detect F-actin (red) and with Hoechst 33342 compound to detect the nucleus (blue). Additional immunostaining with primary antibodies was performed to target vinculin, α -tubulin, or cortactin; antibodies associated with fluorescent-labeled secondary antibodies are in green and yellow for the coculture and transductions experiments, respectively. **A**, Fluorescence staining of Caco-2 cells after coculture without (control, top line) or with *H. pullorum* wild-type strain CCUG 33840 (avian origin; middle line) or its corresponding *cdtB* isogenic mutant ($\Delta cdtB$; bottom line). The yellow color corresponds to the superposition of the green and red labeling. **B**, Fluorescence staining of Caco-2 cells after transduction without (control, top line) or with lentivirus particles used to express the CdtB fused to 3 repeats of the human influenza hemagglutinin epitope (PV-CdtB; middle line), or with lentivirus particles used to express the enhanced green fluorescent protein (PV-GFP; bottom line). Arrows 1, 3, and 4 indicate the cortical actin-rich large lamellipodia, the microtubule network (α -tubulin), and cortactin proteins at the leading edge of CdtB-induced large lamellipodia, respectively. Arrows 2a and 2b indicate the vinculin-stained focal adhesions and vinculin in the perinuclear region of the cytosol, respectively.

HCA-7 cell lines, characterized by the formation of nuclear distended giant cells and an arrest of the cell cycle during the G2/M phase. Similar effects were reported for other CDTs of gram-negative bacteria, such as *Helicobacter* species and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [17, 20, 29]. However, *H. pullorum* did not induce the cytopathogenic effects on the HT-29

cell line. Ceelen et al also reported that some cell lines were not very susceptible to the toxin produced by *H. pullorum* strains [26]. Use of a *cdtB* KO strain of *H. pullorum* yielded no cytopathogenic effects, suggesting that the cytopathogenic effects of *H. pullorum* were due only to the CDT, not to the unidentified soluble cytotoxic factor suspected to be different from the CDT

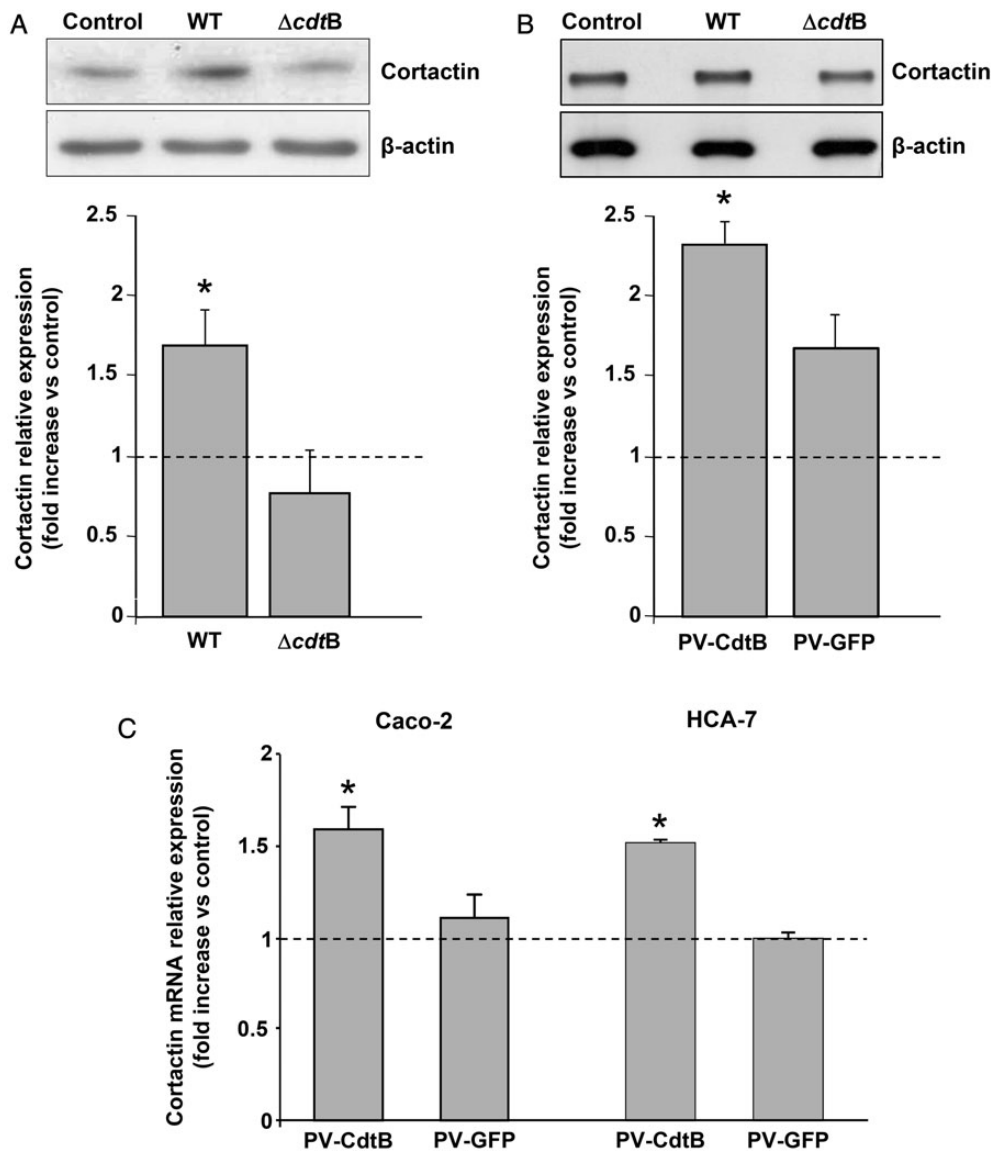


Figure 6. Analysis of the effects of CdtB on cortactin expression. Western blotting analysis of cortactin expression in CaCo-2 cells after 72-hour coculture (A) or transduction (B) with subsequent quantification of cortactin protein expression. The relative expression rate of cortactin proteins in cells was determined by densitometric analysis of the Western blotting autoradiographs and normalized relative to values for the reference protein, actin. Data represent the mean of 4 independent experiments. C, Expression of the cortactin gene in intestinal epithelial cell lines Caco-2 and HCA-7 after 72-hour incubation without or with lentivirus particles. The expression of the cortactin gene in cells was measured by real-time polymerase chain reaction and normalized relative to expression of the reference gene, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1. Results are the means of 3 independent experiments, each performed in triplicate. Ratios were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The relative expression rate of the cortactin protein and gene was reported as a fold increase versus expression in control cells cultured without *H. pullorum* (A) or without lentivirus particles (B and C). The discontinuous line shows the basal rate of cortactin expression by control cells. * $P < .05$ versus control. Abbreviations: $\Delta cdtB$, *cdtB* isogenic mutant of *H. pullorum* strain CCUG 33840; mRNA, messenger RNA; PV-GFP, lentiviral particles used to expressed the enhanced green fluorescent protein; PV-CdtB, lentiviral particles used to expressed the CdtB fused to three repeats of the HA epitope; WT, wild-type *H. pullorum* strain CCUG 33840 (avian origin).

[28], or that the effects of this soluble cytotoxic factor are mediated by the CDT, as proposed by Young et al for that of *H. hepaticus* [20].

Research concerning the CDT and especially its active CdtB subunit is hampered by many obstacles, mainly the difficulty to

produce and purify sufficient amounts of the 3 subunits to reconstitute a complete toxin, CdtB being toxic for numerous cellular and cell-free expression systems. Others strategies have been used, like microinjection [30–33] or electroporation [34] of the purified CdtB subunit in cells. A transient expression of

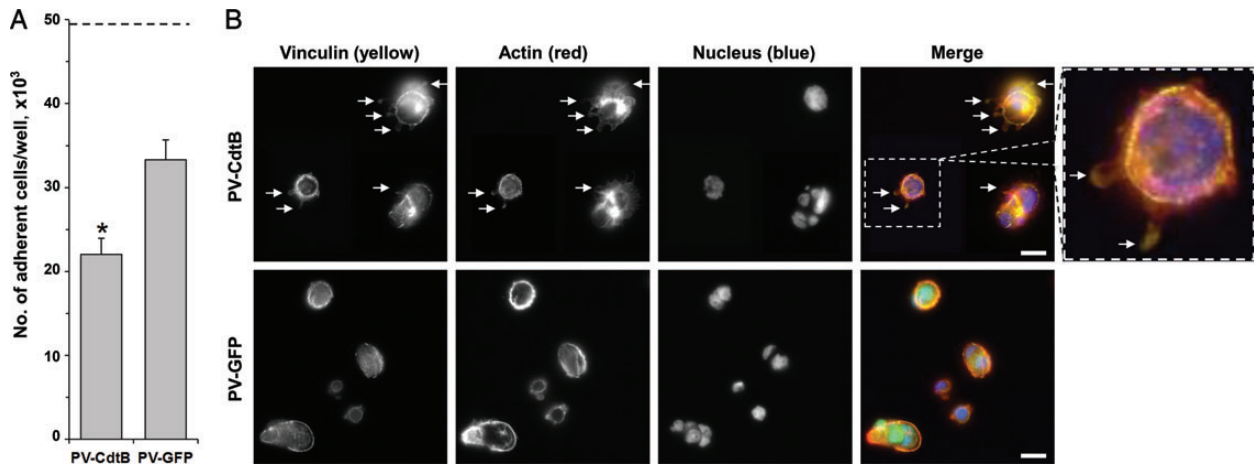


Figure 7. Analysis of the effects of CdtB on cellular adherence. After 72 hours of transduction experiments, Caco-2 cells were detached by trypsin–ethylenediaminetetraacetic acid treatment and seeded again for 6 hours. Then, adherent cells were counted and processed for immunofluorescence staining with fluorescent-labeled phalloidin to detect F-actin (red), with Hoechst 33342 compound to detect the nucleus (blue), and with primary anti-vinculin followed by fluorescent-labeled secondary antibodies (yellow; [Supplementary Materials](#)). **A**, Quantification of adherent Caco-2 cells. Data represent the mean of triplicates in 1 representative experiment of 3. The discontinuous line shows the basal rate in control cells. * $P < .05$ vs control. **B**, Fluorescence staining of Caco-2 cells after transduction with lentivirus particles used to express CdtB fused to 3 repeats of the human influenza hemagglutinin epitope (PV-CdtB; top line), or with lentivirus particles used to express the enhanced green fluorescent protein (PV-GFP; bottom line). Arrows point to membrane ruffles and lamellipodia. Enlargement of a cell with membrane ruffles and lamellipodia is shown in the box. Scale bar, 10 μm .

CdtB was successively achieved by gene delivery systems, using plasmids in transfection and lipofection experiments [30, 35]. Only one study reported an adenovirus-based stable expression system of CdtB from *H. ducreyi* [36]. Unfortunately, expression of CdtB was minimal or undetectable in these systems. An alternative is to use another type of expression system, such as lentivirus vectors, since they can transduce a wide range of cell types and integrate into the host genome in both dividing and postmitotic cells, resulting in stable expression of the transgene. We initially attempted to develop an inducible lentivirus-based expression system [37] to produce CdtB under the control of the EF1- α promoter inducible by tetracycline (a Tet on/off system using the tTR-KRAB repressor). However, no CdtB-inducible cell line could be obtained, probably because the lack of full repression of the promoter by the tTR-KRAB protein in the absence of tetracycline led to CdtB expression that, although slight, was sufficient to inhibit cell proliferation. Thus, new transductions were performed for each experiment, requiring regular production of lentiviruses. However, in contrast to the adenovirus CdtB-based expression system previously reported [36], the high efficiency of this lentivirus transduction system allowed the detection of CdtB by Western blot and also by immunofluorescence at its expected site (ie, the nucleus). The phenotypes induced by this eukaryotic recombinant CdtB were similar to those induced by the *H. pullorum* WT strain, validating the use of the lentivirus expression system. In addition, the effects observed using the lentivirus particles were more pronounced than those observed in coculture experiments, thus

facilitating the observation and the study of CdtB effects. This is due to the constitutive and stable expression of CdtB in transduced cells and to the high percentage of transduced cells (approximately 90%). In fact, the effects observed in coculture experiments may be underestimated because of the low survival of *H. pullorum* strains. The higher frequencies of cells blocked during the G2/M phase after the constitutive expression of CdtB in the cells support this hypothesis.

In fact, this new approach, using the lentivirus-based strategy, offers the possibility to overcome technological barriers and represents a new way to explore the role of CdtB toxin of *H. pullorum*.

Interestingly, this lentivirus-based expression system allowed the observation of CdtB-associated phenotypes in the HT-29 cell line, while no cytopathogenic effect was observed when using *H. pullorum* strains. The fact that the HT-29 cell line became susceptible to CdtB by using direct expression of the toxin in the cell suggests that this cell line could lack the CDT receptor (not yet characterized), which would be present in some epithelial cell lines and absent in others, or that one of the pathways required for the internalization or traffic of CdtB, a crucial step for implementing its genotoxic activity [38], is defective, thus rendering the cell resistant to the effects of CdtB. The nuclear localization of CdtB observed in HT-29 cells after transduction with lentivirus particles suggests that, once inside the cytosol, the transport of the toxin into the nucleus is not affected.

In the present study, the CdtB of *H. pullorum* induces the following major effects on the cytoskeleton of intestinal

epithelial cells: formation of large lamellipodia structures enriched in cortical actin, relocation of vinculin from focal adhesion sites to the perinuclear region of the cytosol, and upregulation of cortactin expression and a decreased cellular adherence. No regulation of β -actin expression was observed either for the CDT or *H. pullorum*. The lack of regulation of some cytoskeletal proteins by *H. pullorum* was previously observed for 2 common target proteins of bacterial pathogens, β -actin and α -tubulin [14, 28]. Nevertheless, a possible effect on the localization of these proteins should not be excluded, as for other bacteria [39]. The effects on cortactin, a central regulator of the actin cytoskeleton, is not surprising, because cortactin is generally considered to promote cell migration by controlling leading-edge lamellipodial dynamics and is one of the targets favored by the pathogen [40]. The formation of lamellipodia structures in response to CdtB was observed in the 3 intestinal epithelial cell lines tested. This effect is in agreement with the recent results obtained in vitro with *H. pullorum* strain 6350–92 (CCUG 33838), which showed that *H. pullorum* can adhere to Caco-2 cells through a flagellum-microvillus interaction that causes membrane ruffling [16]. Another bacterial protein, *Citrobacter rodentium* EspT, triggers formation of lamellipodia on fibroblasts and membrane ruffles on epithelial cells, with these processes dependent on activation of Rac1 and Cdc42 Rho GTPases [41]. These effects are very similar to those observed in the present model in response to *H. pullorum* CdtB, and a possible involvement of *H. pullorum* CdtB in Rac1 or Cdc42 activation should be investigated.

In conclusion, *H. pullorum* is responsible for a cytolethal distending phenotype on Caco-2 and HCA-7 intestinal epithelial cells, inhibition of cellular proliferation via a cell cycle arrest in the G2/M phase, a profound remodeling of the actin cytoskeleton with the formation of lamellipodia, and a modulation of the cortactin expression. Disturbance of focal adhesion and the microtubule network were also observed. These effects have functional consequences because they are associated with a reduced capacity for adherence. They are due to CdtB and seem to be independent of the human or avian origin of the strain. The profound changes observed on cellular cytoskeleton structures of intestinal epithelial cell lines strengthen the hypothesis that *H. pullorum* infection, via CdtB activity, strongly affects the intestinal barrier integrity.

CDT is secreted by numerous enteropathogens that cause acute diarrheal diseases or are suspected to be involved in the development of liver or inflammatory bowel disease. Depending on the colonized organ, these bacteria could induce, via CDT activity, an inflammatory effect on the epithelial cells [42] and could impair mucosa in the susceptible host. Indeed, *C. jejuni* CDT is diarrheagenic in a dose-dependent manner and induces tissue damage in suckling mice [43]. With regard to *H. pullorum*, the bacterium presents a tropism for the duodenum, cecum, liver, and gallbladder of gallinaceous birds [1, 44] and

humans [1–13], suggesting that *H. pullorum* CDT could mainly affect these enterohepatic ducts. Moreover, studies have shown that chronic infection by CDT-producing bacteria might promote malignant transformation and cancer [25, 45]. However, the exact role of CDT in the pathogenesis of digestive diseases and cancer remains to be elucidated.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online (<http://jid.oxfordjournals.org/>). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary data are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

Notes

Acknowledgments. We thank M. Naumann (Institute of Experimental Internal Medicine, Medical Faculty, Otto-von-Guericke-University, Magdeburg, Germany), for supplying the HCA-7 cell line; and Véronique Guyonet-Duperat, Vincent Pitard, Corinne Asencio, Sébastien Richard, and Alice Buissonnière, for technical assistance.

Sequencing experiments were performed at the Genomic and Transcriptomic Facility of Bordeaux. Lentivirus production and flow cytometry experiments were performed at the Viral Vectorology and Flow Cytometry respectively, of the Federative Research Structure “TransBioMed” of the University Bordeaux Segalen (Bordeaux, France).

The sequences of *H. pullorum* strains H152 (CCUG 33837), 459–94 (CCUG 33840), 3758–94 (CCUG 33842), H342 (NCTC 13153), H344 (NCTC 13154), 6350–92 (CCUG 33838), 3166–93 (CCUG 33839), H418 (NCTC 13155), H437 (NCTC 13156), and H443 (NCTC 13157) are available in the GenBank database under the accession numbers JX434690 to JX434699, respectively.

Financial support. This work was supported by the Institut national de la santé et de la recherche médicale, the University Bordeaux Segalen, the Conseil Régional d’Aquitaine (grants 20030304002FA and 20040305003 FA), the Société Nationale Française de Gastroentérologie, the European Union (FEDER no. 2003227), and the Ligue Nationale Contre le Cancer (doctoral fellowship to C. P.-V.).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. Stanley J, Linton D, Burnens AP, et al. *Helicobacter pullorum* sp. nov.—genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. *Microbiology* **1994**; 140:3441–9.
2. Steinbrueckner B, Haerter G, Pelz K, et al. Isolation of *Helicobacter pullorum* from patients with enteritis. *Scand J Infect Dis* **1997**; 29:315–8.
3. Burnens AP, Stanley J, Morgenstern R, Nicolet J. Gastroenteritis associated with *Helicobacter pullorum*. *Lancet* **1994**; 344:1569–70.
4. Bascunana P, Padrones I, Picazo JJ, Velasco AC. Diarrhea associated with *Helicobacter pullorum* in a child. *Rev Esp Quimioter* **2011**; 24: 50–1.
5. Bohr UR, Glasbrenner B, Primus A, Zagoura A, Wex T, Malfertheiner P. Identification of enterohepatic *Helicobacter* species in patients suffering from inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 2766–8.
6. Veijola L, Nilsson I, Halme L, et al. Detection of *Helicobacter* species in chronic liver disease and chronic inflammatory bowel disease. *Ann Med* **2007**; 39:554–60.

7. Laharie D, Asencio C, Asselineau J, et al. Association between enterohepatic *Helicobacter* species and Crohn's disease: a prospective cross-sectional study. *Aliment Pharmacol Ther* **2009**; 30:283–93.
8. Fox JG, Dewhirst FE, Shen Z, et al. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterology* **1998**; 114:755–63.
9. Karagin PH, Stenram U, Wadstrom T, Ljungh A. *Helicobacter* species and common gut bacterial DNA in gallbladder with cholecystitis. *World J Gastroenterol* **2010**; 16:4817–22.
10. Ponzetto A, Pellicano R, Leone N, et al. *Helicobacter* infection and cirrhosis in hepatitis C virus carriage: is it an innocent bystander or a troublemaker? *Med Hypotheses* **2000**; 54:275–7.
11. Rocha M, Avenaud P, Ménard A, et al. Association of *Helicobacter* species with hepatitis C cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma. *Gut* **2005**; 54:396–401.
12. Pellicano R, Ménard A, Rizzetto M, Mégraud F. Helicobacters and liver diseases. Association or causation? *Lancet Infect Dis* **2008**; 8: 254–60.
13. Casswall TH, Nemeth A, Nilsson I, Wadstrom T, Nilsson HO. *Helicobacter* species DNA in liver and gastric tissues in children and adolescents with chronic liver disease. *Scand J Gastroenterol* **2010**; 45: 160–7.
14. Varon C, Duriez A, Lehours P, et al. Study of *Helicobacter pullorum* proinflammatory properties on human epithelial cells in vitro. *Gut* **2009**; 58:629–35.
15. Hynes SO, Ferris JA, Szponar B, et al. Comparative chemical and biological characterization of the lipopolysaccharides of gastric and enterohepatic *Helicobacter* species. *Helicobacter* **2004**; 9:313–23.
16. Sirianni A, Kaakoush NO, Raftery MJ, Mitchell HM. The pathogenic potential of *Helicobacter pullorum*: possible role for the type VI secretion system. *Helicobacter* **2013**; 18:102–11.
17. Chien CC, Taylor NS, Ge Z, Schauer DB, Young VB, Fox JG. Identification of *cdtB* homologues and cytolethal distending toxin activity in enterohepatic *Helicobacter* spp. *J Med Microbiol* **2000**; 49:525–34.
18. Young VB, Knox KA, Schauer DB. Cytolethal distending toxin sequence and activity in the enterohepatic pathogen *Helicobacter hepaticus*. *Infect Immun* **2000**; 68:184–91.
19. Taylor NS, Ge Z, Shen Z, Dewhirst FE, Fox JG. Cytolethal distending toxin: a potential virulence factor for *Helicobacter cinaedi*. *J Infect Dis* **2003**; 188:1892–7.
20. Young VB, Knox KA, Pratt JS, et al. In vitro and in vivo characterization of *Helicobacter hepaticus* cytolethal distending toxin mutants. *Infect Immun* **2004**; 72:2521–7.
21. Young VB, Chien CC, Knox KA, Taylor NS, Schauer DB, Fox JG. Cytolethal distending toxin in avian and human isolates of *Helicobacter pullorum*. *J Infect Dis* **2000**; 182:620–3.
22. Shen Z, Xu S, Dewhirst FE, et al. A novel enterohepatic *Helicobacter* species '*Helicobacter mastomyrinus*' isolated from the liver and intestine of rodents. *Helicobacter* **2005**; 10:59–70.
23. Shen Z, Feng Y, Rogers AB, et al. Cytolethal distending toxin promotes *Helicobacter cinaedi*-associated typhlocolitis in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* **2009**; 77:2508–16.
24. Pratt JS, Sachen KL, Wood HD, Eaton KA, Young VB. Modulation of host immune responses by the cytolethal distending toxin of *Helicobacter hepaticus*. *Infect Immun* **2006**; 74:4496–504.
25. Ge Z, Rogers AB, Feng Y, et al. Bacterial cytolethal distending toxin promotes the development of dysplasia in a model of microbially induced hepatocarcinogenesis. *Cell Microbiol* **2007**; 9:2070–80.
26. Ceelen LM, Haesebrouck F, Favoreel H, Ducatelle R, Decostere A. The cytolethal distending toxin among *Helicobacter pullorum* strains from human and poultry origin. *Vet Microbiol* **2006**; 113:45–53.
27. Avenaud P, Castroviejo M, Claret S, Rosenbaum J, Mégraud F, Ménard A. Expression and activity of the cytolethal distending toxin of *Helicobacter hepaticus*. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**; 318:739–45.
28. Ceelen LM, Haesebrouck F, D'Herde K, et al. Mitotic catastrophe as a prestage to necrosis in mouse liver cells treated with *Helicobacter pullorum* sonicates. *J Morphol* **2009**; 270:921–8.
29. Belibasakis GN, Mattsson A, Wang Y, Chen C, Johansson A. Cell cycle arrest of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: involvement of the cytolethal distending toxin. *APMIS* **2004**; 112:674–85.
30. Lara-Tejero M, Galan JE. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science* **2000**; 290:354–7.
31. Lara-Tejero M, Galan JE. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect Immun* **2001**; 69:4358–65.
32. Li L, Sharipo A, Chaves-Olarte E, et al. The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin activates sensors of DNA damage and repair complexes in proliferating and non-proliferating cells. *Cell Microbiol* **2002**; 4:87–99.
33. Nishikubo S, Ohara M, Ueno Y, et al. An N-terminal segment of the active component of the bacterial genotoxin cytolethal distending toxin B (CDTB) directs CDTB into the nucleus. *J Biol Chem* **2003**; 278:50671–81.
34. Elwell C, Chao K, Patel K, Dreyfus L. *Escherichia coli* CdtB mediates cytolethal distending toxin cell cycle arrest. *Infect Immun* **2001**; 69:3418–22.
35. Yamamoto K, Tominaga K, Sukedai M, et al. Delivery of cytolethal distending toxin B induces cell cycle arrest and apoptosis in gingival squamous cell carcinoma in vitro. *Eur J Oral Sci* **2004**; 112:445–51.
36. Wising C, Magnusson M, Ahlman K, Lindholm L, Lagergard T. Toxic activity of the CdtB component of *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin expressed from an adenovirus 5 vector. *APMIS* **2010**; 118:143–9.
37. Wiznerowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* **2003**; 77:8957–61.
38. Guerra L, Teter K, Lilley BN, et al. Cellular internalization of cytolethal distending toxin: a new end to a known pathway. *Cell Microbiol* **2005**; 7:921–34.
39. Haglund CM, Welch MD. Pathogens and polymers: microbe-host interactions illuminate the cytoskeleton. *J Cell Biol* **2011**; 195:7–17.
40. Selbach M, Backert S. Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens. *Trends Microbiol* **2005**; 13:181–9.
41. Bulgin RR, Arbeloa A, Chung JC, Frankel G. EspT triggers formation of lamellipodia and membrane ruffles through activation of Rac-1 and Cdc42. *Cell Microbiol* **2009**; 11:217–29.
42. Zheng J, Meng J, Zhao S, Singh R, Song W. *Campylobacter*-induced interleukin-8 secretion in polarized human intestinal epithelial cells requires *Campylobacter*-secreted cytolethal distending toxin- and Toll-like receptor-mediated activation of NF- κ B. *Infect Immun* **2008**; 76:4498–508.
43. Okuda J, Fukumoto M, Takeda Y, Nishibuchi M. Examination of diarrheagenicity of cytolethal distending toxin: suckling mouse response to the products of the *cdtABC* genes of *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun* **1997**; 65:428–33.
44. Neubauer C, Hess M. Tissue tropism of *Helicobacter pullorum* in specific pathogen-free chickens determined by culture and nucleic acid detection. *Avian Dis* **2006**; 50:620–3.
45. Guidi R, Guerra L, Levi L, et al. Chronic exposure to the cytolethal distending toxins of Gram-negative bacteria promotes genomic instability and altered DNA damage response. *Cell Microbiol* **2013**; 15:98–113.

II. Publication n°5

Gastric and Enterohepatic Helicobacters other than *Helicobacter pylori*

Armelle Menard, Christelle Péré-Védrenne, Freddy Haesebrouck and Bram Flahou

Helicobacter 2014;19 (Suppl. 1): 59–67

REVIEW ARTICLE

Gastric and Enterohepatic Helicobacters other than *Helicobacter pylori*

Armelle Ménard,^{*,†} Christelle Péré-Védrenne,^{*,†} Freddy Haesebrouck[‡] and Bram Flahou[‡]

*Laboratoire de Bactériologie, Centre National de Référence des Campylobacters et Hélicobacters, Université de Bordeaux, F33076, Bordeaux, France, [†]INSERM U853, F33076, Bordeaux, France, [‡]Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, Ghent University, Merelbeke, Belgium

Keywords

Enterohepatic *Helicobacter* species, gastric *Helicobacter* species, genomics, human disease, microbiota, pathogenesis.

Reprint requests to: Armelle Ménard, Laboratoire de Bactériologie, INSERM U853, Université de Bordeaux, F33076 Bordeaux, France.
E-mail: armelle.menard@u-bordeaux.fr

Abstract

During the past year, research on non-*Helicobacter pylori* species has intensified. *H. valdiviensis* was isolated from wild birds, and putative novel species have been isolated from Bengal tigers and Australian marsupials. Various genomes have been sequenced: *H. bilis*, *H. canis*, *H. macacae*, *H. fennelliae*, *H. cetorum*, and *H. suis*. Several studies highlighted the virulence of non-*H. pylori* species including *H. cinaedi* in humans and hyperlipidemic mice or *H. macacae* in geriatric rhesus monkeys with intestinal adenocarcinoma. Not surprisingly, increased attention has been paid to the position of *Helicobacter* species in the microbiota of children and animal species (mice, chickens, penguins, and migrating birds). A large number of experimental studies have been performed in animal models of *Helicobacter* induced typhlocolitis, showing that the gastrointestinal microbial community is involved in modulation of host pathways leading to chronic inflammation. Animal models of *H. suis*, *H. heilmannii*, and *H. felis* infection have been used to study the development of severe inflammation-related pathologies, including gastric MALT lymphoma and adenocarcinoma.

Taxonomy and Phylogeny

In 2014, *Helicobacter valdiviensis* (type strain WBE14T) was described as a novel species [1], isolated from wild bird feces in Southern Chile. The host range of *H. valdiviensis*, its clinical relevance, and zoonotic potential remain to be investigated. Putative novel *Helicobacter* species from Bengal tigers from Thailand were characterized [2]. Gene and protein analysis identified them as novel *H. acinonychis* strains closely related to strains of other big cats. These isolates express homologs of *H. pylori* urease A/B, flagellins, BabA, NapA, HtrA, and γ -glutamyl transpeptidase, but no expression was detected for CagA, VacA, SabA, DupA, or OipA. Novel *Helicobacter* species were detected in the gastrointestinal tract of Australian marsupials [3], and “S”-shaped isolates with bipolar sheathed flagella were cultivated from ringtail possums. No *Helicobacter* were cultured from the koalas, while *Helicobacter* DNA was detected in the majority of the animals.

An improved PCR/sequencing of the *atpA* gene was reported for the identification of 14 *Helicobacter* taxa,

“*H. winghamensis*,” and *Wolinella succinogenes* [4]. A PCR–restriction fragment length polymorphism targeting the 23S rRNA gene was also reported for the differentiation of 27 non-*H. pylori* taxa and *W. succinogenes* [5]. Using two-dimensional gel electrophoresis of the whole proteome of *Helicobacter* strains, it was possible, based on 66 protein spots, to discriminate between enterohepatic and gastric *Helicobacter*s, despite an extensive heterogeneity [6].

Genomics and Genetics

Genome sequencing was performed for two *H. suis* strains for which no isolates were available in vitro [7]. Genome analysis revealed genes unique to *H. suis*, leading to the development of a new *H. suis*-specific PCR assay based on a homolog of the *carR* gene from *Azospirillum brasilense*, involved in the regulation of carbohydrate catabolism. Two genomes of *H. cetorum* strains, originating from a dolphin and a Beluga whale, were sequenced [8]. The strains were phylogenetically

more closely related to *H. pylori* and *H. acinonychis* than to other *Helicobacter* species. Their genomes are 7–26% larger than *H. pylori* genomes and differ markedly from one another in gene content, sequences, and arrangements of shared genes. They lack the *cag* pathogenicity island (*cagPAI*), but do possess novel alleles of the *vacA* gene. In addition, they reveal an extra triplet of divergent *vacA* genes, metabolic genes distinct from *H. pylori*, and genes encoding an iron and nickel cofactored urease. Although *H. acinonychis* is postulated to descend from the *H. pylori* hpAfrica2 superlineage [9], genome sequences from three South African hpAfrica2 *H. pylori* strains were different from *H. acinonychis* in their gene arrangement and content [10].

H. bilis strain WiWa isolated from the cecum of a mouse (Iowa, USA), *H. canis* strain A805/92 isolated from a boy's stool sample [11], and *H. macacae* type strain MIT 99-5501 isolated from the intestine of a rhesus monkey with chronic idiopathic colitis [12,13] were sequenced (GenBank accession numbers: AQFW01000000, AZJJ01000002, and AZJI01000005, respectively). The draft genome sequence [14] of an *H. fennelliae* strain isolated from the blood of a female patient with non-Hodgkin lymphoma [15] is also available (GenBank accession number: BASD00000000). The genome of this strain MRY12-0050 is 2.15 Mb in size, has a G+C content of 37.9%, and contains 2507 genes (2467 protein-coding genes and 40 structural RNAs). No cytolethal distending toxin (CDT) cluster was identified in contrast to its closest neighbors *H. cinaedi* and *H. hepaticus* [15].

Genomic analysis of a metronidazole-resistant human-derived *H. bizzozeronii* strain revealed a frame length extension of a simple sequence cytosine repeat in the 3' region of the oxygen-insensitive NADPH nitroreductase *rdxA* [16]. This extension was the only mutation, acquired at a high rate, observed in spontaneous *H. bizzozeronii* metronidazole-resistant mutants. The *H. bizzozeronii* *rdxA* appears to be a contingency gene undergoing phase variation, in contrast to its counterpart in *H. pylori*.

Non-*H. pylori* Helicobacters in humans

Contact with animals is believed to be a risk factor for *H. suis* infection, but consumption of contaminated pork is now also considered to be a possible transmission route [17]. Indeed, viable *H. suis* bacteria were detected in retail pork samples and persisted for days in experimentally contaminated pork. Reports in the literature describe an increased proportional mortality from Parkinson's disease among livestock farmers. In patients (n = 60) with idiopathic parkinsonism, and

compared with control patients (n = 256), the relative risk of harboring *H. suis* was 10 times greater than that of having *H. pylori* [18]. This higher frequency was even exaggerated following *H. pylori* eradication therapy.

A 62-year-old Japanese woman, suffering from gastritis and multiple gastric ulcers, was shown to be infected with *H. heilmannii* sensu stricto, which was subsequently eradicated with classic triple therapy [19].

The microaerophilic microbiota was evaluated in colonic biopsies from children presenting for the first time with inflammatory bowel disease (IBD) [20]. The prevalence of *Helicobacter* species (*H. pylori*, *W. succinogenes*, *H. brantiae*, and *H. hepaticus*), detected by PCR was 11% in 44 patients with treatment naïve de novo IBD vs 12% in 42 children with normal colons, suggesting that Helicobacters may not be associated with IBD in children.

It was proposed that enterohepatic Helicobacters could act as a facilitating agent in the initial infection and progression of *Chlamydia trachomatis*-induced proctitis [21]. A meta-analysis including 10 case-control studies supports the possible association between *Helicobacter* species infection and cholangiocarcinoma [22].

H. hepaticus infection may be involved in the progression of primary hepatocellular carcinoma (HCC) [23]. The anti-*H. hepaticus* IgG detection rate was 50.0% in HCC patients (n = 50), while this rate reached only 7.7 and 6.3% in control groups (patients with benign liver tumor and normal liver tissue, respectively). The *H. hepaticus* 16S rRNA gene was detected in 36% of HCC samples positive by serology of which 44.4% were positive for the *cdtB* gene, while these genes were virtually not detected in control groups.

The fourth clinical case of *H. canis* bacteraemia was reported in a 41-year-old woman, 11 months after kidney transplantation [24]. The patient was fully cured after cefuroxime and ciprofloxacin treatment.

Typing of 46 *H. cinaedi* strains isolated from blood of patients from the same hospital revealed that most isolates exhibited the clonal complex 9 and were mainly isolated from immunocompromised patients in the same ward [14]. Three related *H. fennelliae* isolates were also obtained from the same ward. Antimicrobial susceptibilities of the isolates were similar, although mutations conferring clarithromycin resistance in *H. fennelliae* differed from those in *H. cinaedi*. This study highlights that *H. cinaedi* and *H. fennelliae* must be carefully monitored to prevent nosocomial infection in immunocompromised patients [14]. Among 126 *H. cinaedi*-positive sets of blood cultures isolated from 66 bacteremic patients from two hospitals [25], the time for blood cultures to become positive was ≤ 5 and > 5 days for 55% and 45% of sets, respectively,

confirming that *H. cinaedi* is a fastidious, slow-growing organism, hampering its microbiological diagnosis. All patients except one had an underlying disease. The 30-day mortality rate of *H. cinaedi* bacteremia was 6.3%.

H. cinaedi is rarely encountered in immunocompetent individuals. A case of prosthetic (axillobifemoral bypass) graft infection with *H. cinaedi* was reported in an 85-year-old man [26]. The patient was successfully treated by removal of the infected graft and subsequent antibiotherapy (sulbactam/ampicillin for 2 weeks). A case of *H. cinaedi*-associated meningitis was reported in an immunocompetent 34-year-old woman who had daily contact with a kitten for a month, suggesting that the pet served as a reservoir of transmission [27]. A course of 1 week with ceftriaxone and vancomycin combined antibiotherapy, followed by 2 weeks of meropenem, eliminated the symptoms of *H. cinaedi* meningitis.

Matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry was shown to be useful for the identification and subtyping of *H. cinaedi* [28]. As for *hsp60* gene-based phylogeny, human isolates formed a single cluster distinct from animal isolates, suggesting that animal strains may not be a major source of infection in humans [28].

Sequencing of an *H. pylori* strain isolated from a patient with gastric cancer in China revealed a new gene sharing 93% identity with a hypothetical protein of *H. cinaedi*, suggesting a possible horizontal gene transfer to *H. pylori* [29].

Natural Infection with Non-*H. pylori* Helicobacters in Animals

Davison et al. [30] described the first isolation of *H. cetorum* from a striped dolphin and they showed that Atlantic white-sided dolphins and short-beaked common dolphins from European waters are also infected with this *Helicobacter* species. In these wild stranded animals, mucosal hemorrhages were present in the pyloric stomach, as well as an ulcerative gastritis resembling previously described gastritis in *H. cetorum*-infected dolphins [31].

H. canis has been associated with digestive diseases in dogs, cats, and humans. Recently, the bacterium was isolated from sheep feces [32], suggesting that sheep could act as *H. canis* reservoirs for zoonotic or foodborne transmission. *H. canis*, *H. bizzozeroni*, *H. bilis*, *H. felis*, and *H. salomonis* were detected by PCR in the crypts of the cecum and colon of healthy and symptomatic stray dogs [33]. Colonization levels of *Helicobacter*-like bacteria correlated with the level of mucosal fibrosis/atrophy and were highest in younger dogs. In another study, gastric mucosal glycosylation

profiles were evaluated in *Helicobacter*-free dogs [34]. The canine gastric mucosa was shown to lack expression of type 1 Lewis antigens, while a broad expression of type 2 structures and the A antigen was observed. Lewis X (Le^x) revealed a variable expression in the body, whereas expression was detected in the antrum of all animals. Expression of sialylated Le^x, involved in SabA-mediated adherence of *H. pylori*, was mainly observed in the body. Of known canine non-*H. pylori* *Helicobacter* species, *H. heilmannii* sensu stricto presented the highest adherence scores to the antral mucosa in canine paraffin-embedded sections.

The relationship between pet ownership or frequent exposure to dogs and infection with different gastric *Helicobacter* species was assessed [35]. A significant correlation was found between human and canine infection for *H. felis* and to a lesser extent for *H. bizzozeronii*.

The poultry gut microbiota was little studied, while chickens are a major meat source worldwide and are considered as important reservoirs for foodborne pathogens. High abundance of *Campylobacter* species *H. pullorum* and *Megamonas* species was found in the cecal microbiome of Ross broiler chickens housed indoors under standard commercial conditions [36]. The gastrointestinal tract microbiota was characterized in king, gentoo, macaroni, and little penguin species [37]. 16S rRNA gene pyrosequencing revealed that Helicobacteriaceae was the third dominant family in king penguins (8%) in contrast to other penguin species. In the Proteobacteria phylum, *Helicobacter* species ranged from 1 to 11% in these four marine seabird species. Of 3889 16S rRNA sequences analyzed from the feces of migrating birds (migratory stopover, Delaware Bay, USA), 6.5% corresponded to Epsilonproteobacteria, that is, *Campylobacter* (82.3%) and *Helicobacter* (17.7%) species. Most *Helicobacter*-like sequences were closely related to *H. pametensis* and *H. anseris*, while the low percentage of sequence identity (92%) with *H. anseris* suggests a different *Helicobacter* species [38]. Helicobacters were detected at low frequency in feces and intestinal tissues of tropical terrestrial wild birds (Venezuela) by molecular methods [39], suggesting that these bacteria may be uncommon in the populations studied.

PCR arrays for commonly reported rodent infectious agents were used in naturally infected index mice and sentinel mice exposed by contact and soiled-bedding transfer [40]. Helicobacters and pinworms were detected in fewer than half of the soiled-bedding sentinels. Of the four *Helicobacter* species identified in index mice, only *H. ganmani* was found in soiled-bedding and contact sentinels.

The prevalence of enterohepatic Helicobacter (EHH) infection was determined in a study on old rhesus

monkeys [41]. Helicobacter infection (PCR, culture) was present in 97% of the monkeys; 13 of 14 monkeys diagnosed with intestinal adenocarcinoma were infected. *H. macacae* and “*Helicobacter* sp. rhesus monkey” taxons 2 and 4 were detected on the epithelial colonic surface. In vitro experiments showed bacterial adherence to epithelia, invasion as well as induction of proinflammatory gene expression, while genes involved in the inflammasome were downregulated. These results suggest that EHH may mediate diarrhea, chronic inflammation, and intestinal cancer in nonhuman primates. Downregulation of inflammasome function by Helicobacter may represent a strategy for long-term persistence in the host.

The impact of *H. pylori* challenge upon the preexisting gastric microbial community members in rhesus macaques was assessed [42]. When comparing non-*Helicobacter* taxa before and after *H. pylori* inoculation, no significant changes in the microflora were observed. Most animals were naturally infected with *H. suis* prior to *H. pylori* inoculation. After *H. pylori* challenge, only one of two gastric *Helicobacter* species was dominant, revealing potential competitive inhibition/exclusion. Interestingly, the proportions of both species were shown to be highly variable in individual animals.

Natural Helicobacter Infection of Mice in Animal Facilities

Helicobacters were shown to be among the dominant organisms in the intestinal tract of mice [43]. *H. ganmani* and an unidentified *Helicobacter* strain (MIT 01-6451) are the predominant *Helicobacter* species infecting specific pathogen-free mice in Japanese animal facilities [44] and lateral gene transfer probably occurs among *Helicobacter* species during coinfection. The prevalence of *Helicobacter* infection in the feces/cecum of laboratory mice in Thailand reached a level of 78–98% [45]. *H. rodentium* (67.0%) and *Helicobacter* strain MIT 01-6451 (15.4%) were the most common *Helicobacter* species, while some species remained unidentified (14.1%).

The beneficial effects of a 4-drug medicated diet, aimed at Helicobacter eradication, were demonstrated in mice with altered adaptive immunity and naturally infected with *H. hepaticus* and *H. typhlonius* [46]. However, mice that were fed a medicated diet developed severe side effects that improved or were resolved after resuming the control diet.

Experimental Infection with non-*H. pylori* Helicobacters

The involvement of the chemokine CXCL-13 in gastric MALT lymphoma development in *H. suis*-infected mice

was confirmed by administration of an anti-CXCL-13 antibody, which was able to reduce the formation of lymphoid follicles and germinal centers [47]. Similar results were obtained by administering VEGF receptor antibodies to infected mice [48].

Mongolian gerbils were infected with nine *H. heilmannii* sensu stricto strains [49]. Seven strains caused an antrum-dominant chronic active gastritis after 9 weeks of infection. High colonization levels were observed for four strains, while colonization of four other strains was more restricted and one strain did not colonize the stomach of these animals. A strong IL-1 β expression was observed in infected animals, in contrast to IFN- γ expression.

The importance of Th1-mediated immunity in protecting mice against *H. felis* infection was examined [50]. In IL-23p19 KO mice, IL-17 levels remained low but IFN- γ levels were shown to be increased, resulting in colonization levels similar to those in wild-type (WT) mice. In addition, treatment of *H. felis*-infected Balb/c mice with Th1-promoting IL-12 resulted in increased gastric inflammation and even eradication of bacteria in most mice. Infection of mice with *H. felis* was shown to induce expression of the dual oxidase enzyme complex Duox2/Duoxa2 [51]. Higher colonization rates were observed in *Duoxa*^{-/-} mice infected with *H. felis*, compared with WT mice, highlighting the importance of epithelial production of H₂O₂ as a line of defense against *Helicobacter* infection.

Nfkb1^{-/-} mice developed more pronounced gastric atrophy upon *H. felis* infection compared with WT mice, while *nfkb2*^{-/-} mice developed minimal gastric epithelial pathology, and c-Rel-mediated signaling appeared to modulate the risk of lymphomagenesis [52]. Mesenchymal stem cells were shown to promote an accelerated form of *H. felis*-induced gastric cancer [53] and their engraftment in chronic inflammation was shown to be only partially dependent on the CXCR4 receptor. In *H. felis*-infected C57BL/6 mice, gastric metaplasia coincides with the appearance of CD45⁺MHCII⁺CD11b⁺CD11c⁺ myeloid cells, which were indeed absent in mice suffering from chronic gastritis without concurrent metaplasia [54]. Deletion in mice of *Gli1* inhibited expression of markers of metaplasia, clearly showing that Gli1-dependent myeloid cell differentiation plays a role in the appearance of myeloid cell subtypes required for the development of mucous neck cell metaplasia. In another study, diet-induced obesity in mice was shown to cause an increase in bone marrow-derived immature myeloid cells in blood and gastric tissue of *H. felis*-infected mice, as well as increased expression of IL-17A, GM-CSF, and STAT3 activation [55]. Not only did obesity promote a protumorigenic gastric

microenvironment, but *H. felis*-induced gastric inflammation also augmented obesity-induced adipose inflammation. Besides an increased intake of fat leading to obesity, other dietary factors are increasingly recognized as being important factors in modulating progression of *Helicobacter*-induced gastric pathologies [56]. Partially in contrast to previously published experiments, Yang et al. [57] postulate that bone marrow-derived cells might not be the direct source of gastrointestinal tumor cells induced by *H. felis* infection.

Infection of spontaneously hyperlipidemic mice with *H. cinaedi* was shown to significantly enhance the development of atherosclerosis [58], with increased expression of proinflammatory genes, accumulation of neutrophils, and induction of macrophage-derived foam cell formation in aortic root lesions. Although infection was asymptomatic, detection of CDT RNA of *H. cinaedi* indicated an aortic infection. In vitro, *H. cinaedi* infection altered expression of cholesterol receptors and transporters in macrophages and induced foam cell formation and differentiation of THP-1 monocytes.

p16^{ink4a} and p19^{arf} genes are two distinct tumor suppressors located at the Ink4a/Arf locus. Methylation of p16^{ink4a} and APC genes is increased in colorectal carcinoma after X-ray radiotherapy, and inactivation of p16^{ink4a} and p19^{arf}/p14^{arf} by hypermethylation of promoter CpG islands also occurs frequently in various tumors and is implicated in murine carcinogenesis. The small intestine of mice is the most sensitive organ for *ink4a/arf* methylation induced by X-radiation, the chemical carcinogen N-nitrosomethylurea, and *H. felis* infection [59], suggesting that abdomen radiotherapy could be carcinogenic for patients with acute *H. pylori* infection. Young adult mice harbored either conventional intestinal microbiota or intestinal microbiota with a restricted microbial composition. After exposure of mice to irradiation, acute chromosomal DNA lesions were observed in mice with a restricted microbial composition, but not in those with conventional intestinal microbiota [60]. *H. hepaticus* and *Bacteroides stercoris* were more abundant in mice with conventional intestinal microbiota than in those with a restricted intestinal microbiota, suggesting that the intestinal microbiota can influence genotoxic endpoints induced by high-energy protons.

The intestinal microbiota structure was shown to be essential for the development of typhlocolitis in *H. hepaticus*-infected IL-10-deficient mice, and disease can be initiated and progress in the presence of different microbial communities [61]. While the severity of the disease appears to be independent of the microbial community structure, the specific structure of the microbiota may modulate host pathways leading to

H. hepaticus-induced chronic inflammation. Discrepant results have nevertheless been published. Using the same model, it was shown that mice kept under specific pathogen-free conditions in two different facilities displayed strong differences with respect to their susceptibility to *H. hepaticus*-induced typhlocolitis [62]. This was associated with a different composition of the microbiota. *H. trogontum* infection also induced typhlocolitis in IL-10-deficient mice [63]. Disease is associated with significant intestinal barrier dysfunction characterized by a decreased transepithelial electrical resistance and mRNA expression of tight junction proteins and an increased short-circuit current, myosin light chain kinase mRNA, paracellular permeability, and tumor necrosis factor (TNF)- α and myeloperoxidase plasma levels. Exclusive enteral nutrition, a well-established approach for the management of Crohn's disease, metronidazole treatment or a combination of both, restored barrier function and reversed inflammatory changes along with an *H. trogontum* load reduction, while hydrocortisone treatment did not. These findings provide an explanation as to the observation that patients with Crohn's disease achieve mucosal healing more readily following exclusive enteral nutrition than following corticosteroid treatment.

Dietary vitamin B6 modulates colonic inflammation in IL-10-deficient mice naturally colonized by *H. hepaticus*, suggesting that vitamin B6 supplementation may offer an additional tool for the management of IBD [64].

Patients with IBD are at increased risk for bone loss and fractures. A significant trabecular bone loss was observed in infected IL-10-deficient male mice but not in females [65]. Moreover, *H. hepaticus* infection suppressed osteoblast markers only in male mice. The latter suffered from more severe colitis and presented higher levels of *H. hepaticus* colonization than females.

IL-10 receptor-blocking antibody treatment during chronic *H. hepaticus* infection of mice lacking inducible expression of major histocompatibility complex class II (MHCII) molecules led to colitis associated with increased innate effector cell infiltration and expression of proinflammatory cytokines [66]. Moreover, exacerbated colitis correlated with the inability of intestinal epithelial cells to upregulate MHCII expression.

The Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP) is a hematopoietic cell-specific intracellular signaling molecule that regulates the actin cytoskeleton. WASP deficiency is associated with IBD. *Helicobacter* species were detected in feces of WASP-deficient mice [67]. After *Helicobacter* eradication, these mice did not develop spontaneous colitis, and reinfection with *H. bilis* led to typhlitis and colitis which, in several cases, evolved

toward dysplasia with 10% demonstrating colon carcinoma. In addition, a T-cell transfer model of colitis dependent on WAPS-deficient innate immune cells also required *Helicobacter* colonization.

H. hepaticus-infected Rag2-deficient mice emulate many aspects of human IBD, and infected mice develop severe colitis progressing into colon carcinoma. A translational comparison of protein expression and protein damage products in tissues of *H. hepaticus*-infected Rag2-deficient mice and patients with human IBD assessed the validity of this animal model for human IBD [68]. The study determined some systemic inflammatory markers in serum that were most closely associated with disease activity and were common to human IBD and *H. hepaticus*-associated colitis in Rag2-deficient mice.

Necrotizing enterocolitis (NEC) is the second most common cause of morbidity in premature infants, and dysbiosis is thought to play an important role in disease onset. *H. hepaticus* infection of premature formula-fed rats (model of NEC) induced inflammation, increased levels of TLR4 receptor, altered activation of autophagy, and increased the incidence and severity of NEC in rats exposed to asphyxia and cold stress [69]. These results are consistent with observations in neonates of blooms of proinflammatory microbes just before the onset of NEC and support dysbiosis in the incidence of NEC.

H. hepaticus infection is sufficient to enhance prostatic intra-epithelial neoplasia and microinvasive carcinoma in mice with a genetic predilection for dysregulation of wnt signaling (*Apc*^{Min/+} mutant), in an inflammation-dependent manner [70]. Intraperitoneal injection of mesenteric lymph node cells from *H. hepaticus*-infected mice to noninfected mice is sufficient to transmit early neoplasia to uninfected mice. Transmissibility of neoplasia could be prevented by prior neutralization of inflammation using anti-TNF- α antibody in infected mesenteric lymph node donor mice.

A study evaluating the effects of fish oil on mouse gut microbiota showed that fish oil can suppress the *Helicobacter* growth [71].

Virulence Factors

Similar to *H. pylori*, the gamma glutamyl transpeptidase globulin transferase (GGT) from *H. suis* was shown to impair lymphocyte function [72] and this effect could be modulated by supplementation with glutamine and reduced glutathione, two known GGT substrates. *H. suis* outer membrane vesicles were identified as a possible delivery route of GGT to lymphocytes residing in deeper mucosal layers. GGT is also a virulence factor for *H. bilis* that enhances inflammatory stress response via

oxidative stress in colon epithelial cells [73]. IL-8 secretion was upregulated in a GGT-dependent manner, but can be lowered by glutamine supplementation.

The CdtB of *H. pullorum* induces an atypical delocalization of vinculin from focal adhesions to the perinuclear region, formation of cortical actin-rich large lamellipodia with an upregulation of cortactin, and decreased cellular adherence [74].

The CdtB of *H. hepaticus* alone is necessary and sufficient for epithelial cell genotoxicity [75]. As for *H. pylori*, the cholesterol- α -glucosyltransferase of *H. hepaticus* is essential for establishing colonization of the intestine and liver in male A/JCr mice [76]. The PAI of *H. hepaticus* encodes components of a type VI secretion system (T6SS) whose sequence and organization resemble those of the T6SS in *C. coli* and *C. jejuni* [77].

Acknowledgements and Disclosures

C. Péré-Védrenne is a PhD student supported by la Ligue contre le Cancer.

Competing interest: The authors have no competing interests.

References

- Collado L, Jara R, Gonzalez S. Description of *Helicobacter valdiviensis* sp. nov., a novel Epsilonproteobacteria isolated from wild bird faecal samples in Southern Chile. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:1913–9.
- Tegtmeyer N, Rivas Traverso F, Rohde M, Oyarzabal OA, Lehn N, Schneider-Brachert W, Ferrero RL, Fox JG, Berg DE, Backert S. Electron microscopic, genetic and protein expression analyses of *Helicobacter acinonychis* strains from a Bengal tiger. *PLoS One* 2013;8:e71220.
- Coldham T, Rose K, O'Rourke J, Neilan BA, Dalton H, Lee A, Mitchell H. Detection of *Helicobacter* species in the gastrointestinal tract of ringtail possum and koala: possible influence of diet, on the gut microbiota. *Vet Microbiol* 2013;166:429–37.
- Miller WG, Yee E, Jolley KA, Chapman MH. Use of an improved *atpA* amplification and sequencing method to identify members of the *Campylobacteraceae* and *Helicobacteraceae*. *Lett Appl Microbiol* 2014;9:e89774.
- Yadegar A, Alebouyeh M, Lawson AJ, Mirzaei T, Mojarad EN, Zali MR. Differentiation of non-*pylori* *Helicobacter* species based on PCR-restriction fragment length polymorphism of the 23S rRNA gene. *World J Microbiol Biotechnol* 2014;30:1909–17.
- Fowsantear W, Argo E, Pattinson C, Cash P. Comparative proteomics of *Helicobacter* species: the discrimination of gastric and enterohepatic *Helicobacter* species. *J Proteomics* 2014;97:245–55.
- Matsui H, Takahashi T, Murayama SY, et al. Development of new PCR primers by comparative genomics for the detection of *Helicobacter suis* in gastric biopsy specimens. *Helicobacter* 2014; Mar 28. DOI: 10.1111/hel.12127. [Epub ahead of print]
- Kersulyte D, Rossi M, Berg DE. Sequence divergence and conservation in genomes of *Helicobacter cetorum* strains from a dolphin and a whale. *PLoS One* 2013;8:e83177.

- 9 Moodley Y, Linz B, Bond RP, et al. Age of the association between *Helicobacter pylori* and man. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002693.
- 10 Duncan SS, Bertoli MT, Kersulyte D, Valk PL, Tamma S, Segal I, McClain MS, Cover TL, Berg DE. Genome Sequences of Three hpAfrica2 Strains of *Helicobacter pylori*. *Genome Announc* 2013;1:e00729–13.
- 11 Burnens AP, Stanley J, Schaad UB, Nicolet J. Novel *Campylobacter*-like organism resembling *Helicobacter fennelliae* isolated from a boy with gastroenteritis and from dogs. *J Clin Microbiol* 1993;31:1916–7.
- 12 Fox JG, Handt L, Xu S, Shen Z, Dewhirst FE, Paster BJ, Dangler CA, Lodge K, Motzel S, Klein H. Novel *Helicobacter* species isolated from rhesus monkeys with chronic idiopathic colitis. *J Med Microbiol* 2001;50:421–9.
- 13 Fox JG, Boutin SR, Handt LK, et al. Isolation and characterization of a novel *Helicobacter* species, "*Helicobacter macacae*," from rhesus monkeys with and without chronic idiopathic colitis. *J Clin Microbiol* 2007;45:4061–3.
- 14 Rimbara E, Matsui M, Mori S, Suzuki S, Suzuki M, Kim H, Sekizuka T, Kuroda M, Shibayama K. Draft Genome Sequence of *Helicobacter fennelliae* Strain MRY12-0050, Isolated from a Bacteremia Patient. *Genome Announc* 2013;1:e00512–13.
- 15 Rimbara E, Mori S, Kim H, Matsui M, Suzuki S, Takahashi S, Yamamoto S, Mukai M, Shibayama K. *Helicobacter cinaedi* and *Helicobacter fennelliae* transmission in a hospital from 2008 to 2012. *J Clin Microbiol* 2013;51:2439–42.
- 16 Kondadi PK, Pacini C, Revez J, Hanninen ML, Rossi M. Contingency nature of *Helicobacter bizzozeronii* oxygen-insensitive NAD(P)H-nitroreductase (HBZC1_00960) and its role in metronidazole resistance. *Vet Res* 2013;44:56.
- 17 De Cooman L, Flahou B, Houf K, Smet A, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F. Survival of *Helicobacter suis* bacteria in retail pig meat. *Int J Food Microbiol* 2013;166:164–7.
- 18 Blaecher C, Smet A, Flahou B, et al. Significantly higher frequency of *Helicobacter suis* in patients with idiopathic parkinsonism than in control patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;38:1347–53.
- 19 Matsumoto T, Kawakubo M, Akamatsu T, Koide N, Ogiwara N, Kubota S, Sugano M, Kawakami Y, Katsuyama T, Ota H. *Helicobacter heilmannii sensu stricto*-related gastric ulcers: a case report. *World J Gastroenterol* 2014;20:3376–82.
- 20 Hansen R, Berry SH, Mukhopadhyaya I, et al. The microaerophilic microbiota of *de-novo* paediatric inflammatory bowel disease: the BISCUIT study. *PLoS One* 2013;8:e58825.
- 21 Mestrovic T, Ljubin-Sternak S, Sviben M. Potential role of enterohepatic *Helicobacter* species as a facilitating factor in the development of *Chlamydia trachomatis* proctitis. *Med Hypotheses* 2013;81:481–3.
- 22 Xiao M, Gao Y, Wang Y. *Helicobacter* species infection may be associated with cholangiocarcinoma: a meta-analysis. *Int J Clin Pract* 2014;68:262–70.
- 23 Yang J, Ji S, Zhang Y, Wang J. *Helicobacter hepaticus* infection in primary hepatocellular carcinoma tissue. *Singapore Med J* 2013;54:451–7.
- 24 van der Vusse ML, van Son WJ, Ott A, Manson W. *Helicobacter canis* bacteremia in a renal transplant patient. *Transpl Infect Dis* 2014;16:125–9.
- 25 Araoka H, Baba M, Kimura M, Abe M, Inagawa H, Yoneyama A. Clinical characteristics of *Helicobacter cinaedi* bacteremia and time for blood cultures to become positive. *J Clin Microbiol* 2014;52:1519–22.
- 26 Suematsu Y, Morizumi S, Okamura K, Kawata M. A rare case of axillobifemoral bypass graft infection caused by *Helicobacter cinaedi*. *J Vasc Surg* 2013; S0741-5214.01602-9.
- 27 Sugiyama A, Mori M, Ishiwada N, Himuro K, Kuwabara S. First adult case of *Helicobacter cinaedi* meningitis. *J Neurol Sci* 2014;336:263–4.
- 28 Taniguchi T, Sekiya A, Higa M, Saeki Y, Umeki K, Okayama AHayashi T, Misawa N. Rapid identification and subtyping of *Helicobacter cinaedi* strains by intact-cell mass spectrometry profiling with the use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2014;52:95–102.
- 29 You Y, Liu L, Zhang M, Zhu Y, He L, Li D, Zhang J. Genomic characterization of a *Helicobacter pylori* isolate from a patient with gastric cancer in China. *Gut Pathog* 2014;6:5.
- 30 Davison NJ, Barnett JE, Koylass M, Whatmore AM, Perkins MW, Deaville RC, Jepson PD. *Helicobacter cetorum* infection in striped dolphin (*Stenella Coeruleoalba*), Atlantic white-sided dolphin (*Lagenorhynchus Acutus*), and short-beaked common dolphin (*Delphinus Delphus*) from the Southwest Coast of England. *J Wildl Dis* 2014;50:431–7.
- 31 Harper CG, Feng Y, Xu S, et al. *Helicobacter cetorum* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species isolated from dolphins and whales. *J Clin Microbiol* 2002;40:4536–43.
- 32 Swennes AG, Turk ML, Trowel EM, Cullin C, Shen Z, Pang J, Petersson KH, Dewhirst FE, Fox JG. *Helicobacter canis* colonization in sheep: a zoonotic link. *Helicobacter* 2014;19:65–8.
- 33 Abdi FS, Jamshidi S, Moosakhani F, Sasani F. Detection of *Helicobacter* spp. DNA in the colonic biopsies of stray dogs: molecular and histopathological investigations. *Diagn Pathol* 2014;9:50.
- 34 Amorim I, Freitas DP, Magalhaes A, Faria F, Lopes C, Faustino AM, Smet A, Haesebrouck F, Reis CA, Gärtner F. A comparison of *Helicobacter pylori* and non-*Helicobacter pylori* *Helicobacter* spp. binding to canine gastric mucosa with defined gastric glycophe-notype. *Helicobacter* 2014; Apr 2. DOI: 10.1111/hel.12125. [Epub ahead of print]
- 35 Chung TH, Kim HD, Lee YS, Hwang CY. Determination of the prevalence of *Helicobacter heilmannii*-like organisms type 2 (HHLO-2) infection in humans and dogs using non-invasive genus/species-specific PCR in Korea. *J Vet Med Sci* 2014;76:73–9.
- 36 Sergeant MJ, Constantinou C, Cogan TA, Bedford MR, Penn CW, Pallen MJ. Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. *PLoS One* 2014;9:e91941.
- 37 Dewar ML, Arnould JP, Dann P, Trathan P, Groscolas R, Smith S. Interspecific variations in the gastrointestinal microbiota in penguins. *Microbiologyopen* 2013;2:195–204.
- 38 Ryu H, Grond K, Verheijen B, Elk M, Buehler DM, Santo Domingo JW. Intestinal microbiota and species diversity of *Campylobacter* and *Helicobacter* spp. in migrating shorebirds in Delaware Bay. *Appl Environ Microbiol* 2014;80:1838–47.
- 39 Garcia-Amado MA, Sanz V, Martinez LM, Contreras M, Lentino M, Michelangeli F. Low occurrence of *Helicobacter* DNA in tropical wild birds, Venezuela. *J Wildl Dis* 2013;49:991–5.
- 40 Henderson KS, Perkins CL, Havens RB, Kelly MJ, Francis BC, Dole VS, Shek WR. Efficacy of direct detection of pathogens in naturally infected mice by using a high-density PCR array. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2013;52:763–72.
- 41 Lertpiriyapong K, Handt L, Feng Y, Mitchell TW, Lodge KE, Shen Z, Dewhirst FE, Muthupalani S, Fox JG. Pathogenic properties of enterohepatic *Helicobacter* spp. isolated from rhesus

- Macaques with intestinal adenocarcinoma. *J Med Microbiol* 2014;63:1004–16.
- 42 Martin ME, Bhatnagar S, George MD, Paster BJ, Canfield DR, Eisen JA, Solnick JV. The impact of *Helicobacter pylori* infection on the gastric microbiota of the rhesus macaque. *PLoS One* 2013;8:e76375.
- 43 Li X, Yang G, Zhang C, Wu D, Tang L, Xin Y. Improvement of intestinal microflora balance by polysaccharide from *Physalis alkekengi* var. *francheti*. *Mol Med Rep* 2014;9:677–82.
- 44 Yamanaka H, Arita M, Oi R, Ohsawa M, Mizushima M, Takagi T, Kubo N, Yamamoto N, Takemoto T, Ohsawa K. Prevalence of an unidentified *Helicobacter* species in laboratory mice and its distribution in the hepatobiliary system and gastrointestinal tract. *Exp Anim* 2013;62:109–16.
- 45 Duangchanchot M, Inpukaew R, Thongsiri P, Hayashimoto N, Gemma N, Nikaido M, et al. Prevalence of *Helicobacter* in laboratory mice in Thailand. *Exp Anim* 2014;63:169–73.
- 46 Garrett CM, Muth D, Watson J. Effects of medicated diet to eradicate *Helicobacter* spp. on growth, pathology, and infection status in Rag1(–/–) and nude mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2014;53:238–45.
- 47 Yamamoto K, Nishiumi S, Yang L, et al. Anti-CXCL13 antibody can inhibit the formation of gastric lymphoid follicles induced by *Helicobacter* infection. *Mucosal Immunol* 2014; Mar 19. DOI: 10.1038/mi.2014.14. [Epub ahead of print]
- 48 Nakamura M, Takahashi T, Matsui H, Takahashi S, Murayama SY, Suzuki H, Tsuchimoto K. New pharmaceutical treatment of gastric MALT lymphoma: anti-angiogenesis treatment using VEGF receptor antibodies and celecoxib. *Curr Pharm Des* 2014;20:1097–103.
- 49 Joosten M, Blaecher C, Flahou B, Ducatelle R, Haesebrouck F, Smet A. Diversity in bacterium-host interactions within the species *Helicobacter heilmannii sensu stricto*. *Vet Res* 2013;44(1):65.
- 50 Ding H, Nedrud JG, Blanchard TG, Zagorski BM, Li G, Shiu J, Xu J, Czinn SJ. Th1-mediated immunity against *Helicobacter pylori* can compensate for lack of Th17 cells and can protect mice in the absence of immunization. *PLoS One* 2013;8:e69384.
- 51 Grasberger H, El-Zaatari M, Dang DT, Merchant JL. Dual oxidases control release of hydrogen peroxide by the gastric epithelium to prevent *Helicobacter felis* infection and inflammation in mice. *Gastroenterology* 2013;145:1045–54.
- 52 Burkitt MD, Williams JM, Duckworth CA, O'Hara A, Hanedi A, Varro A, Caamaño JH, Pritchard DM. Signaling mediated by the NF-kappaB sub-units NF-kappaB1, NF-kappaB2 and c-Rel differentially regulate *Helicobacter felis*-induced gastric carcinogenesis in C57BL/6 mice. *Oncogene* 2013;32:5563–73.
- 53 Stoicov C, Li H, Liu JH, Houghton J. Mesenchymal stem cells utilize CXCR4-SDF-1 signaling for acute, but not chronic, trafficking to gastric mucosal inflammation. *Dig Dis Sci* 2013;58:2466–77.
- 54 El-Zaatari M, Kao JY, Tessier A, Bai L, Hayes MM, Fontaine C, Eaton KA, Merchant JL. Gli1 deletion prevents *Helicobacter*-induced gastric metaplasia and expansion of myeloid cell subsets. *PLoS One* 2013;8:e58935.
- 55 Ericksen RE, Rose S, Westphalen CB, et al. Obesity accelerates *Helicobacter felis*-induced gastric carcinogenesis by enhancing immature myeloid cell trafficking and TH17 response. *Gut* 2014;63:385–94.
- 56 Fox JG, Wang TC. Dietary factors modulate *Helicobacter*-associated gastric cancer in rodent models. *Toxicol Pathol* 2014;42:162–81.
- 57 Yang C, Gu L, Deng D. Bone marrow-derived cells may not be the original cells for carcinogen-induced mouse gastrointestinal carcinomas. *PLoS One* 2013;8:e79615.
- 58 Khan S, Rahman HN, Okamoto T, et al. Promotion of atherosclerosis by *Helicobacter cinaedi* infection that involves macrophage-driven proinflammatory responses. *Sci Rep* 2014;4:4680.
- 59 Yang C, Gu L, Deng D. Distinct susceptibility of induction of methylation of p16 and p19 CpG islands by X-radiation and chemical carcinogen in mice. *Mutat Res, Genet Toxicol Environ Mutagen* 2014; Apr 26, pii: S1383-5718, 00118-1. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.04.012. [Epub ahead of print]
- 60 Maier I, Berry DM, Schiestl RH. Intestinal microbiota reduces genotoxic endpoints induced by high-energy protons. *Radiat Res* 2014;181:45–53.
- 61 Nagalingam NA, Robinson CJ, Bergin IL, Eaton KA, Huffnagle GB, Young VB. The effects of intestinal microbial community structure on disease manifestation in IL-10^{-/-} mice infected with *Helicobacter hepaticus*. *Microbiome* 2013;1:15.
- 62 Yang I, Eibach D, Kops F, et al. Intestinal microbiota composition of interleukin-10 deficient C57BL/6J mice and susceptibility to *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. *PLoS One* 2013;8:e70783.
- 63 Nahidi L, Leach ST, Mitchell HM, Kaakoush NO, Lemberg DA, Munday JS, Huinao K, Day AS. Inflammatory bowel disease therapies and gut function in a colitis mouse model. *Biomed Res Int* 2013;2013:909613.
- 64 Selhub J, Byun A, Liu Z, Mason JB, Bronson RT, Crott JW. Dietary vitamin B6 intake modulates colonic inflammation in the IL10^{-/-} model of inflammatory bowel disease. *J Nutr Biochem* 2013;24:2138–43.
- 65 Irwin R, Lee T, Young VB, Parameswaran N, McCabe LR. Colitis-induced bone loss is gender dependent and associated with increased inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:1586–97.
- 66 Thelemann C, Eren RO, Coutaz M, et al. Interferon-gamma induces expression of MHC class II on intestinal epithelial cells and protects mice from colitis. *PLoS One* 2014;9:e86844.
- 67 Nguyen DD, Muthupalani S, Goettel JA, Eston MA, Mobley M, Taylor NS, McCabe A, Marin R, Snapper SB, Fox JG. Colitis and colon cancer in WASP-deficient mice require *Helicobacter* species. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:2041–50.
- 68 Knutson CG, Mangerich A, Zeng Y, et al. Chemical and cytokine features of innate immunity characterize serum and tissue profiles in inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 Jun 25;110:E2332–41.
- 69 Dvorak K, Coursodon-Boydiddle CF, Snarrenberg CL, Kananurak A, Underwood MA, Dvorak B. *Helicobacter hepaticus* increases intestinal injury in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013 Oct 15;305:G585–92.
- 70 Poutahidis T, Cappelle K, Levkovich T, Lee CW, Douberis M, Ge Z, Fox JG, Horwitz BH, Erdman SE. Pathogenic intestinal bacteria enhance prostate cancer development via systemic activation of immune cells in mice. *PLoS One* 2013;8:e73933.
- 71 Yu HN, Zhu J, Pan WS, Shen SR, Shan WG, Das UN. Effects of fish oil with high content of n-3 polyunsaturated fatty acids on mouse gut microbiota. *Arch Med Res* 2014;45:195–202.
- 72 Zhang G, Ducatelle R, Pasmans F, D'Herde K, Huang L, Smet A, Haesebrouck F, Flahou B. Effects of *Helicobacter suis* gamma-glutamyl transpeptidase on lymphocytes: modulation by glutamine and glutathione supplementation and outer membrane vesicles as a putative delivery route of the enzyme. *PLoS One* 2013;8:e77966.
- 73 Javed S, Mejias-Luque R, Kalali B, Bolz C, Gerhard M. *Helicobacter bilis* gamma-glutamyltranspeptidase enhances inflammatory stress response via oxidative stress in colon epithelial cells. *PLoS One* 2013;8:e73160.

- 74 Varon C, Mocan I, Mihi B, et al. *Helicobacter pullorum* cytolethal distending toxin targets vinculin and cortactin and triggers formation of lamellipodia in intestinal epithelial cells. *J Infect Dis* 2014;209:588–99.
- 75 Liyanage NP, Dassanayake RP, Kuszynski CA, Duhamel GE. Contribution of *Helicobacter hepaticus* cytolethal distending toxin subunits to human epithelial cell cycle arrest and apoptotic death *in vitro*. *Helicobacter* 2013;18:433–43.
- 76 Ge Z, Feng Y, Muthupalani S, Whary MT, Versalovic J, Fox JG. *Helicobacter hepaticus* Cholesterol- α -glucosyltransferase is Essential for Establishing Colonization in Male A/JCr Mice. *Helicobacter* 2014; May 23. doi: 10.1111/hel.12135. [Epub ahead of print]
- 77 Bleumink-Pluym NM, van Alphen LB, Bouwman LI, Wosten MM, van Putten JP. Identification of a functional type VI secretion system in *Campylobacter jejuni* conferring capsule polysaccharide sensitive cytotoxicity. *PLoS Pathog* 2013;9: e1003393.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aderem, A., and Ulevitch, R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782–787.
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.-H., Sauvage, F.J. de, and Gurney, A.L. (2003). Interleukin-23 Promotes a Distinct CD4 T Cell Activation State Characterized by the Production of Interleukin-17. *J. Biol. Chem.* 278, 1910–1914.
- Ahmed, H.J., Svensson, L.A., Cope, L.D., Latimer, J.L., Hansen, E.J., Ahlman, K., Bayat-Turk, J., Klamer, D., and Lagergård, T. (2001). Prevalence of *cdtABC* genes encoding cytolethal distending toxin among *Haemophilus ducreyi* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains. *J. Med. Microbiol.* 50, 860–864.
- Akifusa, S., Poole, S., Lewthwaite, J., Henderson, B., and Nair, S.P. (2001). Recombinant *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Cytolethal Distending Toxin Proteins Are Required To Interact To Inhibit Human Cell Cycle Progression and To Stimulate Human Leukocyte Cytokine Synthesis. *Infect. Immun.* 69, 5925–5930.
- Al-Ghoul, L., Wessler, S., Hundertmark, T., Krüger, S., Fischer, W., Wunder, C., Haas, R., Roessner, A., and Naumann, M. (2004). Analysis of the type IV secretion system-dependent cell motility of *Helicobacter pylori*-infected epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 860–866.
- Alispahic, M., Hummel, K., Jandreski-Cvetkovic, D., Nöbauer, K., Razzazi-Fazeli, E., Hess, M., and Hess, C. (2010). Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis. *J. Med. Microbiol.* 59, 295–301.
- Anderson, J., MacNab, A., Gransden, W., Damm, S., Johnson, W., and Lior, H. (1987). Gastroenteritis and encephalopathy associated with a strain of *Escherichia coli* 055:K59:H4 that produced a Cytolethal Distending Toxin. *ET J.* 6, 1135–1136.
- Ando-Sugimoto, E.S., da Silva, M.P., Kawamoto, D., Chen, C., DiRienzo, J.M., and Mayer, M.P.A. (2014). The cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inhibits macrophage phagocytosis and subverts cytokine production. *Cytokine* 66, 46–53.
- Aragon, V., Chao, K., and Dreyfus, L.A. (1997). Effect of cytolethal distending toxin on F-actin assembly and cell division in Chinese hamster ovary cells. *Infect. Immun.* 65, 3774–3780.
- Arnold, I.C., Mathisen, S., Schulthess, J., Danne, C., Hegazy, A.N., and Powrie, F. (2015). CD11c(+) monocyte/macrophages promote chronic *Helicobacter hepaticus*-induced intestinal inflammation through the production of IL-23. *Mucosal Immunol.*
- Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.-J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., et al. (2012). Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota. *Science* 338, 120–123.
- Asakura, M., Hinenoya, A., Alam, M.S., Shima, K., Zahid, S.H., Shi, L., Sugimoto, N., Ghosh, A.N., Ramamurthy, T., Faruque, S.M., et al. (2007). An inducible lambdoid prophage encoding cytolethal distending toxin (Cdt-I) and a type III effector protein in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14483–14488.
- Atabay H.I, Corry J.E.L, and On S.L.W (1998). Identification of unusual *Campylobacter*-like isolates from poultry products as *Helicobacter pullorum*. *J. Appl. Microbiol.* 84, 1017–1024.
- Axelrod, L., Munster, A.M., and O'Brien, T.F. (1971). Typhoid cholecystitis and gallbladder carcinoma after interval of 67 years. *JAMA* 217, 83.
- Aziz, A., Vanhille, L., Mohideen, P., Kelly, L.M., Otto, C., Bakri, Y., Mossadegh, N., Sarrazin, S., and Sieweke, M.H. (2006). Development of macrophages with altered actin organization in the absence of MafB. *Mol. Cell. Biol.* 26, 6808–6818.
- Backert, S., Tegtmeyer, N., and Selbach, M. (2010). The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis. *Helicobacter* 15, 163–176.
- Bagnoli, F., Buti, L., Tompkins, L., Covacci, A., and Amieva, M.R. (2005). *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16339–16344.

- Bang, D.D., Borck, B., Nielsen, E.M., Scheutz, F., Pedersen, K., and Madsen, M. (2004). Detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Danish turkeys by PCR and cytolethal distending toxin production of the isolates. *J. Food Prot.* *67*, 2171–2177.
- Bartonickova, L., Sterzenbach, T., Nell, S., Kops, F., Schulze, J., Venzke, A., Brenneke, B., Bader, S., Gruber, A.D., Suerbaum, S., et al. (2013). Hcp and VgrG1 are secreted components of the *Helicobacter hepaticus* type VI secretion system and VgrG1 increases the bacterial colitogenic potential. *Cell. Microbiol.* *15*, 992–1011.
- Bauer, S., Endres, M., Lange, M., Schmidt, T., Schumbrutzki, C., Sickmann, A., and Beier, D. (2013). Novel function assignment to a member of the essential HP1043 response regulator family of epsilon-proteobacteria. *Microbiol. Read. Engl.* *159*, 880–889.
- Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., et al. (2009). Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *J. Immunol.* *183*, 787–791.
- Beckwith, C.S., McGee, D.J., Mobley, H.L., and Riley, L.K. (2001). Cloning, expression, and catalytic activity of *Helicobacter hepaticus* urease. *Infect. Immun.* *69*, 5914–5920.
- Belibasakis, G.N., and Johansson, A. (2012). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* targets NLRP3 and NLRP6 inflammasome expression in human mononuclear leukocytes. *Cytokine* *59*, 124–130.
- Belibasakis, G., Johansson, A., Wang, Y., Claesson, R., Chen, C., Asikainen, S., and Kalfas, S. (2002). Inhibited proliferation of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: involvement of the cytolethal distending toxin. *Eur. J. Oral Sci.* *110*, 366–373.
- Belibasakis, G.N., Johansson, A., Wang, Y., Chen, C., Lagergård, T., Kalfas, S., and Lerner, U.H. (2005). Cytokine responses of human gingival fibroblasts to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *Cytokine* *30*, 56–63.
- Belibasakis, G.N., Brage, M., Lagergård, T., and Johansson, A. (2008). Cytolethal distending toxin upregulates RANKL expression in Jurkat T-cells. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *116*, 499–506.
- Belzer, C., Stoof, J., Beckwith, C.S., Kuipers, E.J., Kusters, J.G., and van Vliet, A.H.M. (2005). Differential regulation of urease activity in *Helicobacter hepaticus* and *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Read. Engl.* *151*, 3989–3995.
- Belzer, C., van Schendel, B.A.M., Kuipers, E.J., Kusters, J.G., and van Vliet, A.H.M. (2007). Iron-responsive repression of urease expression in *Helicobacter hepaticus* is mediated by the transcriptional regulator Fur. *Infect. Immun.* *75*, 745–752.
- Benoit, S.L., Zbell, A.L., and Maier, R.J. (2007). Nickel enzyme maturation in *Helicobacter hepaticus*: roles of accessory proteins in hydrogenase and urease activities. *Microbiol. Read. Engl.* *153*, 3748–3756.
- Benoit, S.L., Seshadri, S., Lamichhane-Khadka, R., and Maier, R.J. (2013). *Helicobacter hepaticus* NikR controls urease and hydrogenase activities via the NikABDE and HH0418 putative nickel import proteins. *Microbiol. Read. Engl.* *159*, 136–146.
- Berg, D.J., Davidson, N., Kühn, R., Müller, W., Menon, S., Holland, G., Thompson-Snipes, L., Leach, M.W., and Rennick, D. (1996). Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J. Clin. Invest.* *98*, 1010–1020.
- Berry, J.G., and Whitenack, D. (1991). Bacterial diseases of poultry. Excluding respiratory diseases. *Okla. Coop. Ext. Serv.* 1–4.
- Bessède, E., Staedel, C., Acuña Amador, L.A., Nguyen, P.H., Chambonnier, L., Hatakeyama, M., Belleannée, G., Mégraud, F., and Varon, C. (2014). *Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Oncogene* *33*, 4123–4131.

- Bielaszewska, M., Sinha, B., Kuczius, T., and Karch, H. (2005). Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. *Infect. Immun.* *73*, 552–562.
- Bischof, O., and Martínez-Zamudio, R.I. (2015). MicroRNAs and lncRNAs in senescence: A review. *IUBMB Life* *67*, 255–267.
- Bischof, O., Dejean, A., and Pineau, P. (2009). [A review of cellular senescence: friend or foe of tumorigenesis?]. *Médecine Sci. MS* *25*, 153–160.
- Blazkova, H., Krejčíková, K., Moudry, P., Frisan, T., Hodny, Z., and Bartek, J. (2010). Bacterial intoxication evokes cellular senescence with persistent DNA damage and cytokine signalling. *J. Cell. Mol. Med.* *14*, 357–367.
- Boesze-Battaglia, K., Besack, D., McKay, T., Zekavat, A., Otis, L., Jordan-Sciutto, K., and Shenker, B.J. (2006). Cholesterol-rich membrane microdomains mediate cell cycle arrest induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal-distending toxin. *Cell. Microbiol.* *8*, 823–836.
- Bondarenko, V.M., and Fialkina, S.V. (2012). [Presence of genes of genotoxin associated with pks pathogenicity island in *Escherichia coli* M-17 probiotic strain]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* *25*–27.
- Boquet, P. (2001). The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* *39*, 1673–1680.
- Borges, V., Santos, A., Correia, C.B., Saraiva, M., Ménard, A., Vieira, L., Sampaio, D.A., Pinheiro, M., Gomes, J.P., and Oleastro, M. (2015). *Helicobacter pullorum* isolated from fresh chicken meat - antibiotic resistance and genomic traits of an emerging foodborne pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Boulard, O., Asquith, M.J., Powrie, F., and Maloy, K.J. (2010). TLR2-independent induction and regulation of chronic intestinal inflammation. *Eur. J. Immunol.* *40*, 516–524.
- Boutin, S.R., Shen, Z., Rogers, A.B., Feng, Y., Ge, Z., Xu, S., Sterzenbach, T., Josenhans, C., Schauer, D.B., Suerbaum, S., et al. (2005). Different *Helicobacter hepaticus* strains with variable genomic content induce various degrees of hepatitis. *Infect. Immun.* *73*, 8449–8452.
- Boutin, S.R., Shen, Z., Roesch, P.L., Stiefel, S.M., Sanderson, A.E., Multari, H.M., Pridhoko, E.A., Smith, J.C., Taylor, N.S., Lohmiller, J.J., et al. (2010). *Helicobacter pullorum* Outbreak in C57BL/6NTac and C3H/HeNTac Barrier-Maintained Mice. *J. Clin. Microbiol.* *48*, 1908–1910.
- Bouzari, S., Vatsala, B.R., and Varghese, A. (1992). In vitro adherence property of cytolethal distending toxin (CLDT) producing EPEC strains and effect of the toxin on rabbit intestine. *Microb. Pathog.* *12*, 153–157.
- Braig, M., and Schmitt, C.A. (2006). Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res.* *66*, 2881–2884.
- Brotherton, C.A., and Balskus, E.P. (2013). A Prodrug Resistance Mechanism Is Involved in Colibactin Biosynthesis and Cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 3359–3362.
- Brown, H.J., Stokes, H.W., and Hall, R.M. (1996). The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives. *J. Bacteriol.* *178*, 4429–4437.
- Buc, E., Dubois, D., Sauvanet, P., Raisch, J., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., Pezet, D., and Bonnet, R. (2013). High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. *PloS One* *8*, e56964.
- Burich, A., Hershberg, R., Waggie, K., Zeng, W., Brabb, T., Westrich, G., Viney, J.L., and Maggio-Price, L. (2001). *Helicobacter*-induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T cell-deficient mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *281*, G764–G778.
- Burnens, A., Stanley, J., Morgenstern, R., and Nicolet, J. (1994). Gastroenteritis associated with *Helicobacter pullorum*. *The Lancet* *344*, 1569–1570.
- Buti, L., Spooner, E., Van der Veen, A.G., Rappuoli, R., Covacci, A., and Ploegh, H.L. (2011). *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A (CagA) subverts the apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) tumor suppressor pathway of the host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 9238–9243.

- Butler, T. (2011). Treatment of typhoid fever in the 21st century: promises and shortcomings. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *17*, 959–963.
- Cacioppo, L.D., Turk, M.L., Shen, Z., Ge, Z., Parry, N., Whary, M.T., Boutin, S.R., Klein, H.J., and Fox, J.G. (2012a). Natural and experimental *Helicobacter pullorum* infection in Brown Norway rats. *J. Med. Microbiol.* *61*, 1319–1323.
- Cacioppo, L.D., Shen, Z., Parry, N.M., and Fox, J.G. (2012b). Resistance of Sprague-Dawley Rats to infection with *Helicobacter pullorum*. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. JAALAS* *51*, 803–807.
- Cahill, R.J., Foltz, C.J., Fox, J.G., Dangler, C.A., Powrie, F., and Schauer, D.B. (1997). Inflammatory bowel disease: an immunity-mediated condition triggered by bacterial infection with *Helicobacter hepaticus*. *Infect. Immun.* *65*, 3126–3131.
- Cao, L., Volgina, A., Huang, C.-M., Korostoff, J., and DiRienzo, J.M. (2005). Characterization of point mutations in the *cdtA* gene of the cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycescomitans*. *Mol. Microbiol.* *58*, 1303–1321.
- Carette, J.E., Guimaraes, C.P., Varadarajan, M., Park, A.S., Wuethrich, I., Godarova, A., Kotecki, M., Cochran, B.H., Spooner, E., Ploegh, H.L., et al. (2009). Haploid Genetic Screens in Human Cells Identify Host Factors Used by Pathogens. *Science* *326*, 1231–1235.
- Carette, J.E., Guimaraes, C.P., Wuethrich, I., Blomen, V.A., Varadarajan, M., Sun, C., Bell, G., Yuan, B., Muellner, M.K., Nijman, S.M., et al. (2011). Global gene disruption in human cells to assign genes to phenotypes by deep sequencing. *Nat. Biotechnol.* *29*, 542–546.
- Castéra, L., Pedeboscq, A., Rocha, M., Bail, B.L., Asencio, C., de Lédighen, V., Bernard, P.-H., Laurent, C., Lafon, M.-E., Capdepon, M., et al. (2006). Relationship between the severity of hepatitis C virus-related liver disease and the presence of *Helicobacter* species in the liver: A prospective study. *World J. Gastroenterol. WJG* *12*, 7278–7284.
- Castro-Vega, L.J., Jouravleva, K., Ortiz-Montero, P., Liu, W.-Y., Galeano, J.L., Romero, M., Popova, T., Bacchetti, S., Vernot, J.P., and Londoño-Vallejo, A. (2015a). The senescent microenvironment promotes the emergence of heterogeneous cancer stem-like cells. *Carcinogenesis* *36*, 1180–1192.
- Castro-Vega, L.J., Jouravleva, K., Ortiz-Montero, P., Liu, W.-Y., Galeano, J.L., Romero, M., Popova, T., Bacchetti, S., Vernot, J.P., and Londoño-Vallejo, A. (2015b). The senescent microenvironment promotes the emergence of heterogeneous cancer stem-like cells. *Carcinogenesis* *36*, 1180–1192.
- Caygill, C.P., Hill, M.J., Braddick, M., and Sharp, J.C. (1994). Cancer mortality in chronic typhoid and paratyphoid carriers. *Lancet Lond. Engl.* *343*, 83–84.
- Ceelen, L., Decostere, A., Verschraegen, G., Ducatelle, R., and Haesebrouck, F. (2005a). Prevalence of *Helicobacter pullorum* among Patients with Gastrointestinal Disease and Clinically Healthy Persons. *J. Clin. Microbiol.* *43*, 2984–2986.
- Ceelen, L., Decostere, A., Devriese, L.A., Ducatelle, R., and Haesebrouck, F. (2005b). In vitro susceptibility of *Helicobacter pullorum* strains to different antimicrobial agents. *Microb. Drug Resist. Larchmt. N* *11*, 122–126.
- Ceelen, L.M., Decostere, A., Martel, A., Pasmans, F., and Haesebrouck, F. (2006a). First report of *Helicobacter pullorum* in the faeces of a diarrhoeic psittacine bird (*Psephotus haematogaster*). *Vet. Rec.* *159*, 389–390.
- Ceelen, L.M., Decostere, A., Van den Bulck, K., On, S.L.W., Baele, M., Ducatelle, R., and Haesebrouck, F. (2006b). *Helicobacter pullorum* in chickens, Belgium. *Emerg. Infect. Dis.* *12*, 263–267.
- Ceelen, L.M., Decostere, A., Chiers, K., Ducatelle, R., Maes, D., and Haesebrouck, F. (2007). Pathogenesis of *Helicobacter pullorum* infections in broilers. *Int. J. Food Microbiol.* *116*, 207–213.
- Ceelen, L.M., Haesebrouck, F., D’Herde, K., Krysko, D.V., Favoreel, H., Vandenabeele, P., Ducatelle, R., and Decostere, A. (2009). Mitotic catastrophe as a prestage to necrosis in mouse liver cells treated with *Helicobacter pullorum* sonicates. *J. Morphol.* *270*, 921–928.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., and Covacci, A. (1996). *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 14648–14653.

- Chang, B.-D., Broude, E.V., Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., Kandel, E.S., Lausch, E., Christov, K., and Roninson, I.B. (1999). A Senescence-like Phenotype Distinguishes Tumor Cells That Undergo Terminal Proliferation Arrest after Exposure to Anticancer Agents. *Cancer Res.* *59*, 3761–3767.
- Chaturvedi, R., de Sablet, T., Peek, R.M., and Wilson, K.T. (2012). Spermine oxidase, a polyamine catabolic enzyme that links *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer risk. *Gut Microbes* *3*, 48–56.
- Chauvière, G., Coconnier, M.H., Kernéis, S., Fourniat, J., and Servin, A.L. (1992). Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J. Gen. Microbiol.* *138 Pt 8*, 1689–1696.
- Chen, Y.-C., Tan, D.-H., Shien, J.-H., Hsieh, M.-K., Yen, T.-Y., and Chang, P.-C. (2014). Identification and functional analysis of the cytolethal distending toxin gene from *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Pathol. J. WVPA* *43*, 43–50.
- Cho, J.A., Chinnapen, D.J.-F., Aamar, E., te Welscher, Y.M., Lencer, W., and Massol, R. (2012). Insights on the trafficking and retro-translocation of glycosphingolipid-binding bacterial toxins. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *2*, 51.
- Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA Damage Response: Making it safe to play with knives. *Mol. Cell* *40*, 179–204.
- Claesson, M.H., Rudolphi, A., Kofoed, S., Poulsen, S.S., and Reimann, J. (1996). CD4+ T lymphocytes injected into severe combined immunodeficient (SCID) mice lead to an inflammatory and lethal bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* *104*, 491–500.
- Coconnier, M.H., Liévin, V., Bernet-Camard, M.F., Hudault, S., and Servin, A.L. (1997). Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrob. Agents Chemother.* *41*, 1046–1052.
- Comayras, C., Tasca, C., Pérès, S.Y., Ducommun, B., Oswald, E., and De Rycke, J. (1997). *Escherichia coli* cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G2/M transition by preventing cdc2 protein kinase dephosphorylation and activation. *Infect. Immun.* *65*, 5088–5095.
- Conlan, S., Deming, C., Tsai, Y.-C., Lau, A.F., Dekker, J.P., Korlach, J., and Segre, J.A. (2014). Complete Genome Sequence of a *Klebsiella pneumoniae* Isolate with Chromosomally Encoded Carbapenem Resistance and Colibactin Synthesis Loci. *Genome Announc.* *2*.
- Cook, L.C., Hillhouse, A.E., Myles, M.H., Lubahn, D.B., Bryda, E.C., Davis, J.W., and Franklin, C.L. (2014). The role of estrogen signaling in a mouse model of inflammatory bowel disease: a *Helicobacter hepaticus* model. *PLoS One* *9*, e94209.
- Cope, L.D., Lumbley, S., Latimer, J.L., Klesney-Tait, J., Stevens, M.K., Johnson, L.S., Purven, M., Munson, R.S., Lagergard, T., Radolf, J.D., et al. (1997). A diffusible cytotoxin of *Haemophilus ducreyi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 4056–4061.
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.* *5*, 99–118.
- Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Lagergård, T., and Thelestam, M. (1999). The cytolethal distending toxin from the chancroid bacterium *Haemophilus ducreyi* induces cell-cycle arrest in the G2 phase. *J. Clin. Invest.* *103*, 107–115.
- Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Lagergård, T., and Thelestam, M. (2000). Cellular internalization of cytolethal distending toxin from *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* *68*, 6903–6911.
- Cortes-Bratti, X., Karlsson, C., Lagergård, T., Thelestam, M., and Frisan, T. (2001). The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest and apoptosis via the DNA damage checkpoint pathways. *J. Biol. Chem.* *276*, 5296–5302.
- Cougnoux, A., Dalmasso, G., Martinez, R., Buc, E., Delmas, J., Gibold, L., Sauvanet, P., Darcha, C., Déchelotte, P., Bonnet, M., et al. (2014). Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* *63*, 1932–1942.

- Cougnoux, A., Delmas, J., Gibold, L., Faïs, T., Romagnoli, C., Robin, F., Cuevas-Ramos, G., Oswald, E., Darfeuille-Michaud, A., Prati, F., et al. (2015). Small-molecule inhibitors prevent the genotoxic and protumoural effects induced by colibactin-producing bacteria. *Gut*.
- Cuevas-Ramos, G., Petit, C.R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2010). *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 11537–11542.
- Damek-Poprawa, M., Haris, M., Volgina, A., Korostoff, J., and DiRienzo, J.M. (2011). Cytolethal distending toxin damages the oral epithelium of gingival explants. *J. Dent. Res.* *90*, 874–879.
- Damek-Poprawa, M., Jang, J.Y., Volgina, A., Korostoff, J., and DiRienzo, J.M. (2012). Localization of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin subunits during intoxication of live cells. *Infect. Immun.* *80*, 2761–2770.
- Deng, K., and Hansen, E.J. (2003). A CdtA-CdtC complex can block killing of HeLa cells by *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* *71*, 6633–6640.
- Dewhirst, F.E., Shen, Z., Scimeca, M.S., Stokes, L.N., Boumenna, T., Chen, T., Paster, B.J., and Fox, J.G. (2005). Discordant 16S and 23S rRNA gene phylogenies for the genus *Helicobacter*: implications for phylogenetic inference and systematics. *J. Bacteriol.* *187*, 6106–6118.
- Dhanasekaran, R., Limaye, A., and Cabrera, R. (2012). Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis, and therapeutics. *Hepatic Med. Evid. Res.* *4*, 19–37.
- Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., and Wahl, G.M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* *8*, 2540–2551.
- DiRienzo, J.M. (2014). Breaking the Gingival Epithelial Barrier: Role of the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Cytolethal Distending Toxin in Oral Infectious Disease. *Cells* *3*, 476–499.
- Dong, Y., Kaushal, A., Brattsand, M., Nicklin, J., and Clements, J.A. (2003). Differential splicing of KLK5 and KLK7 in epithelial ovarian cancer produces novel variants with potential as cancer biomarkers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *9*, 1710–1720.
- Doye, A., Mettouchi, A., Bossis, G., Clément, R., Buisson-Touati, C., Flatau, G., Gagnoux, L., Piechaczyk, M., Boquet, P., and Lemichez, E. (2002). CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* *111*, 553–564.
- Dubois, D., Baron, O., Cougnoux, A., Delmas, J., Pradel, N., Boury, M., Bouchon, B., Bringer, M.-A., Nougayrède, J.-P., Oswald, E., et al. (2011). ClbP Is a Prototype of a Peptidase Subgroup Involved in Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *J. Biol. Chem.* *286*, 35562–35570.
- Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* *274*, 1664–1672.
- Elwell, C.A., and Dreyfus, L.A. (2000). DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol. Microbiol.* *37*, 952–963.
- Elwell, C., Chao, K., Patel, K., and Dreyfus, L. (2001). *Escherichia coli* CdtB mediates cytolethal distending toxin cell cycle arrest. *Infect. Immun.* *69*, 3418–3422.
- Erdman, S.E., Fox, J.G., Dangler, C.A., Feldman, D., and Horwitz, B.H. (2001). Cutting Edge: Typhlocolitis in NF- κ B-Deficient Mice. *J. Immunol.* *166*, 1443–1447.
- Erdman, S.E., Poutahidis, T., Tomczak, M., Rogers, A.B., Cormier, K., Plank, B., Horwitz, B.H., and Fox, J.G. (2003). CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Lymphocytes Inhibit Microbially Induced Colon Cancer in Rag2-Deficient Mice. *Am. J. Pathol.* *162*, 691–702.
- Erdman, S.E., Rao, V.P., Poutahidis, T., Rogers, A.B., Taylor, C.L., Jackson, E.A., Ge, Z., Lee, C.W., Schauer, D.B., Wogan, G.N., et al. (2009). Nitric oxide and TNF- α trigger colonic inflammation and carcinogenesis in *Helicobacter hepaticus*-infected, Rag2-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 1027–1032.
- Eshraghi, A., Dixon, S.D., Tamilselvam, B., Kim, E.J.-K., Gargi, A., Kulik, J.C., Damoiseaux, R., Blanke, S.R., and Bradley, K.A. (2014). Cytolethal distending toxins require components of the ER-associated degradation pathway for host cell entry. *PLoS Pathog.* *10*, e1004295.

- Euzeby, J.P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* 590–592.
- Evans, D.J., Evans, D.G., Takemura, T., Nakano, H., Lampert, H.C., Graham, D.Y., Granger, D.N., and Kvietyts, P.R. (1995). Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect. Immun.* 63, 2213–2220.
- Eychène, A., Rocques, N., and Pouponnot, C. (2008). A new MAFia in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 683–693.
- Eyigor, A., Dawson, K.A., Langlois, B.E., and Pickett, C.L. (1999). Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Campylobacter* spp. isolated from chicken carcasses. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1501–1505.
- Fabbri, A., Travaglione, S., Ballan, G., Loizzo, S., and Fiorentini, C. (2013). The Cytotoxic Necrotizing Factor 1 from *E. Coli*: A Janus Toxin Playing with Cancer Regulators. *Toxins* 5, 1462–1474.
- Fabris, A.S., DiRienzo, J.M., Wikstrom, M., and Mayer, M.P.A. (2002). Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates from geographically diverse populations. *Oral Microbiol. Immunol.* 17, 231–238.
- Fan, T.-F., Bu, L.-L., Wang, W.-M., Ma, S.-R., Liu, J.-F., Deng, W.-W., Mao, L., Yu, G.-T., Huang, C.-F., Liu, B., et al. (2015). Tumor growth suppression by inhibiting both autophagy and STAT3 signaling in HNSCC. *Oncotarget*.
- Fedor, Y., Vignard, J., Nicolau-Travers, M.-L., Boutet-Robinet, E., Watrin, C., Salles, B., and Mirey, G. (2013). From single-strand breaks to double-strand breaks during S-phase: a new mode of action of the *Escherichia coli* Cytolethal Distending Toxin. *Cell. Microbiol.* 15, 1–15.
- Fiorentini, C., Matarrese, P., Straface, E., Falzano, L., Fabbri, A., Donelli, G., Cossarizza, A., Boquet, P., and Malorni, W. (1998). Toxin-induced activation of Rho GTP-binding protein increases Bcl-2 expression and influences mitochondrial homeostasis. *Exp. Cell Res.* 242, 341–350.
- Foltz, C.J., Fox, J.G., Yan, L., and Shames, B. (1995). Evaluation of antibiotic therapies for eradication of *Helicobacter hepaticus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1292–1294.
- Foltz, C.J., Fox, J.G., Yan, L., and Shames, B. (1996). Evaluation of various oral antimicrobial formulations for eradication of *Helicobacter hepaticus*. *Lab. Anim. Sci.* 46, 193–197.
- Foltz, C.J., Fox, J.G., Cahill, R., Murphy, J.C., Yan, L., Shames, B., and Schauer, D.B. (1998). Spontaneous inflammatory bowel disease in multiple mutant mouse lines: association with colonization by *Helicobacter hepaticus*. *Helicobacter* 3, 69–78.
- Fox, J.G. (1997). The expanding genus of *Helicobacter*: pathogenic and zoonotic potential. *Semin. Gastrointest. Dis.* 8, 124–141.
- Fox, J.G. (2002). The non-H pylori helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut* 50, 273–283.
- Fox, J.G., Dewhirst, F.E., Tully, J.G., Paster, B.J., Yan, L., Taylor, N.S., Collins, M.J., Gorelick, P.L., and Ward, J.M. (1994). *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1238–1245.
- Fox, J.G., Li, X., Yan, L., Cahill, R.J., Hurley, R., Lewis, R., and Murphy, J.C. (1996a). Chronic proliferative hepatitis in A/JCr mice associated with persistent *Helicobacter hepaticus* infection: a model of helicobacter-induced carcinogenesis. *Infect. Immun.* 64, 1548–1558.
- Fox, J.G., Yan, L., Shames, B., Campbell, J., Murphy, J.C., and Li, X. (1996b). Persistent hepatitis and enterocolitis in germfree mice infected with *Helicobacter hepaticus*. *Infect. Immun.* 64, 3673–3681.
- Fox, J.G., Dewhirst, F.E., Shen, Z., Feng, Y., Taylor, N.S., Paster, B.J., Ericson, R.L., Lau, C.N., Correa, P., Araya, J.C., et al. (1998). Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterology* 114, 755–763.
- Fox, J.G., Rogers, A.B., Whary, M.T., Taylor, N.S., Xu, S., Feng, Y., and Keys, S. (2004a). *Helicobacter bilis*-associated hepatitis in outbred mice. *Comp. Med.* 54, 571–577.
- Fox, J.G., Rogers, A.B., Whary, M.T., Ge, Z., Taylor, N.S., Xu, S., Horwitz, B.H., and Erdman, S.E. (2004b). Gastroenteritis in NF-kappaB-deficient mice is produced with wild-type

- Campylobacter jejuni but not with C. jejuni lacking cytolethal distending toxin despite persistent colonization with both strains. *Infect. Immun.* 72, 1116–1125.
- Franco, A.T., Israel, D.A., Washington, M.K., Krishna, U., Fox, J.G., Rogers, A.B., Neish, A.S., Collier-Hyams, L., Perez-Perez, G.I., Hatakeyama, M., et al. (2005). Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10646–10651.
- Frisan, T., Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Stenerlöv, B., and Thelestam, M. (2003). The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces DNA double-strand breaks and promotes ATM-dependent activation of RhoA. *Cell. Microbiol.* 5, 695–707.
- Fukuda, Y., Shimoyama, T., Ohmura, T., Sano, Y., Nakabayashi, N., Takahashi, R., Fujioka, T., Mitchell, H.M., and Shimoyama, T. (2009). Characterization and application of a new monoclonal antibody with high specificity for *Helicobacter hepaticus*. *Helicobacter* 14, 66–71.
- García, A., Ihrig, M.M., Fry, R.C., Feng, Y., Xu, S., Boutin, S.R., Rogers, A.B., Muthupalani, S., Samson, L.D., and Fox, J.G. (2008). Genetic Susceptibility to Chronic Hepatitis Is Inherited Codominantly in *Helicobacter hepaticus*-Infected AB6F1 and B6AF1 Hybrid Male Mice, and Progression to Hepatocellular Carcinoma Is Linked to Hepatic Expression of Lipogenic Genes and Immune Function-Associated Networks. *Infect. Immun.* 76, 1866–1876.
- García, A., Zeng, Y., Muthupalani, S., Ge, Z., Potter, A., Mobley, M.W., Boussahmain, C., Feng, Y., Wishnok, J.S., and Fox, J.G. (2011). *H. hepaticus*-induced liver tumor promotion is associated with increased serum bile acid and a persistent microbial-induced immune response. *Cancer Res.* 71, 2529–2540.
- Gargi, A., Reno, M., and Blanke, S.R. (2012). Bacterial toxin modulation of the eukaryotic cell cycle: are all cytolethal distending toxins created equally? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 124.
- Gargi, A., Tamilselvam, B., Powers, B., Prouty, M.G., Lincecum, T., Eshraghi, A., Maldonado-Arocho, F.J., Wilson, B.A., Bradley, K.A., and Blanke, S.R. (2013). Cellular interactions of the cytolethal distending toxins from *Escherichia coli* and *Haemophilus ducreyi*. *J. Biol. Chem.* 288, 7492–7505.
- Garrett, C.M., Muth, D., and Watson, J. (2014). Effects of medicated diet to eradicate *Helicobacter* spp. on growth, pathology, and infection status in Rag1^{-/-} and nude mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. JAALAS* 53, 238–245.
- Ge, Z., White, D.A., Whary, M.T., and Fox, J.G. (2001). Fluorogenic PCR-based quantitative detection of a murine pathogen, *Helicobacter hepaticus*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2598–2602.
- Ge, Z., Feng, Y., Whary, M.T., Nambiar, P.R., Xu, S., Ng, V., Taylor, N.S., and Fox, J.G. (2005). Cytolethal Distending Toxin Is Essential for *Helicobacter hepaticus* Colonization in Outbred Swiss Webster Mice. *Infect. Immun.* 73, 3559–3567.
- Ge, Z., Rogers, A.B., Feng, Y., Lee, A., Xu, S., Taylor, N.S., and Fox, J.G. (2007). Bacterial cytolethal distending toxin promotes the development of dysplasia in a model of microbially induced hepatocarcinogenesis. *Cell. Microbiol.* 9, 2070–2080.
- Ge, Z., Lee, A., Whary, M.T., Rogers, A.B., Maurer, K.J., Taylor, N.S., Schauer, D.B., and Fox, J.G. (2008a). *Helicobacter hepaticus* urease is not required for intestinal colonization but promotes hepatic inflammation in male A/JCr mice. *Microb. Pathog.* 45, 18–24.
- Ge, Z., Sterzenbach, T., Whary, M.T., Rickman, B.H., Rogers, A.B., Shen, Z., Taylor, N.S., Schauer, D.B., Josenhans, C., Suerbaum, S., et al. (2008b). *Helicobacter hepaticus* HHG11 is a pathogenicity island associated with typhlocolitis in B6.129-IL10 tm1Cgn mice. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 10, 726–733.
- Ge, Z., Schauer, D.B., and Fox, J.G. (2008c). In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell. Microbiol.* 10, 1599–1607.
- Ge, Z., Feng, Y., Muthupalani, S., Whary, M.T., Versalovic, J., and Fox, J.G. (2014). *Helicobacter hepaticus* cholesterol- α -glucosyltransferase is essential for establishing colonization in male A/JCr mice. *Helicobacter* 19, 280–288.
- Ge, Z., Feng, Y., Woods, S.E., and Fox, J.G. (2015). Spatial and temporal colonization dynamics of segmented filamentous bacteria is influenced by gender, age and experimental infection

- with *Helicobacter hepaticus* in Swiss Webster mice. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* *17*, 16–22.
- Gebhardt, C., Németh, J., Angel, P., and Hess, J. (2006). S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem. Pharmacol.* *72*, 1622–1631.
- Gibson, J.R., Ferrus, M.A., Woodward, D., Xerry, J., and Owen, R.J. (1999). Genetic diversity in *Helicobacter pullorum* from human and poultry sources identified by an amplified fragment length polymorphism technique and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.* *87*, 602–610.
- Goldmann, W.H., Auernheimer, V., Thievessen, I., and Fabry, B. (2013). Vinculin, cell mechanics and tumour cell invasion. *Cell Biol. Int.* *37*, 397–405.
- Gonzalez, F.J. (2012). Nuclear receptor control of enterohepatic circulation. *Compr. Physiol.* *2*, 2811–2828.
- Goodwin, C., Armstrong, J.A., and Chilvers, T. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. & *Helicobacter mustelae* comb. nov. respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* *39*, 397–405.
- Guerra, L., Teter, K., Lilley, B.N., Stenerlöv, B., Holmes, R.K., Ploegh, H.L., Sandvig, K., Thelestam, M., and Frisan, T. (2005). Cellular internalization of cytolethal distending toxin: a new end to a known pathway. *Cell. Microbiol.* *7*, 921–934.
- Guerra, L., Nemec, K.N., Massey, S., Tatulian, S.A., Thelestam, M., Frisan, T., and Teter, K. (2009). A novel mode of translocation for cytolethal distending toxin. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 489–495.
- Guerra, L., Guidi, R., and Frisan, T. (2011a). Do bacterial genotoxins contribute to chronic inflammation, genomic instability and tumor progression? *FEBS J.* *278*, 4577–4588.
- Guerra, L., Cortes-Bratti, X., Guidi, R., and Frisan, T. (2011b). The Biology of the Cytolethal Distending Toxins. *Toxins* *3*, 172–190.
- Guidi, R., Guerra, L., Levi, L., Stenerlöv, B., Fox, J.G., Josenhans, C., Masucci, M.G., and Frisan, T. (2013a). Chronic exposure to the cytolethal distending toxins of Gram-negative bacteria promotes genomic instability and altered DNA damage response. *Cell. Microbiol.* *15*, 98–113.
- Guidi, R., Guerra, L., Levi, L., Stenerlöv, B., Fox, J.G., Josenhans, C., Masucci, M.G., and Frisan, T. (2013b). Chronic exposure to the cytolethal distending toxins of Gram-negative bacteria promotes genomic instability and altered DNA damage response. *Cell. Microbiol.* *15*, 98–113.
- Guidi, R., Levi, L., Rouf, S.F., Puiac, S., Rhen, M., and Frisan, T. (2013c). *Salmonella enterica* delivers its genotoxin through outer membrane vesicles secreted from infected cells. *Cell. Microbiol.* *15*, 2034–2050.
- Gulani, J., Norbury, C.C., Bonneau, R.H., and Beckwith, C.S. (2009). The effect of *Helicobacter hepaticus* infection on immune responses specific to herpes simplex virus type 1 and characteristics of dendritic cells. *Comp. Med.* *59*, 534–544.
- Hadley, A.T. (1979). Chancroid. *Am. Fam. Physician* *20*, 83–86.
- Haghjoo, E., and Galán, J.E. (2004). *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4614–4619.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* *279*, 509–514.
- Hall, A. (2009). The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* *28*, 5–14.
- Hamada, T., Yokota, K., Ayada, K., Hirai, K., Kamada, T., Haruma, K., Chayama, K., and Oguma, K. (2009). Detection of *Helicobacter hepaticus* in human bile samples of patients with biliary disease. *Helicobacter* *14*, 545–551.
- Haque, M., Hirai, Y., Yokota, K., and Oguma, K. (1995). Steryl glycosides: a characteristic feature of the *Helicobacter* spp.? *J. Bacteriol.* *177*, 5334–5337.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* *6*, 1123–1132.

- Hassane, D.C., Lee, R.B., and Pickett, C.L. (2003). *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin promotes DNA repair responses in normal human cells. *Infect. Immun.* *71*, 541–545.
- Henderson, B., Wilson, M., Sharp, L., and Ward, J.M. (2002). *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Med. Microbiol.* *51*, 1013–1020.
- Herbert, B. a., Novince, C. m., and Kirkwood, K. l. (2015). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. *Mol. Oral Microbiol.* n/a – n/a.
- Hickey, T.E., McVeigh, A.L., Scott, D.A., Michielutti, R.E., Bixby, A., Carroll, S.A., Bourgeois, A.L., and Guerry, P. (2000). *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin Mediates Release of Interleukin-8 from Intestinal Epithelial Cells. *Infect. Immun.* *68*, 6535–6541.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Fujita, A., Yamazaki, S., Asaka, M., Azuma, T., and Hatakeyama, M. (2002). Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 14428–14433.
- Hoy, B., Löwer, M., Weydig, C., Carra, G., Tegtmeyer, N., Geppert, T., Schröder, P., Sewald, N., Backert, S., Schneider, G., et al. (2010). *Helicobacter pylori* HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. *EMBO Rep.* *11*, 798–804.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* *260*, 547–549.
- Hu, X., and Stebbins, C.E. (2006). Dynamics and assembly of the cytolethal distending toxin. *Proteins* *65*, 843–855.
- Hwang, S., Gwon, S.-Y., Kim, M.S., Lee, S., and Rhee, K.-J. (2013). *Bacteroides fragilis* Toxin Induces IL-8 Secretion in HT29/C1 Cells through Disruption of E-cadherin Junctions. *Immune Netw.* *13*, 213–217.
- Hynes, S.O., Ferris, J.A., Szponar, B., Wadström, T., Fox, J.G., O'Rourke, J., Larsson, L., Yaquian, E., Ljungh, Å., Clyne, M., et al. (2004). Comparative Chemical and Biological Characterization of the Lipopolysaccharides of Gastric and Enterohepatic *Helicobacters*. *Helicobacter* *9*, 313–323.
- Ihrig, M., Schrenzel, M.D., and Fox, J.G. (1999). Differential susceptibility to hepatic inflammation and proliferation in AXB recombinant inbred mice chronically infected with *Helicobacter hepaticus*. *Am. J. Pathol.* *155*, 571–582.
- Janka, A., Bielaszewska, M., Dobrindt, U., Greune, L., Schmidt, M.A., and Karch, H. (2003). Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. *Infect. Immun.* *71*, 3634–3638.
- Jinadasa, R.N., Bloom, S.E., Weiss, R.S., and Duhamel, G.E. (2011). Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology* *157*, 1851–1875.
- Johnson, W.M., and Lior, H. (1987). Production of Shiga toxin and a cytolethal distending toxin (CLDT) by sero-groups of *Shigella* spp. *FEMS Microbiol Lett* *48*, 235–238.
- Johnson, W.M., and Lior, H. (1988a). A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. *Microb. Pathog.* *4*, 103–113.
- Johnson, W.M., and Lior, H. (1988b). A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb. Pathog.* *4*, 115–126.
- Johnson, J.R., Johnston, B., Kuskowski, M.A., Nougayrede, J.-P., and Oswald, E. (2008). Molecular Epidemiology and Phylogenetic Distribution of the *Escherichia coli* pks Genomic Island. *J. Clin. Microbiol.* *46*, 3906–3911.
- Johnson, T.J., Kariyawasam, S., Wannemuehler, Y., Mangiamele, P., Johnson, S.J., Doetkott, C., Skyberg, J.A., Lynne, A.M., Johnson, J.R., and Nolan, L.K. (2007). The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J. Bacteriol.* *189*, 3228–3236.

- Jones, M.A., Töttemeyer, S., Maskell, D.J., Bryant, C.E., and Barrow, P.A. (2003). Induction of Proinflammatory Responses in the Human Monocytic Cell Line THP-1 by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* *71*, 2626–2633.
- Kamei, K., Hatanaka, N., Asakura, M., Somroop, S., Samosornsuk, W., Hinenoya, A., Misawa, N., Nakagawa, S., and Yamasaki, S. (2015). *Campylobacter hyointestinalis* Isolated from Pigs Produces Multiple Variants of Biologically Active Cytolethal Distending Toxin. *Infect. Immun.* *83*, 4304–4313.
- Kanda, M., Sugimoto, H., and Kodera, Y. (2015). Genetic and epigenetic aspects of initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol. WJG* *21*, 10584–10597.
- Kang, M., Lee, H.S., Lee, Y.J., Choi, W.S., Park, Y.H., Jeong, C.W., Ku, J.H., Kim, H.H., and Kwak, C. (2015). S100A3 suppression inhibits in vitro and in vivo tumor growth and invasion of human castration-resistant prostate cancer cells. *Urology* *85*, 273.e9–e15.
- Karagin, P.H., Stenram, U., Wadström, T., and Ljungh, A. (2010). *Helicobacter* species and common gut bacterial DNA in gallbladder with cholecystitis. *World J. Gastroenterol. WJG* *16*, 4817–4822.
- Karagin, P.H., Stenram, U., Wadström, T., and Ljungh, A. (2011). *Helicobacter* species and gut bacterial DNA in Meckel's diverticulum and the appendix. *World J. Gastroenterol. WJG* *17*, 4104–4108.
- Keates, S., Keates, A.C., Warny, M., Peek, R.M., Murray, P.G., and Kelly, C.P. (1999). Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by *cag+* and *cag-* *Helicobacter pylori*. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *163*, 5552–5559.
- Kim, L.Y., Thompson, P.M., Lee, H.T., Pershad, M., Campbell, S.L., and Alushin, G.M. (2015). The structural basis of actin organization by vinculin and metavinculin. *J. Mol. Biol.*
- Kirkbride, K.C., Sung, B.H., Sinha, S., and Weaver, A.M. (2011). Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness. *Cell Adhes. Migr.* *5*, 187–198.
- Kitagawa, T., Hoshida, H., and Akada, R. (2007). Genome-wide analysis of cellular response to bacterial genotoxin CdtB in yeast. *Infect. Immun.* *75*, 1393–1402.
- Kleine, M., Worbs, T., Schrem, H., Vondran, F.W.R., Kaltenborn, A., Klempnauer, J., Förster, R., Josenhans, C., Suerbaum, S., and Bektas, H. (2014). *Helicobacter hepaticus* induces an inflammatory response in primary human hepatocytes. *PloS One* *9*, e99713.
- Kloosterman, W.P., and Plasterk, R.H.A. (2006). The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev. Cell* *11*, 441–450.
- Kolls, J.K., and Lindén, A. (2004). Interleukin-17 Family Members and Inflammation. *Immunity* *21*, 467–476.
- Kornilovs'ka, I., Nilsson, I., Utt, M., Ljungh, Å., and Wadström, T. (2002). Immunogenic proteins of *Helicobacter pullorum*, *Helicobacter bilis* and *Helicobacter hepaticus* identified by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting. *PROTEOMICS* *2*, 775–783.
- Kosar, M., Bartkova, J., Hubackova, S., Hodny, Z., Lukas, J., and Bartek, J. (2011). Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16(ink4a). *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 457–468.
- Krtolica, A., and Campisi, J. (2003). Integrating epithelial cancer, aging stroma and cellular senescence. *Adv. Gerontol. Uspekhi Gerontol. Ross. Akad. Nauk Gerontol. Obshchestvo* *11*, 109–116.
- Kuilman, T., and Peeper, D.S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 81–94.
- Kullberg, M.C., Ward, J.M., Gorelick, P.L., Caspar, P., Hieny, S., Cheever, A., Jankovic, D., and Sher, A. (1998). *Helicobacter hepaticus* triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism. *Infect. Immun.* *66*, 5157–5166.
- Kullberg, M.C., Jankovic, D., Gorelick, P.L., Caspar, P., Letterio, J.J., Cheever, A.W., and Sher, A. (2002). Bacteria-triggered CD4(+) T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. *J. Exp. Med.* *196*, 505–515.

- Kullberg, M.C., Jankovic, D., Feng, C.G., Hue, S., Gorelick, P.L., McKenzie, B.S., Cua, D.J., Powrie, F., Cheever, A.W., Maloy, K.J., et al. (2006). IL-23 plays a key role in *Helicobacter hepaticus*-induced T cell-dependent colitis. *J. Exp. Med.* *203*, 2485–2494.
- Kunsch, C., and Rosen, C.A. (1993). NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 6137–6146.
- Laharie, D., Asencio, C., Asselineau, J., Bulois, P., Bourreille, A., Moreau, J., Bonjean, P., Lamarque, D., Pariente, A., Soulé, J.-C., et al. (2009). Association between entero-hepatic *Helicobacter* species and Crohn's disease: a prospective cross-sectional study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *30*, 283–293.
- Lai, C.-H., Chang, C.-S., Liu, H.-H., Tsai, Y.-S., Hsu, F.-M., Yu, Y.-L., Lai, C.-K., Gandee, L., Pong, R.-C., Hsu, H.-W., et al. (2014). Sensitization of radio-resistant prostate cancer cells with a unique cytolethal distending toxin. *Oncotarget* *5*, 5523–5534.
- Lai, C.-K., Su, J.-C., Lin, Y.-H., Chang, C.-S., Feng, C.-L., Lin, H.-J., Lin, C.-J., Tseng, G.-C., Liu, H.-H., Hsieh, J.-T., et al. (2015). Involvement of cholesterol in *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin-induced pathogenesis. *Future Microbiol.* *10*, 489–501.
- Lara-Tejero, M., and Galán, J.E. (2000). A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science* *290*, 354–357.
- Lara-Tejero, M., and Galán, J.E. (2001). CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect. Immun.* *69*, 4358–4365.
- Lee, R.B., Hassane, D.C., Cottle, D.L., and Pickett, C.L. (2003). Interactions of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin subunits CdtA and CdtC with HeLa cells. *Infect. Immun.* *71*, 4883–4890.
- Lewis, D.A., Stevens, M.K., Latimer, J.L., Ward, C.K., Deng, K., Blick, R., Lumbley, S.R., Ison, C.A., and Hansen, E.J. (2001). Characterization of *Haemophilus ducreyi* cdtA, cdtB, and cdtC mutants in in vitro and in vivo systems. *Infect. Immun.* *69*, 5626–5634.
- Li, L., Sharipo, A., Chaves-Olarte, E., Masucci, M.G., Levitsky, V., Thelestam, M., and Frisan, T. (2002). The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin activates sensors of DNA damage and repair complexes in proliferating and non-proliferating cells. *Cell. Microbiol.* *4*, 87–99.
- Ligon, B.L. (2002). Robert Koch: Nobel laureate and controversial figure in tuberculin research. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* *13*, 289–299.
- Lindmark, B., Rompikuntal, P.K., Vaitkevicius, K., Song, T., Mizunoe, Y., Uhlin, B.E., Guerry, P., and Wai, S.N. (2009). Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol.* *9*, 220.
- Liu, B., Sun, W.-Y., Zhi, C.-Y., Lu, T.-C., Gao, H.-M., Zhou, J.-H., Yan, W.-Q., and Gao, H.-C. (2013). Role of S100A3 in human colorectal cancer and the anticancer effect of cantharidin. *Exp. Ther. Med.* *6*, 1499–1503.
- Livingston, R.S., Riley, L.K., Steffen, E.K., Besch-Williford, C.L., Hook, R.R., and Franklin, C.L. (1997). Serodiagnosis of *Helicobacter hepaticus* infection in mice by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* *35*, 1236–1238.
- Livingston, R.S., Myles, M.H., Livingston, B.A., Criley, J.M., and Franklin, C.L. (2004). Sex influence on chronic intestinal inflammation in *Helicobacter hepaticus*-infected A/JCr mice. *Comp. Med.* *54*, 301–308.
- Liyanage, N.P.M., Manthey, K.C., Dassanayake, R.P., Kuszynski, C.A., Oakley, G.G., and Duhamel, G.E. (2010). *Helicobacter hepaticus* cytolethal distending toxin causes cell death in intestinal epithelial cells via mitochondrial apoptotic pathway. *Helicobacter* *15*, 98–107.
- Long, X., Ye, Y., Zhang, L., Liu, P., Yu, W., Wei, F., Ren, X., and Yu, J. (2015). IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways (Review). *Int. J. Oncol.*
- Luo, Y., Ren, F., Liu, Y., Shi, Z., Tan, Z., Xiong, H., Dang, Y., and Chen, G. (2015). Clinicopathological and prognostic significance of high Ki-67 labeling index in hepatocellular carcinoma patients: a meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* *8*, 10235–10247.

- Maggio-Price, L., Treuting, P., Zeng, W., Tsang, M., Bielefeldt-Ohmann, H., and Iritani, B.M. (2006). Helicobacter infection is required for inflammation and colon cancer in SMAD3-deficient mice. *Cancer Res.* 66, 828–838.
- Maheux, A.F., Boudreau, D.K., Bergeron, M.G., and Rodriguez, M.J. (2014). Characterization of *Escherichia fergusonii* and *Escherichia albertii* isolated from water. *J. Appl. Microbiol.* 117, 597–609.
- Malarkey, D.E., Ton, T.V., Hailey, J.R., and Devereux, T.R. (1997). A PCR-RFLP method for the detection of *Helicobacter hepaticus* in frozen or fixed liver from B6C3F1 mice. *Toxicol. Pathol.* 25, 606–612.
- Malchow, H.A. (1997). Crohn's disease and *Escherichia coli* - A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J. Clin. Gastroenterol.* 25, 653–658.
- Malfertheiner, P., Fry, L.C., and Mönkemüller, K. (2006). Can gastric cancer be prevented by *Helicobacter pylori* eradication? *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 20, 709–719.
- Mandell, L., Moran, A.P., Cocchiarella, A., Houghton, J., Taylor, N., Fox, J.G., Wang, T.C., and Kurt-Jones, E.A. (2004). Intact gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4. *Infect. Immun.* 72, 6446–6454.
- Manfreda, G., Parisi, A., Lucchi, A., Zanoni, R.G., and De Cesare, A. (2011). Prevalence of *Helicobacter pullorum* in conventional, organic, and free-range broilers and typing of isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 479–484.
- Mao, X., and DiRienzo, J.M. (2002). Functional studies of the recombinant subunits of a cytolethal distending holotoxin. *Cell. Microbiol.* 4, 245–255.
- Marcq, I., Martin, P., Payros, D., Cuevas-Ramos, G., Boury, M., Watrin, C., Nougayrède, J.-P., Olier, M., and Oswald, E. (2014). The Genotoxin Colibactin Exacerbates Lymphopenia and Decreases Survival Rate in Mice Infected With Septicemic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 210, 285–294.
- Marshall, B.J. (1991). Virulence and pathogenicity of *Helicobacter pylori*. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 6, 121–124.
- Martin, P., Marcq, I., Magistro, G., Penary, M., Garcie, C., Payros, D., Boury, M., Olier, M., Nougayrède, J.-P., Audebert, M., et al. (2013). Interplay between Siderophores and Colibactin Genotoxin Biosynthetic Pathways in *Escherichia coli*. *PLoS Pathog* 9, e1003437.
- McAuley, J.L., Linden, S.K., Png, C.W., King, R.M., Pennington, H.L., Gendler, S.J., Florin, T.H., Hill, G.R., Korolik, V., and McGuckin, M.A. (2007). MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *J. Clin. Invest.* 117, 2313–2324.
- McCarthy, A.J., Martin, P., Cloup, E., Stabler, R.A., Oswald, E., and Taylor, P.W. (2015). The Genotoxin Colibactin Is a Determinant of Virulence in *Escherichia coli* K1 Experimental Neonatal Systemic Infection. *Infect. Immun.* 83, 3704–3711.
- McNamara, D., and O'Morain, C. (1998). *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.* 30 Suppl 3, S294–S298.
- McSweeney, L.A., and Dreyfus, L.A. (2004). Nuclear localization of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin CdtB subunit. *Cell. Microbiol.* 6, 447–458.
- McSweeney, L.A., and Dreyfus, L.A. (2005). Carbohydrate-Binding Specificity of the *Escherichia coli* Cytolethal Distending Toxin CdtA-II and CdtC-II Subunits. *Infect. Immun.* 73, 2051–2060.
- Mégraud, F., Bessède, E., and Varon, C. (2015). *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 984–990.
- Meijer, B., Gearry, R.B., Day, A.S., Meijer, B., Gearry, R.B., and Day, A.S. (2012). The Role of S100A12 as a Systemic Marker of Inflammation, The Role of S100A12 as a Systemic Marker of Inflammation. *Int. J. Inflamm. Int. J. Inflamm.* 2012, 2012, e907078.
- Melito, P.L., Woodward, D.L., Bernard, K.A., Price, L., Khakhria, R., Johnson, W.M., and Rodgers, F.G. (2000). Differentiation of clinical *Helicobacter pullorum* isolates from related *Helicobacter* and *Campylobacter* species. *Helicobacter* 5, 142–147.

- Ménard, A., Buissonnière, A., Prouzet-Mauléon, V., Sifré, E., and Mégraud, F. (2015). The GyrA encoded gene: A pertinent marker for the phylogenetic revision of *Helicobacter* genus. *Syst. Appl. Microbiol.*
- Mezal, E.H., Bae, D., and Khan, A.A. (2014). Detection and functionality of the CdtB, PltA, and PltB from *Salmonella enterica* serovar Javiana. *Pathog. Dis.* 72, 95–103.
- Miraglia, A.G., Travaglione, S., Meschini, S., Falzano, L., Matarrese, P., Quaranta, M.G., Viora, M., Fiorentini, C., and Fabbri, A. (2007). Cytotoxic necrotizing factor 1 prevents apoptosis via the Akt/IkappaB kinase pathway: role of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *Mol. Biol. Cell* 18, 2735–2744.
- Mise, K., Akifusa, S., Watarai, S., Ansai, T., Nishihara, T., and Takehara, T. (2005). Involvement of Ganglioside GM3 in G2/M Cell Cycle Arrest of Human Monocytic Cells Induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Cytolethal Distending Toxin. *Infect. Immun.* 73, 4846–4852.
- Mobley, H.L., Island, M.D., and Hausinger, R.P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59, 451–480.
- Modlin, R.L., Brightbill, H.D., and Godowski, P.J. (1999). The toll of innate immunity on microbial pathogens. *N. Engl. J. Med.* 340, 1834–1835.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683–765.
- Moran, A.P. (1996). The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 10 Suppl 1, 39–50.
- Morrison, P.J., Ballantyne, S.J., Macdonald, S.J., Moore, J.W.J., Jenkins, D., Wright, J.F., Fouser, L.A., and Kullberg, M.C. (2015). Differential Requirements for IL-17A and IL-22 in Cecal versus Colonic Inflammation Induced by *Helicobacter hepaticus*. *Am. J. Pathol.*
- Muglia, C.I., Papa Gobbi, R., Smaldini, P., Orsini Delgado, L., Candia, M., Zanuzzi, C., Sambuelli, A., Rocca, A., Toscano, M.A., Rabinovich, G.A., et al. (2015). Inflammation Controls Sensitivity of Human and Mouse Intestinal Epithelial Cells to Galectin-1. *J. Cell. Physiol.*
- Murakami, K., Takahashi, R., Ono, M., Watanabe, K., Okimoto, T., Kodama, M., Abe, D., Kimura, M., and Fujioka, T. (2011). Serodiagnosis of *Helicobacter hepaticus* infection in patients with liver and gastrointestinal diseases: western blot analysis and ELISA using a highly specific monoclonal antibody for H. hepaticus antigen. *J. Gastroenterol.* 46, 1120–1126.
- Murata-Kamiya, N., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Yamahashi, Y., Saito, Y., Higashi, H., Aburatani, H., Akiyama, T., Peek, R.M., Azuma, T., et al. (2007). *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* 26, 4617–4626.
- Nagy, T.A., Frey, M.R., Yan, F., Israel, D.A., Polk, D.B., and Peek, R.M. (2009). *Helicobacter pylori* regulates cellular migration and apoptosis by activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J. Infect. Dis.* 199, 641–651.
- Nam, C., Ohmachi, Y., Kokubo, T., Nishikawa, T., Uchida, K., and Nakayama, H. (2013). Histopathological studies on cases of chronic mouse hepatitis by natural *Helicobacter* infections. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 75, 1231–1235.
- Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703–716.
- Nath, G., Singh, Y.K., Maurya, P., Gulati, A.K., Srivastava, R.C., and Tripathi, S.K. (2010). Does *Salmonella Typhi* primarily reside in the liver of chronic typhoid carriers? *J. Infect. Dev. Ctries.* 4, 259–261.
- Neal, J.T., Peterson, T.S., Kent, M.L., and Guillemin, K. (2013). *H. pylori* virulence factor CagA increases intestinal cell proliferation by Wnt pathway activation in a transgenic zebrafish model. *Dis. Model. Mech.* 6, 802–810.
- Nebbia, P., Tramuta, C., Ortoffi, M., Bert, E., Cerruti Sola, S., and Robino, P. (2007). Identification of enteric *Helicobacter* in avian species. *Schweiz. Arch. Für Tierheilkd.* 149, 403–407.
- Negrini, S., Gorgoulis, V.G., and Halazonetis, T.D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 220–228.

- Nesić, D., Hsu, Y., and Stebbins, C.E. (2004). Assembly and function of a bacterial genotoxin. *Nature* 429, 429–433.
- Neubauer, C., and Hess, M. (2006). Tissue tropism of *Helicobacter pullorum* in specific pathogen-free chickens determined by culture and nucleic acid detection. *Avian Dis.* 50, 620–623.
- Nilsson, I., Kornilovs'ka, I., Lindgren, S., Ljungh, A., and Wadström, T. (2003). Increased prevalence of seropositivity for non-gastric *Helicobacter* species in patients with autoimmune liver disease. *J. Med. Microbiol.* 52, 949–953.
- Nishikubo, S., Ohara, M., Ueno, Y., Ikura, M., Kurihara, H., Komatsuzawa, H., Oswald, E., and Sugai, M. (2003). An N-terminal segment of the active component of the bacterial genotoxin cytolethal distending toxin B (CDTB) directs CDTB into the nucleus. *J. Biol. Chem.* 278, 50671–50681.
- Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., and Oswald, E. (2006). *Escherichia coli* Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *Science* 313, 848–851.
- Nowrouzian, F.L., and Oswald, E. (2012). *Escherichia coli* strains with the capacity for long-term persistence in the bowel microbiota carry the potentially genotoxic pks island. *Microb. Pathog.* 53, 180–182.
- Ohara, M., Hayashi, T., Kusunoki, Y., Miyauchi, M., Takata, T., and Sugai, M. (2004). Caspase-2 and caspase-7 are involved in cytolethal distending toxin-induced apoptosis in Jurkat and MOLT-4 T-cell lines. *Infect. Immun.* 72, 871–879.
- Ohara, M., Hayashi, T., Kusunoki, Y., Nakachi, K., Fujiwara, T., Komatsuzawa, H., and Sugai, M. (2008). Cytolethal distending toxin induces caspase-dependent and -independent cell death in MOLT-4 cells. *Infect. Immun.* 76, 4783–4791.
- Ohguchi, M., Ishisaki, A., Okahashi, N., Koide, M., Koseki, T., Yamato, K., Noguchi, T., and Nishihara, T. (1998). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* toxin induces both cell cycle arrest in the G2/M phase and apoptosis. *Infect. Immun.* 66, 5980–5987.
- Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., Higashi, H., Musashi, M., Iwabuchi, K., Suzuki, M., et al. (2008). Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1003–1008.
- Okoli, A.S., Fox, E.M., Raftery, M.J., and Mendz, G.L. (2007). Effects of *Helicobacter hepaticus* on the proteome of HEP-2 cells. *Antonie Van Leeuwenhoek* 92, 289–300.
- Okuda, J., Kurazono, H., and Takeda, Y. (1995). Distribution of the cytolethal distending toxin A gene (cdtA) among species of *Shigella* and *Vibrio*, and cloning and sequencing of the cdt gene from *Shigella dysenteriae*. *Microb. Pathog.* 18, 167–172.
- Okuda, J., Fukumoto, M., Takeda, Y., and Nishibuchi, M. (1997). Examination of diarrheagenicity of cytolethal distending toxin: suckling mouse response to the products of the cdtABC genes of *Shigella dysenteriae*. *Infect. Immun.* 65, 428–433.
- Olier, M., Marcq, I., Salvador-Cartier, C., Secher, T., Dobrindt, U., Boury, M., Bacquié, V., Penary, M., Gaultier, E., Nougayrède, J.-P., et al. (2012). Genotoxicity of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microbes* 3, 501–509.
- Parkin, D.M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer* 118, 3030–3044.
- Parry, C.M., Hien, T.T., Dougan, G., White, N.J., and Farrar, J.J. (2002). Typhoid fever. *N. Engl. J. Med.* 347, 1770–1782.
- Pasquali, F., Rossi, M., Manfreda, G., and Zanoni, R. (2007). Complete nucleotide sequence of the gyrA gene of *Helicobacter pullorum* and identification of a point mutation leading to ciprofloxacin resistance in poultry isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* 30, 222–228.
- Pazolli, E., Alspach, E., Milczarek, A., Prior, J., Piwnica-Worms, D., and Stewart, S.A. (2012). Chromatin Remodeling Underlies the Senescence-Associated Secretory Phenotype of Tumor Stromal Fibroblasts That Supports Cancer Progression. *Cancer Res.* 72, 2251–2261.
- Pellicano, R., Ménard, A., Rizzetto, M., and Mégraud, F. (2008). *Helicobacter* species and liver diseases: association or causation? *Lancet Infect. Dis.* 8, 254–260.

- Pérès, S.Y., Marchès, O., Daigle, F., Nougayrède, J.-P., Hérault, F., Tasca, C., De Rycke, J., and Oswald, E. (1997). A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.* *24*, 1095–1107.
- Pickett, C.L., Cottle, D.L., Pesci, E.C., and Bikah, G. (1994). Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. *Infect. Immun.* *62*, 1046–1051.
- Pickett, C.L., Pesci, E.C., Cottle, D.L., Russell, G., Erdem, A.N., and Zeytin, H. (1996). Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* gene. *Infect. Immun.* *64*, 2070–2078.
- Poele, R.H. te, Okorokov, A.L., Jardine, L., Cummings, J., and Joel, S.P. (2002). DNA Damage Is Able to Induce Senescence in Tumor Cells in Vitro and in Vivo. *Cancer Res.* *62*, 1876–1883.
- Pokkunuri, V., Pimentel, M., Morales, W., Jee, S.-R., Alpern, J., Weitsman, S., Marsh, Z., Low, K., Hwang, L., Khoshini, R., et al. (2012). Role of Cytolethal Distending Toxin in Altered Stool Form and Bowel Phenotypes in a Rat Model of Post-infectious Irritable Bowel Syndrome. *J. Neurogastroenterol. Motil.* *18*, 434–442.
- Polk, D.B., and Peek, R.M. (2010). *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 403–414.
- Poutahidis, T., Haigis, K.M., Rao, V.P., Nambiar, P.R., Taylor, C.L., Ge, Z., Watanabe, K., Davidson, A., Horwitz, B.H., Fox, J.G., et al. (2007). Rapid reversal of interleukin-6-dependent epithelial invasion in a mouse model of microbially induced colon carcinoma. *Carcinogenesis* *28*, 2614–2623.
- Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., Menon, S., Caddle, L.B., and Coffman, R.L. (1994). Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* *1*, 553–562.
- Prabhu, L., Mundade, R., Korc, M., Loehrer, P.J., and Lu, T. (2014). Critical role of NF-κB in pancreatic cancer. *Oncotarget* *5*, 10969–10975.
- Pradhan, S.B., and Dali, S. (2004). Relation between gallbladder neoplasm and *Helicobacter hepaticus* infection. *Kathmandu Univ. Med. J. KUMJ* *2*, 331–335.
- Pratt, J.S., Sachen, K.L., Wood, H.D., Eaton, K.A., and Young, V.B. (2006). Modulation of host immune responses by the cytolethal distending toxin of *Helicobacter hepaticus*. *Infect. Immun.* *74*, 4496–4504.
- Prieur, A., and Peeper, D.S. (2008). Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 150–155.
- Pukatzki, S., McAuley, S.B., and Miyata, S.T. (2009). The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr. Opin. Microbiol.* *12*, 11–17.
- Purdy, D., Buswell, C.M., Hodgson, A.E., McAlpine, K., Henderson, I., and Leach, S.A. (2000). Characterisation of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. *J. Med. Microbiol.* *49*, 473–479.
- Purvén, M., and Lagergård, T. (1992). *Haemophilus ducreyi*, a cytotoxin-producing bacterium. *Infect. Immun.* *60*, 1156–1162.
- Qiang, L., Zhao, B., Shah, P., Sample, A., Yang, S., and He, Y.-Y. (2015). Autophagy positively regulates DNA damage recognition by nucleotide excision repair. *Autophagy* *0*.
- Raetz, C.R.H., and Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 635–700.
- Raja, M., Ummer, F., and Dhivakar, C.. (2014). *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* – A Tooth Killer? *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* *8*, ZE13–ZE16.
- Rakoff-Nahoum, S., and Medzhitov, R. (2009). Toll-like receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 57–63.
- Rembacken, B., Snelling, A., Hawkey, P., Chalmers, D., and Axon, A. (1999). Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *The Lancet* *354*, 635–639.
- Reschly, E.J., and Krasowski, M.D. (2006). Evolution and function of the NR1I nuclear hormone receptor subfamily (VDR, PXR, and CAR) with respect to metabolism of xenobiotics and endogenous compounds. *Curr. Drug Metab.* *7*, 349–365.

- Rice, J.M. (1995). *Helicobacter hepaticus*, a recently recognized bacterial pathogen, associated with chronic hepatitis and hepatocellular neoplasia in laboratory mice. *Emerg. Infect. Dis.* 1, 129–131.
- Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389–399.
- Rieder, G., Fischer, W., and Haas, R. (2005). Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 67–73.
- Rocha, M., Avenaud, P., Ménard, A., Le Bail, B., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P., de Magalhães Queiroz, D.M., and Mégraud, F. (2005). Association of *Helicobacter* species with hepatitis C cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma. *Gut* 54, 396–401.
- Rodriguez-Rivera, L.D., Bowen, B.M., den Bakker, H.C., Duhamel, G.E., and Wiedmann, M. (2015). Characterization of the cytolethal distending toxin (typhoid toxin) in non-typhoidal *Salmonella* serovars. *Gut Pathog.* 7, 19.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858–5868.
- Rogers, A.B., Boutin, S.R., Whary, M.T., Sundina, N., Ge, Z., Cormier, K., and Fox, J.G. (2004). Progression of chronic hepatitis and preneoplasia in *Helicobacter hepaticus*-infected A/JCr mice. *Toxicol. Pathol.* 32, 668–677.
- Rompikuntal, P.K., Thay, B., Khan, M.K., Alanko, J., Penttinen, A.-M., Asikainen, S., Wai, S.N., and Oscarsson, J. (2012). Perinuclear localization of internalized outer membrane vesicles carrying active cytolethal distending toxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 80, 31–42.
- Russell, R.J., Haines, D.C., Anver, M.R., Battles, J.K., Gorelick, P.L., Blumenauer, L.L., Gonda, M.A., and Ward, J.M. (1995). Use of antibiotics to prevent hepatitis and typhlitis in male scid mice spontaneously infected with *Helicobacter hepaticus*. *Lab. Anim. Sci.* 45, 373–378.
- Russo, T.A., and Johnson, J.R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* 5, 449–456.
- Saiki, K., Gomi, T., and Konishi, K. (2004). Deletion and purification studies to elucidate the structure of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *J. Biochem. (Tokyo)* 136, 335–342.
- Santana, P., Martel, J., Lai, H.-C., Perfettini, J.-L., Kanellopoulos, J., Young, J.D., Coutinho-Silva, R., and Ojcius, D.M. (2015). Is the inflammasome relevant for epithelial cell function? *Microbes Infect.*
- Sato, T., Koseki, T., Yamato, K., Saiki, K., Konishi, K., Yoshikawa, M., Ishikawa, I., and Nishihara, T. (2002). p53-Independent Expression of p21CIP1/WAF1 in Plasmacytic Cells during G2 Cell Cycle Arrest Induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Cytolethal Distending Toxin. *Infect. Immun.* 70, 528–534.
- Schnittler, H., Taha, M., Schnittler, M.O., Taha, A.A., Lindemann, N., and Seebach, J. (2014). Actin filament dynamics and endothelial cell junctions: the Ying and Yang between stabilization and motion. *Cell Tissue Res.* 355, 529–543.
- Scott, D.A., and Kaper, J.B. (1994). Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* 62, 244–251.
- Sears, C.L. (2009). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a Rogue among Symbiotes. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 349–369.
- Secher, T., Samba-Louaka, A., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2013). *Escherichia coli* producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. *PloS One* 8, e77157.
- Secher, T., Payros, D., Brehin, C., Boury, M., Watrin, C., Gillet, M., Bernard-Cadenat, I., Menard, S., Theodorou, V., Saoudi, A., et al. (2015). Oral tolerance failure upon neonatal gut colonization with *Escherichia coli* producing the genotoxin colibactin. *Infect. Immun.* 83, 2420–2429.

- Segal, E.D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1999). Altered states: Involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 14559–14564.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* *88*, 593–602.
- Shames, B., Fox, J.G., Dewhirst, F., Yan, L., Shen, Z., and Taylor, N.S. (1995). Identification of widespread *Helicobacter hepaticus* infection in feces in commercial mouse colonies by culture and PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* *33*, 2968–2972.
- Shen, Z., Schauer, D.B., Mobley, H.L., and Fox, J.G. (1998). Development of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay using the nucleotide sequence of the *Helicobacter hepaticus* urease structural genes ureAB. *J. Clin. Microbiol.* *36*, 2447–2453.
- Shen, Z., Sheh, A., Young, S.K., Abouelliel, A., Ward, D.V., Earl, A.M., and Fox, J.G. (2014). Draft genome sequences of six enterohepatic *Helicobacter* species isolated from humans and one from rhesus macaques. *Genome Announc.* *2*.
- Shenker, B.J., McKay, T., Datar, S., Miller, M., Chowhan, R., and Demuth, D. (1999). Actinobacillus actinomycetemcomitans Immunosuppressive Protein Is a Member of the Family of Cytolethal Distending Toxins Capable of Causing a G2 Arrest in Human T Cells. *J. Immunol.* *162*, 4773–4780.
- Shenker, B.J., Hoffmaster, R.H., Zekavat, A., Yamaguchi, N., Lally, E.T., and Demuth, D.R. (2001). Induction of apoptosis in human T cells by Actinobacillus actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin is a consequence of G2 arrest of the cell cycle. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 435–441.
- Shenker, B.J., Besack, D., McKay, T., Pankoski, L., Zekavat, A., and Demuth, D.R. (2005). Induction of cell cycle arrest in lymphocytes by Actinobacillus actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin requires three subunits for maximum activity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 2228–2234.
- Shenker, B.J., Dlakić, M., Walker, L.P., Besack, D., Jaffe, E., LaBelle, E., and Boesze-Battaglia, K. (2007). A Novel Mode of Action for a Microbial-Derived Immunotoxin: The Cytolethal Distending Toxin Subunit B Exhibits Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphate Phosphatase Activity. *J. Immunol.* *178*, 5099–5108.
- Shenker, B.J., Walker, L.P., Zekavat, A., Dlakić, M., and Boesze-Battaglia, K. (2014). Blockade of the PI-3K signalling pathway by the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces macrophages to synthesize and secrete pro-inflammatory cytokines. *Cell. Microbiol.* *16*, 1391–1404.
- Shenker, B.J., Boesze-Battaglia, K., Scuron, M.D., Walker, L.P., Zekavat, A., and Dlakić, M. (2015a). The toxicity of the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin correlates with its phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate phosphatase activity. *Cell. Microbiol.*
- Shenker, B.J., Ojcius, D.M., Walker, L.P., Zekavat, A., Scuron, M.D., and Boesze-Battaglia, K. (2015b). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin activates the NLRP3 inflammasome in human macrophages, leading to the release of proinflammatory cytokines. *Infect. Immun.* *83*, 1487–1496.
- Shibata, A., Moiani, D., Arvai, A.S., Perry, J., Harding, S.M., Genois, M.-M., Maity, R., van Rossum-Fikkert, S., Kertokallio, A., Romoli, F., et al. (2014). DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. *Mol. Cell* *53*, 7–18.
- Shimoyama, T., Takahashi, R., Abe, D., Mizuki, I., Endo, T., and Fukuda, S. (2010). Serological analysis of *Helicobacter hepaticus* infection in patients with biliary and pancreatic diseases. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *25 Suppl 1*, S86–S89.
- Sirianni, A., Kaakoush, N.O., Raftery, M.J., and Mitchell, H.M. (2013). The pathogenic potential of *Helicobacter pullorum*: possible role for the type VI secretion system. *Helicobacter* *18*, 102–111.
- Smith, J., Tho, L.M., Xu, N., and Gillespie, D.A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv. Cancer Res.* *108*, 73–112.

- Song, J., Willinger, T., Rongvaux, A., Eynon, E.E., Stevens, S., Manz, M.G., Flavell, R.A., and Galán, J.E. (2010). A mouse model for the human pathogen *Salmonella typhi*. *Cell Host Microbe* 8, 369–376.
- Song, J., Gao, X., and Galán, J.E. (2013). Conferring Virulence: Structure and Function of the chimeric A2B5 Typhoid Toxin. *Nature* 499, 350–354.
- Spanò, S., Ugalde, J.E., and Galán, J.E. (2008). Delivery of a *Salmonella Typhi* exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe* 3, 30–38.
- Spencer, J., and Wotherspoon, A.C. (1997). Gastric MALT lymphoma and *Helicobacter pylori*. *Cancer Surv.* 30, 213–231.
- Stanley, J., Linton, D., Burnens, A.P., Dewhirst, F.E., On, S.L., Porter, A., Owen, R.J., and Costas, M. (1994). *Helicobacter pullorum* sp. nov.-genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. *Microbiol. Read. Engl.* 140 (Pt 12), 3441–3449.
- Steinbrueckner, B., Haerter, G., Pelz, K., Weiner, S., Rump, J.A., Deissler, W., Bereswill, S., and Kist, M. (1997). Isolation of *Helicobacter pullorum* from patients with enteritis. *Scand. J. Infect. Dis.* 29, 315–318.
- Steinbrueckner, B., Haerter, G., Pelz, K., Burnens, A., and Kist, M. (1998). Discrimination of *Helicobacter pullorum* and *Campylobacter lari* by analysis of whole cell fatty acid extracts. *FEMS Microbiol. Lett.* 168, 209–212.
- Sterzenbach, T., Lee, S.K., Brenneke, B., von Goetz, F., Schauer, D.B., Fox, J.G., Suerbaum, S., and Josenhans, C. (2007). Inhibitory Effect of Enterohepatic *Helicobacter hepaticus* on Innate Immune Responses of Mouse Intestinal Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 75, 2717–2728.
- Stralen, E., Leguit, R.J., Begthel, H., Michaux, L., Buijs, A., Lemmens, H., Scheiff, J.M., Doyen, C., Pierre, P., Forget, F., et al. (2009). MafB oncoprotein detected by immunohistochemistry as a highly sensitive and specific marker for the prognostic unfavorable t(14;20) (q32;q12) in multiple myeloma patients. *Leukemia* 23, 801–803.
- Strom, B.L., Soloway, R.D., Rios-Dalenz, J.L., Rodriguez-Martinez, H.A., West, S.L., Kinman, J.L., Polansky, M., and Berlin, J.A. (1995). Risk factors for gallbladder cancer. An international collaborative case-control study. *Cancer* 76, 1747–1756.
- Struve, C., Roe, C.C., Stegger, M., Stahlhut, S.G., Hansen, D.S., Engelthaler, D.M., Andersen, P.S., Driebe, E.M., Keim, P., and Krogfelt, K.A. (2015). Mapping the Evolution of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *mBio* 6, e00630.
- Suerbaum, S., Josenhans, C., Sterzenbach, T., Drescher, B., Brandt, P., Bell, M., Droge, M., Fartmann, B., Fischer, H.-P., Ge, Z., et al. (2003). The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7901–7906.
- Sugai, M., Kawamoto, T., Pérès, S.Y., Ueno, Y., Komatsuzawa, H., Fujiwara, T., Kurihara, H., Suginaka, H., and Oswald, E. (1998). The Cell Cycle-Specific Growth-Inhibitory Factor Produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Is a Cytotoxic Distending Toxin. *Infect. Immun.* 66, 5008–5019.
- Suzuki, M., Mimuro, H., Kiga, K., Fukumatsu, M., Ishijima, N., Morikawa, H., Nagai, S., Koyasu, S., Gilman, R.H., Kersulyte, D., et al. (2009). *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. *Cell Host Microbe* 5, 23–34.
- Svensson, L.A., Henning, P., and Lagergård, T. (2002). The cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi* inhibits endothelial cell proliferation. *Infect. Immun.* 70, 2665–2669.
- Swennes, A.G., Sheh, A., Parry, N.M.A., Muthupalani, S., Lertpiriyapong, K., García, A., and Fox, J.G. (2014). *Helicobacter hepaticus* infection promotes hepatitis and preneoplastic foci in farnesoid X receptor (FXR) deficient mice. *PloS One* 9, e106764.
- Taieb, F., Sváb, D., Watrin, C., Oswald, E., and Tóth, I. (2015). Cytolethal distending toxin A, B and C subunit proteins are necessary for the genotoxic effect of *Escherichia coli* CDT-V. *Acta Vet. Hung.* 63, 1–10.

- Tammer, I., Brandt, S., Hartig, R., König, W., and Backert, S. (2007). Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology* 132, 1309–1319.
- Taylor, N.S., Fox, J.G., and Yan, L. (1995). In-vitro hepatotoxic factor in *Helicobacter hepaticus*, *H. pylori* and other *Helicobacter* species. *J. Med. Microbiol.* 42, 48–52.
- Taylor, N.S., Xu, S., Nambiar, P., Dewhirst, F.E., and Fox, J.G. (2007). Enterohepatic *Helicobacter* species are prevalent in mice from commercial and academic institutions in Asia, Europe, and North America. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2166–2172.
- Tee, W., Montgomery, J., and Dyall-Smith, M. (2001). Bacteremia Caused by a *Helicobacter pullorum*-Like Organism. *Clin. Infect. Dis.* 33, 1789–1791.
- Tegtmeier, N., Wittelsberger, R., Hartig, R., Wessler, S., Martinez-Quiles, N., and Backert, S. (2011). Serine phosphorylation of cortactin controls focal adhesion kinase activity and cell scattering induced by *Helicobacter pylori*. *Cell Host Microbe* 9, 520–531.
- Thay, B., Damm, A., Kufer, T.A., Wai, S.N., and Oscarsson, J. (2014). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* outer membrane vesicles are internalized in human host cells and trigger NOD1- and NOD2-dependent NF- κ B activation. *Infect. Immun.* 82, 4034–4046.
- Tomczak, M.F., Gadjeva, M., Wang, Y.Y., Brown, K., Maroulakou, I., Tsihchlis, P.N., Erdman, S.E., Fox, J.G., and Horwitz, B.H. (2006). Defective Activation of ERK in Macrophages Lacking the p50/p105 Subunit of NF- κ B Is Responsible for Elevated Expression of IL-12 p40 Observed after Challenge with *Helicobacter hepaticus*. *J. Immunol.* 176, 1244–1251.
- Toprak, N.U., Yagci, A., Gulluoglu, B.M., Akin, M.L., Demirkalem, P., Celenk, T., and Soyletir, G. (2006). A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12, 782–786.
- Tóth, I., Héroult, F., Beutin, L., and Oswald, E. (2003). Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new cdt variant (Type IV). *J. Clin. Microbiol.* 41, 4285–4291.
- Tóth, I., Nougayrède, J.-P., Dobrindt, U., Ledger, T.N., Boury, M., Morabito, S., Fujiwara, T., Sugai, M., Hacker, J., and Oswald, E. (2009). Cytolethal Distending Toxin Type I and Type IV Genes Are Framed with Lambdoid Prophage Genes in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 77, 492–500.
- Touati, E., Michel, V., Thiberge, J.-M., Wuscher, N., Huerre, M., and Labigne, A. (2003). Chronic *Helicobacter pylori* infections induce gastric mutations in mice. *Gastroenterology* 124, 1408–1419.
- Tsang, Y.H., Lamb, A., Romero-Gallo, J., Huang, B., Ito, K., Peek, R.M., Ito, Y., and Chen, L.F. (2010). *Helicobacter pylori* CagA targets gastric tumor suppressor RUNX3 for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 29, 5643–5650.
- Ueno, Y., Ohara, M., Kawamoto, T., Fujiwara, T., Komatsuzawa, H., Oswald, E., and Sugai, M. (2006). Biogenesis of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Cytolethal Distending Toxin Holotoxin. *Infect. Immun.* 74, 3480–3487.
- Varon, C., Duriez, A., Lehours, P., Ménard, A., Layé, S., Zerbib, F., Mégraud, F., and Laharie, D. (2009). Study of *Helicobacter pullorum* proinflammatory properties on human epithelial cells in vitro. *Gut* 58, 629–635.
- Varon, C., Mocan, I., Mihi, B., Péré-Védrenne, C., Aboubacar, A., Moraté, C., Oleastro, M., Doignon, F., Laharie, D., Mégraud, F., et al. (2014). *Helicobacter pullorum* cytolethal distending toxin targets vinculin and cortactin and triggers formation of lamellipodia in intestinal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 209, 588–599.
- Veijola, L., Nilsson, I., Halme, L., Abu Al-Soud, W., Mäkinen, J., Ljungh, Å., and Rautelin, H. (2007). Detection of *Helicobacter* species in chronic liver disease and chronic inflammatory bowel disease. *Ann. Med.* 39, 554–560.
- Vil'shanskaia, F.L., Mazitova, O.P., Shteinberg, G.B., Pospelova, V.V., and Rakhimova, N.G. (1977). [Effect of bificol on the intestinal microflora of chronic colitis patients working in antibiotic production]. *Antibiotiki* 22, 181–184.

- Vizcaino, M.I., and Crawford, J.M. (2015). The colibactin warhead crosslinks DNA. *Nat. Chem.* *7*, 411–417.
- Vogelmann, R., and Amieva, M.R. (2007). The role of bacterial pathogens in cancer. *Curr. Opin. Microbiol.* *10*, 76–81.
- Wang, X., Li, L., Yang, M., Geng, Y., Chen, H., Xu, Y., and Sun, Y. (2014). Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its *cdtB* gene in subgingival plaque of Chinese periodontitis patients. *BMC Oral Health* *14*, 37.
- Wang, X., Yang, J., Qian, J., Liu, Z., Chen, H., and Cui, Z. (2015). S100A14, a mediator of epithelial-mesenchymal transition, regulates proliferation, migration and invasion of human cervical cancer cells. *Am. J. Cancer Res.* *5*, 1484–1495.
- Ward, J.M., Anver, M.R., Haines, D.C., and Benveniste, R.E. (1994a). Chronic active hepatitis in mice caused by *Helicobacter hepaticus*. *Am. J. Pathol.* *145*, 959–968.
- Ward, J.M., Fox, J.G., Anver, M.R., Haines, D.C., George, C.V., Collins, M.J., Gorelick, P.L., Nagashima, K., Gonda, M.A., and Gilden, R.V. (1994b). Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species. *J. Natl. Cancer Inst.* *86*, 1222–1227.
- Ward, J.M., Anver, M.R., Haines, D.C., Melhorn, J.M., Gorelick, P., Yan, L., and Fox, J.G. (1996). Inflammatory large bowel disease in immunodeficient mice naturally infected with *Helicobacter hepaticus*. *Lab. Anim. Sci.* *46*, 15–20.
- Wasimuddin, null, Čížková, D., Bryja, J., Albrechtová, J., Hauffe, H.C., and Piálek, J. (2012). High prevalence and species diversity of *Helicobacter* spp. detected in wild house mice. *Appl. Environ. Microbiol.* *78*, 8158–8160.
- Weeks, D.L., Eskandari, S., Scott, D.R., and Sachs, G. (2000). A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* *287*, 482–485.
- Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (1999). The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* *53*, 155–187.
- Whary, M.T., and Fox, J.G. (2004). Natural and experimental *Helicobacter* infections. *Comp. Med.* *54*, 128–158.
- Whitehouse, C.A., Balbo, P.B., Pesci, E.C., Cottle, D.L., Mirabito, P.M., and Pickett, C.L. (1998). *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin Causes a G2-Phase Cell Cycle Block. *Infect. Immun.* *66*, 1934–1940.
- Wising, C., Azem, J., Zetterberg, M., Svensson, L.A., Ahlman, K., and Lagergård, T. (2005a). Induction of apoptosis/necrosis in various human cell lineages by *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* *45*, 767–776.
- Wising, C., Mölne, L., Jonsson, I.-M., Ahlman, K., and Lagergård, T. (2005b). The cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi* aggravates dermal lesions in a rabbit model of chancroid. *Microbes Infect.* *7*, 867–874.
- Wright, W.E., and Shay, J.W. (2001). Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *11*, 98–103.
- Wu, S., Rhee, K.-J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H.-R., Huso, D.L., Brancati, F.L., Wick, E., McAllister, F., et al. (2009). A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat. Med.* *15*, 1016–1022.
- Yamada, T., Komoto, J., Saiki, K., Konishi, K., and Takusagawa, F. (2006). Variation of loop sequence alters stability of cytolethal distending toxin (CDT): crystal structure of CDT from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *15*, 362–372.
- Yang, Y., and Cvekl, A. (2007). Large Maf Transcription Factors: Cousins of AP-1 Proteins and Important Regulators of Cellular Differentiation. *Einstein J. Biol. Med. EJBM* *23*, 2–11.
- Yang, J., Ji, S., Zhang, Y., and Wang, J. (2013). *Helicobacter hepaticus* infection in primary hepatocellular carcinoma tissue. *Singapore Med. J.* *54*, 451–457.
- Yang, W., Lan, X., Li, D., Li, T., and Lu, S. (2015). MiR-223 targeting MAFB suppresses proliferation and migration of nasopharyngeal carcinoma cells. *BMC Cancer* *15*, 1–12.

- Yao, R., Lopez-Beltran, A., MacLennan, G.T., Montironi, R., Eble, J.N., and Cheng, L. (2007). Expression of S100 protein family members in the pathogenesis of bladder tumors. *Anticancer Res.* 27, 3051–3058.
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345–347.
- Young, R.S., Fortney, K.R., Gelfanova, V., Phillips, C.L., Katz, B.P., Hood, A.F., Latimer, J.L., Munson, R.S., Hansen, E.J., and Spinola, S.M. (2001). Expression of cytolethal distending toxin and hemolysin is not required for pustule formation by *Haemophilus ducreyi* in human volunteers. *Infect. Immun.* 69, 1938–1942.
- Young, V.B., Chien, C.-C., Knox, K.A., Taylor, N.S., Schauer, D.B., and Fox, J.G. (2000a). Cytolethal Distending Toxin in Avian and Human Isolates of *Helicobacter pullorum*. *J. Infect. Dis.* 182, 620–623.
- Young, V.B., Knox, K.A., and Schauer, D.B. (2000b). Cytolethal distending toxin sequence and activity in the enterohepatic pathogen *Helicobacter hepaticus*. *Infect. Immun.* 68, 184–191.
- Young, V.B., Knox, K.A., Pratt, J.S., Cortez, J.S., Mansfield, L.S., Rogers, A.B., Fox, J.G., and Schauer, D.B. (2004). In Vitro and In Vivo Characterization of *Helicobacter hepaticus* Cytolethal Distending Toxin Mutants. *Infect. Immun.* 72, 2521–2527.
- Yue, M., Yang, F., Yang, J., Bei, W., Cai, X., Chen, L., Dong, J., Zhou, R., Jin, M., Jin, Q., et al. (2009). Complete genome sequence of *Haemophilus parasuis* SH0165. *J. Bacteriol.* 191, 1359–1360.
- Zanoni, R.G., Rossi, M., Giacomucci, D., Sanguinetti, V., and Manfreda, G. (2007). Occurrence and antibiotic susceptibility of *Helicobacter pullorum* from broiler chickens and commercial laying hens in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 168–173.
- Zhang, M., Zhang, H., Li, Y., Qi, W., Wang, X., and Wang, J. (2013). Inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus* on *Helicobacter hepaticus* in vitro. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 499–504.
- Zheng, J., Meng, J., Zhao, S., Singh, R., and Song, W. (2008). *Campylobacter*-induced interleukin-8 secretion in polarized human intestinal epithelial cells requires *Campylobacter*-secreted cytolethal distending toxin- and Toll-like receptor-mediated activation of NF-kappaB. *Infect. Immun.* 76, 4498–4508.
- Zychlinsky, A., and Sansonetti, P. (1997). Perspectives series: host/pathogen interactions. Apoptosis in bacterial pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 100, 493–495.

Titre : Etude de la Cytolethal Distending Toxin B des Hélicobacters dans l'inflammation et la carcinogenèse digestive

Résumé :

La démonstration du rôle de la CDT (« Cytolethal Distending Toxin ») de *Helicobacter hepaticus* dans le développement de l'hépatocarcinome murin fait de cette toxine un candidat pertinent dans l'activation de processus pro-cancéreux. Comme la toxine CagA de *Helicobacter pylori*, la sous-unité active CdtB de la CDT pourrait être une oncoprotéine. Nous avons étudié le rôle de la CdtB des Hélicobacters dans l'inflammation et la carcinogenèse digestive via une stratégie lentivirale d'expression constitutive ou conditionnelle de la CdtB ou de son mutant pour l'activité DNase. Nous avons réalisé une étude du transcriptome et montré que la CdtB de *H. hepaticus* induisait une réponse inflammatoire en surexprimant des cytokines, chimiokines, peptides antimicrobiens et en activant la voie du NF- κ B des cellules épithéliales. La CdtB régule également l'expression et la localisation nucléaire du facteur de transcription et oncogène MafB. Ces résultats ont été confirmés pour la CdtB de *Helicobacter pullorum*. Des expériences d'infection des cellules avec des souches sauvages et mutées pour la CDT (de *H. hepaticus* & *H. pullorum*) ont permis de valider les résultats obtenus et de les attribuer à la CdtB et notamment à son activité DNase. Nous avons aussi développé un nouveau modèle de xénogreffes de cellules épithéliales inductibles pour l'expression de la CdtB de *H. hepaticus*. Dans ce modèle, la CdtB, en plus de ses effets déjà connus, retarde la croissance tumorale, induit l'apoptose, la sénescence et la surexpression du marqueur nucléaire de prolifération, Ki-67, suggérant la survie cellulaire. L'ensemble de ces résultats fournit de nouveaux arguments en faveur du potentiel oncogénique de la CDT.

Mots clés : Cytolethal distending toxin B, Hélicobacters, inflammation, MafB, xénogreffe, peptides antimicrobiens

Title : Study of the Cytolethal Distending Toxin B of Helicobacters in inflammation and gastrointestinal carcinogenesis

Abstract :

The demonstration of the role of the Cytolethal Distending Toxin (CDT) of *Helicobacter hepaticus* in the development of hepatocarcinoma in mice, makes this toxin a relevant candidate in the activation of precancerous processes. As in the case of the CagA toxin of *Helicobacter pylori*, the CdtB active subunit of CDT could be an oncoprotein. We studied the role of *Helicobacter* CdtB in inflammation and digestive carcinogenesis using a lentiviral strategy for constitutive or conditional expression of the CdtB subunit or its corresponding DNase mutant. We conducted a study of the transcriptome and showed that CdtB induced an inflammatory response by overexpressing cytokines, chemokines, antimicrobial peptides and activating the NF- κ B pathway in epithelial cells. The CdtB also regulated the expression and nuclear localization of the transcription factor and oncogene MafB. These results were confirmed for the CdtB of *Helicobacter pullorum*. Infection of cells with wild type strains and the corresponding CDT-mutant strains (of *H. hepaticus* & *H. pullorum*) were used to validate the results and to attribute the effects to the CdtB and, in particular, to its DNase activity. We also developed a novel epithelial cell xenograft model to evaluate the inducible expression of *H. hepaticus* CdtB. In this model, the CdtB, in addition to its previously well-known effects, delayed tumor growth, induced apoptosis, senescence and the overexpression of nuclear proliferation marker, Ki-67, suggesting cell survival. All of these results provide new arguments in favor of the oncogenic potential of the CDT.

Keywords : Cytolethal distending toxin B, Helicobacters, inflammation, MafB, xenograft, antimicrobial peptides

Infection à *Helicobacter*, Inflammation et Cancer

[INSERM U853 - Université de Bordeaux - Case 76 - 146, rue Léo Saignat - 33076 Bordeaux]