THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme ELISABETH BEZINE

le lundi 23 novembre 2015

Titre :

ANALYSE DES DOMMAGES A L'ADN INDUITS PAR LA TOXINE CDT ET DE LEUR REPARATION

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Toxicologie Alimentaire (ToxAlim)

Directeur(s) de Thèse :

MME GLADYS MIREY

M. JULIEN VIGNARD

Rapporteurs :

Mme CLAUDIE LEMERCIER, INSERM RHONE ALPES - AUVERGNE

Mme MELANIE HAMON, INSTITUT PASTEUR

Membre(s) du jury :

M. BERNARD SALLES, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Président

M. JEAN-SEBASTIEN HOFFMANN, INSERM MIDI PYRENEES, Membre

Remerciements

Je n'aurais jamais pu réaliser ce travail de thèse sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes, à qui je témoigne ma profonde reconnaissance.

Tout d'abord, je tiens à remercier Mélanie Hamon, Claudie Lemercier, Jean-Sébastien Hoffman et Bernard Salles pour avoir accepté de faire parti de mon jury de thèse, et d'évaluer ce travail.

Je remercie également Yvan Canitrot, Sylvie Friant, et Vassilia Théodorou pour avoir accepté de faire parti de mon comité de thèse. Merci beaucoup pour toutes les discussions qui ont émergées de ces réunions, de nombreuses perspectives de ma thèse en ont découlées.

Je souhaiterai exprimer ma gratitude à mes directeurs de thèse Gladys Mirey et Julien Vignard. Tout d'abord pour m'avoir coachée pour le concours de l'école doctorale afin de pouvoir réaliser ma thèse en leur compagnie, puis pour m'avoir encadrée scientifiquement et techniquement pendant ces trois années de thèse. Merci beaucoup Gladys, de m'avoir fait confiance les yeux fermés pour commencer mon travail dans ton équipe en Master 2. Malgré une charge de travail conséquente tu as toujours trouvé le temps pour discuter de mes résultats et te soucier de mon bien-être, je t'en remercie profondément. Ton rire et ta bonne humeur ont toujours réussi à me remonter le moral dans les moments de panique. Merci Julien pour ton encadrement permanent au laboratoire, d'avoir été là dès que j'avais une question, et de m'avoir aidé lorsque le taux de manips était trop important. Tes connaissances scientifiques, ta curiosité et ton inventivité m'ont toujours impressionnée.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe E08-GS, dont la présence a été essentielle à la bonne humeur qui a accompagné mes trois années de thèse. Merci à Elisa Boutet pour son aide précieuse dans les discussions scientifiques, mais également pour son soutien moral et ses conseils, qui m'ont permis de toujours relativiser la situation et de continuer à avancer. Je remercie Bernard Salles, pour toutes les discussions scientifiques ainsi que toutes les remarques apportées à ce travail. Merci à Saleha Hashim, pour son aide au laboratoire, sa bonne humeur permanente et sa capacité à toujours trouver ce dont on a besoin, tes succulents gâteaux me manqueront. Merci également à Marianne Chevalier pour son soutien moral et son sourire qui nous met de bonne humeur tous les matins. Je remercie également Vanessa Graillot pour m'avoir aidée au cours de ces derniers mois de thèse.

Mes remerciements vont également à Yann Malaisé et Aurore Loeuillet pour leurs travaux de master 2 qui ont permis de générer les lignées HCT116 déplétées pour les différents systèmes de réparation. La génération et le criblage de ces lignées a été un travail long et fastidieux. Merci infiniment, car sans votre travail, je n'aurai jamais pu réaliser le mien.

Il m'est impossible d'oublier de remercier Mélissa Hanique, pour la quantité impressionnante de travail qu'elle a réalisé au cours de son stage de Master 2. Merci pour ton acharnement, ta passion et ta bonne humeur. J'ai vraiment apprécié de travailler avec toi. Je te souhaite bonne chance dans la poursuite de ta carrière.

J’adresse également mes remerciements à l’équipe du Dr Lionel Mourey pour leur aide et leurs conseils sur la purification de CdtB. Je tiens à remercier plus particulièrement Valérie Guillet pour son aide dans la purification par chromatographie d’exclusion de taille de la toxine.

Je tiens également à remercier tous les membres du comité des 3R-T pour leurs questions et leur intérêt pour mon sujet de thèse. Merci également à Bernard Payrastre pour les discussions et les conseils sur l’étude de l’activité phosphatase de CdtB. Mes remerciements vont également à Bruno Segui pour les discussions sur l’étude de la mort cellulaire associée à CDT.

Je remercie également Sarah, Alix, Marion, Mélanie et Julia pour m’avoir soutenue pendant ces trois années de thèse. Vous avez toujours été là dans les moments difficiles, pour me changer les idées et me faire rire. Sans vous, ma thèse n’aurait pas été la même. Merci infiniment et “Keep calm and have fun” ! Je vous souhaite tout le courage que vous m’avez apporté.

Je remercie également l’ensemble des personnes travaillant dans l’unité INRA Toxalim avec qui j’ai partagé ces trois années de thèse. Merci beaucoup pour votre aide, vos conseils et surtout votre gentillesse et votre bonne humeur. J’ai beaucoup apprécié l’ambiance de travail et la bonne entente présente au sein de l’unité. Je suis heureuse d’avoir pu réaliser ma thèse dans cet institut en votre compagnie. Il m’est impossible de citer tous les noms, mais merci à tous.

Enfin, cette thèse n’aurait pas été possible sans le soutien permanent de ma famille et de mes amis. Je tiens donc à remercier tous mes amis de l’Aïkido pour avoir su me faire oublier les dures journées de travail et m’avoir redonné de la sérénité dans les moments de doutes. Merci infiniment à mes parents et mes grands-parents pour m’avoir soutenue et encouragée pendant ces trois années de thèse. Je remercie également ma sœur, Christelle, qui a su me faire rire et oublier mes tracas dès que je la voyais. Pour finir, ma thèse aurait été considérablement plus difficile sans l’aide, le soutien et les encouragements de Clément. Merci de m’avoir supportée dans tout ce que j’ai entrepris, d’avoir accepté les heures et les heures de travail passées au laboratoire et de m’avoir toujours encouragée. Je te dois énormément. Merci

Résumé

La Cytolethal Distending Toxin (CDT) est un facteur de virulence produit par de nombreuses bactéries pathogènes Gram négatives. Sa production est associée à différentes pathologies, dont le développement de cancers. Un lien de causalité a été établi entre dommages à l'ADN, mutagénèse et cancérogenèse. Or, différentes études ont classé CDT dans la famille des génotoxines bactériennes. L'action génotoxique de CDT repose sur l'activité de sa sous-unité catalytique CdtB, connue pour induire des cassures double-brin (CDBs) de l'ADN génomique eucaryote. Cependant, des travaux de l'équipe ont montré qu'à des doses 1000 fois plus faibles que celles utilisées dans la littérature, CDT induit des dommages primaires (probablement de type cassure simple-brin), qui dégénèrent en CDB lors de la phase S. Afin de mieux documenter ce modèle, nous avons étudié ici les systèmes de réparation impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN induits par CDT. Nous avons ainsi confirmé l'importance des voies de réparations des CDBs (Homologous Recombinaison et Non-Homologous End-Joining). Nous avons également montré que le Nucleotide Excision Repair, impliqué dans la réparation des adduits à l'ADN, n'est pas impliqué dans la prise en charge des dommages induits par CDT. En revanche, nous avons démontré, pour la première fois, l'implication de systèmes de réparation de dommages plus précoces, comme le Single-Strand Break Repair et la voie de l'Anémie de Fanconi. Pour finir, afin de mieux caractériser ces dommages et leur induction, nous avons initié des travaux visant à étudier, *in vitro*, l'activité catalytique de CdtB. Dans ce but, différents mutants catalytiques ont été générés, purifiés, et leur activité nucléase a été testée. Une activité nucléase similaire entre les CdtB sauvages et mutantes a été obtenue lors d'un test *in vitro* (digestion d'un plasmide super-enroulé). Cependant, un test cellulaire (expression nucléaire en cellules eucaryotes de la sous-unité CdtB sauvage ou mutante) indique bien la perte de l'activité nucléase de la sous-unité mutante. Nos résultats montrent donc l'importance de tester les différentes sous-unités dans différents contextes. En conclusion, notre travail conforte les données selon lesquelles CDT induit des CSB, et non des CDB directes de l'ADN. De plus, notre travail a permis d'éclaircir les processus cellulaires activés dans la cellule hôte, suite aux dommages à l'ADN induits par CDT.

Abstract

The Cytolethal Distending Toxin (CDT) is a virulence factor produced by many pathogenic gram-negative bacteria, its production being associated to various diseases, including tumorigenesis. A causal relationship has been established between DNA damage, mutagenesis and cancerogenesis. Different studies classified CDT among the bacterial genotoxins. The CDT-related pathogenicity relies on the catalytic subunit CdtB action, shown to induce double-strand breaks (DSB) on the host genomic DNA. Previously, our team showed that, at doses 1000 times lower than those used in the literature, CDT probably induces single-strand breaks that degenerate into DSB during S-phase. To document this model, we studied the repair systems involved in host-cell in response to CDT-induced DNA damage. Since various repair pathways allow cells to respond different type of DNA damage, we speculated that non-DSB repair mechanisms might contribute to the cellular resistance to CDT-mediated genotoxicity. First, we confirm that HR is involved in the management of CDT-induced lesions, but also Non Homologous End Joining, the second major DSB repair mechanism. Next we show that nucleotide excision repair, involved in adducts repair, is not important to take care of CDT-induced DNA damage, whereas base excision repair impairment sensitizes CDT-treated cells, suggesting that CDT induce single-strand breaks. Moreover, we demonstrate for the first time the involvement and the activation of the Fanconi Anemia repair pathway in response to CDT. Finally, to better characterize CDT-induced damage, we initiate experiments to study CdtB nuclease activity *in vitro*. For this, different CdtB mutants have been generated, purified and their nuclease activity tested. A similar nuclease activity has been obtained for the wt or mutant CdtB in an *in vitro* assay (digestion of a supercoiled plasmid). However, a cell assay (nuclear expression of CdtB in eukaryotic cells) confirms the loss of activity for the mutant subunit. Our results thus indicate the importance to test the CdtB subunit in different context. To conclude, our work reinforces a model where CDT induces single-strand damage and not direct DSB. This also underlines the importance of cell proliferation to generate DSB and sheds light on the activated host-cell systems, after CDT-induced DNA damage.

Préambule

Au cours de ma thèse, j'ai contribué à mieux caractériser les dommages induits par CDT, grâce à des études sur cellules de mammifères ainsi que par des tests *in vitro* réalisés après purification de la sous-unité catalytique de CDT (CdtB). Ainsi, mon manuscrit débutera par une partie introductive sur la toxine CDT, son implication dans la pathogénicité des bactéries qui la produisent et son interaction avec les cellules eucaryotes lors d'une infection. La deuxième partie de cette thèse détaillera les dommages à l'ADN induits par CDT ainsi que mes résultats sur les voies de signalisation et de réparation importantes lors d'une exposition à CDT, dans des cellules de mammifères. Je poursuivrai ensuite par une partie détaillant le deuxième projet avancé au cours de ma thèse, portant sur la caractérisation biochimique de la sous-unité catalytique CdtB purifiée, par des tests d'activité *in vitro*. Enfin, une discussion générale autour de l'impact des dommages induits par CDT, au niveau cellulaire, tissulaire et de l'organisme entier, conclura ce manuscrit de thèse. Ce travail a donné lieu à la publication d'un chapitre de livre, d'une revue scientifique dans un journal international, ainsi qu'à la soumission d'un article scientifique dans le journal *Cellular Microbiology*.

Sommaire

PARTIE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

I. RELATION HOTE / BACTERIES, UN EQUILIBRE INSTABLE PERMANENT 1

1) Les différents microbiotes de l'organisme humain 1

2) La flore bactérienne : commensale ou pathogène 1

3) La production de toxines par les bactéries pathogènes 2

a) Les endotoxines 3

b) Les exotoxines 3

◊ *Les superantigènes 3*

◊ *Les cytolysines 4*

◊ *Les toxines de type AB 5*

II. LA CYTOLETHAL DISTENDING TOXIN 7

1) Bactéries produisant CDT : importance dans la pathogénicité 7

2) Synthèse et sécrétion de CDT 8

3) Internalisation dans les cellules eucaryotes : différents moyens pour un même but 9

4) Cas particulier de la toxine typhoïde 9

5) Action et effets de CdtB dans les cellules eucaryotes 10

Chapitre publié chez NOVA Science Publisher

PARTIE II : ETUDE DES DOMMAGES A L'ADN INDUITS PAR CDT 11

I. INTRODUCTION 11

1) Les dommages à l'ADN et leurs prises en charge 11

a) Les dommages à l'ADN et leurs responsables 11

◊ *Les mésappariements de bases 12*

◊ *Les modifications ou délétions de bases 13*

◊ *Les dommages encombrants 14*

◊ *Pontages inter-brin 15*

◊ *Cassures double-brins de l'ADN 15*

b) Détection et signalisation des dommages 16

◊ *Activation de la voie ATR-CHK1 ..... 17*

◊ *Activation de la voie ATM-CHK2 ..... 17*

c) Le cycle cellulaire et sa régulation en présence de dommages 18

d) Les voies de réparations des dommages à l'ADN 20

◊ *Ribonucleotide Excision Repair and Mismatch Repair 20*

◊ *Trans-lesion Synthesis* ... 20
◊ *Nucleotide Excision Repair* ... 21
◊ *Base Excision Repair* ... 22
◊ *Fanconi Anemia* ... 23
◊ *Homologous Recombination* ... 25
◊ *Classical Non-Homologous End-Joining* ... 27
◊ *Alternative Non-Homologous End-Joining* ... 29
e) Mort cellulaire et Sénescence ... 30
◊ *La Sénescence* ... 30
◊ *La mort cellulaire par apoptose* ... 31
f) Conséquences d'une dérégulation de la réponse aux dommages à l'ADN ... 31
◊ *Mutations et instabilité génétique* ... 31
◊ *Prolifération incontrôlée* ... 32
◊ *Echappement à la mort cellulaire* ... 33
2) Les génotoxines bactériennes ... 33
a) La Colibactine, produite par certaines souches de *E. coli* ... 33
b) La toxine ExoS, produite par *P. aeruginosa* ... 34
c) La toxine Usp, produite par les souches Uropathogènes de *E. coli* ... 34
d) *H. pylori* et dommages à l'ADN ... 35
e) *L. monocytogenes* et dommages à l'ADN ... 35
3) Les dommages à l'ADN induits par la génotoxine CDT ... 36

Revue : Bezine et al., *Cells*, 2014

II. PARTIE EXPERIMENTALE ... 38
1) Caractérisation des dommages induits par CDT *via* l'étude des voies de réparation activées 38
a) Article : Cellular resistance to the Cytolethal Distending Toxin involves a combination of DNA repair mechanisms ... 38

Article en révision dans le journal *Cellular Microbiology*

b) Résultats additionnels : Cinétique de réparation des dommages induits par CDT ... 64
◊ *Matériels et Méthodes* ... 64
◊ *Résultats* ... 64

III. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ... 66
1) Conclusion ... 66
2) Perspectives ... 67
a) Préciser la cinétique d'activation des systèmes de réparation ... 67

b) Etude de la cinétique de réparation des dommages induits par CDT 68

PARTIE III : CARACTERISATION *IN VITRO* DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE CDTB 70

I. INTRODUCTION 70

1) La désoxyribonuclease-like CdtB 70

a) La DNase I 71

b) Homologie structurale de CdtB avec la DNAseI 72

2) CdtB possède une double activité nucléase/phosphatase 75

II. PARTIE EXPERIMENTALE 75

1) Matériels et Méthodes 75

a) Souches bactériennes, plasmides utilisés et conditions de culture 75

b) Mutagénèse dirigée et Clonage de EcCdtB-6His 76

c) Production et Purification de CdtB 79

◊ *Purification de EcCdtB taguée Histidine 79*

◊ *Purification de EcCdtB taguée GST 80*

◊ *Purification de HdCdtB-6His à partir des corps d'inclusion 81*

d) Gels SDS-PAGE 82

e) Tests de l'activité nucléase in vitro 82

f) Chromatographie d'exclusion de taille 82

g) Spectrométrie de masse 83

2) Résultats 83

a) Génération de mutants de CdtB 83

b) Expression de EcCdtB en BL21 85

c) Activité catalytique de protéines EcCdtB purifiées en conditions natives 88

◊ *Purification 88*

◊ *Tests de l'activité nucléase 90*

◊ *Analyse par Spectrométrie de Masse des protéines EcCdtB purifiées 94*

d) Activité de protéines EcCdtB purifiées en conditions stringentes, voire dénaturantes 94

◊ *Purification de EcCdtB wt et H153A 94*

◊ *Etude de l'activité nucléase de EcCdtB wt et EcCdtB H153A 96*

III. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 97

1) Conclusions 97

2) Perspectives 98

a) Etude de l'activité in vitro dans un contexte chromatinien plus complexe 98

b) Etude de l'activité phosphatase de CdtB 99

c) Etude du transport de EcCdtB dans la cellule eucaryote 100

PARTIE IV : DISCUSSION GENERALE 101

I. Y A-T-IL UNE DOSE PHYSIOLOGIQUE DE CDT ? 101

1) Quantité de bactéries présentent lors d'une infection 101

2) Production de CDT lors d'une infection 102

3) Accessibilité des cellules eucaryotes à CDT 103

II. POTENTIELS IMPACTS DE DIFFERENTES DOSES DE CDT 104

1) Effets à courts et longs termes 104

2) CDT et cancérogénèse : Quels sont les indices connus ? 105

a) Instabilité génétique et prolifération incontrôlée 105

b) Induction d'une inflammation et d'une immunodépression localisée 106

3) CDT et Cancérogénèse : Où et Quand regarder ? 107

a) Epithélium buccal et infection par *A. actinomycetemcomitans* 109

b) Epithélium biliaire et infection par *H. hepaticus* 109

c) Epithélium colorectal et infection par *E. coli* 110

d) Epithélium biliaire et infection par *S. enterica* serovar typhi 110

III. CONCLUSION 111

RÉFÉRENCES 112

Liste des figures

Figure 1 : Production d'endotoxines et d'exotoxines par les bactéries 2

Figure 2 : Mode d'action des Superantigènes sur les cellules lymphocytaires 4

Figure 3 : Les dommages à l'ADN et leurs responsables 12

Figure 4 : Lésions de l'ADN par des agents a) alkylants, oxydants ou b) clastogènes 14

Figure 5 : Le cycle cellulaire et sa régulation 19

Figure 6 : Modèle de la réparation d'adduits à l'ADN par NER 21

Figure 7 : Modèle de réparation de bases modifiées par BER 22

Figure 8 : Modèle de la prise en charge d'un pontage inter-brin par la voie FA 24

Figure 9 : Reconnaissance et prise en charge des CDB par la HR 25

Figure 10 : Etapes finales de la réparation d'une CDB par HR 26

Figure 11 : Modèle de la réparation d'une CDBs par NHEJ classique 28

Figure 12 : Modèle de la réparation des CDB par Alt-NHEJ 29

Figure 13 : Modèle récapitulant les connaissances sur les dommages induits par CDT avant nos travaux 37

Figure 14 : Evolution du taux de dommages à l'ADN après un court traitement de 4h par CDT^{wt} 65

Figure 15 : Structure du complexe DNase I / ADN obtenu à partir des données de cristallographie 71

Figure 16 : Résidus impliqués dans l'activité nucléase de la DNase I 72

Figure 17 : Clivage in vitro, d'un plasmide super-enroulé par la sous-unité CdtB 73

Figure 18 : Homologie de séquence entre CdtB et la DNase I réalisée par Elwell et Dreyfus 74

Figure 19 : Mutagénèse dirigée et clonage de EcCdtB dans le pRSET-A 77

Figure 20 : Clonage de EcCdtB dans les plasmides pet16b et pGEX 78

Figure 21 : Alignement de CdtB et carte des résidus mutés dans notre étude 84

Figure 22 : Etude de l'induction et de la solubilisation de EcCdtB 86

Figure 23 : Protéines EcCdtB taguées 6His et GST purifiées en conditions natives 89

Figure 24 : Test de l'activité nucléase des protéines EcCdtB purifiées en conditions natives 91

Figure 25 : Dose-réponse des activités nucléases de EcCdtB et de la DNase I 93

Figure 26 : Purification de EcCdtB wt et H153A en conditions stringentes et dénaturantes..... 95

Figure 27 : Comparaison des activités nucléases des protéines EcCdtB wt et H153A purifiées dans différentes conditions 96

Figure 28 : Variation hypothétique du taux de bactéries au cours d'une infection..... 102

Figure 29 : Régulation de la production de CDT par des signaux environnementaux..... 103

Figure 30 : Caractéristiques tumorales influencées par l'action de CDT..... 107

Figure 31 : Sites d'infections chroniques par des bactéries productrices de CDT, et épithélia associés. 108

Abréviations

53BP1 : p53 Binding Protein 1
8-oxoG : 8-oxoGuanine
8-oxodG : 8-oxo-2'-déoxyguanosine
A. Actinomycetemcomitans : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique
Alt-NHEJ : Alternative Non-Homologous End-Joining (aussi appelé B-NHEJ et MMEJ)
AP : Antigène Protecteur
APE1 : AP Endonuclease 1
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP : Adénosine TriPhosphate
ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3 related
ATRIP : ATR Interacting Protein
BAX : BCL2-associated X protein
BER : Base Excision Repair
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
BLM : Bloom Syndrome, RecQ Helicase-Like
B-NHEJ : Backup NHEJ (aussi appelé Alt-NHEJ et MMEJ)
BRCA1/2 : Breast Cancer 1 ou 2
CBD : Chitin Binding Domain
CDB : Cassure Double-Brin
CDT : Cytolethal Distending Toxin
CdtA/B/C : CDT subunit A or B or C
CFP : Cyan Fluorescent Protein
CHK : Checkpoint Kinase
C-NHEJ : voie Classique du NHEJ (aussi appelé NHEJ)
CSB : Cassure Simple-Brin
CtIP : C-terminal Binding Protein Interacting Protein
DDR : DNA Damage Response
dJH : double Jonction d'Holliday
DNA2 : DNA Replication Helicase/Nuclease 2
DNA-PKcs : DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit
DNase I : Desoxyribonuclease 1
dNTP : DesoxyRibonucleoside Tri-Phosphate
E. coli : *Escherichia coli*
EcCdtB : Sous-unité B de la toxine CDT produite par *E. coli*
EME1 : Essential Meiotic Structure-Specific Endonuclease 1
Epac : Exchange protein activated by cAMP
EXO1 : Exonucléase 1
ExoS / ExoT : Exotoxine S / Exotoxine T
FA : Fanconi Anemia
FAAP : Fanconi Anemia-Associated Protein
FANC(A, B, …) : Fanconi anemia, complementation group A, B, …
FE : Facteur Oedémateux
FL : Facteur Létal
GEN1 : Gen Endonuclease 1
GFP : Green Fluorescent Protein
GG-NER : Global Genome NER
GST : Glutathion S-Transferase
H. ducreyi : *Haemophilus ducreyi*
H2AX : Variant X de l'histone H2A
HdCdtB : Sous-unité B de la toxine CDT produite par *H. ducreyi*
HR : Homologous Recombination
IFN-γ : Interferon γ
IL-2 / 6 : Interleukine-2 ou 6
Lig : DNA Ligase
LLO : ListerioLysine O

LPS :	Lypopolysaccharide
MAPKs :	Mitogen-activated protein kinases
MCA :	Multicolor Competition Assay
MDC1 :	Mediator of DNA Damage Checkpoint protein 1
MEKs :	Mitogen-activated protein kinase kinases
MHC :	Major Histocompatibility Complex
MHF1/2 :	Mph1-associated Histone-Fold protein 1 or 2
MMC :	Mitomycine C
MMEJ :	Microhomology-Mediated End-Joining (aussi appelé Alt-NHEJ et C-NHEJ)
MMR :	Mismatch Repair
MRN :	Mre11-Rad50-Nbs1 complex
NBS1 :	Nijmegen Breakage Syndrome protein 1
NER :	Nucleotide Excision Repair
NHEJ :	Non-Homologous End-Joining (aussi appelé C-NHEJ)
NLS :	Nuclear Localization Signal
OGG1 :	8-OxoGuanine DNA Glycosylase
OMV :	Outer Membrane Vesicle
p53 :	tumor Protein 53 kDa
P. aeruginosa :	*Pseudomonas aeruginosa*
PALB2 :	Partner And Localizer of BRCA2
PARP1 :	Poly-ADP Ribose Polymerase 1
pH2AX :	phosphopeptide H2AX
PI-3K :	Phosphoinositide 3-Kinase
PIP :	Phosphatidylinositol Phosphate
PKA :	Protein Kinase A
PltA :	Pertussis-like toxin A
PltB :	Pertussis-like toxin B
Pol :	Polymerase
PSI-BLAST :	Position Specific Iterated BLAST
PUMA :	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
Rad51 :	Radiation sensitive protein 51
RE :	Reticulum Endoplamisque
RER :	Ribonucleotide Excision Repair
RFP :	Red Fluorescent Protein
rNTP :	ribonucléoside Tri-Phosphate
RPA :	Replication Protein A
ROS :	Reactive Oxygen Species
SDSA :	Synthesis-dependent strand annealing
SIPS :	Sénescence Induite Prématurément par le Stress
SSBR :	Single Strand-Break Repair
S. Typhi :	*Salmonella enterica* serovar Typhi
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
T3SS :	Type III Secretion System
TCR :	T-Cell Receptor
TCR (NER) :	Transcription Coupled Repair
TFIIH :	Transcription Factor II Human
TLS :	Trans-lesion synthesis
TNF :	Tumor Necrosis Factor
TOPOIII :	Topoisomerase III
TSST-1 :	Toxic Shock Syndrome Toxin-1
Usp :	Uropathogenic-specific protein
UV :	UltraViolet
WRN :	Werner
wt :	forme sauvage
XLF :	XRCC4-Like Factor
XP(A, B, C …) :	Xéroderma Pigmentosum complementation group A, B, C …
XRCC :	X-Ray Cross Complementing

PARTIE I

INTRODUCTION GENERALE

PARTIE I : Introduction Générale

I. Relation hôte / bactéries, un équilibre instable permanent

1) Les différents microbiotes de l'organisme humain

Notre organisme coexiste en permanence avec des micro-organismes dont de très nombreuses bactéries, certaines souches de champignons, des virus, etc. L'ensemble de ces organismes microscopiques compose le microbiote. Suivant leur "lieu de vie" appelé microbiome, différents microbiotes peuvent être distingués, comme le microbiote de la cavité buccale, du tractus gastro-intestinal, des voies génitales, etc. Une grande partie de ces microbiotes est constituée de bactéries (Marsland and Gollwitzer, 2014). Les souches bactériennes composant les différents microbiotes varient en fonction de la localisation dans le corps, mais également en fonction de l'âge de l'individu, de son lieu de résidence, de ses habitudes alimentaires, de son hygiène de vie, et de la prise d'antibiotiques ou de probiotiques (Claesson *et al.*, 2012). La majorité des bactéries en contact avec notre corps est pacifique et bénéfique pour notre organisme (Sansonetti, 2011). En effet, certaines bactéries jouent un rôle dans la digestion des aliments et notamment des polysaccharides végétaux, dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale, dans la protection contre la colonisation de bactéries pathogènes, et dans la maturation des défenses immunitaires (Sommer and Bäckhed, 2013; Leslie and Young, 2015).

2) La flore bactérienne : commensale ou pathogène

Au sein de ces microbiotes, les relations hôte / bactéries peuvent être commensales, mutualistes, ou pathogènes (Casadevall and Pirofski, 2000). Les bactéries commensales n'entraînent pas de désordre physique de l'hôte, cette relation profitant à un seul des deux partenaires. Dans le cas d'une relation mutualiste, aucun préjudice n'est causé aux deux partenaires et cette relation va apporter des avantages à l'hôte ainsi qu'à la bactérie. Enfin, dans le cas d'une relation pathogène, la relation est bénéfique pour la bactérie mais nuisible pour l'hôte. Une bactérie pathogène est capable d'infecter l'hôte, de persister et de proliférer au sein de l'organisme, d'éviter le système immunitaire, et d'induire une pathologie endommageant l'hôte que ce soit au niveau cellulaire, tissulaire ou de l'organisme entier (Sansonetti, 2011). Deux types de bactéries pathogènes peuvent être distingués. Les pathogènes

primaires vont pouvoir induire une pathologie chez un individu sain. Au contraire, les bactéries pathogènes opportunistes sont des bactéries, commensales ou mutualistes, qui profitent d'un affaiblissement de l'organisme pour induire une pathologie (Casadevall & Pirofski, 1999). A l'état physiologique, un équilibre s'établit entre la flore bactérienne, l'épithélium et le système immunitaire. Un changement dans la quantité d'une des souches bactériennes de la flore, un affaiblissement du système immunitaire, ou un stress extérieur, peuvent faire basculer cette situation commensale/mutualiste à une relation hôte / pathogène.

La pathogénicité d'une bactérie est la capacité à induire une pathologie. La sévérité de la pathologie et des symptômes dépend de la virulence de la bactérie. Ainsi, différentes souches bactériennes peuvent être plus ou moins virulentes tout en possédant la même pathogénicité (Casadevall & Pirofski, 1999).

3) La production de toxines par les bactéries pathogènes

Le pouvoir pathogène des bactéries dépend en grande partie de la production de toxines bactériennes qui peuvent avoir un rôle majeur dans la pathogénicité (dans l'induction de la pathologie) ou un rôle de facteurs de virulence (aggravation des symptômes). La production de ces toxines permet à la bactérie de survivre et de se multiplier dans l'organisme. Elles permettent également aux bactéries d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte. Deux catégories de toxines peuvent être produites : les endotoxines et les exotoxines (Ramachandran, 2014).

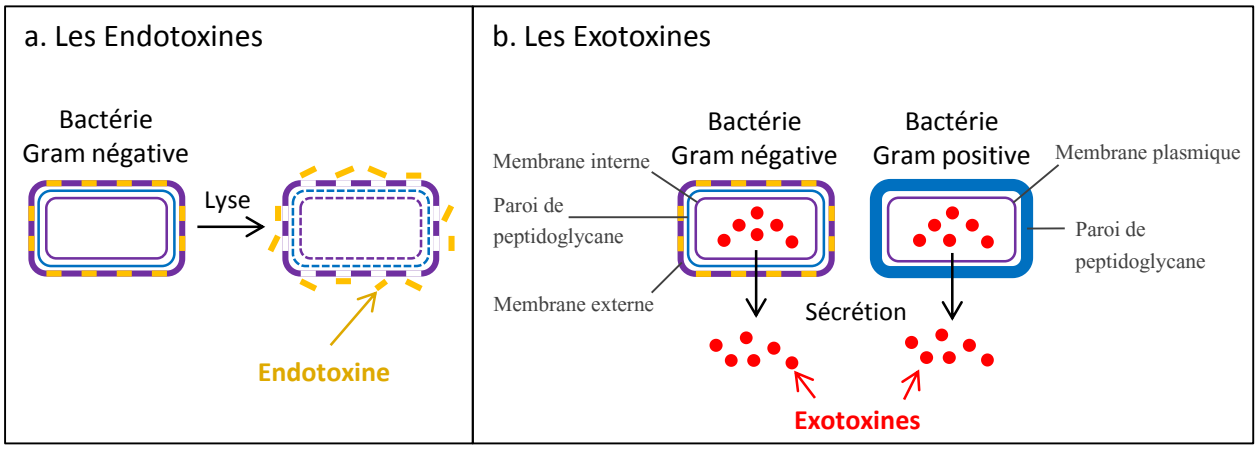


Figure 1 : Production d'endotoxines et d'exotoxines par les bactéries

a) Les endotoxines

Les endotoxines sont des protéines de type lipopolysaccharidique (LPS). Elles sont des constituants majeurs de la membrane externe des bactéries Gram négatives, exprimées quelle que soit la souche bactérienne, pathogène ou non. Les endotoxines sont dans la plupart des cas liées à la membrane de la bactérie, et ne sont libérées dans l'environnement extérieur qu'en cas de lyse de la bactérie (Figure 1a). Les LPS libérés peuvent être reconnus par le système immunitaire, notamment par les macrophages et les cellules dendritiques, conduisant à la production de molécules pro-inflammatoires (Mani *et al.*, 2012; Ramachandran, 2014). La toxicité des endotoxines peut être limitée à faibles doses, mais fatale à de trop fortes doses. Si les symptômes induits par la libération d'endotoxines sont essentiellement des frissons, de la fièvre et des crampes, lors d'une septicémie, le relargage trop important de LPS dans le sang peut induire une réponse inflammatoire extrêmement importante conduisant à un choc septique.

b) Les exotoxines

Les exotoxines sont des protéines sécrétées ou directement injectées par la bactérie, dans les cellules hôtes (Figure 1b). Les exotoxines peuvent agir au niveau du tissu infecté ou bien à distance, par exemple après diffusion dans l'organisme *via* la voie sanguine. Dans de nombreux cas, une faible dose de toxine est suffisante pour induire des effets sur les cellules hôtes. Les pathologies et les symptômes induits vont varier d'une toxine à l'autre. En effet, les exotoxines diffèrent en fonction de leur structure et de leur mécanisme d'action. De nombreuses exotoxines sont des enzymes et possèdent donc une activité catalytique et une action spécifique, qui sera dépendante de la présence ou non de leur substrat. Trois types d'exotoxines peuvent être distingués.

◊ *Les superantigènes*

Les superantigènes sont des toxines qui vont influencer et perturber les cellules eucaryotes, sans y être internalisées. Ils sont produits par les bactéries Gram positives *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes*. Leur nom vient de leur capacité à activer en masse les lymphocytes T (Ramachandran, 2014).

En effet, après leur sécrétion par la bactérie, les superantigènes interagissent avec les récepteurs des cellules T (TCR) et la molécule MHC-II (Major Histocompatibility Complex II) de la cellule présentatrice d'antigène (Rödström et al., 2014). Cette liaison du superantigène induit une activation non spécifique des lymphocytes T. Une fois activés les lymphocytes relarguent une quantité importante de molécules pro-inflammatoires, dont du TNFα (tumor necrosis factor α), de l'interferon γ (IFNγ) et de l'interleukine-2 (IL-2) (Figure 2) (Cameron *et al.*, 2001).

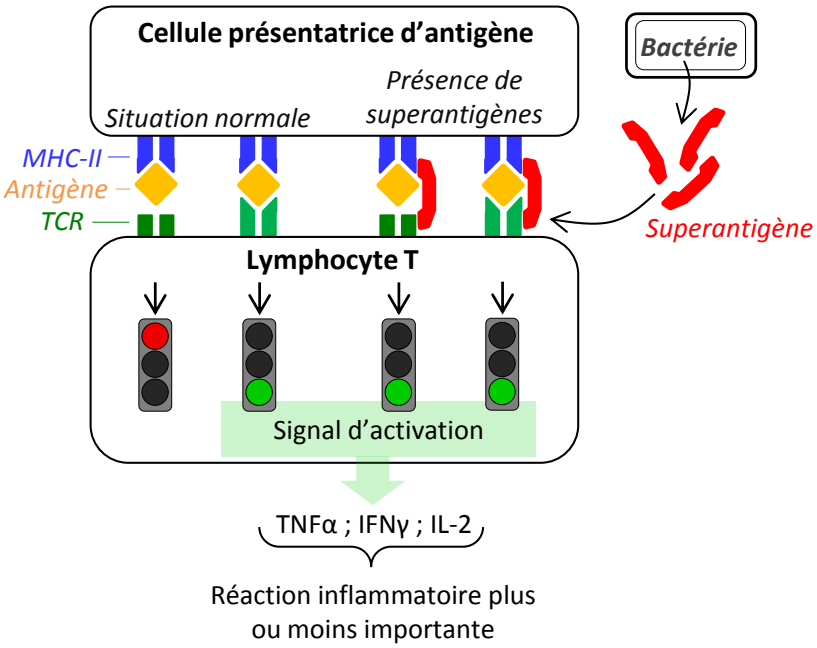


Figure 2 : Mode d'action des Superantigènes sur les cellules lymphocytaires

Une infime quantité de toxine est suffisante pour induire une réaction immunitaire. Cette réponse immunitaire peut être extrêmement forte et conduire à un choc toxique, pouvant être fatal pour l'individu infecté, comme lors de la production de la toxine TSST-1 (Toxic Shock Syndrome Toxin-1) par *Staphylococcus aureus* (Cameron *et al.*, 2001).

◊ *Les cytolysines*

Les cytolysines sont des toxines agissant sur les membranes des cellules eucaryotes, afin de provoquer leur lyse. Différents types de cytolysines peuvent être distingués. Certaines d'entre elles déstabilisent la membrane grâce à leur action sur les phospholipides ou sur les régions hydrophobes.

Par exemple, la phospholipase produite par *Clostridium perfingens*, nommée Toxine α, hydrolyse les phospholipides membranaires, entrainant une dégradation de la membrane plasmique et une mort de la cellule eucaryote (Urbina *et al.*, 2011). D'autres cytolysines, vont pouvoir s'insérer dans la membrane eucaryote afin de former un pore, entraînant la lyse de la membrane. De nombreuses bactéries produisent ce type de toxine, parmi lesquelles se trouvent la Toxine α (ou Hemolysine α) produite par *Staphylococcus aureus*, la Listeriolysine O de *Listeria monocytogenes*, la Streptolysine O de *Streptococcus pyogenes*, la toxine vacuolisante VacA produite par *Helicobacter pylori (H. pylori)*, et bien d'autres. La formation de ces pores, dans certains cas au niveau de la membrane plasmique (ex : Hemolysine α), entraîne une perturbation de l'influx et d'efflux d'ions, modifiant la réponse cellulaire ou entraînant sa mort (Nagamatsu et al., 2015; Söderblom et al., 2002). Certaines toxines comme la Listeriolysine O et VacA, peuvent également s'assembler au niveau des membranes des vacuoles intracellulaires, afin de permettre aux bactéries et/ou toxines contenues d'être libérées dans le cytoplasme (Cover and Blanke, 2005; Hamon *et al.*, 2012). Enfin, des toxines comme VacA peuvent former des pores au niveau de l'appareil de Golgi, entrainant un relargage de cytochrome C et déclenchant un mécanisme de mort cellulaire par apoptose (Cover and Blanke, 2005).

◊ *Les toxines de type AB*

Les toxines de type AB sont constituées de deux composantes. Une composante A, responsable de l'activité catalytique et une composante B, régulatrice, chargée de l'interaction de la toxine avec la cellule eucaryote (Odumosu et al., 2010). Les deux sous-unités sont essentielles à l'action toxique. De plus, l'activité enzymatique de la partie A n'est active que lorsqu'elle est détachée de la partie régulatrice B. La synthèse et la sécrétion des deux sous-unités peut être liée ou séparée.

- *Composantes au sein d'une seule et même protéine*

Dans certain cas, les composantes A et B sont synthétisées par la bactérie sous forme d'une seule protéine, qui sera séparée en deux parties suite à l'action d'une ou plusieurs protéase(s) dans la cellule eucaryote.

Une de ces toxines bien caractérisée est la toxine diphtérique, produite par *Corynebacterium diphtheriae* (Simon *et al.*, 2014). En effet, une forme catalytiquement inactive de la toxine diphtérique est produite par la bactérie sous forme d'un unique polypeptide. Après sa sécrétion par la bactérie, la

partie B de la protéine interagit avec un récepteur spécifique de la membrane plasmique eucaryote, entraînant son endocytose. Une fois dans l'endosome, une partie hydrophobe de la toxine s'insère dans la membrane de l'endosome afin de transloquer la partie A du coté cytoplasmique, où elle sera clivée par une protéase spécifique. Etant détachée de la composante B, la partie A de la toxine est active et peut exercer son activité catalytique. Dans les cellules eucaryotes, la composante A va inactiver le facteur d'élongation 2 (EF-2), inhibant la synthèse protéique et conduisant à la mort de la cellule eucaryote (Simon *et al.*, 2014). De nombreuses bactéries produisent des toxines possédant un mécanisme similaire, dont *Clostridium botulinum* avec la toxine botulique (Rowland, 2002), *Clostridium tetani* avec la Tetanospasmine (Ahaduzzaman, 2014), ou encore *Shigella dysenteriae* qui produit la Shiga-toxine (Johannes and Römer, 2010).

- *Composantes synthétisées et sécrétées indépendamment*

Dans le cas présent, les composantes A et B de la toxine sont au moins deux protéines synthétisées et sécrétées de façon indépendante par la bactérie. Ce n'est qu'au niveau de la membrane de la cellule eucaryote que les deux parties vont interagir afin de pouvoir injecter la sous-unité A dans la cellule hôte. Une des toxines appartenant à cette catégorie est la toxine de l'anthrax produite par *Bacillus anthracis* (Rasko and Sperandio, 2010; Liu *et al.*, 2014). Il s'agit d'une toxine de type A_2B, constituée de deux protéines catalytiques : le facteur létal (FL) et le facteur œdémateux (FE), et d'une protéine régulatrice : l'antigène protecteur (AP). Dans le cas de l'anthrax, la production de cette toxine est essentielle et responsable de la pathogénicité de la bactérie. Après leur synthèse et leur sécrétion par la bactérie, les protéines AP interagissent avec la membrane de la cellule hôte, où elles s'assemblent sous forme d'homo-heptamères ou octamères. Les protéines AP assemblées sous forme d'anneau vont pouvoir interagir avec trois ou quatre protéines FL et/ou FE. L'oligomère est alors internalisé par endocytose. Dans l'endosome, l'acidification de la vacuole entraîne une conversion de l'oligomère en canal. Les protéines FL et/ou FE peuvent ainsi sortir de l'endosome pour être relarguées dans le cytoplasme, où elles exercent leur activité catalytique. La protéine FL inactive les protéines MEKs (Mitogen-activated protein kinase kinases) qui ne pourront plus activer les voies des MAPKs (Mitogen-activated protein kinases). Les voies des MAPKs étant impliquées dans la prolifération cellulaire et la survie cellulaire, leur inactivation conduit à la mort de la cellule. Concernant la protéine FE, il s'agit d'une adénylate cyclase qui, une fois dans le cytoplasme, produit de l'Adénosine monophosphate cyclique (AMPc), un second messager intra-cellulaire, à partir d'adénosine triphosphate (ATP) (Rasko and Sperandio, 2010; Liu *et al.*, 2014). L'augmentation

d'AMPc va activer les voies dépendantes des protéines kinases A (PKA) ainsi que celles dépendantes des protéines d'échange activées par l'AMPc, Epac (Exchange protein activated by cAMP). Ces voies sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires, dont la régulation du métabolisme lipidique, du sucre, etc. Toutefois, la relation entre la variation d'AMPc causée par FE et les dommages induits par ce facteur sur les cellules, reste à ce jour mal caractérisée.

- *Composantes synthétisées indépendamment, associées en holotoxine au sein de la bactérie*

Le dernier type de toxines AB concerne les toxines dont les composantes A et B sont produites séparément et s'assemblent dans la bactérie, grâce à des liaisons non-covalentes. L'holotoxine est ensuite sécrétées et va pouvoir interagir avec la cellule hôte. Parmi ces toxines se trouvent la toxine cholérique (de type AB_5) produite par *Vibrio cholerae* (Clemens *et al.*, 2011), la toxine Pertussique (AB_5) produite par *Bordetella Pertussis* (Melvin *et al.*, 2014), et la toxine typhoïde (A_2B_5) produite par *Salmonella enterica* serovar typhi (*S. enterica* serovar Typhi ou *S.* Typhi) (Song *et al.*, 2013). Une autre toxine appartenant à ce groupe est la Cytolethal Distending Toxin (CDT) (Dirienzo., 2014). Cette toxine est de type AB_2 et a la particularité, contrairement aux exotoxines décrites précédemment, d'être produite par de nombreuses souches bactériennes Gram négatives.

Au cours de ma thèse je me suis particulièrement intéressée à l'étude de l'activité de la toxine CDT produite par *Escherichia coli (E. coli)* ainsi qu'à ses effets sur les cellules eucaryotes. Dans la suite de ce manuscrit, je présenterai les particularités des toxines AB, grâce à l'exemple détaillé de CDT. J'y évoquerai également le cas particulier de la toxine typhoïde.

II. La Cytolethal Distending Toxin

Un chapitre de livre décrivant précisément les toxines CDTs, leur production, leur sécrétion, et leurs effets, autant cellulaires que dans la pathogénicité des bactéries qui les produisent, est inséré à la fin de cette partie I. En voici un court résumé.

1) Bactéries produisant CDT : importance dans la pathogénicité

La toxine CDT a été découverte à partir d'isolats cliniques de patients souffrant de diarrhées

causées par une infection à *E. coli* (Johnson and Lior, 1988). Par la suite, de nombreuses souches bactériennes pathogènes Gram négatives ont été identifiées comme productrices de CDT. Parmi les plus connues se trouvent *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans (A. actinomycetemcomitans)*, *Haemophilus ducreyi (H. ducreyi)*, *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter sp*., *Helicobacter sp*. et *S. enterica* serovar typhi. Plusieurs études *in vivo* ont montré que la toxine CDT est un facteur de virulence, jouant un rôle plus ou moins important dans la pathogénicité des bactéries qui la produisent (Ge *et al.*, 2008). En effet, la toxine CDT est essentielle pour que *Helicobacter hepaticus* et *Campylobacter jejuni* colonisent durablement le système gastro-intestinal et induisent une inflammation sévère des muqueuses ou du foie, dans un modèle murin (Jain *et al.*, 2008). De même, l'expression de CDT par *Helicobacter hepaticus* stimule le développement d'infections hépatiques et l'apparition de nodules dysplasiques hépatiques dans des souris immunocompétentes (Ge *et al.*, 2007). L'importance de la production de CDT dans la pathogénicité va varier suivant la souche bactérienne productrice. Un point commun, retrouvé, quel que soit le cas, est l'endommagement et la déstabilisation de la barrière épithéliale, permettant ainsi aux bactéries d'infecter le tissu. Une analyse détaillée de l'implication de CDT dans les différentes pathologies associées est publiée dans le chapitre 6 du livre « Prokaryotes » des éditions NOVA Science (Bezine *et al.*, 2015). Cette analyse a été réalisée grâce à un regroupement entre les données *ex vivo* et *in vivo* publiées sur CDT et les données cliniques des différentes pathologies.

2) Synthèse et sécrétion de CDT

Comme présenté précédemment, CDT est une holotoxine tripartite, de type AB_2. Elle est constituée de deux sous-unités régulatrices, nommées CdtA et CdtC ; et d'une sous-unité catalytique, CdtB (Nesić *et al.*, 2004). L'expression des trois sous-unités est essentielle à l'activité cytotoxique de CDT, chacune jouant un rôle crucial dans le processus conduisant à l'action de CdtB dans la cellule hôte.

Les gènes codant pour ces trois sous-unités sont organisés en opéron. CdtA, CdtB et CdtC sont produites de façon indépendante dans le cytoplasme de la bactérie, avant d'être transloquées dans le périplasme. C'est dans le périplasme, et suite à des actions protéolytiques, que les sous-unités vont s'assembler pour former l'holotoxine CDT (Ueno *et al.*, 2006). Deux modes de sécrétion de CDT ont été caractérisés à ce jour. En effet, CDT peut être sécrétée directement dans le milieu extracellulaire (Zijnge *et al.*, 2012) ou bien, à l'intérieur de vésicules membranaires bactériennes appelées OMVs

(Outer Membrane vesicles) (Berlanda Scorza *et al.*, 2008).

3) Internalisation dans les cellules eucaryotes : différents moyens pour un même but

Lorsque CDT est sécrétée par l'intermédiaire d'OMVs, ce sont les vésicules qui interagissent avec la cellule hôte, avant de fusionner et de relarguer la toxine CDT dans le cytoplasme. Dans le cas où l'holotoxine est sécrétée dans le milieu extracellulaire, ce sont les sous-unités CdtA et CdtC qui vont interagir avec la membrane de la cellule eucaryote et permettre à CDT d'être internalisée par un mécanisme d'endocytose (Lee *et al.*, 2003). Une fois dans la cellule, les différentes sous-unités se dissocient et seule la sous-unité catalytique CdtB est relocalisée au noyau, par un mécanisme de transport rétrograde du Réticulum Endoplasmique (RE) (Damek-Poprawa *et al.*, 2012).

4) Cas particulier de la toxine typhoïde

La toxine typhoïde est une toxine de type A_2B_5 produite par *S. enterica* serovar typhi. Elle est constituée d'une sous-unité régulatrice pentamérique PltB qui est l'homologue de la sous-unité régulatrice de la toxine Pertussique (Melvin *et al.*, 2014), et de deux sous-unités catalytiques : PltA, homologue de la sous-unité A de la toxine Pertussique et CdtB (Song *et al.*, 2013). L'expression d'une toxine typhoïde comportant une CdtB fonctionnelle, est essentielle à l'induction des symptômes de la fièvre typhoïde. En effet, des souris traitées avec une toxine possédant une CdtB catalytiquement inactive ne présentent pas de perte de poids significative et survivent après 15 jours de traitement, ce qui n'est pas le cas d'animaux traités avec la toxine sauvage (Song *et al.*, 2013). Ces résultats démontrent l'importance de CdtB dans l'action de la toxine typhoïde. Le mode de sécrétion de la toxine typhoïde est également un peu particulier. En effet, *S. enterica* serovar typhi est une bactérie intracellulaire. Ce n'est qu'une fois dans la cellule eucaryote que la bactérie va sécréter la toxine typhoïde. La toxine est ensuite exocytée, hors de la cellule eucaryote, avant d'interagir avec la membrane de celle-ci (ou d'une cellule voisine) et y être endocytée. Ce processus permet aux sous-unités A et B de la toxine d'être séparées et, ainsi, à CdtB d'être relocalisée au noyau par la voie de transport rétrograde du Réticulum endoplasmique (RE), comme dans le cas des autres CDTs (Spanò *et al.*, 2008).

5) Action et effets de CdtB dans les cellules eucaryotes

La plupart des toxines de type AB décrites possèdent une sous-unité catalytique qui influence les voies de signalisations cellulaires. Dans le cas de CDT, CdtB va induire directement des dommages à l'ADN qui entrainent l'activation de toute une cascade de voies de signalisations (Hassane *et al.*, 2003). Cet effet classe les CDTs dans la famille des génotoxines bactériennes.

Les dommages à l'ADN induits par CDT ainsi que les voies de signalisations activées sont décrites brièvement dans le chapitre de livre qui suit. Toutefois, une introduction détaillée sur les dommages à l'ADN en général et une description plus précise des connaissances sur les dommages induits par CDT sont données dans la partie II de ce manuscrit.

Chapitre publié chez NOVA Science Publisher

Bezine E, Vignard J, Mirey G. **(2014)**. Prokaryotes: Physiology, Biochemistry and Cell Behavior. Chapter 6: The effect of Cytolethal Distending Toxin from Gram-negative bacteria on mammalian cells. *NOVA Science Publisher*.

eBOOK

Prokaryotes

Editor : Marina Nisnevitch

CHAPITRE 6

Effects of the Cytolethal Distending Toxin from Gram-Negative Bacteria on Mammalian Cells

Bezine E., Vignard J., Mirey G. 2015. Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-63321-592-4

Le chapitre 6 du livre « Prokaryotes: Physiology, Biochemistry and Cell Bihavior » est en accès libre. Toutefois, les droits d'auteur et d'impression de ce document étant restreints (lecture seule autorisée), il ne peut être attaché à mon manuscrit de thèse.

Ce chapitre est téléchargeable sur le lien suivant :

https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=52973&osCsid=5c086307d4ddb51ff5cfbe6d8498ee99

PARTIE II

ETUDE DES DOMMAGES A L'ADN INDUITS PAR CDT

PARTIE II : Etude des dommages à l'ADN induits par CDT

I. Introduction

1) Les dommages à l'ADN et leurs prises en charge

L'ADN est le support de l'information génétique, essentiel à l'établissement des caractéristiques propres à la cellule. Toutefois l'ADN est fragile et une modification de sa séquence peut conduire à des phénotypes plus ou moins importants. Ainsi, des mutations du génome peuvent entraîner des effets, au niveau cellulaire, tissulaire ou même de l'organisme entier. Afin de préserver son information génétique, il est essentiel pour la cellule de détecter et signaler ces dommages. Pour cela les cellules eucaryotes possèdent un ensemble de mécanismes rassemblés sous l'appellation de réponse aux dommages à l'ADN, ou « DNA damage response » (DDR). La DDR est divisée en trois étapes : la reconnaissance du dommage, l'amplification du signal, et enfin l'activation de réponses cellulaires adaptées (Jackson and Bartek, 2009).

a) Les dommages à l'ADN et leurs responsables

Nos cellules subissent en permanence des endommagements de leur ADN. La source de ces dommages peut être : i) endogène, provenant du métabolisme cellulaire, d'évènements programmés (recombinaison méiotique ou VDJ), de stress inhérents au processus de réplication (erreurs de polymérases, régions difficiles à répliquer, collision avec la machinerie de transcription), ou bien ii) exogène, par des substances chimiques (agents clastogènes, alkylants, adduits, etc.), physiques de l'environnement (rayonnements ultraviolets (UVs), radiations ionisantes), ou enfin par des agents pathogènes (protéines virales, mycotoxines ou toxines bactériennes). Suivant la source génotoxique impliquée, les dommages induits peuvent être de différents types (Figure 3) (Hoeijmakers, 2001; Hühn *et al.*, 2013).

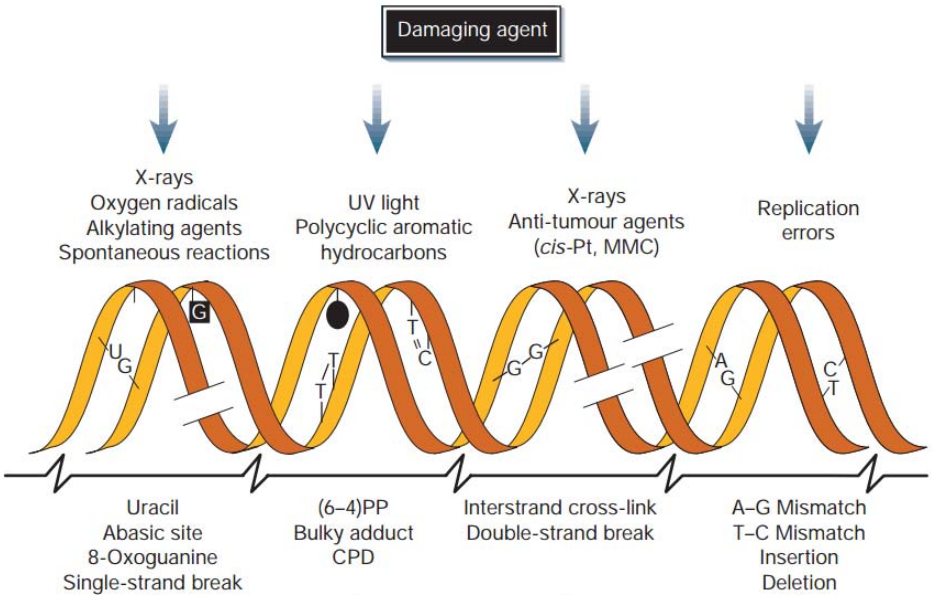


Schéma adapté de Hoeijmakers., 2001

Figure 3 : Les dommages à l'ADN et leurs responsables

Ce schéma publié par Hoeijmakers en 2001 représente les différents types de dommages pouvant altérer l'ADN. Sont représentés de gauche à droite : les modifications de bases (alkylation, oxydation, etc.), les cassures simple-brins (générées par les radiations ionisantes, des endonucléases, etc.), les adduits et les pontages intra-brins (générés par exemple par les UVs et les hydrocarbures aromatiques polycycliques), les pontages inter-brins (générés par le Cisplatine et la Mitomycine C), les cassures double-brins (générées par les radiations ionisantes, par des endonucléases, etc.), et enfin, les mésappariements de bases (générés suite à des erreurs des ADN Polymérases).

◊ *Les mésappariements de bases*

Un taux de dommage important est généré par le fonctionnement normal de la cellule lors de la réplication ou encore lors de la réparation des dommages à l'ADN. En effet, les ADN polymérases peuvent commettre des erreurs lors de l'insertion des bases dans l'ADN, générant ainsi un mésappariement de bases. Les cellules eucaryotes possèdent différentes polymérases : cinq ADN polymérases dites classiques, impliquées dans la réplication et la réparation par Base-Excision Repair (BER) ; et neuf polymérases dites « error-prone », moins fidèles, impliquées dans la synthèse trans-lésionnelle de l'ADN (système décrit dans la suite du manuscrit) (Tableau 1) (Gearhart and Wood, 2001; Loeb and Monnat, 2008; Jones and Petermann, 2012). Les mésappariements de bases sont réparés par Mismatch Repair (MMR).

Polymerase replicative	Gène	Fidélité	Fonction
Pol α	POLA1	$10^{-4} – 10^{-5}$	Synthèse des amorces ADN / ARN
Pol β	POLB	5.10^{-4}	Base Excision Repair
Pol γ	POLG1	$10^{-5} – 10^{-6}$	Réplication de l'ADN mitochondrial et Réparation
Pol δ	POLD1	$10^{-5} – 10^{-6}$	Réplication de l'ADN et Réparation
Pol ε	POLE	$10^{-6} – 10^{-7}$	Réplication de l'ADN et Réparation
Polymérase « Error-prone »	**Gène**	**Fidélité**	**Fonction**
Pol η	POLH	3.10-2	Synthèse trans-lésionnelle
Pol ι	POLI	3.10-1	Synthèse trans-lésionnelle
Pol κ	POLK	6.10-3	Synthèse trans-lésionnelle
Pol λ	POLL	-	Base Excision Repair, NHEJ
Pol μ	POLM	-	NHEJ
Pol θ	POLQ	-	Réparation de l'ADN (Alt-NHEJ)
Pol ζ	POLZ	5.10-4	Synthèse trans-lésionnelle
Rev 1	REV1	-	Synthèse trans-lésionnelle
Pol ν	POLN	-	Inconnu

Tableau 1 : Liste des ADN Polymérases eucaryotes classiques et « error-prone »

◊ *Les modifications ou délétions de bases*

Les altérations de bases peuvent être des modifications chimiques des bases de l'ADN ou simplement des pertes de ces dernières. Concernant les modifications de bases, le type de modification et sa localisation varient suivant la source génotoxique. Il peut s'agir de dommages oxydatifs ou alkylants (Figure 4).

L'alkylation d'une base consiste dans le transfert d'un groupement alkyle (CH3) au niveau de la base d'ADN, conduisant ainsi à une augmentation du nombre de molécule de carbone de cette dernière (Figure 4a) (Hanssen-Bauer *et al.*, 2012). De par leur action génotoxique, de nombreux agents alkylants sont utilisés en traitement anticancéreux, comme les moutardes azotées (Chlormétine, Chlorambucil, etc.) (Puyo *et al.*, 2014). Une autre modification fréquente des bases est l'oxydation par des espèces réactives de l'oxygène (O_2^-, H_2O_2, NO, etc.) produites par le métabolisme cellulaire ou encore par des radiations ionisantes. L'oxydation est l'ajout d'un atome d'oxygène ou le transfert d'un électron au niveau de la base de l'ADN (Figure 4a) (Hanssen-Bauer *et al.*, 2012; Swift and Golsteyn, 2014). Cette modification peut entrainer, par exemple, la formation de thymidine glycol ou bien la transformation d'une guanine en 8-oxoguanine (8-oxoG), qui peut s'apparier avec une adénine dans la double-hélice d'ADN, créant ainsi un dimère de pyrimidine.

Enfin, les bases peuvent être hydrolysées, spontanément ou par des enzymes telles que des nucléases et des glycosylases. L'hydrolyse entraîne la disparition d'une liaison hydrogène conduisant au détachement de la base (formation d'un site abasique) ou à la séparation des molécules de sucre et de phosphate lorsque la liaison phosphodiester est ciblée (formation d'une cassure simple-brin ou CSB) (Figure 4b) (Caldecott, 2008). La majorité de ces dommages sont réparés par Base-Excision Repair (BER).

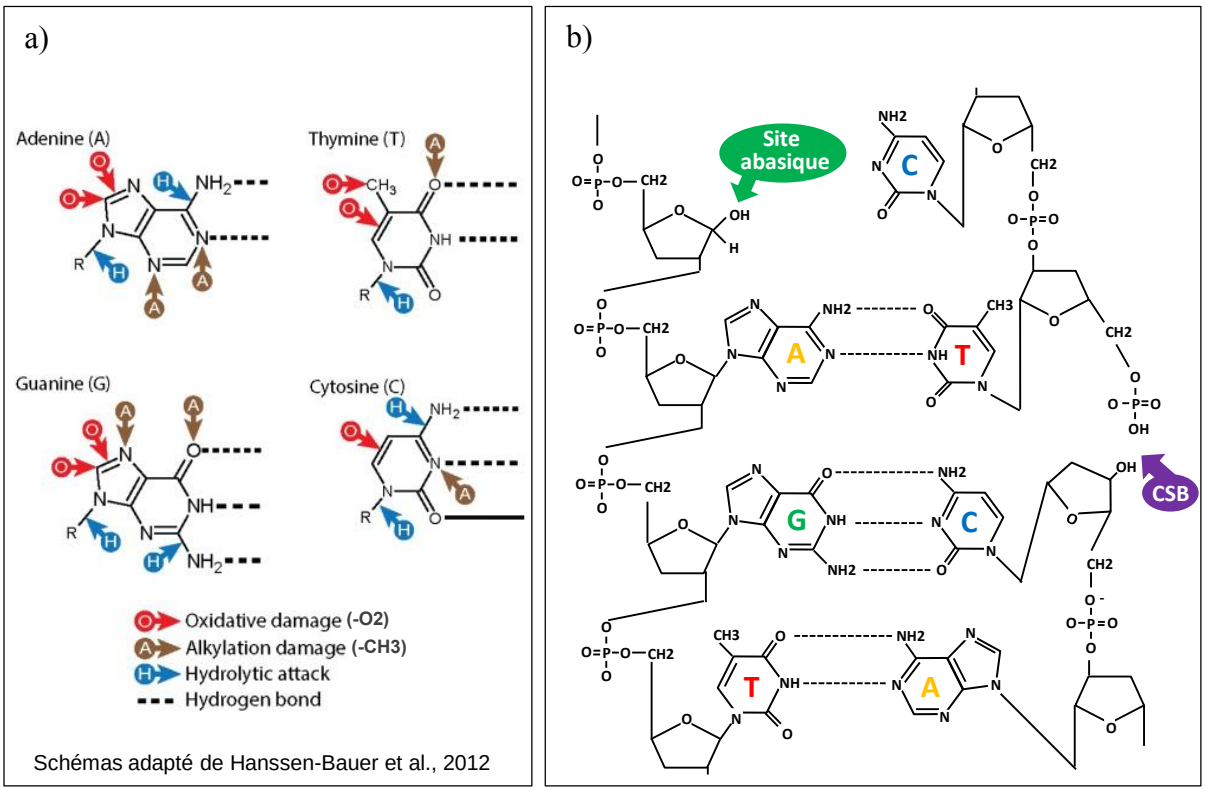


Figure 4 : Lésions de l'ADN par des agents a) alkylants, oxydants ou b) clastogènes

◊ *Les dommages encombrants*

L'ADN peut également subir des dommages dits encombrants par formation de liaisons covalentes impliquant une ou plusieurs bases d'un même brin. Il peut s'agir de dimères de pyrimidines, de pontages intra-brin (entre deux bases d'un même brin d'ADN), ou encore d'adduits à l'ADN (Figure 3) (Hoeijmakers, 2001). Une des principales sources d'induction de dimère de pyrimidines sont les UVs. Les pontages intra-brin et les adduits peuvent être générés par des sources

endogènes ou exogènes. Des exemples bien caractérisés sont les aflatoxines produites par certains champignons, le Cisplatine (molécule utilisée en chimiothérapie), et les acétaldéhydes, molécules mutagènes retrouvées dans le tabac et sous une forme volatile dans la fumée de cigarette (Wang *et al.*, 2000). Ce type de lésion étant localisé sur le même brin d'ADN, la réparation nécessite la prise en charge d'un seul brin d'ADN, par remplacement des nucléotides endommagés. Ces dommages sont réparés par Nucleotide Excision Repair (NER).

◊ *Pontages inter-brin*

Les pontages inter-brin peuvent également être induits par le Cisplatine, mais aussi par la Mitomycine C (MMC) ou par des agents alkylants comme les moutardes azotées (Swift and Golsteyn, 2014). Contrairement aux pontages intra-brin, dans le cas de pontages inter-brins, la liaison est réalisée entre deux bases situées sur les brins opposés. Les deux brins d'ADN ne pouvant se séparer, ce type de lésion représente un blocage strict à la réplication et la transcription. Il est donc primordial de les réparer. Toutefois, les deux brins d'ADN sont endommagés, ce qui implique qu'il n'y a pas de brin intact pouvant servir de matrice aux mécanismes de réparation. Ce type de dommages sera pris en charge par la voie de l'Anémie de Fanconi (FA).

◊ *Cassures double-brins de l'ADN*

Les sources de cassures double-brins (CDBs) sont nombreuses. Elles peuvent être formées par des radiations ionisantes, des molécules radiomimétiques, des radicaux libres de l'oxygène, ou encore suite à la réplication de molécules d'ADN endommagées. Les CDBs représentent un clivage des deux brins d'ADN. Il s'agit d'une des lésions les plus dangereuses pour la cellule, car elle ne laisse aucun des brins complémentaires intacts, pouvant servir de matrice à la réparation. S'il n'est pas réparé, ce type de dommage est létal pour la cellule (Bennet *et al.*, 1993). Toutefois, une mauvaise réparation peut conduire à des mutations ou des translocations chromosomiques, facteurs favorisant la cancérogénèse (Hanahan and Weinberg, 2011).

Suivant la source génotoxique, différents types de CDBs peuvent être induites. Ainsi, des CDBs directes ou indirectes, présentant une extrémité franche, ou une extrémité 3' ou 5' sortante, peuvent être formées par certaines enzymes. Enfin, des CDBs peuvent également être générées lors de la réplication. En effet, lors de la phase S, les dommages non réparés vont soit bloquer la fourche de

réplication, soit être « contournés », pouvant ainsi conduire à l'insertion de mutations (cas des modifications de bases et de certains adduits) (Vermeij *et al.*, 2014). Les dommages bloquant les fourches de réplication, incluent les modifications de bases, les CSBs, les dommages encombrants, et les pontages inter-brins, décris précédemment dans ce chapitre. De plus, la réplication peut également être bloquée en absence de dommages, lors d'une diminution du pool de nucléotide, d'un ralentissement au niveau de régions difficiles à répliquer, de la présence de structures secondaires d'ADN simple-brin ou d'une collision avec la machinerie de transcription. Ces stress réplicatifs perturbent la progression de la fourche de réplication et peuvent conduire à son arrêt. Si le blocage de la machinerie de réplication persiste, alors un désassemblage de cette dernière peut être amorcé, conduisant à un effondrement des fourches et à la génération d'une CDB à une seule extrémité (la seconde extrémité n'étant pas encore synthétisée par la machinerie de réplication) (Caldecott, 2008; Brandsma and Gent, 2012; Cannan and Pederson, 2015). En partant de ce principe, dans des cellules proliférantes, les dommages qui ne sont pas réparés avant le passage de la machinerie de réplication peuvent dégénérer en CDBs. Dans ces cellules, les CDBs peuvent donc être considérées comme un état final de tout dommage non réparé.

Pour faire face à ces CDBs de diverses origines, plusieurs systèmes de réparation peuvent être activés dont le mécanisme de Recombinaison Homologue (HR), le mécanisme de Jonction des Extrémités Non-Homologues (NHEJ), ainsi que des voies alternatives comme le NHEJ Alternatif (Alt-NHEJ).

b) Détection et signalisation des dommages

Suite à l'induction de dommages, un signal d'alarme est tiré à l'attention des mécanismes de régulation du cycle cellulaire, de réparation des dommages et des systèmes de survie/mort cellulaire. La signalisation du dommage se fait en plusieurs étapes successives. Tout d'abord la lésion ou l'altération de la chromatine est reconnue par des protéines senseurs, capables de détecter spécifiquement certains types de dommages. Ces protéines activent ensuite des protéines de signalisation, les Ser/Thr kinases apparentées à la Phosphoinositide 3-kinase (PI-3Ks), qui activent à leur tour des protéines amplificatrices du signal et activent différentes réponses cellulaires (Jackson and Bartek, 2009). Deux voies majoritaires de signalisation sont impliquées en réponse aux dommages à l'ADN : la voie ATR-CHK1 et la voie ATM-CHK2.

◊ *Activation de la voie ATR-CHK1*

La voie ATR-CHK1 est activée lors de la présence de régions d'ADN simple-brins. Ces régions peuvent être générées suite à un blocage de la fourche de réplication ou bien lors de certains processus de réparation (BER, HR, NER). L'ADN simple-brin est spécifiquement reconnu par la protéine RPA (Replication Protein A) (Alani *et al.*, 1992; Sugiyama *et al.*, 1997), qui recouvre cette région afin de la stabiliser et de la protéger. RPA va également recruter et activer, la kinase ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related protein), kinase essentielle apparentée à PI3K, *via* la protéine ATRIP (ATR interacting protein) (Zou and Elledge, 2003). La cible majoritaire de ATR est la protéine kinase CHK1. ATR active CHK1 par phosphorylation des sérines 317 et 345, considérées comme des marqueurs de l'activation de CHK1 et donc de la voie ATR-CHK1 (Walker et al., 2009; Zhao & Piwnica-Worms, 2001). Une fois activée, CHK1 phosphoryle des régulateurs du cycle cellulaire, entraînant une activation des points de contrôles du cycle cellulaire.

◊ *Activation de la voie ATM-CHK2*

Dans le cas de CDBs de l'ADN, le dommage est détecté par le complexe MRN, composé des protéines MRE11, RAD50 et NBS1 (Petrini, John and Stracker, Travis, 2003; Lafrance-Vanasse *et al.*, 2015). La kinase ATM est alors recrutée au niveau du dommage (Lee and Paull, 2005), où elle va s'activer par autophosphorylation. ATM phosphoryle par la suite diverses protéines (Matsuoka *et al.*, 2007), dont H2AX, un variant de l'histone H2A. Sous sa forme phosphorylée, cette histone est alors appelée γH2AX (Bonner *et al.*, 2008). La phosphorylation de H2AX se propage jusqu'à plusieurs mégabases autour du site de cassure (Burma et al., 2001), permettant l'amplification du signal de dommage. Parallèlement, ATM active deux autres cibles majoritaires : l'effecteur CHK2 et la protéine transductrice p53. CHK2 phosphoryle divers substrats, dont p53 et les phosphatases régulatrices du cycle cellulaire, entraînant un arrêt du cycle en phase G1/S ou G2/M.

Les voies ATM-CHK2 et ATR-CHK1, décrites ici comme deux voies distinctes et parallèles, composent en réalité, un système plus complexe. Tout d'abord, l'activation simultanée des deux voies pour un même dommage est possible. Par exemple, suite à l'induction d'une CDB, la voie ATM est activée. Cependant, lors de la réparation de ce dommage, un fragment d'ADN simple-brin peut être formé, conduisant à l'activation de la voie ATR (Jazayeri *et al.*, 2006). De même, lors d'un stress réplicatif, la voie ATR-CHK1 est activée. Or, un effondrement des fourches de réplication peut

conduire à la formation d'une CDB, qui sera signalée par la voie ATM-CHK2 (Feng *et al.*, 2011). Ensuite, des connections entre les deux voies existent. En effet, ATM peut phosphoryler CHK1 en présence de CDBs (Gatei *et al.*, 2003), et ATR est capable de phosphoryler CHK2, mais également H2AX (Pabla *et al.*, 2008). De plus, un effecteur important et commun des voies ATR et ATM est p53. p53 est un gène suppresseur de tumeur ou anti-oncogène, codant pour un facteur de transcription. Il s'agit d'un acteur clé de la régulation cellulaire dont la mutation, conduisant à son inactivation, est retrouvée dans plus de la moitié des cancers. Après son activation par phosphorylation, p53 stimule la transcription de gènes cibles, codant pour des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dommages, ou encore la mort cellulaire par apoptose (Vousden and Lane, 2007).

c) Le cycle cellulaire et sa régulation en présence de dommages

Le cycle cellulaire eucaryote est constitué de quatre phases qui s'enchainent et se succèdent de façon dépendante (Figure 5) (Malumbres and Barbacid, 2009). La première phase, G1, est une étape de croissance cellulaire et de synthèse protéique. Il s'agit de l'étape la plus longue du cycle cellulaire et qui varie le plus d'une lignée cellulaire à l'autre. Suite à la phase G1, les cellules entrent en phase S, qui est l'étape où s'effectue la réplication de l'ADN. A la fin de la phase S, les cellules entrent dans la phase G2, qui est une période de transition entre la fin de la réplication et la dernière étape du cycle : la phase M (mitotique). C'est au cours de cette phase M, qu'est réalisée la division cellulaire, elle-même divisée en 4 sous-étapes : prophase, métaphase, anaphase et télophase. Une cinquième étape particulière du cycle cellulaire peut être distinguée. Il s'agit de la phase appelée G0, pendant laquelle les cellules ne se divisent pas et sont quiescentes. Ces cellules peuvent entrer dans le cycle cellulaire, en G1, suite à la stimulation par des facteurs de croissance.

La progression dans le cycle cellulaire est extrêmement contrôlée (Figure 5) (Malumbres and Barbacid, 2009). La présence d'une lésion à l'ADN non détectée ou non signalée peut conduire à la mort de la cellule ou à une mauvaise séparation des chromosomes, conduisant à la formation de cellules aneuploïdes ou possédant des aberrations chromosomiques. Une prolifération incontrôlée est d'ailleurs une caractéristique majeure des cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011). Les cellules eucaryotes possèdent plusieurs points de contrôle, dont l'activation entraîne l'arrêt de la progression dans le cycle cellulaire. Ainsi, en présence de dommages à l'ADN, l'activation des voies ATR-CHK1 et ATM-CHK2 entraîne l'activation de protéines inhibitrices du cycle cellulaire qui vont arrêter les cellules au niveau de la fin de la phase G1 ou en fin de phase G2 (Beamish *et al.*, 1996; Liu

et al., 2000; Aleem and Arceci, 2015). Un point de contrôle en phase S, en réponse aux dommages à l'ADN, existe également. Toutefois, un blocage de la réplication dans sa totalité étant extrêmement délétère pour la cellule, l'activation de ce point de contrôle conduit à un ralentissement de la réplication et non à un arrêt des cellules en phase S (Seiler *et al.*, 2007). Enfin, un dernier point de contrôle est présent en phase M, pendant la métaphase. La métaphase est l'étape durant laquelle les chromosomes condensés s'alignent sur la plaque métaphasique, juste avant la séparation des chromatides sœurs lors de l'anaphase. Lorsque les chromosomes sont alignés, des protéines de contrôles vérifient que les kinétochores des chromosomes sont bien attachés et que la répartition des chromatides entre les deux cellules filles va pouvoir se faire de manière équitable (Musacchio and Salmon, 2007; Holland and Cleveland, 2009). Les protéines régulatrices du cycle cellulaire modulées par les voies ATR-CHK1 et ATM-CHK2 sont décrites et détaillées dans la revue publiée dans le journal *Cells*, insérée à la fin de cette partie (Bezine *et al.*, 2014).

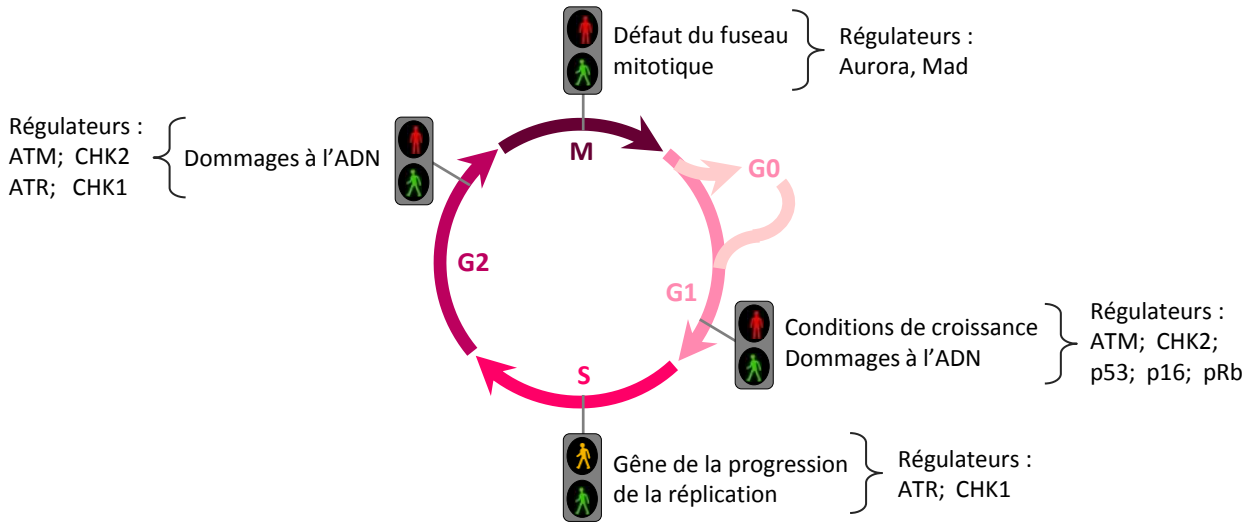


Figure 5 : Le cycle cellulaire et sa régulation

Dans certains cas, les points de contrôles peuvent être affaiblis, notamment lors de la perte de fonction d'une protéine impliquée dans ce contrôle. Une des protéines essentielle au maintient de ces points de contrôles est la protéine p53. En effet, des cellules déficientes pour p53 peuvent survivre, contourner les points de contrôle, et progresser dans le cycle, malgré la persistance de dommages à l'ADN (Bunz *et al.*, 1998). Ceci a pour conséquence l'absence d'un blocage en phase G1 et un blocage partiel en phase G2. Ainsi, les cellules qui évitent le point de contrôle G1 seront par la suite bloquées, au moins partiellement, à la transition G2/M. Cependant, dans le cas d'un contournement du point de

contrôle G2, les cellules entrent en mitose où elles s'arrêtent au point de contrôle métaphasique. En présence de CDBs, les chromosomes ne peuvent pas s'aligner correctement. Des figures mitotiques anormales et des micronoyaux, seront alors formés (Moran *et al.*, 2008). Ces données illustrent l'importance pour les cellules de posséder des voies de signalisation et de réparation des dommages fonctionnelles.

d) Les voies de réparations des dommages à l'ADN

En plus de moduler la progression dans le cycle cellulaire, les voies de réponse aux dommages activent des mécanismes de réparation spécifiques.

◊ *Ribonucleotide Excision Repair and Mismatch Repair*

Lors de la réplication de l'ADN, les ADN polymérases peuvent commettre des erreurs (Tableau 1) (McCulloch and Kunkel, 2008). Il peut s'agir de l'insertion d'un ribonucléotide (rNTP) ou bien d'un mauvais désoxyribonucléotide (dNTP). Respectivement, ces lésions sont réparées par Ribonucleotide Excision Repair (RER) et par Mismatch Repair (MMR).

Le RER consiste en deux étapes : le clivage du rNTP par la RNase H2, suivi de la synthèse de l'ADN manquant par les polymérases de la réplication (Reijns *et al.*, 2012). Le MMR suit un processus similaire. Tout d'abord le mésappariement est reconnu par le complexe protéique hMutSα (si le dommage est sur un ou deux nucléotides) ou par le complexe hMutSβ (en cas d'endommagement de plus de 2 nucléotides). Le complexe hMutLα ainsi que la protéine EXO1 sont ensuite recrutés, afin d'exciser la zone endommagée. Les polymérases de la réplication peuvent, dans une étape finale, synthétiser l'ADN manquant (Kolodner, 1996).

◊ *Trans-lesion Synthesis*

En cas d'un blocage de la fourche de réplication causé par la présence d'une base modifiée ou d'un adduit, un redémarrage de la synthèse peut s'effectuer grâce à un mécanisme de synthèse trans-lésionnelle (TLS). Lors de la TLS, les ADN polymérases classiques sont remplacées par des polymérases trans-lésionnelles. Ces dernières sont moins strictes dans la reconnaissance des bases d'ADN et peuvent ainsi continuer la réplication, malgré la présence du dommage. Toutefois, la TLS

utilisant des polymérases moins fidèles que celles de la réplication classique (Gearhart and Wood, 2001; Loeb and Monnat, 2008), elle peut induire l'insertion d'une mauvaise base et ainsi générer une mutation. Après la lecture et la réplication du dommage, les polymérases classiques reprennent donc le relais (Jones and Petermann, 2012). Le mécanisme de TLS ne permet pas de réparer le dommage, seulement de le contourner et de redémarrer la réplication. Les dommages persistant devront être pris en charge dans un second temps, par un autre mécanisme de réparation post-réplicatif.

◊ *Nucleotide Excision Repair*

En présence de dommages encombrants, d'adduits, une distorsion de la double hélice d'ADN est formée. Ces lésions interfèrent avec l'appariement des bases et bloquent la transcription et la réplication. La voie du NER est composée de deux « sous-voies », activées en fonction du statut transcriptionnel de la zone endommagée (Figure 6).

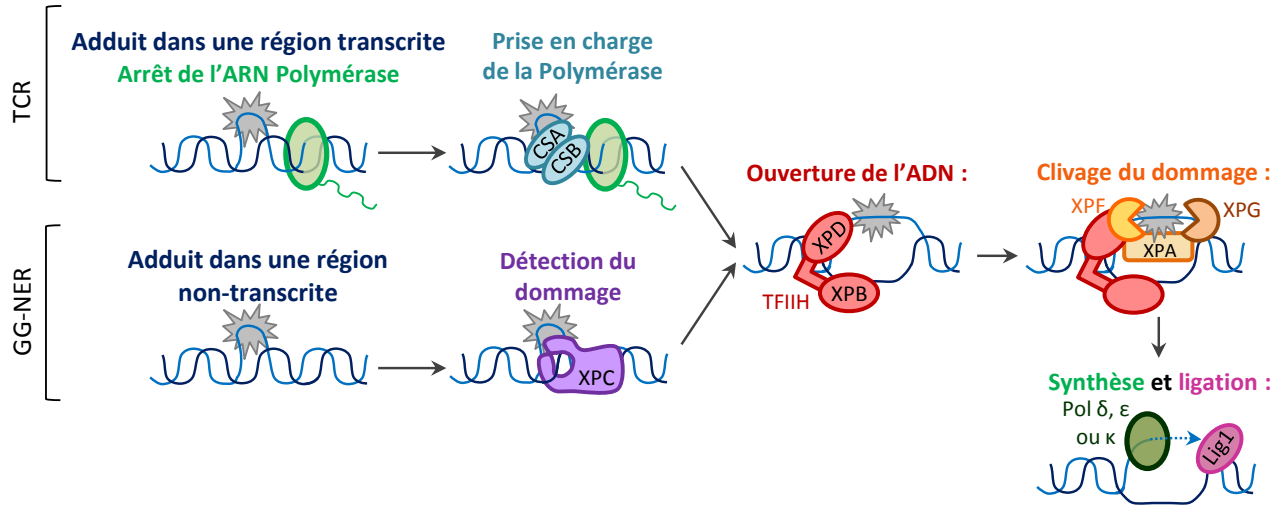


Figure 6 : Modèle de la réparation d'adduits à l'ADN par NER

La voie communément connue du NER (Global Genome NER ou GG-NER) a lieu dans les régions non transcrites et est dépendante de la reconnaissance du dommage par la protéine XPC (Hoogstraten *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2015). A l'opposé, dans les régions transcrites, c'est la voie appelée TCR (Transcription Coupled Repair) ou TC-NER (Transcription Coupled NER) qui intervient

(Fousteri and Mullenders, 2008). Dans ce cas, l'initiation s'effectue lorsque les polymérases transcriptionnelles se bloquent au niveau du dommage. Les facteurs CSB et CSA sont alors recrutés et déplacent les polymérases afin de rendre le dommage accessible aux enzymes de la réparation (Fousteri and Mullenders, 2008). A partir de là, les étapes des deux sous-voies sont communes (Figure 6). Le complexe TFIIH (Transcription Factor II Human), constitué de dix protéines (dont les hélicases XPB et XPD, importantes dans l'ouverture de l'hélice d'ADN au niveau du dommage), est recruté au niveau du dommage (Volker *et al.*, 2001; Riedl *et al.*, 2003). Une fois accessible, les nucléases XPG et XPF guidées par la protéine XPA clivent de part et d'autre de la zone encombrée (Volker *et al.*, 2001; Zotter *et al.*, 2006). Enfin, l'ADN manquant est synthétisé par des ADN Polymérases (δ, ε ou κ) et religué par l'ADN Ligase I (ou III dans les cellules quiescentes) (Hoeijmakers, 2001).

◊ *Base Excision Repair*

Le BER prend en charge les dommages de type modification de bases. Ces dommages peuvent ou non bloquer la transcription et la réplication, mais ils peuvent surtout entrainer une mauvaise lecture et donc générer des mutations.

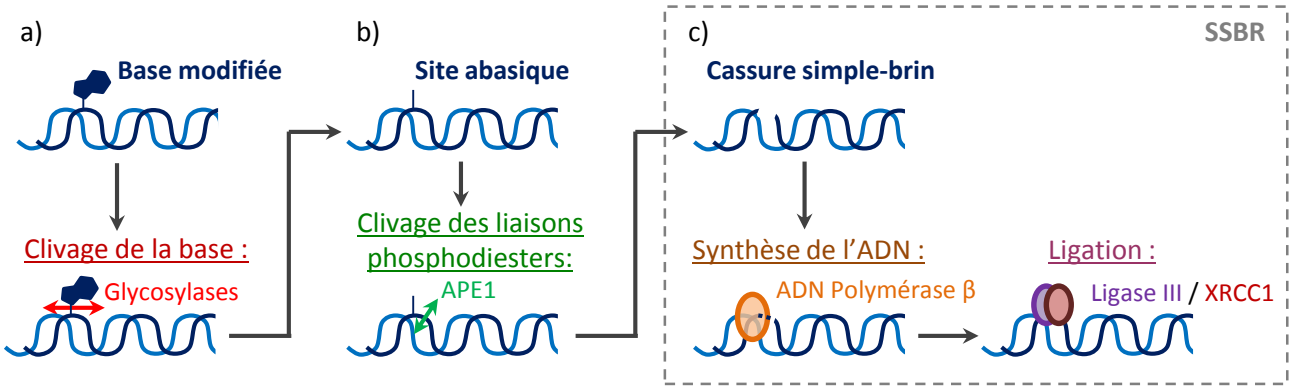


Figure 7 : Modèle de réparation de bases modifiées par BER

La voie du BER peut être divisée en 4 étapes successives (Figure 7) (Caldecott, 2008; Hanssen-Bauer *et al.*, 2012). Tout d'abord, la base endommagée est clivée par des glycosylases (Figure 7a). Différentes glycosylases peuvent intervenir, chacune reconnaissant et clivant un certain type de dommage. Par exemple, les 8-oxoG sont prises en charge par la protéine OGG1 (De Souza-Pinto *et al.*,

2001). Quel que soit le cas, le clivage de la base modifiée laisse place à un site abasique au niveau de l'ADN (Figure 7b). La seconde étape du BER, sera donc la prise en charge de ce site abasique par des AP-endonucléases. APE1, l'AP-endonucléase majoritaire du BER, clive la liaison phosphodiester en 5' du site abasique afin de générer une extrémité 3'-OH libre (Hinz, 2014). Une CSB est ainsi formée (Figure 7c). Les étapes suivantes sont regroupées sous le nom de SSBR (single-strand break repair). Afin de réparer la CSB présente, la protéine APE1 interagit et stimule l'ADN Polymérase Polβ, qui pourra ainsi synthétiser la séquence d'ADN manquante à partir de l'extrémité 3' libre. Enfin, dans une dernière étape, l'ADN Ligase III accompagnée de son cofacteur essentiel XRCC1 va réparer la double-hélice d'ADN en reliant l'extrémité 3' à l'extrémité 5' libre (Parsons *et al.*, 2005; Caldecott, 2014). XRCC1 est une protéine essentielle du BER, servant de plateforme afin de recruter, stabiliser et stimuler les effecteurs Polβ et Ligase III (Horton *et al.*, 2008). En effet, la seule déplétion de XRCC1 entraîne une sensibilisation de cellules humaines à divers agents génotoxiques générant des dommages alkylants, des CSBs etc. (Brem and Hall, 2005). La réparation par BER n'est pas obligée de contenir les quatre étapes. Ainsi, des sites abasiques et des CSBs seront réparés par BER en commençant respectivement à la deuxième et troisième étape. Les sites abasiques seront directement reconnus par APE1, alors que les CSBs seront reconnues par la protéine PARP1 (Godon *et al.*, 2008) qui entraînera le recrutement des effecteurs du SSBR dont XRCC1 (Breslin *et al.*, 2015).

◊ *Fanconi Anemia*

L'Anémie de Fanconi est une maladie autosomale récessive, due à un défaut d'une des protéines impliquée dans la voie de réparation portant le même nom. Au niveau cellulaire, le principal phénotype est un défaut dans la réparation des dommages à l'ADN et particulièrement en réponse aux pontages inter-brins de l'ADN. La voie FA réagit aux pontages induisant un blocage des fourches de réplications (Figure 8). Actuellement, 19 gènes Fanconi ont été caractérisés (codant pour les protéines FANC A, B, C etc.). Les protéines impliquées dans la voie FA ne sont pas toutes appelées FANC. En effet, seules les protéines dont le gène a été caractérisé comme muté chez un patient atteint de l'Anémie de Fanconi portent ce nom (Walden and Deans, 2014). Plusieurs autres gènes dont aucune mutation n'a été détectée chez des patients, ont été montrés comme étant impliqués dans la voie FA.

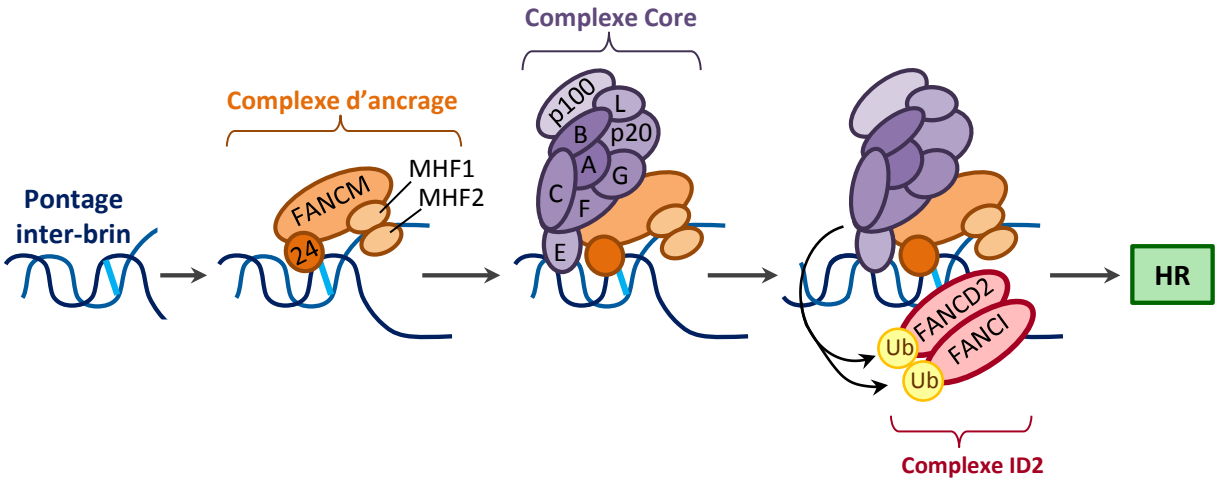


Figure 8 : Modèle de la prise en charge d'un pontage inter-brin par la voie FA

Le premier complexe intervenant dans cette voie est le complexe d'ancrage. Il est constitué de FANCM, protéine clé dans la reconnaissance des pontages, de son partenaire constitutif FAAP24, et des protéines MHF1/MHF2 (Coulthard *et al.*, 2013). Un deuxième complexe est ensuite recruté au niveau du dommage : le complexe « Core ». Il est composé de nombreuses protéines dont FANC A, B, C, E, F, G, L et des protéines FAAP20 et FAAP100 (Walden and Deans, 2014). Les protéines FA de ce complexe sont essentielles à la mise en place de la voie. En effet, l'absence d'une seule de ces protéines entraîne un désassemblage (ou un défaut d'assemblage) de ce complexe, et une inactivation de la voie FA (Hodson and Walden, 2012). Une fois formé et relocalisé au niveau du dommage, le complexe Core joue un rôle essentiel d'Ubiquitine Ligase *via* FANCL, en mono-ubiquitinilant un nouveau complexe appelé ID2 (Longerich *et al.*, 2014). Ce troisième complexe de la voie FA est constitué de 2 protéines : FANCD2 et FANCI. L'ubiquitinilation de ID2 est un élément crucial pour le recrutement de protéines telles que les nucléases FANCP (SLX4), FANCQ (XPF), FAN1 et les facteurs de la réparation FANCJ (BRIP), FANCN (PALB2), FANCD1 (BRCA2), FANCS (BRCA1), FANCO(RAD51C) et FANCR (RAD51). Après la reconnaissance du dommage et sa signalisation par la voie FA (Figure 8), les étapes de réparation sont réalisées par les protéines de la voie HR (Taniguchi *et al.*, 2002), détaillée plus bas. Pour cette raison, la mutation de gènes impliqués dans la HR résulte en une hypersensibilité aux agents induisant des pontages inter-brin de l'ADN, démontrant le lien étroit entre ces deux voies de réparation (Wang *et al.*, 2015).

◊ *Homologous Recombination*

Les CDB sont des lésions extrêmement dangereuses pour la cellule. Leur réparation nécessite un ensemble complexe de différentes voies de réparation. Deux voies majoritaires sont impliquées dans la réparation des CDBs : les voies HR et NHEJ. La recombinaison homologue est strictement dépendante de la présence de la chromatine sœur et sera donc active seulement en phase S et G2 du cycle cellulaire (Rothkamm *et al.*, 2003).

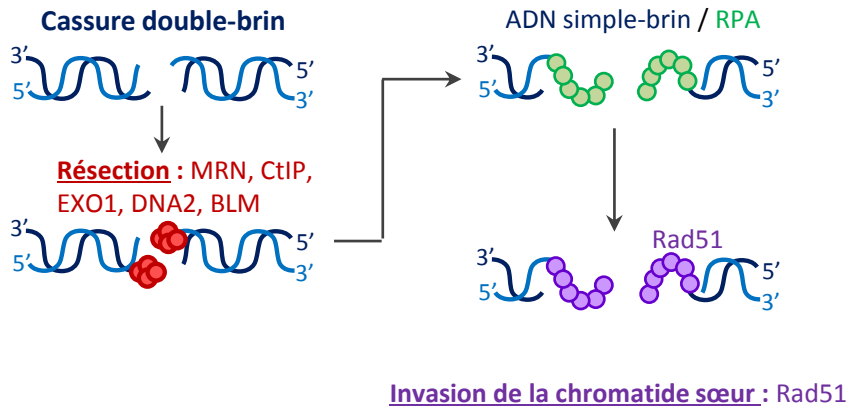


Figure 9 : Reconnaissance et prise en charge des CDB par la HR

La première étape de la HR est la résection de la CDB afin de générer un long fragment d'ADN simple brin en 3' (Figure 9). Cette étape est réalisée par le complexe MRN, la protéine CtIP, les nucléases EXO1 et DNA2, et l'hélicase BLM (Nimonkar *et al.*, 2011). La résection de l'ADN conduit à la formation d'un ADN simple-brin, reconnu et recouvert par la protéine RPA, comme décrit plus tôt (Alani *et al.*, 1992; Sugiyama *et al.*, 1997). Une fois le dommage stabilisé, RPA est remplacée par la protéine Rad51 qui forme avec l'ADN simple-brin une structure nucléoprotéique appelée le nucleofilament (Sung and Robberson, 1995). Le remplacement de RPA par Rad51 nécessite l'activité de protéines médiatrices telles que BRCA2, PALB2, et les cinq paralogues de Rad51 (Oliver *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2010; Chun *et al.*, 2013). Une fois formé, le nucléofilament envahit la molécule intacte d'ADN double-brin de la chromatide sœur, à la recherche de séquences homologues (Sung and Robberson, 1995). A partir de là, deux voies peuvent être empruntées, la voie SDSA pour « synthesis-dependent strand annealing » ou la voie de double Jonction d'Holliday (dJH) (Figure 10) (Mladenov *et al.*, 2013).

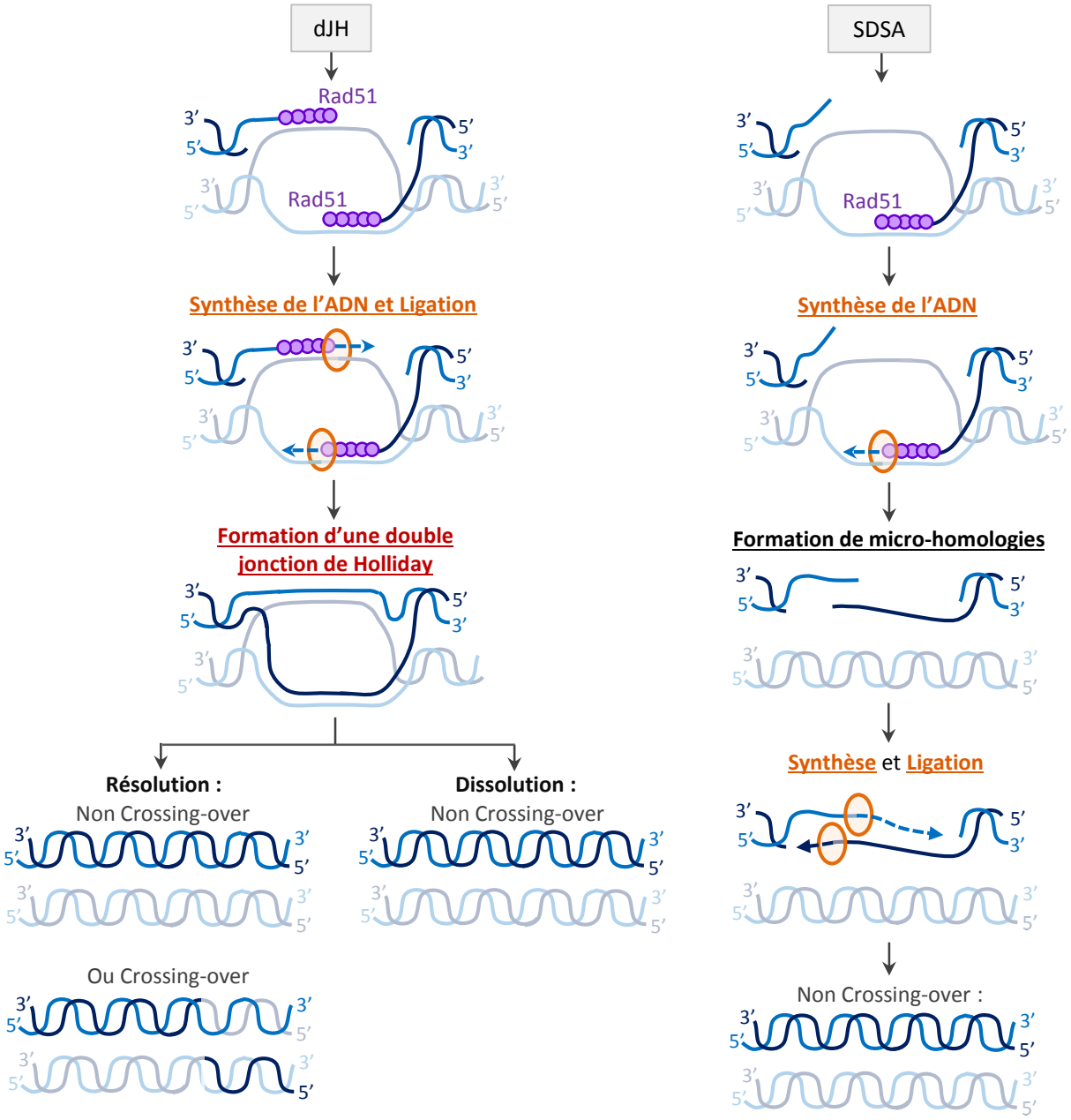


Figure 10 : Etapes finales de la réparation d'une CDB par HR

La voie la plus classique, SDSA, a lieu lorsqu'une seule extrémité de la cassure envahit la chromatide sœur (Figure 10b) (Iyama and Wilson, 2013). Elle consiste à continuer l'élongation de la synthèse d'ADN sur une courte distance, jusqu'à ce qu'une microhomologie avec le brin de départ de la chromatide endommagée puisse se former. La synthèse et la ligation de l'ADN manquant peuvent ensuite être réalisées. Aucun évènement de recombinaison entre les deux chromatide, ou « crossing-over » n'est réalisé avec ce système de réparation.

La deuxième sous-voie de la HR, appelée voie de double Jonction de Holliday (dJH), a lieu lorsque le brin déplacé lors de l'invasion s'hybride à la seconde extrémité de la cassure (Figure 10a) (Iyama and Wilson, 2013). Suite à la synthèse et la ligation des ADN manquants, une double Jonction de Holliday est formée. Afin de résoudre cette structure, deux possibilités sont envisageables : la dissolution par le complexe BLM-TOPOIII (Raynard *et al.*, 2006) ou la résolution par des endonucléases (GEN1, MUS81-EME1 et SLX1-SLX4) (Castor *et al.*, 2013). La dissolution entraînant uniquement une dissociation des brins appariés, aucun évènement de crossing-over n'est induit. En revanche, dans le cas de la résolution, les endonucléases génèrent un clivage, qui, lors de la ligation des extrémités des chromosomes, formera ou non un crossing-over.

La HR n'est pas impliquée dans la réparation de toutes les CDBs. Son activation dépend de la nature de la CDB et est régulée positivement ou négativement par de nombreux facteurs. Tout d'abord, la HR est régulée à un niveau temporel, puisqu'elle est dépendante de la présence de la chromatide sœur d'ADN, en phase S et G2 du cycle cellulaire (Rothkamm *et al.*, 2003). Toutefois, en phase G2, les CDBs peuvent être prises en charge par HR et NHEJ. Une étape clé qui différencie la HR et le NHEJ est la résection de la CDB qui est nécessaire à la HR mais inhibitrice pour le NHEJ. Différentes protéines vont activer ou inhiber cette étape de résection, dont l'hétérodimère Ku70/Ku80 qui empêche la résection afin de favoriser la voie NHEJ (Krasner *et al.*, 2015). A l'inverse, la voie HR est favorisée suite à la relocalisation de la protéine BRCA1 au dommage (Yun and Hiom, 2009).

◊ *Classical Non-Homologous End-Joining*

La voie Classique du NHEJ (C-NHEJ) est la seconde voie de réparation majoritaire des CDBs. A l'opposé de la HR, le NHEJ ne nécessite pas la présence d'une séquence d'ADN homologue, et peut donc être activé quelle que soit la phase du cycle cellulaire (Figure 11) (Rothkamm *et al.*, 2003).

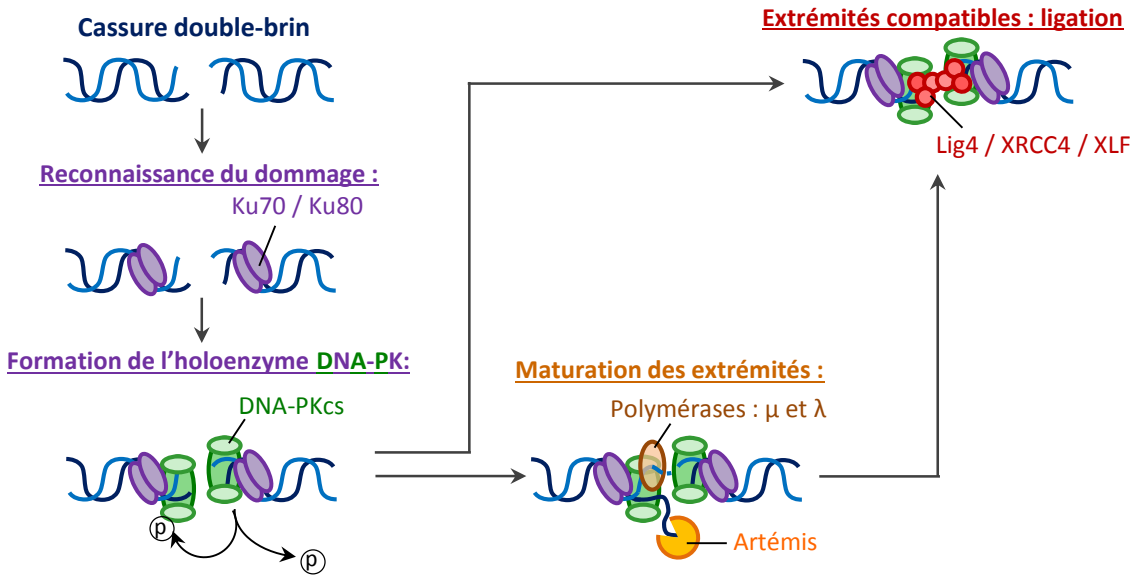


Figure 11 : Modèle de la réparation d'une CDBs par NHEJ classique

Le C-NHEJ commence par le recrutement, au niveau du dommage, du complexe KU, constitué des deux protéines Ku70 et Ku80 (Hammel *et al.*, 2010). La liaison de KU à la CDB va stabiliser la lésion, empêcher la résection de la cassure, et recruter la sous-unité catalytique DNA-PKcs. L'holoenzyme formée par le complexe KU et DNA-PKcs est alors appelée DNA-PK. Grâce à sa sous-unité catalytique, DNA-PK phosphoryle un grand nombre de protéines de la réparation (DDR), dont elle-même. L'autophosphorylation de DNA-PKcs est essentielle au bon déroulement du NHEJ (Hammel *et al.*, 2010), et permet le recrutement d'autres facteurs. La réparation d'une CDB par NHEJ consiste en la religation des deux extrémités de la cassure, ce processus impliquant que les bases au niveau de la cassure ne soient pas endommagées ou manquantes. Dans de tels cas, des enzymes comme Artemis, et les ADN polymérases Polμ et Polλ sont recrutées (Moscariello *et al.*, 2015). La présence d'une séquence d'ADN homologue n'est pas requise pour cette étape. En cas de synthèse d'ADN, des changements de séquences à la jonction de la CDB sont possibles, pouvant ainsi entraîner des mutations. L'étape finale du C-NHEJ est la liaison rapide et efficace des deux brins d'ADN, réalisée par le complexe DNA ligase 4 (Lig4) / XRCC4 (X-ray cross complementing 4) (Grawunder *et al.*, 1997), assisté par le facteur XLF. Les protéines Ku, DNA-PKcs, XLF, XRCC4 et Lig4 sont essentielles au bon fonctionnement du NHEJ (Budman and Chu, 2005).

◊ *Alternative Non-Homologous End-Joining*

Le NHEJ alternatif (Alt-NHEJ), aussi appelé « backup » (B-NHEJ), ou microhomology-mediated end-joining (MMEJ) est principalement activé suite à un échec du C-NHEJ. Comme la voie classique, le Alt-NHEJ peut être activé indépendamment de la phase du cycle cellulaire. Pendant longtemps considéré comme une sous-voie du C-NHEJ, il est aujourd'hui accepté comme une voie distincte.

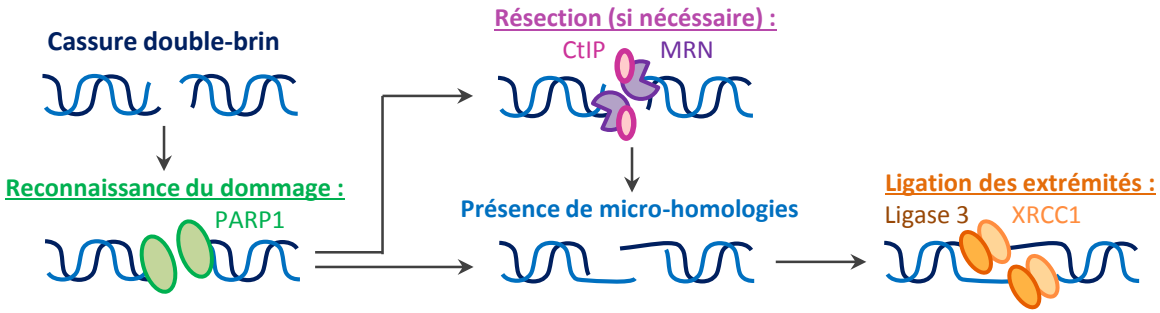


Figure 12 : Modèle de la réparation des CDB par Alt-NHEJ

Contrairement au C-NHEJ, la voie du Alt-NHEJ est indépendante de la présence de la DNA-PK (Taylor *et al.*, 2009). Une des protéines essentielle au Alt-NHEJ est PARP-1 (également impliquée dans la réparation des CSBs) (Audebert *et al.*, 2004). Le Alt-NHEJ nécessite des micro-homologies aux extrémités de la CDB, suggérant le besoin d'une résection de la cassure (Figure 12). Après la reconnaissance du dommage par PARP-1, le complexe MRN et la protéine CtIP seraient ainsi recrutés au dommage afin de participer à l'étape de résection (Taylor *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). Dès que les micro-homologies sont formées, une étape de ligation des extrémités est réalisée par l'ADN Ligase III (décrite précédemment pour son rôle essentiel dans le BER). De plus, des données suggèrent que son partenaire, XRCC1, serait également impliqué dans cette étape (Audebert *et al.*, 2004), mais ne serait pas essentiel (Boboila *et al.*, 2012). Les micro-homologies, nécessaires à la mise en place du Alt-NHEJ, peuvent être formées suite à la résection ou suite à une synthèse d'ADN par l'ADN polymérase θ. La présence de cette ADN polymérase est essentielle à la mise en place d'une réparation par Alt-NHEJ (Mateos-gomez *et al.*, 2015). L'ADN polymerase θ est capable de synthétiser un fragment ADN indépendamment de la présence d'une matrice. Cette implication de l'ADN polymerase θ rend le Alt-NHEJ beaucoup plus mutagène que le C-NHEJ et que la HR (Simsek *et al.*, 2011; Mateos-gomez *et*

al., 2015). En effet, il serait responsable de l'induction de nombreuses translocations et réarrangements chromosomiques. Le caractère mutagène du Alt-NHEJ peut être dangereux pour la cellule. En effet, l'augmentation du taux de mutation est associée à un risque accru de développement tumoral, d'autant plus que l'activation du Alt-NHEJ se ferait dans un contexte C-NHEJ et/ou HR déficient.

e) Mort cellulaire et Sénescence

Suite à l'induction de dommages à l'ADN, plusieurs devenirs cellulaires sont possibles. Si la cellule arrive à réparer ces dommages, les points de contrôles sont levés et la progression dans le cycle peut reprendre. En revanche, si le taux de dommages non réparés est trop important, les points de contrôles vont persister, conduisant soit à l'entrée en sénescence, soit à la mort cellulaire par apoptose (Jackson and Bartek, 2009).

◊ *La Sénescence*

La Sénescence est un arrêt irréversible de la prolifération dû à l'activation permanente des points de contrôles des dommages à l'ADN (Klement and Googarzi, 2014; Vermeij *et al.*, 2014).

En absence de dommage, le vieillissement des cellules est appelé sénescence réplicative. En effet, au fur et à mesure des divisions cellulaires, les télomères raccourcissent, jusqu'à atteindre une taille trop petite, et ne pourront être protégés. L'extrémité des chromosomes est alors reconnue comme une CDB non réparable, entraînant une activation persistante de la DDR et la sénescence réplicative (Klement and Googarzi, 2014).

Toutefois, suite à un stress génotoxique important, des CDBs peuvent persister. La non réparation de ces dommages peut conduire à un mécanisme appelé « sénescence induite prématurément par le stress » (SIPS) (Rodier *et al.*, 2009). L'induction de la SIPS implique les protéines ATM, p53 et la protéine inhibitrice du cycle cellulaire p16 (Naka *et al.*, 2004; Rodier *et al.*, 2009). L'entrée en SIPS des cellules endommagées présente plusieurs caractéristiques. Une prolifération anarchique et incontrôlée étant un aspect typique des cellules tumorales, l'arrêt de la prolifération des cellules par SIPS va « sécuriser » le tissu en empêchant cette prolifération exagérée. De plus, les cellules SIPS sécrètent des facteurs solubles, dont des cytokines pro-inflammatoires (IL-6), permettant de signaler à leur environnement leur état critique d'endommagement (Rodier *et al.*,

2009).

◊ *La mort cellulaire par apoptose*

L'induction de l'apoptose suite à une activation de la DDR est majoritairement dépendante de la protéine p53. Comme précisé précédemment, p53 est un facteur de transcription, phosphorylé et activé par les protéines ATM/CHK2 et ATR/CHK1 (Bieging *et al.*, 2014). Parmi les gènes cibles régulés par p53 se trouvent ceux des protéines pro-apoptotiques BAX (BCL2-associated X protein), et PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) (Roos and Kaina, 2006). Cette voie apoptotique est activée dès la présence de dommages à l'ADN. Toutefois, si les dommages ne sont pas réparés ou présents en trop grande quantité, le niveau de p53 activé dépasse un seuil critique et l'apoptose est enclenchée. Ainsi, les protéines BAX et PUMA sont relocalisées à la mitochondrie où elles entraînent la libération du cytochrome C (Liu *et al.*, 2003). Le cytochrome C conduit alors à l'activation des caspases 9 puis 3, induisant les phénotypes caractéristiques d'une mort par apoptose : fragmentation de la chromatine, formation de protrusions membranaires et de corps apoptotiques (Zhivotovsky and Orrenius, 2011). Les corps apoptotiques seront phagocytés par les cellules environnantes. Ce processus de mort n'induisant pas de réaction inflammatoire, il est considéré comme « une mort propre » pour l'organisme.

f) Conséquences d'une dérégulation de la réponse aux dommages à l'ADN

Les mécanismes de la DDR assurent en permanence le maintien de l'intégrité et la stabilité du génome. Une altération dans ces voies, que ce soit dans leur fonctionnement ou dans leur régulation, peut conduire à la promotion de la cancérogénèse. La cancérogénèse consiste en la perte successive de plusieurs mécanismes de contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire, *via* l'acquisition de mutations (Hanahan and Weinberg, 2011).

◊ *Mutations et instabilité génétique*

Les systèmes de réparation des dommages sont extrêmement fiables, mais pas infaillibles. Parfois, des dommages peuvent être mal réparés, ou non réparés en raison d'un trop grand nombre de lésions ou d'une complexité importante de la lésion. Dans ce cas, les conséquences cellulaires sont

variables. Des lésions nucléotidiques peuvent résulter en des mutations ponctuelles stables, qui auront différentes conséquences suivant le gène muté et la localisation de la mutation dans le gène. Une cassure double-brin non réparée aura, quant à elle, des conséquences plus graves (fragmentation). De plus, ce type de lésion pouvant dégénérer en des translocations chromosomiques ou des pertes de portions de chromosomes, le nombre de gènes touchés sera plus important.

Une mutation peut conduire à une perte de fonction ou à une surexpression d'une protéine clé. Par exemple, la mutation d'un gène codant pour une protéine impliquée dans un système de réparation, peut conduire à son inactivation, et à un défaut de la voie de réparation. Puisque certains types de dommages ne seront pas pris en charge correctement, une instabilité génomique va apparaître selon un effet « boule de neige ». Cette instabilité génomique induit l'accumulation de mutations aléatoires (Negrini *et al.*, 2010), pouvant conduire les cellules à développer des caractéristiques tumorales, comme une prolifération incontrôlée, un échappement à la mort cellulaire, etc. (Hanahan and Weinberg, 2011). Ainsi, l'instabilité génomique est une caractéristique clé de nombreux cancers. Pour toutes ces raisons, un point commun retrouvé chez les individus déficients pour certaines protéines de réparation est une susceptibilité accrue au développement de certains types de cancer (Hoeijmakers, 2001).

◊ *Prolifération incontrôlée*

Comme décrit précédemment, la progression dans le cycle cellulaire est extrêmement contrôlée. La perte de fonction d'une des protéines impliquée dans les points de contrôle peut atténuer, voire abroger ces derniers (Bunz *et al.*, 1998). Ainsi, dans certains cas, les cellules peuvent progresser dans le cycle malgré la présence de dommages non réparés. De plus, à l'état physiologique, l'entrée en phase G1 du cycle cellulaire dépend de la stimulation par des facteurs extérieurs, comme des facteurs de croissance et des signaux d'ancrage des cellules (Miranti and Brugge, 2002). Sans ces facteurs, les cellules restent bloquées en phase G0 du cycle cellulaire. Toutefois, la mutation de protéines impliquées dans la détection de ces signaux peut induire une activation constitutive de ces voies et donc une stimulation permanente de la prolifération (Cerezo *et al.*, 2009). Cette entrée permanente dans le cycle cellulaire et l'affaiblissement des points de contrôle peuvent conduire à une prolifération incontrôlée et indépendante des signaux d'ancrages, deux caractéristiques clés des cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011).

◊ *Echappement à la mort cellulaire*

Une mutation d'un gène clé dans l'induction de la mort cellulaire ou de l'entrée en sénescence peut avoir un effet critique pour la cellule. Par exemple la perte de fonction de la protéine p53 suite à sa mutation, conduit à une inactivation de la voie de mort cellulaire par apoptose dépendante de p53 (Words, 1999; Vousden and Lane, 2007). Il en est de même pour la mutation inactivatrice de la protéine p16, essentielle dans l'entrée en sénescence (Jackstadt *et al.*, 2013). La déplétion de ces protéines conduit à un taux de survie accru des cellules en présence de dommages. L'échappement à la mort cellulaire est également un critère des cellules tumorales.

2) Les génotoxines bactériennes

Même si les dommages à l'ADN peuvent être induits par des agents exogènes physiques et chimiques divers, il est maintenant accepté que certains puissent être dus à des effecteurs bactériens appelés génotoxines bactériennes. Plusieurs toxines, dont CDT, ont été caractérisées à ce jour comme induisant directement ou indirectement des dommages à l'ADN.

a) La Colibactine, produite par certaines souches de E. coli

La Colibactine est une toxine produite par certaines bactéries *E. coli* du groupe phylogénétique B2. Il s'agit d'un polyketide-peptidique non ribosomal, synthétisé par un ensemble d'enzymes, codées par des gènes regroupés au niveau de l'îlot génomique pks (polyketide megasynthetases). Tous les gènes de l'îlot pks, codant pour les polyketide megasynthetases (PKS) et les nonribosomal peptide megasynthetase (NRPS), sont essentiels à l'expression d'une génotoxine fonctionnelle (Nougayrède *et al.*, 2006). La colibactine n'est pas sécrétée dans le milieu extra-cellulaire. En effet, son internalisation dans les cellules eucaryotes nécessite un contact entre les bactéries (vivantes) et la cellule hôte pour que la génotoxine y soit directement injectée (Nougayrède *et al.*, 2006).

Dans les cellules eucaryotes, la Colibactine induit des dommages à l'ADN de type CDBs signalés par une phosphorylation du variant H2AX et une activation des protéines ATM / CHK2. L'activation de ces voies de réponse aux CDBs conduit à un ralentissement de la progression des cellules en phase S, suivit d'un blocage de ces dernières en phase G2/M du cycle cellulaire (Nougayrède *et al.*, 2006). Toutefois, de récentes données suggèrent que la Colibactine induirait des

alkylation et des pontages de l'ADN et non directement des CDBs de l'ADN (Vizcaino and Crawford, 2015). Quel que soit le cas, les CDBs générées entraînent un endommagement persistant des cellules eucaryotes, avec une induction d'une instabilité génétique et l'apparition de caractères spécifiques aux cellules transformées (par exemple une prolifération indépendante de l'ancrage cellulaire) (Cuevas-Ramos *et al.*, 2010).

b) La toxine ExoS, produite par P. aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa) est une bactérie Gram-négative produisant différentes toxines dont l'Exoenzyme S (ExoS) et Exoenzyme T (ExoT). L'action génotoxique de *P. aeruginosa* est dépendante de l'expression d'un système de sécrétion de type III (T3SS). Ces données suggèrent l'implication d'une génotoxine, injectée directement dans les cellules eucaryotes, et non une action génotoxique du LPS et de l'inflammation accompagnée de ROS qu'il peut provoquer (Wu *et al.*, 2011; Elsen *et al.*, 2013).

Dans les cellules eucaryotes infectées par *P. aeruginosa*, une induction de dommages à l'ADN (Wu *et al.*, 2011; Elsen *et al.*, 2013), et plus particulièrement de CDBs à l'ADN, signalées par les protéines γH2AX et 53BP1, est observée (Elsen *et al.*, 2013). Ces dommages sont induits majoritairement par la toxine ExoS, la toxine ExoT n'ayant qu'une implication limitée dans l'induction de ces CDBs. L'induction de dommage à l'ADN est dépendante de l'activité ADP-ribosyltransferase de ExoS. Cependant, ExoS ne possédant pas d'activité nucléase, ces données démontrent une induction indirecte de dommages à l'ADN par ExoS (Elsen *et al.*, 2013). De plus, des données *ex vivo* et *in vivo* démontrent que le système de réparation BER est activé lors d'une infection par *P. aeruginosa*. Cette activation implique les protéines OGG1, APE1 et XRCC1, et semble également être dépendante de l'expression du facteur ExoS (Wu *et al.*, 2011). L'importance de OGG1 dans la prise en charge des dommages suggère une induction de modifications de bases de type 8oxodG par *P. aeruginosa*. Toutefois, le mode d'action de ExoS et de son activité ADP-ribosyltransferase dans l'induction de dommages à l'ADN (et potentiellement de modifications de bases) restent à caractériser.

c) La toxine Usp, produite par les souches Uropathogènes de E. coli

Le dernier effecteur bactérien caractérisé comme appartenant à la famille des génotoxines est la protéine Usp (Uropathogenic-specific protein), produite et sécrétée par les souches uropathogènes de

E. coli (Nipič *et al.*, 2013). En effet, Usp possède une activité nucléase capable de cliver directement un plasmide super-enroulé *in vitro*, et capable d'induire des dommages à l'ADN sur cellules de mammifères. Toutefois, le type de dommages induits par Usp, reste à déterminer.

d) *H. pylori et dommages à l'ADN*

Le lien de causalité entre infection par *H. pylori* et développement d'adénocarcinomes gastrique est connu (Peek and Crabtree, 2006). *H. pylori* produit de nombreux facteurs de virulences, dont les gènes sont situés au niveau d'un ilot de pathogénicité « cagPAI » (cytotoxin-associated gene pathogenicity island). Parmi ces facteurs de virulence se trouve la protéine CagA (cytotoxin-associated gene A), dont l'expression est corrélée à un risque accru de développement tumoral (Blaser *et al.*, 1995). Même si certaines publications proposent CagA comme responsable d'une partie des dommages à l'ADN, elle ne serait pas la seule à être impliquée (Chaturvedi *et al.*, 2011; Koeppel *et al.*, 2015).

H. pylori induirait une production de ROS, générant des modifications de bases (8oxodG) prises en charge par la protéine OGG1 du BER. En résulte alors la formation de sites abasiques qui vont s'accumuler, dégénérant en CDBs suite au passage de la réplication (Chaturvedi *et al.*, 2011; Kidane *et al.*, 2014). Ces CDBs sont ensuite signalées par une phosphorylation de H2AX et un recrutement de 53BP1 aux sites de dommage (Toller *et al.*, 2011; Kidane *et al.*, 2014; Koeppel *et al.*, 2015). Toutefois, la totalité des CDBs ne semble pas dépendre uniquement de la production de ROS, suggérant un mode plus complexe d'induction des dommages (Toller *et al.*, 2011; Koeppel *et al.*, 2015). De surcroît, en plus d'induire des dommages à l'ADN, *H. pylori* génère un défaut dans l'activation de certaines protéines de réponse aux dommages. En effet, une diminution du taux de protéines MutS et MutL impliquées dans le Mismatch Repair (Kim *et al.*, 2002), ainsi que celui des protéines NBS1 et MRE11 impliquées dans la signalisation des CDB et dans les premières étapes de la Recombinaison Homologue (Koeppel *et al.*, 2015), est observée. Ces données démontrent une action génotoxique complexe de *H. pylori*, dont certains acteurs restent à caractériser.

e) *L. monocytogenes et dommages à l'ADN*

Même si les effecteur(s) impliqué(s) ne sont pas encore déterminés, de récentes données démontrent une induction de dommages à l'ADN par *Listeria monocytogenes* (Samba-Louaka *et al.*,

2014). Les dommages induits sont de type CDBs et signalés par une augmentation du taux de γH2AX et un recrutement de 53BP1. Toutefois, cette réponse aux dommages est affaiblie par *Listeria monocytogenes* grâce à son effecteur : la Listeriolysine O (LLO). En effet, la LLO entraîne la dégradation de la protéine MRE11, limitant la signalisation des CDBs (Samba-Louaka *et al.*, 2014).

3) Les dommages à l'ADN induits par la génotoxine CDT

L'induction de dommages à l'ADN par la toxine CDT entraîne une réponse aux dommages similaire à celle activée en réponse radiations ionisantes. En effet, en réponse à CDT, un recrutement et/ou une activation des protéines ATM, CHK2, p53, 53BP1 ainsi que du complexe MRN sont observés (Cortes-Bratti *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Alaoui-El-Azher *et al.*, 2010; Fahrer *et al.*, 2014). Ces données ont permis de définir CDT comme un facteur induisant des CDBs de l'ADN, conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire et la mort des cellules par apoptose, classant les CDTs dans la famille des génotoxines et des cyclomodulines. Toutefois, une étude menée en 1997 suggérait l'importance du passage par la réplication dans la génotoxicité de CDT, ce qui n'est pas le cas lors d'induction de CDBs (Comayras *et al.*, 1997). Précédemment, au laboratoire, des données réconciliant les deux modèles ont été publiées. En effet, nous avons pu montrer que la toxine CDT induit des dommages précoces, certainement de type CSBs, qui dégénèrent en CDBs lors de la réplication (Fedor *et al.*, 2013). De plus, les CDBs générées par CDT semblent être prises en charge par Recombinaison Homologue (Kitagawa *et al.*, 2007; Fedor *et al.*, 2013). Enfin, des données récentes suggèrent également une implication de la protéine DNA-PK, et donc du système de réparation NHEJ (Fahrer *et al.*, 2014).

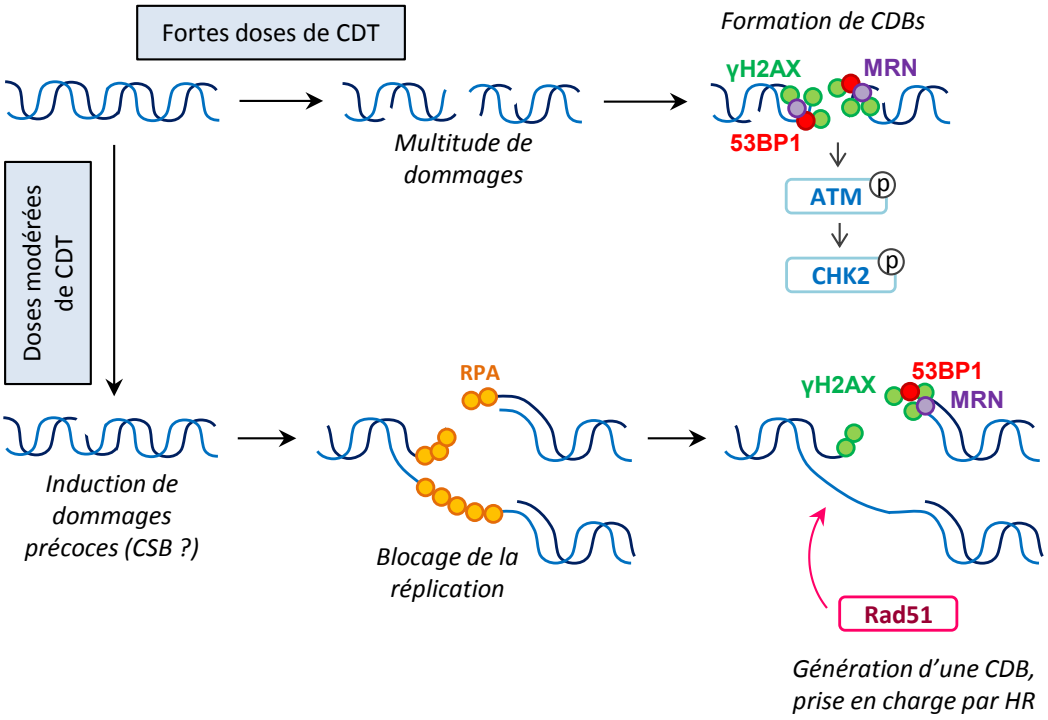


Figure 13 : Modèle récapitulant les connaissances sur les dommages induits par CDT avant nos travaux

Une description et une discussion approfondie des dommages induits par la toxine CDT, et des conséquences pour les cellules eucaryotes, ont été réalisées dans une revue, publiée dans le journal *Cells* en 2014 (Bezine *et al.*, 2014).

Review: Bezine et al., Cells, 2014

REVUE

The Cytolethal Distending Toxin Effects on Mammalian Cells: a DNA Damage Perspective

Bezine E., Vignard J., Mirey G. *Cells.* 2014, 3, 592-615
doi: 10.2290/cells3020592

Cells **2014**, *3*, 592-615; doi:10.3390/cells3020592

OPEN ACCESS

cells

ISSN 2073-4409

www.mdpi.com/journal/cells

Review

The Cytolethal Distending Toxin Effects on Mammalian Cells: A DNA Damage Perspective

Elisabeth Bezine [1,2,3], Julien Vignard [1,2]* and Gladys Mirey [1,2,4,]*

1 INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, F-31027 Toulouse, France; E-Mail: elisabeth.bezine@toulouse.inra.fr

2 Genotoxicity Signaling Team, Toxalim INRA, 180 Chemin de Tournefeuille BP 93173, F-31027 Toulouse, France

3 Université de Toulouse, INP, UMR1331, Toxalim, F-31000 Toulouse, France

4 Université de Toulouse, UPS, UMR1331, Toxalim, F-31062 Toulouse, France

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: julien.vignard@toulouse.inra.fr (J.V.); gladys.mirey@toulouse.inra.fr (G.M.); Tel.: +33-582-066-338 (G.M.); Fax: +33-561-285-244 (G.M.).

Received: 16 April 2014; in revised form: 28 May 2014 / Accepted: 28 May 2014 / Published: 11 June 2014

Abstract: The cytolethal distending toxin (CDT) is produced by many pathogenic Gram-negative bacteria and is considered as a virulence factor. In human cells, CDT exposure leads to a unique cytotoxicity associated with a characteristic cell distension and induces a cell cycle arrest dependent on the DNA damage response (DDR) triggered by DNA double-strand breaks (DSBs). CDT has thus been classified as a cyclomodulin and a genotoxin. Whereas unrepaired damage can lead to cell death, effective, but improper repair may be detrimental. Indeed, improper repair of DNA damage may allow cells to resume the cell cycle and induce genetic instability, a hallmark in cancer. *In vivo*, CDT has been shown to induce the development of dysplastic nodules and to lead to genetic instability, defining CDT as a potential carcinogen. It is therefore important to characterize the outcome of the CDT-induced DNA damage and the consequences for intoxicated cells and organisms. Here, we review the latest results regarding the host cell response to CDT intoxication and focus on DNA damage characteristics, cell cycle modulation and cell outcomes.

Keywords: Gram-negative bacteria; cytolethal distending toxin; DNA damage response; double-strand breaks; cell cycle checkpoints; replicative stress

1. Introduction

The cytolethal distending toxin (CDT) was discovered and described as a heat-labile exotoxin, from both *Escherichia coli* (EcCDT) and *Campylobacter jejuni* (CjCDT), able to induce the distension and death of eukaryotic cells [1,2]. Later, different bacterial strains obtained from human clinical isolates were shown to produce CDT, including *Haemophilus ducreyi* (HdCDT) [3], *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AaCDT) [4] and enterohepatic *Helicobacter cinaedi* [5], all being Gram-negative pathogenic bacterial strains. In addition, *Salmonella enterica* serovar typhi (*S. typhi*) displays a CDT-like activity without expressing a typical CDT toxin [6]. Finally, CDT is also found in bacteria colonizing animals, such as *Helicobacter* species in poultry [7], mice and woodchuck [8] (reviewed in [9]). Up to now, no Gram-positive CDT producing bacteria have been characterized.

Globally, eukaryotic cell exposure to CDT leads to a characteristic cytotoxicity associated with a cell distension phenomenon. CDT also induces a cell cycle arrest dependent on the DNA damage response (DDR), triggered by DNA double-strand breaks (DSBs). In addition to CDTs, only a few bacterial genotoxins have been described, among them the *E. coli* Usp (uropathogenic-specific protein) [10] and colibactin, characterized in extra-intestinal commensal and pathogenic *E. coli* strains [11]. Regarding the pathological significance, *E. coli* Usp is associated with urinary tract infection [12], whereas colibactin has been shown to promote colorectal cancer [13]. In this review, we will focus on CDT and briefly present the structural features of CDT and the trafficking of the catalytic moiety to the host cell nucleus. We will then describe the host cell response to CDT intoxication and, finally, discuss the CDT-related DNA damage characteristics.

1.1. CDT-Related Pathogenicity

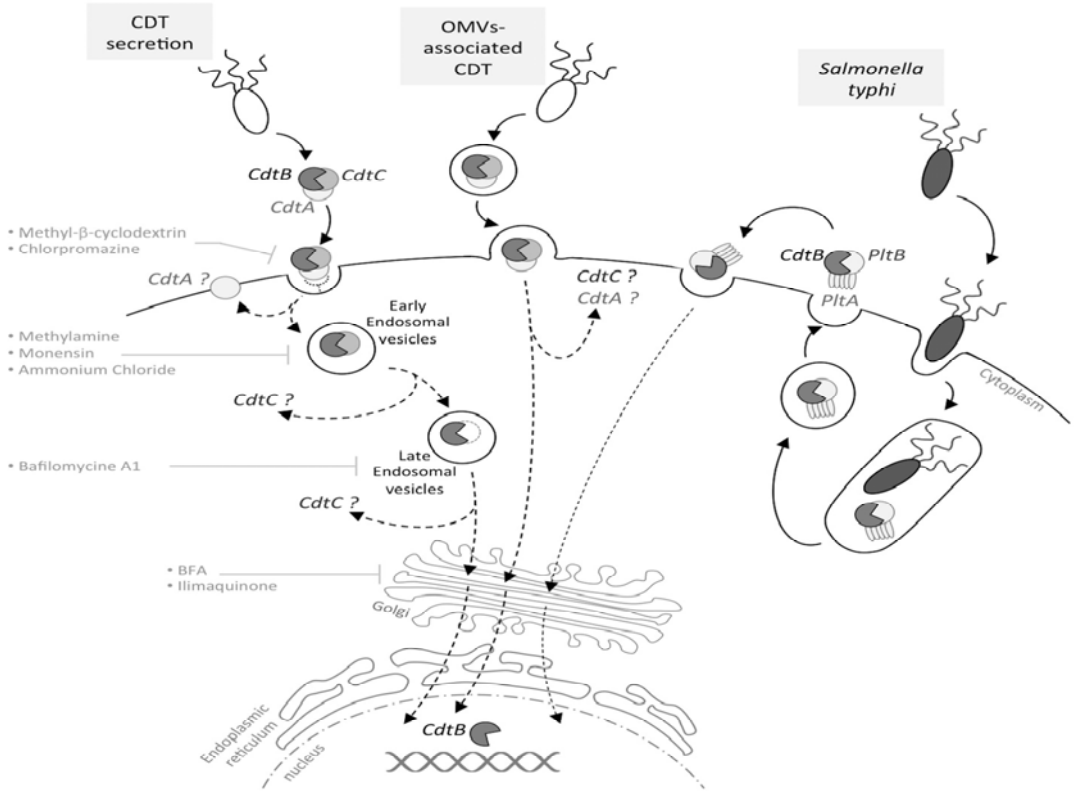
The CDT toxin has been involved in diseases development and is thus considered as a virulence factor [14,15]. For example, the pathophysiologic role of CDT has been clearly shown in a rat model for *C. jejuni*, where only a catalytically-active CjCDT induced damage to the epithelial barrier, diarrhea and severe inflammation of the entire gastro-intestinal tract [16,17]. CDT has also been implicated in *Helicobacter hepaticus* pathogenicity, as the toxin is key in the development of hepatic dysplastic nodules in an immunocompetent mouse model [18]. Finally, in *S. typhi*, the pathogen responsible for typhoid fever causing more than 200,000 deaths worldwide per year, the role of the CDT-like typhoid toxin has been characterized. In contrast to a catalytic mutant of the toxin (a mutant of the CDT catalytic moiety), the systemic administration of the purified wild-type typhoid toxin in a mouse model induces almost all of the typhoid fever symptoms [19]. Taken together, these data clearly show that the role of CDT in different pathogenic contexts mainly relies on the catalytic activity of the toxin.

1.2. CDT is a Tripartite A-B Exotoxin

The CDT holotoxin is made of three subunits, CdtA, CdtB and CdtC, encoded by three genes organized in one operon [20,21]. The structures of AaCDT and of HdCDT have been determined [22,23], showing that CDT displays an A-B architecture, like many other exotoxins, where

CdtB is the catalytic A-subunit. The B-moiety, essential for the holotoxin binding to the host cell membrane, is composed of the CdtA and CdtC subunits. CDT can therefore be classified as an A-B_2 exotoxin. To date, the only known exception is the typhoid toxin of *S. typhi*, in which the *CdtB* gene is not associated with *CdtA* and *CdtC*, but to *PltA* and *PltB* [24], encoding, respectively, the pertussis-like toxin A (homologous to the pertussis toxin ADP-ribosyltransferase subunit) and the pertussis-like toxin B (homologous to one of the pertussis B subunits) [25]. The structure of the typhoid toxin has been solved [19] and shown to be an A_2–B_5 toxin, the B5 regulatory subunit being composed of a pentameric PltB, whereas the A2 catalytic subunit is composed of the StCdtB and PltA proteins, covalently linked by a disulfide bond.

Figure 1. Cytolethal distending toxin (CDT) internalization and trafficking. Depending on the bacteria, CDT may be secreted freely, into outer membrane vesicles (OMVs) or, in the particular case of *Salmonella typhi*, into intracellular vesicles. In the case of a CDT extracellular secretion, CdtA and CdtC are involved in the toxin binding to the eukaryotic membrane. Once bound, CdtA remains associated with the membrane, while CdtC and CdtB are internalized, with CdtB being relocated to the nucleus by a retrograde transport pathway, via early and late endosomes. This has been demonstrated using inhibitors, such as methyl-β-cyclodextrin, methylamine, bafilomycin A1, BFA, *etc.* For OMV-secreted CDT, the toxin is internalized into the host cell through the OMV fusion with the eukaryotic membrane. CdtB is relocated to the nucleus by an undescribed pathway (dotted arrow), and the CdtA and CdtC outcome in the cytoplasm is still unknown. The typhoid toxin production requires *S. typhi* internalization into the host cell; thereafter, the toxin must be secreted to be active. The typhoid toxin interacts with the eukaryotic membrane and is endocytosed, and CdtB is relocated to the nucleus.



CdtA, CdtB and CdtC present a signal sequence and are, therefore, directed to the general secretory pathway, leading to CDT secretion [26,27]. However, CDT may also be released through outer membrane vesicles (OMVs), fusing with the host plasma membrane via lipid rafts [28–30]. The *S. typhi* toxin is once again an exception, as infection studies revealed that the bacterial uptake into host cells triggers the CdtB/PltA/PltB expression, leading to the formation of an intracellular multipartite toxin. Following its production, the typhoid toxin is secreted into the extracellular environment and then interacts, in an autocrine and paracrine way, with the eukaryotic plasma membrane to be internalized and to exert its cytotoxic activity [24], as the inhibition of the typhoid toxin export in the extracellular medium inhibits its effects (Figure 1).

1.3. From CDT Host Cell Binding to CdtB Nuclear Localization

CDT toxins are produced by bacterial strains located in different niches, implying that all CDTs are not secreted in the same microenvironment (different epithelia types, presence of mucus or not, *etc.*), and this raises questions regarding the cell specificity of the CDT toxins [31]. The CdtB subunit is the most conserved of the subunits among all CDT-producing bacteria strains [32]. On the other hand, significant sequence variability is found between CdtC and CdtA homologs. As CdtA and CdtC subunits are essential to the CDT binding, with CdtB alone not being able to bind at the host cell surface [33,34], some authors hypothesized that this variability may allow CDT to interact specifically with different cell types of the host niches [35]. However, if CdtA and CdtC are involved in the CDT binding to host cells, the nature of the CDT receptor only begins to emerge. Recently, genetic screens identified several eukaryotic cell candidates important for CDT intoxication [36,37]. If different CDT toxins share some host factors as the SGMS1 gene encoding the sphingomyelin synthase 1, some specific host proteins were also found. For example, EcCDT-I specifically requires a putative G protein-coupled receptor, TMEM181, shown to co-immunoprecipitate with CDT [36]. The CDT receptor(s) identification may ultimately provide insights regarding cellular tropism and shed light on host-bacteria interactions.

CDT internalization in host cells seems to occur through receptor-mediated endocytosis [38], where the host receptor bound by the toxin can be considered as a cargo hijacked from its normal cellular function. However, this does not rule out the possibility that CDT enters through other endocytic pathways, such as caveolae, given the importance of cholesterol-rich domains [39–42], or through cholesterol-independent endocytic pathways [43].

Recently, AaCdtA was shown to stay at the cell surface, whereas AaCdtC was found both on the host cell surface and in the cytosol, AaCdtB being localized at the ER and later at the nucleus [43]. CdtB relocation to the nucleus was also observed after CdtB microinjection into eukaryotic cell cytoplasm [44,45]. Four hours after microinjection, CjCdtB and AaCdtB are located into the nucleus, demonstrating that the nuclear localization of CdtB from the cytoplasm to the nucleus does not require CdtA and CdtC subunits.

After cell entry by endocytosis, HdCdtB seems to follow a retrograde endosome-Golgi traffic to the endoplasmic reticulum (ER) [38], however without requiring the ER-associated degradation (ERAD) pathway usually exploited by ER-translocating toxins [39]. HdCdtB may be directly translocated from the ER to the nucleus, as it could not be seen freely in the intoxicated cells cytosol [46]. Interestingly,

the endosomal disruption stops the HdCDT transport, but has no effect on EcCDT-III [47], supporting the hypothesis that different CDT toxins may use different trafficking pathways, possibly through different cargo interactions. Important domains for CdtB nuclear transport have been characterized with green fluorescent protein (GFP) fusions. In the CdtB N-terminal region, an 11-amino acid peptide was found, essential for both nuclear localization and toxin-induced cellular effects [45]. This sequence could be replaced by the nuclear localization signal (NLS) of the SV40 large T-antigen [45], suggesting that CdtB nuclear localization is crucial for CDT cytotoxicity. In addition, two potential NLSs have been identified in the C-terminal part of EcCdtB-II [48], whose deletion produces differential CdtB localizations, suggesting specific functions for these NLS sequences.

To summarize, the CDT trafficking current model involves a stepwise holotoxin disassembly process with: (1) CdtA subunit retention at the plasma membrane, after the CDT toxin binds to a yet unidentified receptor; (2) endocytosis of the CdtB-CdtC complex; and (3) CdtB nuclear localization by a retrograde transport pathway (Figure 1). In addition, CdtC could inhibit the CdtB catalytic activity, as suggested by structural data showing that the N-terminus tail of CdtC occludes the CdtB active site [22]. Hence, once it has entered into the host cell and during its intracellular trafficking, CdtB seems locked-in and has to be released from the CdtC interaction to be active.

2. DNA Damage-Related Cellular Outcomes of CDT Intoxication

Since the discovery of CDT, the cellular response to CDT intoxication has been better and better characterized. CDT induces a cell cycle arrest (at the G2/M transition and, depending on the cell type, at the G1/S transition), accompanied by a cellular distention and, eventually, cell death [49–52]. These CDT effects showed similarities with those exerted by some DNA damaging agents, such as ionizing radiation (IR) and etoposide, activating similar pathways [50,52,53]. In light of this observation, the apparent sequence homology between CdtB and the endonuclease/exonuclease/phosphatase family encouraged researchers to compare more precisely, among these proteins, CdtB with a well-known nuclease: deoxyribonuclease I (DNase I) [44,54]. As most of the DNase I residues essential for enzymatic activity are strikingly conserved in the different CdtB homologues, potential sites involved in the CdtB nuclease activity have been determined. The corresponding mutants failed to induce any distension, cell death or cell cycle arrest, showing that the CdtB catalytic activity is responsible for the observed cellular effects and that CdtB has a functional homology with DNase I [44,54]. Finally, the CdtB nuclease activity has been demonstrated *in vitro* by incubating a super-coiled plasmid DNA with the whole CDT holotoxin or with CdtB alone (see below). We reintroduce here the important concepts to study the DNA damage response pathway activation and relate them with the observations made after CDT treatment.

2.1. The CDT-Activated DNA Damage Response

In order to replicate correctly and to maintain the stability of their genetic information, eukaryotic cells display systems for controlling the genome integrity. Cells continuously undergo DNA damage generated by different sources (environment, metabolism, *etc.*). To survive in the presence of DNA lesions, the cell has developed mechanisms to detect and signal the damage. These interconnected pathways are referred to as the DNA damage response (DDR).

2.1.1. Introduction to the DDR

The DNA damage-related activation of checkpoints is divided into three stages: (i) the recognition of DNA damage by sensor proteins (MRN and Ku complexes, RPA), which rapidly activate specific phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinases (ATM, ATR, DNA-PK) [55]; (ii) the signal amplification by transducing proteins (CHK1, CHK2); which (iii) activates an appropriate cellular response by effectors proteins (p53, CDC25, *etc.*). This cell response initiates the cell cycle regulation, the activation of DNA repair pathways and, in some cases, cell death pathways [56].

Two key signaling pathways are activated in response to DNA damage: the ATM-CHK2 and the ATR-CHK1 pathways. The ATM-CHK2 pathway is activated with the response to DSB-inducing agents. Following the generation of a DSB, the MRN complex, consisting of MRE11, RAD50 and NBS1, recruits the ATM kinase to the site of injury [57]. Once at the DSB site, ATM is activated by autophosphorylation and phosphorylates hundreds of substrates, including CHK2 and p53. Meanwhile, ATM phosphorylates the H2AX histone (then called γH2AX), several megabases around the DSB site [58], allowing signal amplification. The activated CHK2 phosphorylates various substrates, including p53 and the CDC25 phosphatases family. By contrast, the ATR-CHK1 pathway is activated by the accumulation of single-stranded DNA (ssDNA), particularly during the stalling of replication forks (RFs). Indeed, when replication is blocked by DNA lesions (SSB, DSB, inter-strand and intra-strand crosslinks, base modifications or adducts), DNA polymerase is uncoupled from the replicative helicase, which continues to unwind the DNA and, thus, generates ssDNA. ssDNA is recognized by the RPA protein complex, which protects and stabilizes it, and the accumulation of RPA-coated ssDNA at stalled RFs induces the recruitment of the ATR/ATRIP complex [59]. ATR then phosphorylates the CHK1 transducing protein [60]. ATR can, like ATM, phosphorylate H2AX [61], p53 and many cell cycle regulators (such as CDC25A, CDC25C and Wee1). In conclusion, whatever the activated pathway, the ATR-CHK1 or ATM-CHK2 activation will lead to major protein phosphorylation, involved in various cellular processes, including cell cycle regulation, DNA repair and programmed cell death [62]. However, it has to be underlined that many crosstalk exist between the ATM and ATR pathways (reviewed in [63]). Indeed, although CHK2 is the ATM primary target, ATM can also phosphorylate CHK1. In addition, processing of DSBs during the homologous recombination pathway (HR) generates stretches of ssDNA, leading to the ATR pathway activation [64]. Conversely, prolonged replicative stress can provoke RF collapse [65], resulting in DSB formation and ATM-CHK2 pathway activation (Figure 2). In summary, according to the type of DNA injury, the ATM and ATR pathways can be specifically or sequentially activated, resulting in the cell cycle arrest, the activation of the DNA repair machinery and, potentially, in cell death.

2.1.2. CDT Activates the DNA Damage Response

Many studies have compared the cellular effects of CdtB with DSB induced by IR. The first report deals with the cell cycle arrest induced in response to HdCDT or IR, in HL(human embryonic lung)-fibroblasts and HEp-2 cells [66], and suggested that CDT induces the activation of the DSB-related pathway. To better characterize the CdtB intracellular effects, the activation and the recruitment of different DDR proteins to damaged sites have been studied, demonstrating that CDT

exposure recapitulates the different steps of DSB signaling (Figure 3). First, the three subunits of the MRN complex have been shown to form nuclear foci following CDT exposure [67–69]. Different studies highlighted an activation of the ATM-dependent pathway, since the ATM protein level was increased and its phosphorylated form accumulated after CDT infection [11,53,70]. Besides, γH2AX foci are formed in response to CDT from various origins [53,67,68,71–75]. γH2AX is the most commonly used DSB biomarker, but can be observed in response to other stresses, such as replicative stress, hypoxia, chromatin remodeling, senescence or cell death [76]. Hence, to strengthen the fact that CDT induces DSB, another DSB marker, 53BP1, has been shown to form foci after CDT treatment [53,73,75]. Finally, ATM activation in response to CDT leads to CHK2 phosphorylation [11,53,70,72,73]. CHK2 phosphorylates different effectors, such as the cell cycle regulators of the phosphatase family, CDC25A and CDC25C. It is well known that ATM and CHK2 activate and stabilize p53, enhancing the transcription of the p21 gene involved in the cell cycle arrest at G1/S [77]. As expected, several studies showed that CDT induces p53 phosphorylation and stabilization, leading to the accumulation of p21 [38,73,78].

Figure 2. Activation and crosstalk between the ATM and ATR pathways. (**a**) Pathway activation at the double-stranded break (DSB). DSB formation induces the MRN-dependent ATM recruitment. ATM then phosphorylates numerous substrates, including itself and H2AX near the DSB site. DSB repair occurs through non-homologous end joining (NHEJ) or homologous recombination (HR) mechanisms (see Section 3.2 for details). During HR, resection of the DSB extremities produces ssDNA stretches that are coated by RPA, leading to ATRIP-dependent ATR recruitment and activation. (**b**) Pathway activation during replicative stress. Replication fork (RF) stalling induces ssDNA formation that is rapidly coated by RPA. This structure is recognized by ATRIP, which drives the recruitment and activation of ATR. Besides phosphorylating its other substrates, ATR locally phosphorylates H2AX. RF can restart in case of transient stress or collapse after prolonged stresses. RF collapse induces DSB formation and ATM pathway activation, leading to a second and more important wave of H2AX phosphorylation.

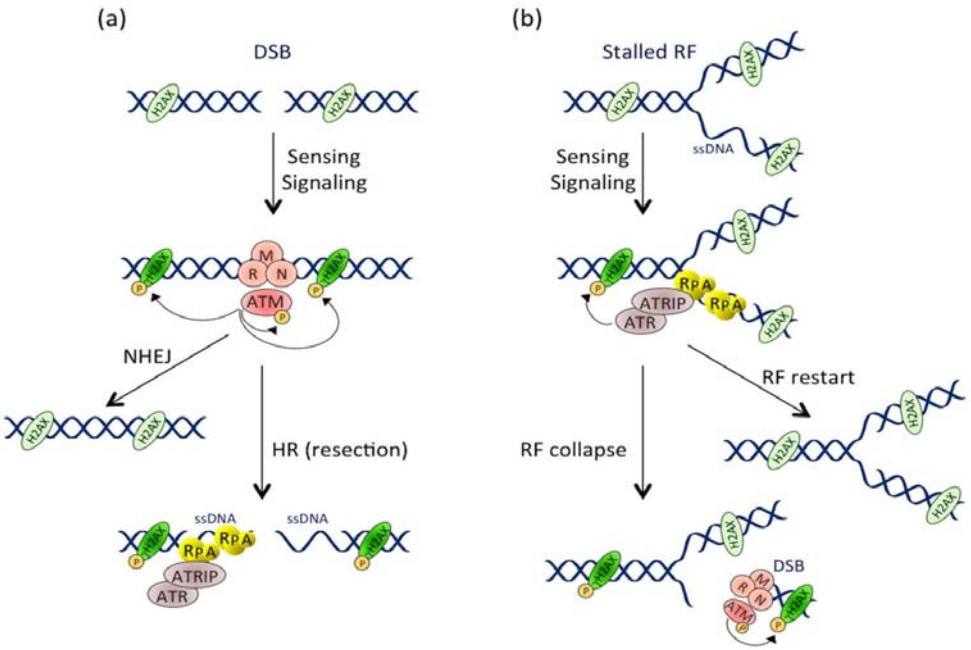
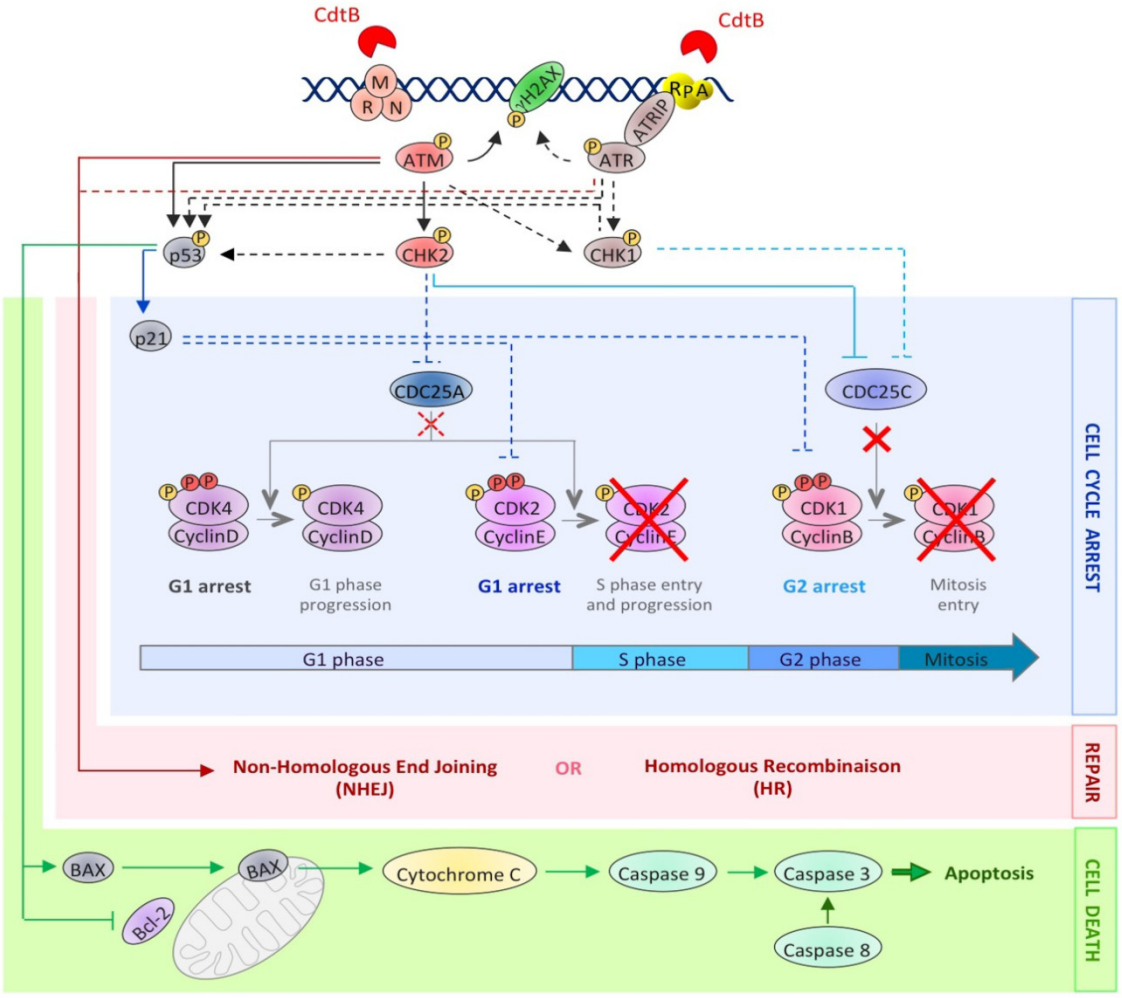


Figure 3. The activation of the DNA damage response upon CDT exposure. This picture depicts the DDR molecular events induced after CDT intoxication. The dotted lines represent well-studied events occurring during the DDR, but not yet demonstrated in the context of CDT exposure. CdtB-induced DNA lesions are detected by sensors, such as the MRN complex and RPA, resulting in the recruitment and the activation of the PI3K related kinases, ATM and ATR. ATM and ATR then phosphorylate hundreds of substrates, including H2AX, CHK1, CHK2 and p53 (black arrows). This signaling cascade results in the regulation of cell cycle modulators (blue lines), through the inhibition of CDC25C phosphatase by CHK2 and, possibly, CHK1. Phosphorylated CDC25C is unable to activate the cyclin B/CDK1 complex (red crosses), essential for mitotic entry. Moreover, the p53-dependent accumulation of p21 blocks cells in G1 by inhibiting the CDK2/cyclin E complex. At the same time, the DSB repair mechanisms (NHEJ and HR) are activated by ATM and ATR (red arrows). However, if the level of DNA lesions is too severe, the process of cell death is initiated (green arrows). Apoptotic cell death can be induced by an intrinsic pathway involving p53 activation, leading to an increase in the BAX level, the sequestration and inactivation of Bcl-2, the mitochondrial release of cytochrome C and caspase 9 activation. Apoptosis can also be induced through the activation of the extrinsic pathway, involving caspase 8 activation. In both cases, this leads to caspase 3 activation and apoptotic cell death.



Few publications studied the activation of the ATR-CHK1 pathway in response to CDT. In 2006, Taieb *et al.* showed the phosphorylation of ATM, CHK2 and CHK1 proteins following a 24-h treatment with EcCDT. However, in this study, no information on the protein responsible for the CHK1 phosphorylation was given [72]. In a recent publication, the activation of the ATM-CHK2 and ATR-CHK1 pathways, in response to gamma-irradiation or CDT treatment, were compared [53]. Irradiated GM637 fibroblasts present a rapid and transient ATM-dependent CHK1 phosphorylation that precedes a second wave of CHK1 phosphorylation, mediated by ATR, which was not activated during the first 8 h post-irradiation. This delayed ATR-CHK1 pathway activation, as well as the late CHK2 phosphorylation are a consequence of the unrepaired DNA lesions that stall and ultimately collapse the RFs when cells progress through the S-phase. In contrast, following HdCDT treatment, the kinetics of ATR and CHK1 phosphorylation are totally different, while the ATM-CHK2 response is quite similar. Indeed, ATR is found phosphorylated at early time points after CDT exposure, with the same kinetics as CHK1 phosphorylation, which increases over time and is shown to be ATM-independent [53]. These data show that, in contrast to the IR-related DDR response, the ATR-CHK1 pathway is activated early and continuously in response to HdCDT.

2.2. Cellular Effects of the CDT-Induced DNA Damage

2.2.1. Cell Cycle Arrest

The cell-cycle progression is regulated by sequential activation and nuclear relocalization of CDK/Cyclin complexes [79]. At the beginning of the cell cycle, the activation of CDK4/Cyclin D and CDK2/Cyclin E complexes controls the G1-phase progression and entry into S-phase. The CDK2/Cyclin A complex then regulates the S-phase progression. The S-phase completion and G2 transition are coordinated by the activation of the CDK1/Cyclin A complex. Finally mitotic entry depends on the activation and nuclear relocalization of the CDK1/Cyclin B complex. CDK/Cyclin complexes are activated by CDC25-dependent dephosphorylation and can be inhibited by different regulators, like p16, p21, p27 and Wee1 [80].

In response to CDT treatment, CHK2 activation induces the sequestration of CDC25C phosphatase in the cytoplasm, making it unable to activate the CDK1/Cyclin B complex [81]. As a result, the CDK1/Cyclin B complex is hyperphosphorylated [11,52,72,82] and inactive [50], preventing cells from entering the G2-phase (Figure 3). The implication of CDC25C in this process was demonstrated by overexpression of a recombinant CDC25C, which abrogates the CDT-induced G2/M cell cycle arrest [83]. Two other key factors of the cell cycle regulation are p53 and its p21 downstream target. Coherently, the G1/S checkpoint activation in response to CDT relies on the activation of p53 and p21 [84–86]. The G1/S checkpoint activation being largely dependent on p53, the variation in the p53 status among the cell types used in the experiments may explain the difference observed for their cell-cycle arrest; most of the p53 negative cells (or with a p53 inactive form) only arresting at G2/M and not at G1/S [68,74,86]. However, p21 induction can also be p53-independent, and a study indeed reported, in response to CDT, a p21 accumulation that was p53-independent [78]. In eukaryotic cells, p21 is known to inhibit many CDK/cyclin complexes, leading to the cell cycle regulation at different

steps [87]. CDT intoxication may therefore lead to the cell cycle arrest at the G1/S transition via the CDK2/cyclin E inactivation.

2.2.2. Cell Death or Senescence

Cell cycle arrest is not the only cellular response induced by the DDR. Indeed, the ATM-CHK2 and ATR-CHK1 pathways also activate DNA repair and cell death pathways. Generally, CDT treatment leads to cell death by an apoptotic pathway. CDT-mediated apoptosis has been shown to follow the intrinsic mitochondrial pathway, involving the BAX/Bcl-2 protein [51,74,88], cytochrome C release [74] and caspases activation [74,88,89]. However, few cell lines were shown to use the extrinsic apoptotic pathway through the caspase-8 cleavage [88–90]. CDT intoxicated cells die either by apoptosis or necrosis, the latter being perhaps a consequence of abortive mitosis. Hence, some studies demonstrated that in spite of the DDR activation, CDT-treated cells can bypass the G2/M checkpoint, resulting in micronucleation and abortive mitosis [82,91]. Furthermore, endoreplication events have also been documented [49,82]. CDT has been shown to induce an apoptotic response (Figure 3), following the cell cycle arrest, in a broad range of cell lines, with cell death being detectable between two and four days post-intoxication [9]. However, hematopoietic cells seem to activate a rapid apoptotic pathway during the first day of treatment to such an extent that the cell cycle arrest is not even observed [38,51,67,86,92]. When tested under the same conditions, non-hematopoietic cells presented a mild apoptotic response compared to hematopoietic cells, like monocytes and T-cells [93]. Hematopoietic cells therefore show the most dramatic apoptotic response and do not seem to activate the DDR in response to CDT, suggesting a specific cytotoxic mechanism that does not involve CDT-related DNA damage. Hence, such a DNA damage-independent cell death response may rely on the CdtB phosphatase activity [94].

Another possible cellular outcome of the CDT genotoxic effects is the induction of cellular senescence. CDT intoxicated cells express the hallmarks of cellular senescence (*i.e.*, persistently activated DNA damage signaling, enhanced senescence-associated β-galactosidase activity and promyelocytic nuclear compartments expansion) [73]. This is especially important with regard to the senescence-associated secretory phenotype and inflammation [95], as the expression of proinflammatory mediators is observed after CDT infection [18,96]. Finally, this could lead to cytokine-induced bystander genotoxic effects, with a two-fold increase of reactive oxygen species (ROS) observed after a CDT chronic treatment [91]. These particular aspects will not be further outlined in this review.

3. Characterization of the CDT-Induced DNA Lesions

3.1. CDT Does Not Directly Induce DSBs

Although the well-established model assumes that the CDT genotoxic activity is driven by a direct CdtB-induced DSB formation, several lines of evidence favor a more complex situation. Indeed, if a broad range of studies pointed out the recruitment of many factors involved in DSB signaling and repair as early as two hours after CDT intoxication (see above), DSB formation only occurs 6 h after CDT intoxication and increases over time, as detected by the direct visualization of DSB by pulse field

gel electrophoresis [86]. By comparison, using the same technique on irradiated cells, a similar amount of DSBs are detected immediately after cell irradiation. As CdtB reaches the nucleus in approximately 3 h [45], the delay between CdtB nuclear localization and DSB appearance may not be explained by a direct CdtB-related DSB formation.

3.1.1. CdtB Nuclease Activity Primarily Generates SSBs

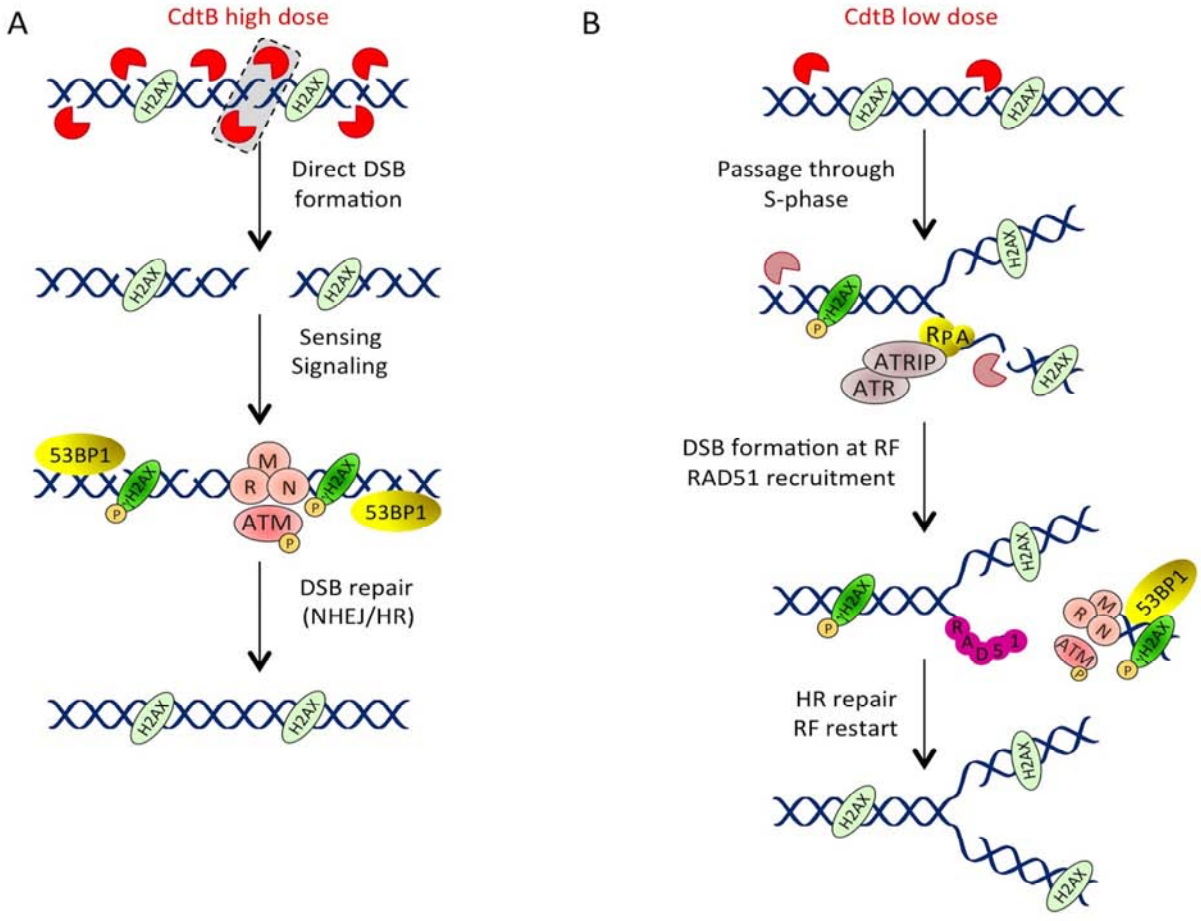
More strikingly, biochemical characterization of CdtB nuclease activity by the digestion of plasmid DNA clearly demonstrated that CdtB from various origins mostly induces nicks on supercoiled DNA, rather than direct DSB [54,67,97]. CdtB belongs to the endonuclease-phosphatase family, including the mammalian DNase I, as EcCdtB, AaCdtB or HdCdtB share sequence homology and structural similarity with DNase I, notably in their active site and DNA binding motif [22,23,44,54,98]. DNase I has been extensively characterized, and its nuclease activity is well documented. This enzyme is a divalent metal ion-dependent phosphodiesterase that catalyzes the degradation of double-stranded DNA by creating single-strand breaks (SSB), also called nicks, in the presence of magnesium [99]. The addition of calcium strongly stimulates the magnesium-dependent nicking activity, leading to the formation of DSB resulting from the presence of two closed nicks in opposite strands [100]. Such a synergistic effect between magnesium and calcium has also been observed for *Helicobacter hepaticus* CdtB nuclease activity [101]. Moreover, the structural and functional relationship between CdtB and DNase I has also been supported by chimeric AaCdtB-DNase I construct analysis [102]. Altogether, these studies strongly suggest that DNase I and CdtB nuclease activities are very similar. However, several studies have demonstrated that DNase I activity is by far higher than CdtB [67,101]. As DNase I primarily induces SSB, which can be converted to DSB under optimal conditions when two nicks face each other, it is therefore unlikely that CdtB induces direct DSBs.

3.1.2. Different Doses, Different DNA Lesions

In light of this rationale, we have been able to show by single-cell gel electrophoresis that EcCDT-treated cells accumulate SSB at early time points of intoxication, before DSB formation [75]. Such an observation may appear contradictory to previous data reporting the signaling of DSB, through the formation of NBS1 or γH2AX foci in the first two hours after CDT treatment [67,69]. This discrepancy is probably due to the CDT doses used in these different studies. Hence, as the vast majority of studies employ doses around 1 µg/mL or more, we chose to evaluate CDT genotoxicity at a very low dose (50 pg/mL) that is yet enough to induce a 50% loss of viability 72 h post-intoxication [75]. It is important to note that increasing doses up to 25 ng/mL induced DSB signaling, via γH2AX and 53BP1 foci formation, as early as 3 h post-intoxication, in agreement with previous reports. Thus, we strongly favor the assumption that CdtB does not directly induce DSBs on genomic or plasmid DNA, but rather SSBs. However, exceeding a certain threshold of SSBs on opposite strands may lead to the generation of DSBs. In a recent study, where the authors worked with high doses of HdCDT (4 µg/mL), the amount of DNA damage detected by a neutral (detection of DSBs) or alkaline (detection of DSBs, SSBs and alkali-labile sites) comet assay was similar after 6 h of exposure to the toxin, leading to the conclusion that HdCDT primarily induced DSBs under these conditions [53]. In contrast, 8 Gy of gamma-irradiation induced a two-fold higher rate of damage

revealed under alkaline condition. However, one has to remember that gamma-irradiation induces a large excess of SSBs and alkali-labile sites compared to DSBs, with a ratio of at least 1:20 [103,104]. Besides, the induction of tail DNA under neutral condition in a comet assay not only depends on DSBs, but also on the relaxation of genomic DNA supercoils resulting from SSBs [105], and direct comparison of neutral and alkaline comet assay will therefore under-estimate the SSB:DSB ratio. In conclusion, we believe that cells treated with high doses of CDT rapidly accumulate direct DSBs, these lesions being a part of the total CDT-induced SSBs. At lower doses, the total number of SSBs is not sufficient to produce direct DSBs (Figure 4).

Figure 4. A model of CDT-mediated DSB formation and repair. (**A**) Direct DSB formation with high doses of CDT. CdtB induces a large number of nicks on the host cell DNA. When two closed nicks face each other on opposite strands (dashed rectangle), they directly create a DSB that is sensed by MRN and signaled by ATM, resulting in H2AX phosphorylation and 53BP1 recruitment. This lesion will be repaired by NHEJ or HR. (**B**) Low doses of CDT induce S-phase-associated DSB. At low doses, the number of nicks is not large enough to produce direct DSBs. However, if these nicks are left unrepaired or if CdtB induces nicks during the S-phase (hatched CdtB), these lesions will block RF progression, resulting in ssDNA accumulation. ssDNA is then coated by RPA, leading to ATR activation. Then, the RF collapses, resulting in DSB formation and ATM pathway activation. RAD51 is recruited in order to restart the RF through HR repair.



3.1.3. Low Doses of CDT Induce Replication-Associated DSBs

Low doses of CDT thus firstly induce SSBs, which are converted into DSBs during the S-phase [75]. These cells suffer a slight replicative slow-down, underscored by the accumulation of chromatin bound PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) -positive cells, which precedes the G2/M arrest. It is therefore tempting to speculate that some unrepaired SSBs are converted into DSBs when encountering an RF (Figure 4), resembling the kinetics of camptothecin-induced DSBs [106]. Camptothecin prevents the repair of the topoisomerase I-induced cleavage complex, causing the RF to collapse and, thus, DSB formation. To corroborate this similarity, we have shown that the camptothecin-induced cell cycle alteration and DSB formation are reminiscent of those induced by low doses of EcCDT [75], suggesting that as for camptothecin, CDT-induced DNA damage requires S-phase progression to convert SSBs into DSBs. However, in contrast to camptothecin, data are missing in order to demonstrate that CdtB-induced SSBs are irreparable. However, CDT-induced DSBs (high doses) are still signaled by the persistence of γH2AX foci two days after a 4-h pulse treatment, whereas the number of γH2AX foci strongly decreases within 4 h after gamma-irradiation [53]. This suggests that the CdtB-related lesions cannot be repaired or that CdtB retains its nuclease activity over a long period of time after intoxication. If the latter is true, replication-associated DSB formed at low doses of CDT should result from newly induced SSBs that encounter an RF during replication, before being repaired.

By activating the DDR, replicative stress is known to lead to cellular senescence [95], providing a barrier to tumorigenesis. DDR downregulation prevents senescence initiation and maintenance, allowing cell proliferation and predisposing cells to oncogenic transformation [107,108]. Interestingly, cells surviving to CDT intoxication rapidly exhibit the hallmark of replicative cellular senescence within the firsts few days, including persistently activated DDR [73]. However, after chronic exposure of several weeks to sublethal doses of CDT, intoxicated cells show impaired DDR activation, bypass the cell cycle checkpoints and do not display the β-galactosidase senescent marker [91]. Thus, the different cellular outcomes of CDT intoxication have to be considered in regards to the toxin dose and the related DDR activation. If the CDT-induced apoptotic response is activated by a huge amount of unrepaired DNA lesions caused by high doses of CDT, then senescence may result from replicative stress induced by low doses of CDT. Finally, cells escaping these responses will eventually undergo oncogenic transformation.

3.2. Repair of the CDT-Related DNA Damage

3.2.1. Overview of the Eukaryotic DSB Repair Mechanisms

Eukaryotes have developed two main pathways to repair DSBs, namely non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR) [109]. NHEJ is the predominant pathway for the repair of DSBs throughout the cell cycle [110], while HR is more dedicated to RF-associated DSBs during the S-phase and G2 [111]. NHEJ is initiated through the recognition of DSB ends by the Ku70/Ku80 heterodimer, enabling the recruitment of the core NHEJ complex composed of DNA-PKcs, XLF and the XRCC4/DNA ligase IV complex (reviewed by [110]). The Ku70/Ku80 complex holds the two ends in close proximity and prevents resection, while the ligation of the two

extremities is mediated by the XRCC4/DNA ligase IV complex. On the other side, resection of the DSB-ends by specific nucleases (including MRE11) and helicases results in the formation of ssDNA 3' tails, promoting the HR pathway. The ssDNA 3' tails are coated by RPA, which is subsequently displaced by BRCA2 to allow the formation of the nucleofilament between the ssDNA and RAD51. The nucleofilament can then invade a homologous template, usually the sister chromatid, to initiate the repair (reviewed by [112]).

3.2.2. Involvement of the Direct DSB Response Pathway

Until recently, little was known concerning the pathways involved in the repair of CDT-induced DNA damage. The importance of the ATM-dependent pathway has been clearly demonstrated in the signaling of the CDT-related DSBs, but its role in surviving CDT intoxication is still under debate. ATM-deficient lymphoblastoid cell lines exposed to HdCDT exhibit a reduced p53 stabilization and cytotoxicity, determined by the sub-G1 population, in comparison to wild-type counterparts [66]. In consistency, the apoptotic response of CHK2-depleted keratinocytes treated with AaCDT was attenuated compared to control cells [70]. On the contrary, ATM-deficient fibroblasts are hypersensitive to HdCDT [53]. The difference observed between ATM-deficient lymphoblastoid cell lines, and fibroblasts may be explained by the atypical response of hematopoietic cells to CDT intoxication (see above). In addition, the opposite effects of ATM and CHK2 deficiency were not unexpected, as demonstrated by the radioresistance of *Chk2*$^{-/-}$ mice compared to the extreme sensitivity of the *Atm*$^{-/-}$ mice to gamma-irradiation [113,114]. Besides, a glioblastoma cell line mutated in DNA-PKcs shows an increased cell death after HdCDT exposure, pointing out that NHEJ is required for the repair of CDT-induced DNA lesions, at least for high doses [53] (Figure 4).

3.2.3. Implication of HR during the CDT-Mediated Replicative Stress Recovery

Beyond the requirement of the ATM pathway to protect cells against CDT genotoxicity, another pathway seems to be activated. Indeed, the pharmacological inhibition of ATM and DNA-PK does not abrogate the phosphorylation of CHK2 after CDT treatment [81], suggesting that ATR may be involved in this response. As a matter of fact, a rapid and increasing activation of the ATR-CHK1 pathway has been observed during the first 24 h post-intoxication with HdCDT [53]. As mentioned above, the ATR activation requires the accumulation of ssDNA regions coated by RPA, and interestingly, RPA foci are rapidly detected in EcCDT-treated cells [75]. One of the first studies characterizing the CDT-induced cell cycle arrest showed that replication seems to play a crucial role in the response to CDT-induced DNA damage, since the progression through the S-phase appears to be essential for cells to be arrested at the next G2/M [50]. The importance of the S-phase is also indicated by the observation that low doses of CDT induce the formation of replication-associated DSBs. As HR plays a major role in the repair of DSBs produced at RF, this pathway is probably activated in response to CDT. The BRCA2 expression level is enhanced in response to HdCDT [53], and RAD51 is recruited at DSBs sites induced with low doses of EcCDT [75]. However, after an 8-h treatment with high doses of HdCDT, 100% of the exposed cells exhibit γH2AX foci, whereas MRE11 foci are only detected in 40% to 45% of these cells [67]. This result suggests that in the context of CDT-induced DNA damage, the mobilization of MRN does not reflect the sensing of all DSBs, but may rather be

involved in the DSB processing, probably the resection of S-phase-associated DSBs during HR repair. Interestingly, a yeast genetic screen revealed that only the strains defective for HR, but not for any other repair pathways, including NHEJ, were compromised in surviving to AaCdtB [115]. This study corroborates another yeast screen depicting the CjCdtB sensitivity of a genome-wide mutant library [116]. Besides demonstrating the replicative stress response to CjCdtB and the protective role of HR, this study also pointed out the difference between the repair of HO endonuclease and CjCdtB DNA lesions, suggesting that CdtB-induced genotoxicity is not similar to the direct HO-related DSB. Finally, human RAD51- or BRCA2-depleted cells are hypersensitive to CDT intoxication, confirming the involvement of HR in the repair of CDT-induced DNA lesions in mammals [53,75].

4. Conclusions

Chronic exposure to DNA damaging agents may result in genomic instability, because of the alteration of key genes involved in DDR, cell-cycle regulation or DNA repair mechanisms, therefore enhancing the risk of tumor development [117]. Chronic exposure to CDT sublethal doses has been shown to induce genomic instability, with DDR and checkpoint activation being impaired upon genotoxic stress [91]. In addition, the cell viability was not found to be altered, due to sustained p38 MAP kinase activity, and anchorage-independent proliferation, a hallmark of cell transformation, was observed. These results point out the impairment of damage detection and DNA repair mechanisms in chronically CDT-exposed cells. Furthermore, CDT treatment was shown to induce pro-inflammatory genes and was associated with inflammation to dysplasia progression [18]. Inflammation contributes to cancerogenesis [118], and it is known that bacterial pathogens induce host cell DNA damage through chronic inflammation [119]. Bacterial infection has already been linked to carcinogenesis. *Helicobacter pylori* is a well-known example, associated with gastric carcinoma (reviewed in [120]), downregulation of repair mechanisms and increased mutation frequency [121,122], although this pathogen does not encode any CDT genotoxin. New examples are still being uncovered, with recent studies associating *Fusobacterium spp.* with colorectal cancer and providing mechanistic insights into inflammation involvement in this process [123,124]. Now, chronic *S. typhi* infection is also associated with gallbladder and hepatobiliary carcinoma [125]. Altogether, these results suggest that CDT may contribute to virulence and pathogenicity by interfering with various cellular processes, leading to genomic instability and inflammation [96]. A global view is being established, and the clarification of CDT-expressing bacteria involvement in host pathogenicity will be of particular interest in the future. Particularly, in this context, the characterization of CDT genotoxic potential appears essential.

Acknowledgments

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (Grant ANR-10-CESA-011) and the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Elisabeth Bezine is a recipient of a fellowship of the French Ministry of Research.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Johnson, W.M.; Lior, H. Response of chinese hamster ovary cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misinterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **1987**, *43*, 19–23.
2. Johnson, W.M.; Lior, H. A new heat-labile Cytolethal Distending Toxin (CLDT) produced by campylobacter spp. *Microbiol. Pathol.* **1988**, *4*, 115–126.
3. 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*. A diffusible cytotoxin of haemophilus ducreyi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 4056–4061.
4. Sugai, M.; Kawamoto, T.; Pérès, S.Y.; Ueno, Y.; Komatsuzawa, H.; Fujiwara, T.; Kurihara, H.; Suginaka, H.; Oswald, E. The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by actinobacillus actinomycetemcomitans is a cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 5008–5019.
5. Shen, Z.; Feng, Y.; Rogers, A.B.; Rickman, B.; Whary, M.T.; Xu, S.; Clapp, K.M.; Boutin, S.R.; Fox, J.G. Cytolethal distending toxin promotes helicobacter cinaedi-associated typhlocolitis in interleukin-10-deficient mice. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 2508–2516.
6. Haghjoo, E.; Galán, J.E. Salmonella typhi encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 4614–4619.
7. Stanley, J.; Linton, D.; Burnens, A.P.; Dewhirst, F.E.; On, S.L.W.; Porter, A.; Owen, R.J.; Costas, M. Helicobacter pullorurn sp. nov.-genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. *Microbiology* **1994**, *140*, 3441–3449.
8. Chien, C.C.; Taylor, N.S.; Ge, Z.; Schauer, D.B.; Young, V.B.; Fox, J.G. Identification of cdtB homologues and cytolethal distending toxin activity in enterohepatic Helicobacter spp. *J. Med. Microbiol.* **2000**, *49*, 525–534.
9. Jinadasa, R.N.; Bloom, S.E.; Weiss, R.S.; Duhamel, G.E. Cytolethal distending toxin: A conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression , leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology* **2011**, *157*, 1851–1875.
10. Nipic, D.; Podlesek, Z.; Budic, M.; Crnigoj, M.; Zgur-Bertok, D. *Escherichia coli* uropathogenic-specific protein, usp, is a bacteriocin-like genotoxin. *J. Infect. Dis.* **2013**, *208*, 1545–1552.
11. Nougayrède, J.; Homburg, S.; Taieb, F.; Boury, M.; Brzuszkiewicz, E.; Gottschalk, G.; Buchrieser, C.; Hacker, J.; Dobrindt, U.; Oswald, E. *Escherichia coli* induces dna double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* **2006**, *313*, 848–851.
12. Yamamoto, S.; Nakano, M.; Terai, A.; Yuri, K.; Nakata, K.; Nair, G.B.; Kurazono, H.; Ogawa, O. The presence of the virulence island containing the usp gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. *J. Urol.* **2001**, *165*, 1347–1351.
13. Arthur, J.C.; Perez-chanona, E.; Mühlbauer, M.; Tomkovich, S.; Uronis, J.M.; Fan, T.; Campbell, B.J.; Abujamel, T.; Dogan, B.; Rogers, A.B.; *et al*. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* **2012**, *338*, 120–123.

14. Finlay, B.B.; Falkow, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**, *61*, 136–169.
15. Ge, Z.; Schauer, D.B.; Fox, J.G. *In vivo* virulence properties of bacterial Cytolethal Distending Toxin. *Cell. Microbiol.* **2008**, *10*, 1599–1607.
16. Jain, D.; Prasad, K.N.; Sinha, S.; Husain, N. Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative campylobacter jejuni strains. *J. Med. Microbiol.* **2008**, *57*, 267–272.
17. Pokkunuri, V.; Pimentel, M.; Morales, W.; Jee, S.R.; Alpern, J.; Weitsman, S.; Marsh, Z.; Low, K.; Hwang, L.; Khoshini, R.; *et al.* 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.* **2012**, *18*, 434–442.
18. Ge, Z.; Rogers, A.B.; Feng, Y.; Lee, A.; Xu, S.; Taylor, N.S.; Fox, J.G. Bacterial cytolethal distending toxin promotes the development of dysplasia in a model of microbially induced hepatocarcinogenesis. *Cell. Microbiol.* **2007**, *9*, 2070–2080.
19. Song, J.; Gao, X.; Galán, J.E. Structure and function of the salmonella typhi chimaeric A2B5 typhoid toxin. *Nature* **2013**, *499*, 350–354.
20. Scott, D.A.; Kaper, J.B. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* **1994**, *62*, 244–251.
21. Pickett, C.L.; Cottle, D.L.; Pesci, E.C.; Bikah, G. Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. *Infect. Immun.* **1994**, *62*, 1046–1051.
22. Nesić, D.; Hsu, Y.; Stebbins, C.E. Assembly and function of a bacterial genotoxin. *Nature* **2004**, *429*, 429–433.
23. Yamada, T.; Komoto, J.; Saiki, K.; Konishi, K.; Takusagawa, F. Variation of loop sequence alters stability of cytolethal distending toxin (CDT): Crystal structure of CDT from actinobacillus actinomycetemcomitans. *Protein Sci.* **2006**, *15*, 362–372.
24. Spanò, S.; Ugalde, J.E.; Galán, J.E. Delivery of a salmonella typhi exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe* **2008**, *3*, 30–38.
25. Kaslow, H.R.; Burns, D.L. Pertussis toxin and target eukaryotic cells: Binding, entry, and activation. *FASEB J.* **1992**, *6*, 2685–2690.
26. Ueno, Y.; Ohara, M.; Kawamoto, T.; Fujiwara, T.; Komatsuzawa, H.; Oswald, E.; Sugai, M. Biogenesis of the actinobacillus actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin holotoxin. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 3480–3487.
27. Zijnge, V.; Kieselbach, T.; Oscarsson, J. Proteomics of protein secretion by aggregatibacter actinomycetemcomitans. *PLoS One* **2012**, *7*, e41662.
28. Berlanda Scorza, F.; Doro, F.; Rodríguez-Ortega, M.J.; Stella, M.; Liberatori, S.; Taddei, A.R.; Serino, L.; Gomes Moriel, D.; Nesta, B.; Fontana, M.R.; *et al*. Proteomics characterization of outer membrane vesicles from the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* deltatolR IHE3034 mutant. *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7*, 473–485.
29. Lindmark, B.; Rompikuntal, P.K.; Vaitkevicius, K.; Song, T.; Mizunoe, Y.; Uhlin, B.E.; Guerry, P.; Wai, S.N. Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from campylobacter jejuni. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 220.

30. Rompikuntal, P.K.; Thay, B.; Khan, M.K.; Alanko, J.; Penttinen, A.-M.; Asikainen, S.; Wai, S.N.; Oscarsson, J. Perinuclear localization of internalized outer membrane vesicles carrying active cytolethal distending toxin from aggregatibacter actinomycetemcomitans. *Infect. Immun.* **2012**, *80*, 31–42.
31. Gargi, A.; Reno, M.; Blanke, S.R. Bacterial toxin modulation of the eukaryotic cell cycle: Are all cytolethal distending toxins created equally? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2012**, *2*, 124.
32. Hu, X.; Nesic, D.; Stebbins, C.E. Comparative structure-function analysis of cytolethal distending toxins. *Proteins* **2006**, *62*, 421–434.
33. Lee, R.B.; Hassane, D.C.; Cottle, D.L.; Pickett, C.L. Interactions of campylobacter jejuni cytolethal distending toxin subunits CdtA and CdtC with HeLa cells. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 4883–4890.
34. Mcsweeney, L.A.; Dreyfus, L.A. Carbohydrate-binding specificity of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin CdtA-II and CdtC-II subunits. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 2051–2060.
35. Eshraghi, A.; Maldonado-arocho, F.J.; Gargi, A.; Cardwell, M.M.; Prouty, M.G.; Blanke, S.R.; Bradley, K.A. Cytolethal distending toxin family members are differentially affected by alterations in host glycans and membrane cholesterol. *Microbiology* **2010**, *285*, 18199–18207.
36. 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*. Haploid genetic screens in human cells identify host factors used by pathogens. *Science* **2009**, *326*, 1231–1235.
37. Carette, J.E.; Guimaraes, C.P.; Wuethrich, I.; Blomen, V.A.; Sun, C.; Bell, G.; Yuan, B.; Muellner, M.K.; Nijman, M.; Ploegh, H.L.; *et al*. Global gene disruption in human cells to assign genes to phenotypes. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 542–546.
38. Cortes-Bratti, X.; Chaves-Olarte, E.; Lagergård, T.; Thelestam, M. Cellular Internalization of cytolethal distending toxin from haemophilus ducreyi. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 6903–6911.
39. Guerra, L.; Teter, K.; Lilley, B.N.; Stenerlöw, B.; Holmes, R.K.; Ploegh, H.L.; Sandvig, K.; Thelestam, M.; Frisan, T. Cellular internalization of cytolethal distending toxin: A new end to a known pathway. *Cell. Microbiol.* **2005**, *7*, 921–934.
40. Boesze-Battaglia, K.; Besack, D.; McKay, T.; Zekavat, A.; Otis, L.; Jordan-Sciutto, K.; Shenker, B.J. Cholesterol-rich membrane microdomains mediate cell cycle arrest induced by actinobacillus actinomycetemcomitans cytolethal-distending toxin. *Cell. Microbiol.* **2006**, *8*, 823–836.
41. Boesze-Battaglia, K.; Brown, A.; Walker, L.; Besack, D.; Zekavat, A.; Wrenn, S.; Krummenacher, C.; Shenker, B.J. cytolethal distending toxin-induced cell cycle arrest of lymphocytes is dependent upon recognition and binding to cholesterol. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 10650–10658.
42. Lin, C.D.; Lai, C.K.; Lin, Y.H.; Hsieh, J.T.; Sing, Y.T.; Chang, Y.C.; Chen, K.C.; Wang, W.C.; Su, H.L.; Lai, C.H. Cholesterol depletion reduces entry of Campylobacter jejuni cytolethal distending toxin and attenuates intoxication of host cells. *Infect. Immun.* **2011**, *79*, 3563–3575.
43. Damek-Poprawa, M.; Jang, J.Y.; Volgina, A.; Korostoff, J.; DiRienzo, J.M. Localization of Aggregatibacter actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin subunits during intoxication of live cells. *Infect. Immun.* **2012**, *80*, 2761–2770.

44. Lara-Tejero, M.; Galàn, J.E. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-Like protein. *Science* **2000**, *290*, 354–357.
45. Nishikubo, S.; Ohara, M.; Ueno, Y.; Ikura, M.; Kurihara, H.; Komatsuzawa, H.; Oswald, E.; Sugai, M. Ann-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*, 50671–50681.
46. Guerra, L.; Nemec, K.N.; Massey, S.; Tatulian, S.A.; Thelestam, M.; Frisan, T.; Teter, K. A novel mode of translocation for cytolethal distending toxin. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1793*, 489–495.
47. Gargi, A.; Tamilselvam, B.; Powers, B.; Prouty, M.G.; Lincecum, T.; Eshraghi, A.; Maldonado-Arocho, F.J.; Wilson, B.A.; Bradley, K.A.; Blanke, S.R. Cellular interactions of the cytolethal distending toxins from *Escherichia coli* and haemophilus ducreyi. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 7492–7505.
48. McSweeney, L.A.; Dreyfus, L.A. Nuclear localization of the *Escherichia coli* cytolethal Distending toxin CdtB subunit. *Cell. Microbiol.* **2004**, *6*, 447–458.
49. Pérès, S.Y.; Marchès, O.; Daigle, F.; Nougayrède, J.P.; Herault, F.; Tasca, C.; de Rycke, J.; Oswald, E. A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.* **1997**, *24*, 1095–1107.
50. Comayras, C.; Tasca, C.; Pe, S.Y.; Oswald, E.; Rycke, J.D.E. *Escherichia coli* cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G2/M transition by preventing cdc2 protein kinase dephosphorylation and activation. *Escherichia coli* cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G 2/M Tr. *Infect. Immun.* **1997**, *65*, 5088–5095.
51. Ohguchi, M.; Ishisaki, A.; Okahashi, N.; Koide, M.; Koseki, T.; Yamato, K.; Noguchi, T.; Nishihara, T. Actinobacillus actinomycetemcomitans toxin induces both cell cycle arrest in the G2/M phase and apoptosis. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 5980–5987.
52. Sert, V.; Cans, C.; Tasca, C.; Oswald, E.; Ducommun, B.; de Rycke, J. The bacterial cytolethal distending toxin (CDT) triggers a G2 cell cycle checkpoint in mammalian cells without preliminary induction of DNA strand breaks. *Oncogene* **1999**, *18*, 6296–6304.
53. Fahrer, J.; Huelsenbeck, J.; Jaurich, H.; Dörsam, B.; Frisan, T.; Eich, M.; Roos, W.P.; Kaina, B.; Fritz, G. Cytolethal distending toxin (CDT) is a radiomimetic agent and induces persistent levels of DNA double-strand breaks in human fibroblasts. *DNA Repair (Amst)* **2014**, *18*, 31–43.
54. Elwell, C.A.; Dreyfus, L.A. DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol. Microbiol.* **2000**, *37*, 952–963.
55. Niida, H.; Nakanishi, M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* **2006**, *21*, 3–9.
56. Jackson, S.P.; Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **2009**, *461*, 1071–1078.
57. Lee, J.-H.; Paull, T.T. ATM activation by DNA double-Strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **2005**, *308*, 551–554.
58. Rogakou, E.P.; Boon, C.; Redon, C.; Bonner, W.M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *J. Cell Biol.* **1999**, *146*, 905–916.
59. Zou, L.; Elledge, S.J. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **2003**, *300*, 1542–1548.

60. Zhao, H.; Piwnica-Worms, H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 4129–4139.
61. Ward, I.M.; Chen, J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47759–47762.
62. Matsuoka, S.; Ballif, B.A; Smogorzewska, A.; McDonald, E.R.; Hurov, K.E.; Luo, J.; Bakalarski, C.E.; Zhao, Z.; Solimini, N.; Lerenthal, Y.; *et al*. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **2007**, *316*, 1160–1166.
63. Gobbini, E.; Cesena, D.; Galbiati, A.; Lockhart, A.; Longhese, M.P. Interplays between ATM/Tel1 and ATR/Mec1 in sensing and signaling DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* **2013**, *12*, 791–799.
64. Jazayeri, A.; Falck, J.; Lukas, C.; Bartek, J.; Smith, G.C.M.; Lukas, J.; Jackson, S.P. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 37–45.
65. Feng, W.; di Rienzi, S.C.; Raghuraman, M.K.; Brewer, B.J. Replication stress-induced chromosome breakage is correlated with replication fork progression and is preceded by single-stranded DNA formation. *G3 Genes Genomes Genet.* **2011**, *1*, 327–335.
66. Cortes-Bratti, X.; Karlsson, C.; Lagergård, T.; Thelestam, M.; Frisan, T. The haemophilus ducreyi cytolethal distending Toxin induces cell cycle arrest and apoptosis via the DNA damage checkpoint pathways. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5296–5302.
67. Li, L.; Sharipo, A.; Chaves-Olarte, E.; Masucci, M.G.; Levitsky, V.; Thelestam, M.; Frisan, T. 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.
68. Hassane, D.C.; Lee, R.B.; Pickett, C.L. Campylobacter jejuni cytolethal distending toxin promotes DNA repair responses in normal human cells. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 541–545.
69. Guerra, L.; Albihn, A.; Tronnersjö, S.; Yan, Q.; Guidi, R.; Stenerlöw, B.; Sterzenbach, T.; Josenhans, C.; Fox, J.G.; Schauer, D.B.; *et al*. Myc is required for activation of the ATM-dependent checkpoints in response to DNA damage. *PLoS One* **2010**, *5*, e8924.
70. Alaoui-El-Azher, M.; Mans, J.J.; Baker, H.V; Chen, C.; Progulske-Fox, A.; Lamont, R.J.; Handfield, M. Role of the ATM-checkpoint kinase 2 pathway in CDT-mediated apoptosis of gingival epithelial cells. *PLoS One* **2010**, *5*, e11714.
71. Bielaszewska, M.; Sinha, B.; Kuczlus, T.; Karch, H. 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.* **2005**, *73*, 552–562.
72. Taieb, F.; Nougayrède, J.; Watrin, C.; Samba-louaka, A.; Oswald, E. *Escherichia coli* cyclomodulin Cif induces G 2 arrest of the host cell cycle without activation of the DNA-damage checkpoint-signalling pathway. **2006**, *8*, 1910–1921.
73. Blazkova, H.; Krejcikova, K.; Moudry, P.; Frisan, T.; Hodny, Z.; Bartek, J. Bacterial intoxication evokes cellular senescence with persistent DNA damage and cytokine signalling. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14*, 357–367.
74. Liyanage, N.P.M.; Manthey, K.C.; Dassanayake, R.P.; Kuszynski, C.A.; Oakley, G.G.; Duhamel, G.E. Helicobacter hepaticus cytolethal distending toxin causes cell death in Intestinal epithelial cells via mitochondrial apoptotic pathway. *Helicobacter* **2010**, *15*, 98–107.

75. Fedor, Y.; Vignard, J.; Nicolau-Travers, M.-L.; Boutet-Robinet, E.; Watrin, C.; Salles, B.; Mirey, G. 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.* **2013**, *15*, 1–15.
76. Vignard, J.; Mirey, G.; Salles, B. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A direct and indirect lighting up. *Radiother. Oncol.* **2013**, *108*, 362–369.
77. Ahn, J.; Urist, M.; Prives, C. The Chk2 protein kinase. *DNA Repair (Amst)* **2004**, *3*, 1039–1047.
78. Sato, T.; Koseki, T.; Yamato, K.; Saiki, K.; Konishi, K.; Yoshikawa, M.; Ishikawa, I.; Nishihara, T. p53-Independent Expression of p21 CIP1/WAF1 in plasmacytic cells during G2 cell cycle arrest induced by actinobacillus actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 528–534.
79. Hochegger, H.; Takeda, S.; Hunt, T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: Does one fit all? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 910–916.
80. Langerak, P.; Russell, P. Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2011**, *366*, 3562–3571.
81. Alby, F.; Mazars, R.; de Rycke, J.; Guillou, E.; Baldin, V.; Darbon, J.M.; Ducommun, B. Study of the cytolethal distending toxin (CDT)-activated cell cycle checkpoint. Involvement of the CHK2 kinase. *FEBS Lett.* **2001**, *491*, 261–265.
82. De Rycke, J.; Sert, V.; Comayras, C.; Tasca, C. Sequence of lethal events in HeLa cells exposed to the G2 blocking cytolethal distending toxin. *Eur. J. Cell Biol.* **2000**, *79*, 192–201.
83. Escalas, N.; Davezac, N.; de Rycke, J.; Baldin, V.; Mazars, R.; Ducommun, B. Study of the cytolethal distending toxin-induced cell cycle arrest in HeLa cells: Involvement of the CDC25 phosphatase. *Exp. Cell Res.* **2000**, *257*, 206–212.
84. Bielaszewska, M.; Fell, M.; Greune, L.; Prager, R.; Fruth, A.; Tschäpe, H.; Schmidt, M.A.; Karch, H.; Tscha, H. Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 1812–1816.
85. Cortes-Bratti, X.; Frisan, T.; Thelestam, M. The cytolethal distending toxins induce DNA damage and cell cycle arrest. *Toxicon* **2001**, *39*, 1729–1736.
86. Frisan, T.; Cortes-bratti, X.; Chaves-olarte, E.; Stenerlöw, B.; Thelestam, M.; Rica, U.D.C.; José, S.; Rica, C. The Haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin induces DNA double-strand breaks and promotes ATM-dependent activation of RhoA. *Cell. Microbiol.* **2003**, *5*, 695–707.
87. Abbas, T.; Dutta, A. P21 in Cancer: Intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 400–414.
88. Shenker, B.J.; Hoffmaster, R.H.; Zekavat, A.; Yamaguchi, N.; Lally, E.T.; Demuth, D.R. 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.* **2001**, *167*, 435–441.
89. Ohara, M.; Hayashi, T.; Kusunoki, Y.; Miyauchi, M.; Takata, T.; Sugai, M.; Mmun, I.N.I. Caspase-2 and Caspase-7 are involved in cytolethal distending toxin-induced apoptosis in jurkat and MOLT-4 T-cell lines. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 871–879.

90. Hickey, T.E.; Majam, G.; Guerry, P. Intracellular survival of campylobacter jejuni in human monocytic cells and induction of apoptotic death by cytholethal distending toxin. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 5194–5197.
91. Guidi, R.; Guerra, L.; Levi, L.; Stenerlöw, B.; Fox, J.G.; Josenhans, C.; Masucci, M.G.; Frisan, T. 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.
92. Gelfanova, V.; Hansen, E.J.; Spinola, S.M. Cytolethal distending toxin of haemophilus ducreyi induces apoptotic death of jurkat T cells. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 6394–6402.
93. Wising, C.; Azem, J.; Zetterberg, M.; Svensson, L.A.; Ahlman, K.; Lagerga, T. Induction of apoptosis/necrosis in various human cell lineages by haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin. *Toxicon* **2005**, *45*, 767–776.
94. Shenker, B.J.; Dlakic, M.; Walker, L.P.; Besack, D.; Jaffe, E.; LaBelle, E.; Boesze-Battaglia, K. A novel mode of action for a microbial-derivated immunotoxin: The cytolethal distending toxin subunit B exhibits phosphatidylinositol3,4,5-triphosphate phosphatase activity. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 5099–5108.
95. Campisi, J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **2013**, *75*, 685–705.
96. Guerra, L.; Guidi, R.; Frisan, T. Do bacterial genotoxins contribute to chronic inflammation, genomic instability and tumor progression? *FEBS J.* **2011**, *278*, 4577–4588.
97. Mao, X.; DiRienzo, J.M. Functional studies of the recombinant subunits of a cytolethal distending holotoxin. *Cell. Microbiol.* **2002**, *4*, 245–255.
98. Hontz, J.S.; Villar-Lecumberri, M.T.; Dreyfus, L.A; Yoder, M.D. Crystallization of *Escherichia coli* CdtB, the biologically active subunit of cytolethal distending toxin. *Acta Crystallogr. Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2006**, *62*, 192–195.
99. Campbell, V.W.; Jackson, D.A. The effect of divalent cations on the mode of action of DNase I. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3726–3735.
100. Pan, C.Q.; Ulmer, J.S.; Herzka, A.; Lazarus, R.A. Mutational analysis of human DNase I at the DNA binding interface: Implications for DNA recognition, catalysis, and metal ion dependence. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 628–636.
101. Dassanayake, R.P.; Griep, M.A.; Duhamel, G.E. The cytolethal distending toxin B sub-unit of Helicobacter hepaticus is a Ca^{2+}—and Mg^{2+} -dependent neutral nuclease. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *251*, 219–225.
102. DiRienzo, J.M.; Cao, L.; Volgina, A.; Bandelac, G.; Korostoff, J. Functional and structural characterization of chimeras of a bacterial genotoxin and human type I DNAse. *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *291*, 222–231.
103. Roots, R.; Holley, W.; Chatterjee, A.; Rachal, E.; Kraft, G. The influence of radiation quality on the formation of DNA breaks. *Adv. Space Res.* **1989**, *9*, 45–55.
104. Averbeck, D. Mécanismes de réparation et mutagenèse radio-induite chez les eucaryotes supérieurs. *Cancer Radiother.* **2000**, *4*, 335–354.
105. Collins, A.R.; Oscoz, A.A.; Brunborg, G.; Gaivão, I.; Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Smith, C.C.; Stetina, R. The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis* **2008**, *23*, 143–151.
106. Pommier, Y. Topoisomerase I inhibitors: Camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 789–802.

107. Di Micco, R.; Fumagalli, M.; Cicalese, A.; Piccinin, S.; Gasparini, P.; Luise, C.; Schurra, C.; Garre, M.; Nuciforo, P.G.; Bensimon, A.; *et al*. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **2006**, *444*, 638–642.
108. Bartkova, J.; Rezaei, N.; Liontos, M.; Karakaidos, P.; Kletsas, D.; Issaeva, N.; Vassiliou, L.V.F.; Kolettas, E.; Niforou, K.; Zoumpourlis, V.C.; *et al*. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **2006**, *444*, 633–637.
109. Goodarzi, A.A.; Jeggo, P.A. The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. *Adv. Genet.* **2013**, *82*, 1–45.
110. Bétermier, M.; Bertrand, P.; Lopez, B.S. Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004086.
111. Aze, A.; Zhou, J.C.; Costa, A.; Costanzo, V. DNA replication and homologous recombination factors: Acting together to maintain genome stability. *Chromosoma* **2013**, *122*, 401–413.
112. Amunugama, R.; Fishel, R. *Homologous Recombination in Eukaryotes*, 1st ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2012; Volume 110, pp. 155–206.
113. Barlow, C.; Hirotsune, S.; Paylor, R.; Liyanage, M.; Eckhaus, M.; Collins, F.; Shiloh, Y.; Crawley, J.N.; Ried, T.; Tagle, D.; *et al*. Atm-deficient mice: A paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* **1996**, *86*, 159–171.
114. Takai, H.; Naka, K.; Okada, Y.; Watanabe, M.; Harada, N.; Saito, S.; Anderson, C.W.; Appella, E.; Nakanishi, M.; Suzuki, H.; *et al*. Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *EMBO J.* **2002**, *21*, 5195–5205.
115. Matangkasombut, O.; Wattanawaraporn, R.; Tsuruda, K.; Ohara, M.; Sugai, M.; Mongkolsuk, S. Cytolethal distending toxin from aggregatibacter actinomycetemcomitans induces DNA damage, S/G2 cell cycle arrest, and caspase-independent death in a saccharomyces cerevisiae model. *Infect. Immun.* **2010**, *78*, 783–792.
116. Kitagawa, T.; Hoshida, H.; Akada, R. Genome-wide analysis of cellular response to bacterial genotoxin CdtB in yeast. *Infect. Immun.* **2007**, *75*, 1393–1402.
117. Janssen, A.; Medema, R.H. Genetic instability: Tipping the balance. *Oncogene* **2013**, *32*, 4459–4470.
118. Morrison, W.B. Inflammation and cancer: A comparative view. *J. Vet. Intern. Med.* **2012**, *26*, 18–31.
119. Grivennikov, S.I.; Greten, F.R.; Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **2010**, *140*, 883–899.
120. Polk, D.B.; Peek, R.M., Jr. Helicobacter pylori: Gastric cancer and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 403–414.
121. Machado, A.M.; Fiqueiredo, C.; Seruca, R.; Rasmussen, L. Helicobacter pylori infection generates genetic instability in gastric cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1806*, 58–65.
122. Touati, E.; Michel, V.; Thiberge, J.M.; Wuscher, N.; Huerre, M.; Labigne, A. Chronic helicobacter pylori infections induce gastric mutations in mice. *Gastroenterology* **2003**, *124*, 1408–1419.
123. Kostic, A.D.; Chun, E.; Robertson, L.; Glickman, J.N.; Gallini, C.A.; Michaud, M.; Clancy, T.E.; Chung, D.C.; Lochhead, P.; Hold, G.L.; *et al*. Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe* **2013**, *14*, 207–215.

124. Rubinstein, M.R.; Wang, X.; Liu, W.; Hao, Y.; Cai, G.; Han, Y.W. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/β-catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe* **2013**, *14*, 195–206.
125. Samaras, V.; Rafailidis, P.I.; Mourtzoukou, E.G.; Peppas, G.; Falagas, M.E. Chronic bacteria and parasitic infections and cancer: A review. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2010**, *4*, 267–281.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

II. Partie Expérimentale

1) Caractérisation des dommages induits par CDT *via* l'étude des voies de réparation activées

Les travaux précédents réalisés au sein de l'équipe ont permis d'établir un nouveau modèle d'action de CDT, selon lequel CDT induit des dommages précoces qui dégénèrent en CDBs lors de la réplication. Toutefois, à de fortes doses, des CDBs indépendantes de la réplication peuvent être observées dues à une accumulation de dommages proches (Fedor *et al.*, 2013). Puisque CdtB est une nucléase capable, *in vitro*, de cliver un plasmide super-enroulé en sa forme relâchée puis linéaire, il est supposé que, *ex vivo*, les dommages précoces induits par CDT sont de type CSBs. Toutefois, au début de ma thèse, aucune donnée sur cellule de mammifère n'étayait cette hypothèse.

L'objectif de notre travail a donc été d'approfondir notre modèle, en caractérisant les voies de réparation impliquées et activées suite à un traitement à CDT. L'importance de différents systèmes de réparation dans la réponse aux dommages à CDT a été étudiée : le NHEJ et la HR dans la réparation des CDBs, la voie FA pour les fourches de réplications bloquées, et les voies NER et SSBR réparant respectivement les adduits et les CSB, afin d'apporter des données plus précises sur les dommages précoces générés par CDT. Dans ce but, nous avons étudié la résistance à CDT de cellules déficientes pour des protéines clés des différentes voies de réparation des dommages à l'ADN. L'étude de la viabilité cellulaire suite à un traitement CDT a été réalisée grâce à une technique récemment décrite, appelée Multicolor Competition Assay (MCA) (Smogorzewska *et al.*, 2007), que nous avons adapté. Ce travail a conduit à la soumission d'un article, actuellement en révision, dans le journal *Cellular Microbiology*.

a) Article : Cellular resistance to the Cytolethal Distending Toxin involves a combination of DNA repair mechanisms

Article: Cellular Microbiology, Revision under process

ARTICLE

Cellular Resistance to the Cytolethal Distending Toxin involves a combination of DNA repair mechanisms

Bezine E., Malaisé Y, Loueillet A., Chevalier M., Boutet-Robinet E., Salles B., Mirey G., Vignard J. *Cellular Microbiology*. Under Review

Cellular resistance to the Cytolethal Distending Toxin involves a combination of DNA repair mechanisms.

BEZINE E.[1,2], MALAISÉ Y.[1,3], LOEUILLET A.[1,3], CHEVALIER M.[1], BOUTET-ROBINET E.[1,3], SALLES B.[1,3], MIREY G.[1,3*], VIGNARD J.[1*]

1 - INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, F-31027 Toulouse, France
2 - Université de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse, F-31030 Toulouse, France
3 - Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, F-31062 Toulouse, France
* These authors are co-corresponding authors.

Abstract.

The Cytolethal Distending Toxin (CDT), produced by many bacteria, has been associated with various diseases including cancer. CDT induces DNA double-strand breaks (DSBs), leading to cell death or transformation if misrepaired. We have previously shown that a low dose of CDT induces DNA damage, degenerating in DSBs during replication. If other DNA lesions precede DSB formation during CDT exposure, we hypothesized that non-DSB repair mechanisms might contribute to the CDT cellular resistance. To address this question, we developed a proliferation assay using human cell lines depleted in major DNA repair pathways. Here, we validate the involvement of the two major DSB repair mechanisms, Homologous Recombination and Non Homologous End Joining, in the management of CDT-induced lesions. We show that impairment of single-strand break repair (SSBR), but not nucleotide excision repair, sensitizes cells to CDT, suggesting that CDT primarily induces single-strand breaks (SSBs). Finally, we document the role of the replicative stress response and demonstrate the involvement of the Fanconi Anemia repair pathway in response to CDT. In conclusion, our work indicates that cellular survival to CDT-induced DNA damage involves different repair pathways, in particular SSBR. This reinforces a model where CDT-related genotoxicity primarily involves SSBs rather than DSBs, underlining the importance of cell proliferation during CDT intoxication and pathogenicity.

Introduction

The Cytolethal distending Toxin (CDT) is a virulence factor produced by many pathogenic bacteria (Jinadasa et al., 2011). CDT is a tripartite holotoxin generally composed of two regulatory subunits (CdtA and CdtC) and one catalytic subunit (CdtB) (Nesic et al., 2004). As an exception, CdtB from the typhoid toxin, identified in Salmonella enterica serovar Typhi, is associated with another catalytic subunit (PltA) and regulatory subunit (PltB) (Song et al., 2013). Sequences and structures of the different CdtB subunits analyzed so far are highly conserved (Hu and Stebbins, 2006) and the CdtB virulence properties have been documented in many cases (Ge et al., 2007, DiRienzo, 2014). Indeed, mice infected with Helicobacter hepaticus producing the

CDT toxin developed hepatic dysplasic nodules, whereas mice infected with the CdtB-deficient strain did not (Ge et al., 2007). Moreover, many of the acute phase symptoms of typhoid fever can be reproduced in mice by systemic administration of the typhoid toxin but not with a toxin harboring a CdtB catalytically dead mutant (Song et al., 2013). These findings highlight the importance of understanding the mode of action of CdtB on host cells.

After its secretion by bacteria, CDT interacts with eukaryotic cells. CdtA and CdtC are involved in the cell-binding of the toxin whereas the CdtB subunit is endocytosed and relocated to the nucleus, through an ER-associated protein degradation (ERAD)-mechanism (Eshraghi et al., 2014). CdtB shares structural and functional homology with DNase I and displays nuclease activity that has been observed in vitro by plasmid digestion or in mammalian cells by chromatin fragmentation (Elwell and Dreyfus, 2000, Lara-Tejero and Galan, 2000, Nesic et al., 2004). It has long been recognized that CdtB directly induces DNA double-strand breaks (DSBs). Hence, intoxication of human cells with CDT is accompanied by DSB signaling through the ATM-dependent phosphorylation of H2AX (referred to as γH2AX) and the recruitment to damaged sites of many DSB processing factors including the MRN complex components and 53BP1 (Li et al., 2002, Hassane et al., 2003, Guerra et al., 2010, Fedor et al., 2013). In parallel, the CDT-dependent activation of the ATM-CHK2 pathway promotes cell cycle arrest and eventually apoptotic cell death when the cell encounters excessive damage (Cortes-Bratti et al., 2001, Alaoui-El-Azher et al., 2010).

However, several lines of evidence challenge the model of direct DSB induction by CdtB. First, plasmid digestion by CdtB predominantly results in single-strand breaks (SSBs) formation rather than DSBs (Elwell et al., 2001, Li et al., 2002). Furthermore, we have recently shown that decreasing the CDT concentration (less than 1 ng/ml) induces primary DNA lesions, most likely SSBs, before DSB formation during S-phase (Fedor et al., 2013). These replication-dependent DSBs accumulate over time in proliferating cells, in contrast to the massive and rapid DSB formation induced by severe CDT treatments (over 1 □g/ml) on both proliferating and non-proliferating cells (Li et al., 2002, Fedor et al., 2013). Thus, it is tempting to speculate that these two dose-dependent modes of CDT-induced DSB formation activate different cellular pathways. Here, CDT doses will be designated as 'moderate' when they only induce replication-dependent DSBs, whereas 'high doses' will refer to treatment that directly induce DSBs.

As mammalian cells experience thousands of DNA lesions each day, they have evolved DNA repair mechanisms to maintain genomic integrity (Iyama and Wilson, 2013). While being partly interconnected, each repair pathway responds to specific types of DNA lesions (table 1). Altered bases are processed by base excision repair (BER) while bulky adducts are repaired through the nucleotide excision repair (NER) mechanism. SSBs, arising directly by disintegration of the oxidized sugar or indirectly as intermediates of BER, are repaired by SSB repair (SSBR) (Caldecott, 2008). DSB management involves two major mechanisms (Aparicio et al., 2014). Non-homologous end joining (NHEJ), active throughout the cell cycle, directly ligates two double-stranded DNA ends without any sequence homology requirement. On the other hand, Homologous recombination (HR) restores DNA integrity through homology search on an undamaged template. As sister chromatid is generally used as the homologous template, HR is restricted to S and G2 cells, and, contrary to NHEJ, allows the restart of collapsed replication forks (Petermann et al., 2010). Finally, the last type of DNA lesion, interstrand crosslink (ICL), is processed by the Fanconi Anemia (FA) pathway, which is also involved in replication fork stability (Jones and Huang, 2012).

To date, little is known about the repair pathways implicated in response to CDT-mediated genotoxicity. A genetic screen performed in budding yeast identified HR as being the only mechanism that contributes to the repair of the CdtB-induced DNA lesions (Matangkasombut et al., 2010). The role of HR to survive to CDT was also confirmed in human cells (Fedor et al., 2013, Fahrer et al., 2014), particularly in relation to replication-dependent DSBs (Fedor et al., 2013). Indeed, the recruitment to damaged chromatin of RAD51, a central HR

factor, was extremely limited after exposure to high doses of CDT generating direct DSBs, compared to moderate doses. This finding suggests that resistance to CDT-induced direct DSBs involves another repair pathway, presumably NHEJ.

In the present study, we developed a Multicolor Competition Assay (MCA) strategy (Smogorzewska et al., 2007), based on human cells depleted in major DNA repair pathways (table 1), to gain insight into the repair mechanisms involved in the cellular response against CDT genotoxicity. The implication of each DNA repair mechanism involved in CDT resistance was confirmed by clonogenic survival performed on classical genetic models of DNA repair pathways, validating our approach. First we confirmed the importance of the DSB repair pathways for cells to survive CDT intoxication. Next, we demonstrate for the first time the role of SSBR in response to CDT. We also underline the importance of the replicative stress response and identify the FA pathway as being activated and essential following CDT treatment. Altogether, our findings depict a more global view of the DNA repair pathways involved in the resistance to CDT-mediated genotoxicity, enabling a deeper understanding of the CdtB mode of action.

Experimental procedures

Cell lines and treatments

Human colon cancer cells (HCT116), HeLa cells and Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen). The human PD20 cell line and the FANCD2 complemented cell line (PD20 D2) were maintained in Opti-MEM media. Finally, AA8 and EM9 cell lines were maintained in a mixture of 50% DMEM media and 50% F-12 media. All mediums were supplemented with 10% heat-inactivated calf serum, and 0.5 mg/ml Penicillin/Streptomycin (P/S). Cells lines were grown in a humidified incubator at 37˚C with 5% CO2.

The Cytolethal Distending Toxins (CDTwt or CDTH153A) were produced and purified as described previously (Fedor et al., 2013). When needed, shPALB2 or shFANCC HCT116 cells were treated with Mitomycin C (MMC) (Sigma-Aldrich), and HeLa cells were treated with 10 pM of calicheamicin-□1 (Pfizer) or with 20 μM of Wortmannin (Sigma-Aldrich).

Small-hairpin RNA (shRNA) knockdown

Stable cell lines defective in the different repair pathways (see table 1 for details) were generated in HCT116 p53-/- cells (Bunz et al., 1998) according to standard protocols using Mission short hairpin RNA (shRNA) lentiviral particles bearing the pLKO.1-puro vector either containing the turboGFP, TagCFP or TagRFP gene (Sigma-Aldrich). Targeted genes and shRNA sequences are listed in table 1. Briefly, HCT116 cells were infected with lentiviral particles for 24 h, then puromycin was applied to select for lentiviral transduction. Puromycin resistant cells were diluted (limit-dilution), and fluorescent clones were selected, amplified and screened for the shRNA-mediated depletion efficiency by Western-Blot and RT-qPCR analysis.

Depleted protein	Pathway (DNA lesion)	Protein function	shRNA target sequence
PALB2	HR (DSB; ICL)	Forms a complex with BRCA1 and BRCA2; HR mediator	GATGCACATTGATGATTCTTA
XRCC4	NHEJ (DSB)	Interacts with Lig4 and XLF to form the DSB end ligation complex	CCTCAGGAGAATCAGCTTCAA
XPA	NER (bulky lesions)	Binds and stabilizes the open pre-incision complexes; recruits ERCC1-XPF endonuclease	CATGAGTATGGACCAGAAGAA
XRCC1	SSBR (SSB)	Scaffold protein; stabilizes and stimulates multiple enzymatic components during SSBR	CCAGTGCTCCAGGAAGATATA
ATR	Replicative stress signaling	Serine/threonine kinase involved in the replicative stress signaling	GCCAAAGTATTTCTAGCCTAT
FANCC	Fanconi Anemia (ICL)	Subunit of the FA core complex involved in FANCD2/FANCI monoubiquitination	CACGAGATCATTGGCTTTCTT

Table 1. Summary of the DNA repair proteins down-regulated in HCT116 cells.
This table depicts the down-regulated proteins, the repair pathways associated (and the processed DNA lesions), their function and the sequence targeted by the shRNA.

Cytometry analyses

Cell cycle analysis was done as previously reported (Fedor et al., 2013). For Multicolor Competition Assay, control cells and fluorescent shRNA cells were counted, mixed with a 1:1 ratio, and were left untreated or treated either with CDTwt or CDTH153A. After 6 days of culture, cells were collected and the fluorescent rate was analyzed by flow cytometry with a Miltenyi MACSQuant Analyser 10 cytometer. Analysis was made with VenturyOne software (Applied Cytometry). Relative survival of shRNA-untreated cells was set to 1.

RNA interference

Gene silencing was performed by transfection of siRNA (Sigma-Aldrich) in HeLa cells with INTERFERin® according to the manufacturer's instructions (Polyplus). Briefly, siRNA were mixed with Interferin in Opti-MEM, and incubated 10 minutes at room temperature. Then, HeLa cells were transfected with the negative control siRNA (CAUGUCAUGUGUCACAUCU-dTdT), FANCD2 siRNA (AACAGCCAUGGAUACACUUGA-dTdT), or ATR siRNA (CCUCCGUGAUGUUGCUUGA-dTdT). After 24 h of incubation, cells were counted and plated for further analysis. Cells were then incubated for 24 h and treated with CDT for 6 h, before being washed and released in fresh media for an additional 72 hours.

Crystal violet viability assay

24 h after siRNA transfection, 6 000 HeLa cells were grown for 24 h in 24-well plates before being treated with CDT for 6 h. Cells were washed and released in fresh media for 5 days. After a PBS wash, cells were fixed for 10 minutes with 10% (vol/vol) methanol/10% (vol/vol) acetic acid at room temperature. Cells were then stained for 10 minutes with 1% (wt/vol) crystal violet (Sigma-Aldrich) in methanol, washed in water and the absorbed dye was released by incubation with agitation for 1 h at room temperature in methanol containing 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS). The dye containing solutions were then transferred to 96-well microtiter plates, and dilutions (1:2) were prepared. The optical density (OD) at 595 nm was assayed in an Infinite 200 PRO reader (TECAN).

Clonogenic assay

Cells were plated in triplicate at a density of 500 to 9000 cells per 6 cm plate. One day after seeding, cells were treated with CDT and grown for 6–12 days. Formed colonies were fixed and stained with a 0.25% methylene blue (Sigma) and 50% methanol solution. Colonies containing more than 50 cells were counted and the surviving rate calculated.

RT-qPCR analysis

Total RNA was extracted from cultured cells using TRIzol® Reagent (Invitrogen) and RT-PCR was performed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed using the Power SYBR® Green PCR Master Mix and an ABI Prism 7300 Sequence Detection System instrument and software (Applied Biosystems). The following gene-specific primers were used: PALB2 (forward: 5'-GGAGCTGCATAAACATTCCGTCG-3'; reverse: 5'- CTACGGAACAGGAACCTGAAGG -3'); FANCC (forward: 5'- CTGGCTCCAGACACTGAAGCAT-3'; reverse: 5'- ATTGCTCTGCCACCATCTCAGC-3',); and TBP (forward: 5'- TGTATCCACAGTGAATCTTGGTTG-3', reverse: 5'- GGTTCGTGGCTCTCTTATCCTC-3') (Sigma Aldrich). TBP was chosen as an internal control. The comparative threshold cycle ($2^{-\Delta Ct}$) method was used to enable the mRNA quantification of these genes. All samples were run in triplicate. After PCR, a melting curve was obtained and analyzed.

Western blot analysis

Cells were incubated on ice for 30 min in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 500 mM NaCl and 0.5% NP40) containing the HaltTM Protease & Phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific) and sonicated on a VibraCell 72434 (Bioblock Scientific). Cell lysates were centrifugated and the supernatant containing total soluble proteins was kept. Chromatin and soluble fractions were then prepared as previously described (Shechter et al., 2007). Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham). Membranes were incubated with the primary antibody for a period of 1-16 hours. H2AX antibody was purchased from Epitomics (3522-1), γH2AX antibody from Merck/Millipore (05-636), ATR (SAB4200348), Lamin A/C (SAB4200236), β-actin (sc-47778) from Santa Cruz, XRCC1 (X0629), XRCC4 (HPA006801) and XPA (SAB1406599-50UG) antibodies from SIGMA, FANCD2 (NB100-182) antibody from Novus Biologicals, and GAPDH (GTX100118) antibody from GeneTex. Secondary fluorescent antibodies (CFTM770 Goat anti-rabbit (20078) or anti-mouse (20077) and CFTM680 anti-rabbit (20067) or anti-mouse (20065)), purchased from BIOTUM, were visualized on the membrane using an Odyssey Infrared Imaging Scanner (Li-Cor ScienceTec). Lamin, β-actin or GAPDH were used as internal control to normalize the protein level.

Immunofluorescence analysis

Cells were grown on glass coverslips. After at least 24 h of culture, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.5% Triton X-100 and stained with primary antibodies over-night at 4°C. γH2AX antibody was purchased from Merck/Millipore (05-636), FANCD2 from Genetex (GTX116037), and Chk1 (phosphor S345) from Abcam (ab58567). Cells were washed three times with PBS Tween 0.1% and incubated with the secondary antibodies for 1h (Rhodamine Red X (R6394) and AlexaFluor 488 Goat anti-mouse (A11017) or anti-rabbit (A11070), purchased from Invitrogen). DNA was stained with 4,6-diamino-2-phenyl indole (DAPI). Cells were counted positive for foci formation when >10 foci/nuclei were detected.

Comet assay

Alkaline comet assay was performed as previously described (Lebailly et al., 2015) with minor modification. Cells were embedded in 0.7% low melting point agarose and laid on CometAssay® HT Slide (Trevigen). Fifty cells per slide and 2 slides per sample were analyzed. The extent of DNA damage was evaluated for each cell through the measurement of intensity of all tale pixels divided by the total intensity of all pixels in head and tail of comet. The median from these 100 values was calculated, and named % tail DNA.

Statistical analysis

When not specified, results are expressed as the mean of three independent experiments. The error bars represent the standard deviation (SD). For clonogenic and crystal violet viability assays, differential effects between the two cells type for a same treatment condition were assessed by unpaired Student's t-test. A paired Student's t-test was used for MCA and immunofluorescence experiments, in order to evaluate the variation between a treated and a non-treated (NT) condition. In these experiments, when the difference between two treated conditions was assessed, a paired Student's t-test was realized and results indicated above a horizontal bracket. For comet assays, unpaired Student's t-test was applied to compare a time point to the NT condition for a unique cell line, while paired Student's t-test was used to compare value for a same time point between two cell lines. P-values <0.05 were considered significant (indicated by asterisks): *P < 0.05; ** P < 0.01, ***P < 0.001. Statistical analyses and plots were generated using GraphPad Prism 6.0 software.

Results

HR processing of CDT-mediated DSBs is confirmed by the Multicolor Competition Assay

Previous studies have demonstrated that DSB repair pathways are required for cells to survive CDT intoxication (Fedor et al., 2013, Fahrer et al., 2014). However, we previously reported that CDT induces other DNA lesions prior to DSB appearance (Fedor et al., 2013), suggesting the involvement of other repair mechanisms. To clearly address this issue, we established fluorescent human stable cell lines deficient for several repair pathways, by genomic integration of a cassette containing a fluorescent marker and a short-hairpin RNA (shRNA) against a DNA repair gene, from the HCT116 p53-/- background (Bunz et al., 1998). The p53 deficiency prevents the DNA-damage induced G1 block, enabling the S-phase dependent repair processing. Then we developed a simple proliferation assay based on the Multicolor Competition Assay (Smogorzewska et al., 2007). Basically, fluorescent DNA repair defective cells are co-cultured with the non-fluorescent parental control cells and subjected to CDT intoxication (Fig. 1A). The ratio of fluorescent cells is then calculated by flow cytometry and compared to the untreated condition, which is used as a control for the relative cell growth. If CDT exposure induces DNA damage, then at least one of the DNA repair deficient cell lines that have been generated will present proliferation defect compared to the control cells, provoking a fluorescent rate drop during the co-culture. Defining which DNA repair mechanism is necessary to maintain normal cell growth during MCA will permit a better characterization of the DNA lesions generated by CDT.

As HR deficient cells are hypersensitive to CDT (Kitagawa et al., 2007, Matangkasombut et al., 2010, Fedor et al., 2013, Fahrer et al., 2014), we decided to validate the MCA strategy by confirming the role of HR. The shRNA depletion of PALB2 (Fig. S1A), an essential HR factor (Xia et al., 2006), led to a dose-dependent reduction of the fluorescent ratio when cells are exposed to MMC (Fig. 1A), a chemical agent known to induce ICL that need HR processing (Clauson et al., 2013). Thus, MMC sensitivity of shPALB2 cells can be easily observed with MCA. Next, MCA was performed on shPALB2 cells treated with an active toxin (CDTwt) or a catalytically dead mutant (CDTH153A) that does not cleave DNA (Elwell and Dreyfus, 2000). The fluorescence ratio decreases in CDTwt treated cells, demonstrating that the impairment of HR, through PALB2 down-

regulation, leads to CDT sensitization (Fig. 1B). As CDTH153A exposure did not induce any proliferation defect, this underlines the PALB2 function on CDT-induced DNA damage. Thus, our results show that PALB2 is important to respond to the toxin, confirming that HR can repair CDT-mediated DSBs and validating the MCA approach.

NHEJ involvement in response to CDT-induced DSBs

NHEJ constitutes the primary DSB repair pathway in mammalian cells (Lieber, 2010). We created a NHEJ deficient HCT116 cell line by targeting XRCC4 (Fig. S1B), a protein implicated in the ligation step of NHEJ (Grawunder et al., 1997). The proliferation rate of CDT-treated shXRCC4 cells was tested by MCA (Fig. 1C). The fluorescent population is significantly reduced as soon as cells are exposed to 25 pg/ml of CDTwt, but is not affected by CDTH153A, indicating that XRCC4 is essential to repair the CDT-induced DSBs. To strengthen this result, a knockout MEF model disrupted for XRCC4 has been tested for CDT sensitivity using a colony-formation assay (Fig. 1D). Whereas control XRCC4+/+ MEFs only exhibit a 25% viability loss when exposed to 250 pg/ml of CDTwt, viability of XRCC4-/- cells dropped more than 96% with the same concentration, showing that cells defective for NHEJ repair are around 20-fold more sensitive to CDT. These effects depend on the CdtB nuclease activity, as MEF cells intoxicated with CDTH153A are as viable as untreated cells.

DSB formation is known to induce XRCC4 phosphorylation, resulting in a migration shift in SDS-PAGE (Drouet et al., 2005). Moreover, the phosphorylated form preferentially binds chromatin in the presence of DSB compared to the unmodified XRCC4, illustrating an activation of NHEJ. To verify that CDT-induced DSB are indeed processed by NHEJ, HeLa cells were exposed to active or inactive toxins before being collected and subjected to chromatin fractionation (Shechter et al., 2007). Compared to untreated or CDTH153A treated cells, cells exposed to the DSB-inducing agent calicheamicin or to CDTwt mostly accumulate a long form of XRCC4 (L form) rather than the short form (S form) (Fig. 1E). After DNA damage, XRCC4 phosphorylation mainly depends on DNA-PK and to a less extend on ATM (Imamichi et al., 2014). When DNA-PK and ATM are inhibited with Wortmaninn, the XRCC4 L form does no longer accumulate after calicheamicin or CDTWT exposure, demonstrating that the L form represents a DNA damage-dependent phosphorylated XRCC4. These results attest for the signaling of the CDT-induced DSB through XRCC4 phosphorylation and mobilization to chromatin, a characteristic of NHEJ processing. Altogether, these results show that XRCC4, and thus NHEJ, are implicated in the repair of CDT-induced DSBs.

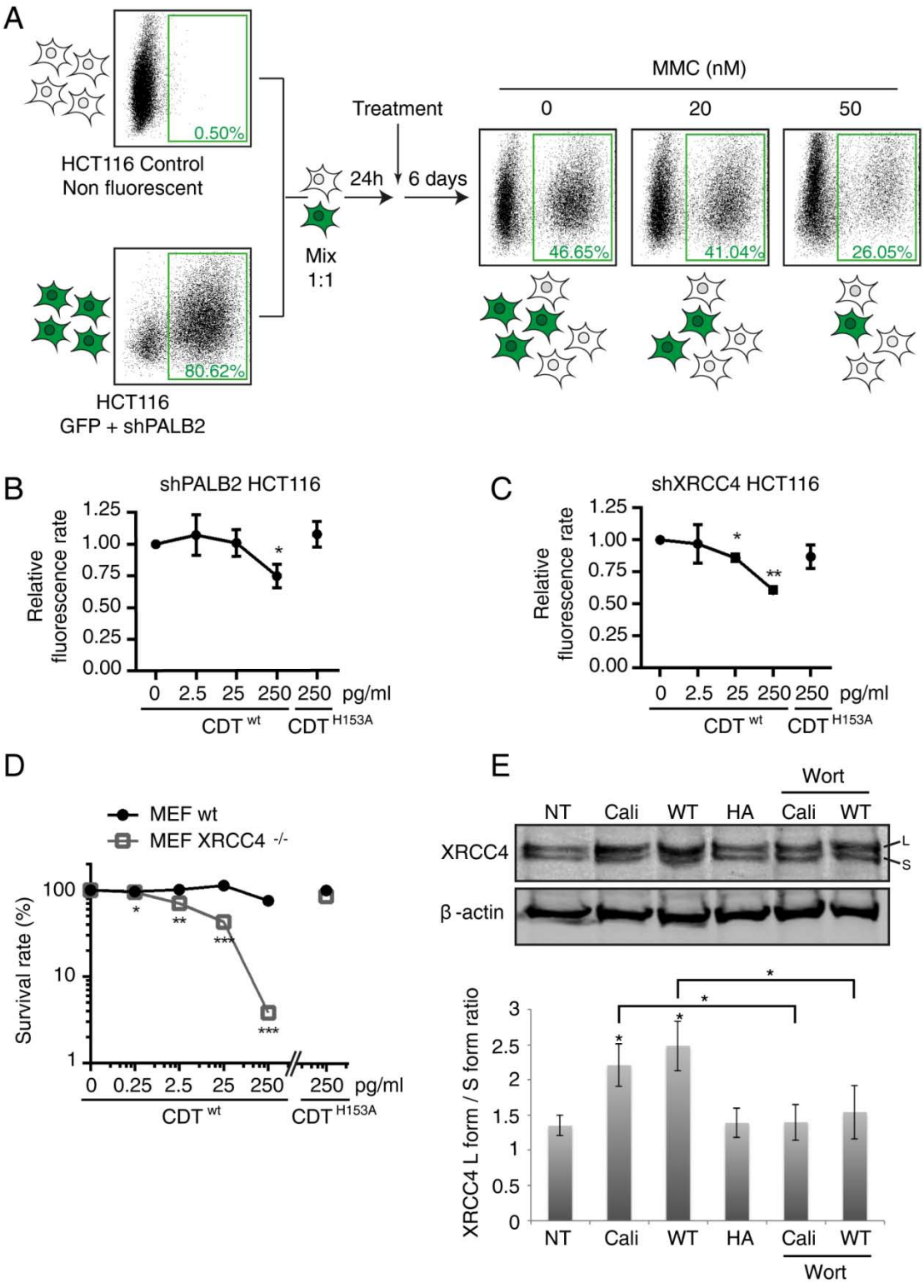


Fig. 1. Cellular survival to CDT-induced DSB involves both homologous recombination and non-homologous end joining.

A. Schematic representation of the Multicolor Competition Assay (MCA) exemplified by the validation of the shPALB2 cell line. The shRNA-mediated down-regulation of PALB2 is coupled to the green fluorescent protein (GFP)

expression. Cells were co-cultured with a ratio 1:1 with non-fluorescent control cells and after 1 day, treated with 0, 20 or 50nM of Mitomycin C (MMC) for 6 days. MMC induces a dose-dependent decrease of the fluorescence rate, indicating a sensitization of the shPALB2 cell line.
B-C. MCA analysis in HCT116 cells down-regulated for PALB2 (B) or XRCC4 (C), treated for 6 days with increasing doses of CDTwt or with 250 pg/ml of CDTH153A. Data are expressed as the mean ± SD of at least 3 independent experiments; statistical differences between the means of treated or non-treated cells were identified by paired Student's t-test (*P < 0.05; ** P < 0.01).
D. Clonogenic survival of XRCC4+/+ and XRCC4-/- MEFs exposed to CDTwt or CDTH153A. Results present the mean ± SD of at least 3 independent experiments; statistical analyses between the means of the two cells types for a same treatment were analyzed by an unpaired Student's t-test (*P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).
E. XRCC4 immunoblots of chromatin extracts from HeLa cells non-treated (NT), or pre-exposed or not for 1 hour with 30 µM of Wortmaninn (Wort) before to be treated for 1 hour with 10 pM of Calicheamicin (Cali), or for 6 hours with 25 ng/ml of CDTH153A (HA) or CDTwt (WT). L represents the long (phosphorylated) form and S the short form of XRCC4. A quantification of the XRCC4 L form / S form ratio is presented in the graph. Results present the mean ± SD of at least three independent experiments; statistical differences were analyzed by a Student's t-test, between treated and non treated condition (identified by an arrow above the SD bar), or between two treated conditions (identified by an arrow above a horizontal bracket (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).

SSBR is important to respond to CDT-related genotoxicity, while NER is not

Moderate doses of CDT induce early DNA damage, which degenerate into DSBs during S-phase (Fedor et al., 2013). Different types of DNA lesions, such as single-strand breaks (SSBs) or bulky lesions, hinder the progression of replication forks and cause fork collapse and DSB formation (Cannan and Pederson, 2015). Thus, we aimed to clarify the initial type of CDT-induced DNA damage by analyzing the implication of the Single-Strand Break Repair (SSBR) and the Nucleotide Excision Repair (NER), involved in SSB and bulky lesions repair respectively.

For this purpose, HCT116 cells were down-regulated for XPA protein (Fig. S1C), an important player of global NER (Gillet and Scharer, 2006). According to MCA, inhibition of XPA does not impact the viability of CDT-treated cells as the fluorescent rate remains constant in all tested conditions (Fig. 2A), whereas a control treatment with UV sensitizes shXPA HCT116 cells (Fig. S2), confirming that these cells are NER-defective. Hence, NER does not appear to be necessary for host cells to respond to CDT. We then studied the consequences of a SSBR defect after CDT treatment, by performing MCA on HCT116 cells depleted for XRCC1 (Fig. S1D), an essential SSBR protein (Brem and Hall, 2005). After CDTwt treatment, the fluorescence rate strongly decreases whereas no effect is observed with CDTH153A, indicating the crucial XRCC1 role during repair of CDT-mediated DNA lesions (Fig. 2B). To strengthen this observation, CDT sensitivity was monitored by clonogenic survival in the XRCC1-/- CHO cell line (EM9), compared to the corresponding control (AA8). EM9 cells displayed a higher sensitivity than the wild-type counterpart, for all tested CDTwt concentrations, while the catalytically inactive toxin did not induce any viability defect (Fig. 2C). Thus, SSBR clearly contributes to survival following CDT intoxication, favoring the assumption that SSBs are the primary lesions induced by CDT. To support these data, the viability of PARP1 KO MEFs, another SSBR key protein (Godon et al., 2008), was assessed. We found that PARP1-/- cells are more sensitive to CDT than control cells in a clonogenic assay (Fig. S3). Altogether, these results demonstrate that SSBR is important for eukaryotic cells to respond to CDT-induced DNA damage.

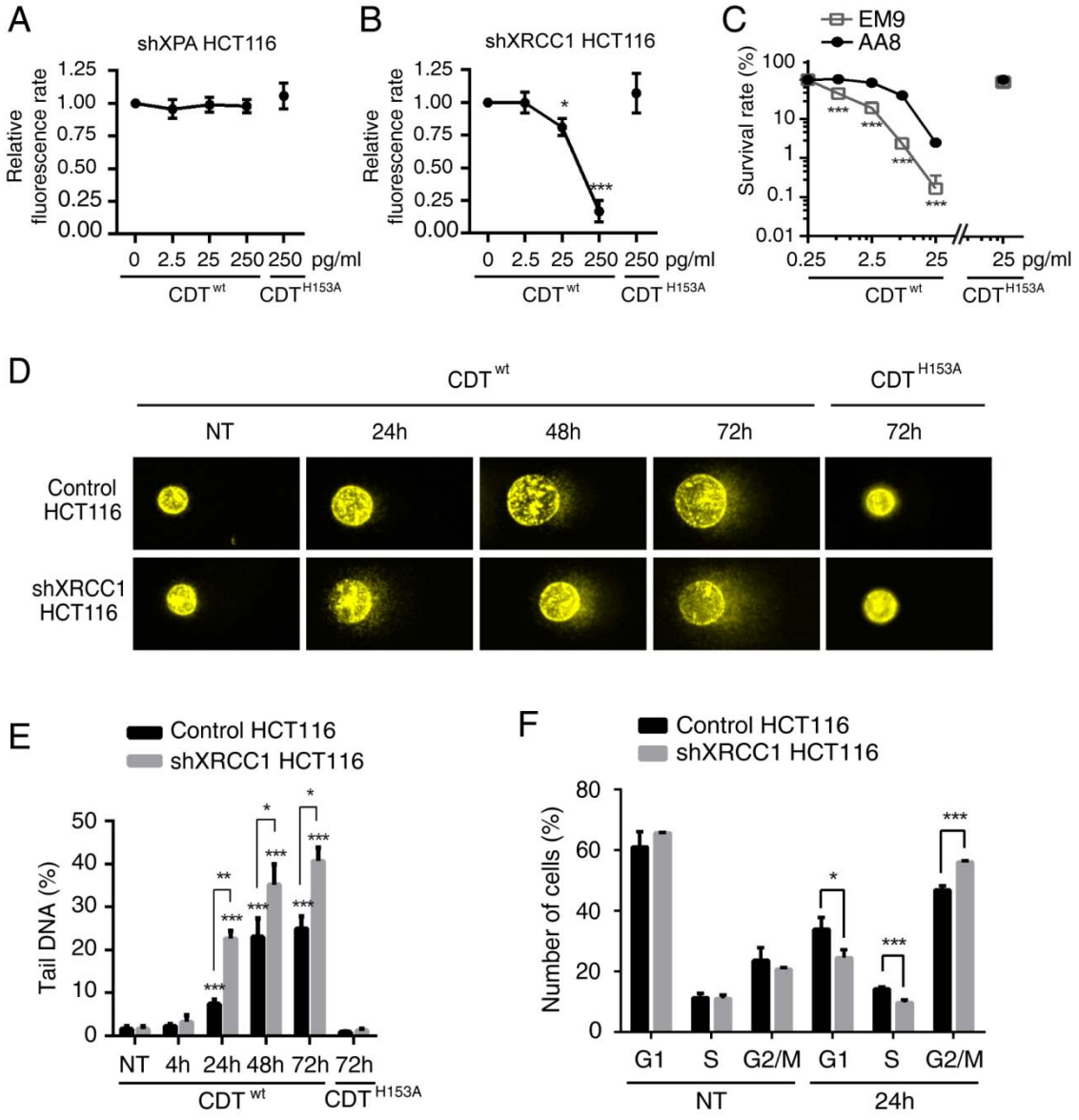


Fig. 2. SSBR, but not NER, is essential in the response and repair of CDT-induced DNA damage.

A-B. MCA analyses in HCT116 cells down-regulated for XPA (A) or XRCC1 (B), treated for 6 days with CDTwt or CDTH153A. Data are expressed as the mean ± SD of at least 3 independent experiments; statistical differences between the means of treated compared to non-treated cells were identified by paired Student's t-test (*P < 0.05; *** P < 0.001).

C. Clonogenic survival of EM9 (XRCC1-/-) and AA8 (XRCC1+/+) cells after a treatment with CDTwt or CDTH153A. Results present the mean ± SD of at least 3 independent experiments; statistical analyses present the differences between the means of the two cells types for a same treatment, and are analyzed by an unpaired Student's t-test (*** P < 0.001).

D. Representative images of HCT116 control and shXRCC1 cells non-treated (NT) or treated for the indicated times with 25 ng/ml of CDTwt or CDTH153A and subjected to alkaline COMET assays.

E. Tail DNA percentage obtained after alkaline COMET assays presented in D. At least three independent experiments were realized. Data are mean ± SD; statistical differences were analyzed by a Student's t-test, between treated and non-treated conditions (identified by asterisks above the SD bar), or between two CDT treatments (identified by asterisks above a horizontal bracket (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).

F. Cell cycle analysis by flow-cytometry of HCT116 control and shXRCC1 cells non-treated (NT) or exposed for 24 h to CDTwt (0.75 ng/ml). Data present the mean ± SD of at least three independent experiments; statistical differences

were analyzed by an unpaired Student's t-test, and present the differences between the means of the two cells types for a same cell cycle phase (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).

To better characterize the consequences of SSBR failure on CDT intoxication, an alkaline single cell gel electrophoresis assay was performed on shXRCC1 HCT116 cells to reveal the overall DNA damage rate per cells, including SSBs and DSBs. shXRCC1 or control HCT116 cells were treated for different times with CDTwt or CDTH153A (Fig. 2D). No significant change was observed between the control and the XRCC1-depleted cells exposed to CDTH153A or left untreated, showing that neither XRCC1 knockdown nor CDTH153A induces detectable DNA lesions in these conditions (Fig. 2E). On the other side, treatment with 25 ng/ml CDTwt provokes a time-dependent increase of tail DNA level in both cell populations, which seems to reach a plateau after 48 h. This suggests that the toxin remains active for at least two days, as stated earlier (Fahrer et al., 2014). However, shXRCC1 cells clearly exhibit more tail DNA level from as early as 24 h of CDTwt treatment (22,6 %) compared to control cells (7,4 %). This result demonstrates that cells lacking XRCC1 accumulate more damage than control cells, which may illustrate a lower repair capacity in SSBR deficient cells of CDT-mediated DNA damage. As CDT-exposed shXRCC1 cells suffer more unrepaired DNA lesions, the DNA damage-dependent cell cycle arrest should be more important compared to control cells. Indeed, after 24 h of CDTwt intoxication, the accumulation of G2/M cells is significantly more pronounced for shXRCC1 cells, suggesting that the magnitude of G2 arrest in response to CDT reflects the level of unrepaired DNA lesions (Fig. 2F and Fig. S4). Taken together, these data demonstrate that defective SSBR aggravates the cellular outcome of CDT exposure, with an accumulation of unrepaired DNA lesions associated with enhanced cell cycle arrest. In conclusion, our findings establish for the first time the crucial role of SSBR for cells to survive CDT-induced genotoxicity.

CDT related DNA damage induces the replicative stress response

As the replication-dependent DSBs induced by CDT led to a S-phase slow-down (Fedor et al., 2013), we inferred that such DSBs were associated with replication fork collapse and, thus, to ATR signaling (Jones and Petermann, 2012). CDT intoxication promotes the activation of the replicative stress response through the phosphorylation of ATR and Chk1 (Fahrer et al., 2014), that we also observed by phospho-Chk1 immunofluorescence in HeLa cells treated with 50 pg/ml of CDT (Fig. S5A and B). In order to attest the essential role of the replicative stress signaling after CDT treatment, MCA was conducted on shATR HCT116 (Fig. S1E). ATR down-regulation sensitizes cells to CDTwt but not to CDTH153A, indicating that ATR-dependent replicative stress signaling is required to respond to CDT-mediated DNA damage (Fig. 3A). In order to support this assumption, viability of ATR knockdown HeLa cells exposed to CDT was assessed (Fig. S5C and D). Compared to control cells, a significant decrease in survival of ATR-depleted cells is observed in response to CDTwt but not to CDTH153A. Thus, these experiments further reinforce the notion that the ATR-dependent replicative stress signaling is important for cells to respond to the CDT genotoxic potential.

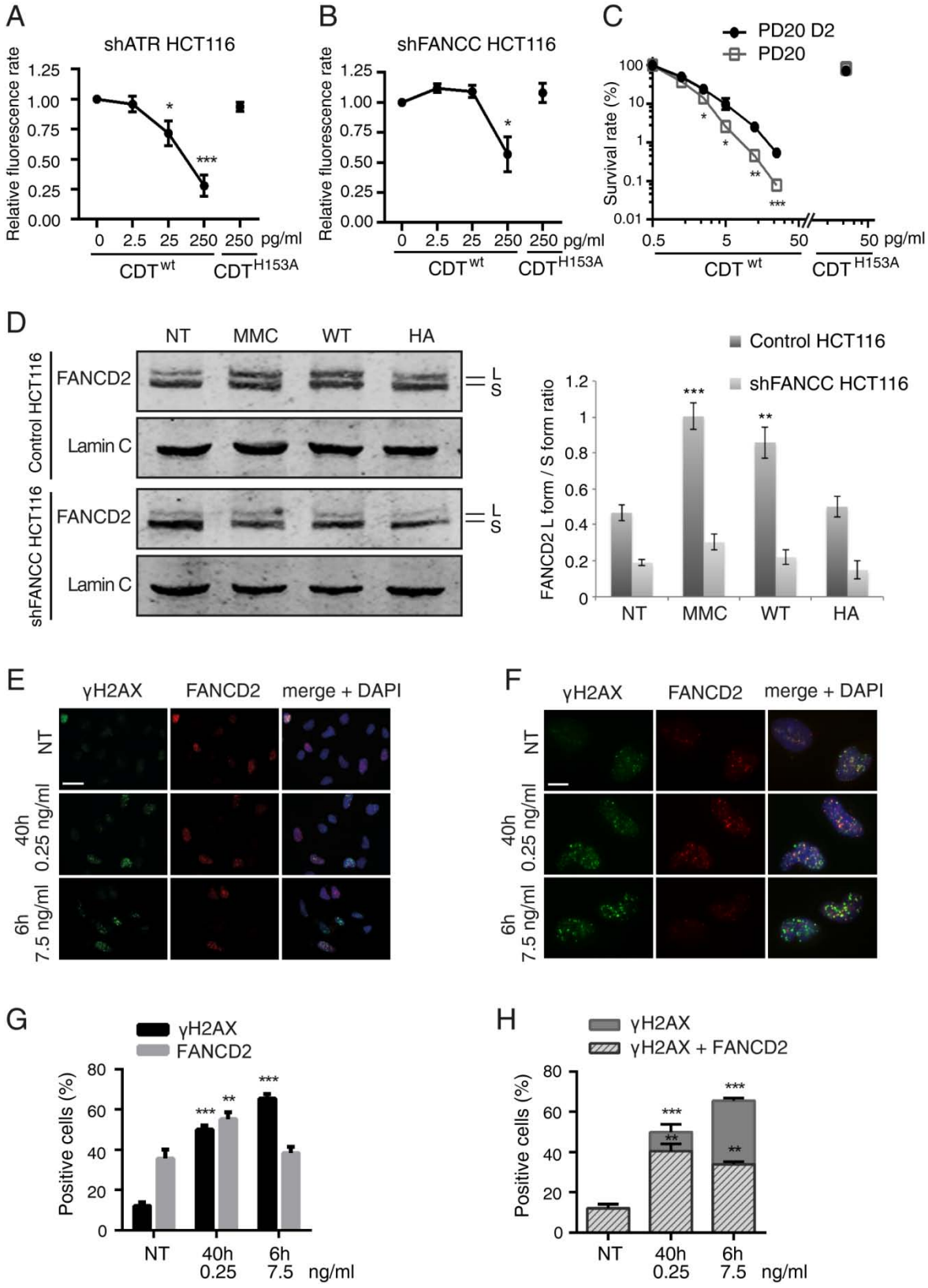


Fig. 3. ATR and the Fanconi anemia pathway are implicated in response to CDT-mediated DNA damage.
A-B. MCA analyses of HCT116 cells down-regulated for ATR (A) or FANCC (B), treated for 6 days with CDTwt or CDTH153A. Data are expressed as the mean ± SD of at least 3 independent experiments; statistical differences

between the means of treated compared to non-treated cells were identified by paired Student's t-test (*P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).
C. Clonogenic survival of PD20 and PD20 D2 cells after a CDTwt or CDTH153A treatment. Results present the mean ± SD of at least 3 independent experiments; statistical analyses present the differences between the means of the two cells types for a same treatment, and were analyzed by an unpaired Student's t-test (*P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).
D. FANCD2 immunoblots of soluble extracts from control or shFANCC cells non-treated (NT), treated for 6 h with 3 µM of MMC, or with 25 ng/ml of CDTwt (WT) or CDTH153A (HA). L represents the long (monoubiquitinated) form and S the short form of the FANCD2 proteins. The graph on the right presents the quantification of the FANCD2 L form / S form ratio. Results present the mean ± SD of at least three independent experiments; statistical differences were analyzed by a Student's t-test, between treated and non-treated condition, identified by asterisks above the SD bar (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).
E. Representative images of FANCD2 and γH2AX immunostaining in HeLa non-treated (NT) cells, treated for 40 h with 0.25 ng/ml or for 6 h with 7.5 ng/ml of CDTwt. Scale bar = 50 µm.
F. Representative images for the same conditions as in E with a higher magnification to show colocalization between FANCD2 and γH2AX. Scale bar = 20 µm.
G. Quantification of HeLa cells positive for FANCD2 or γH2AX presented in (E-F) Results present the mean ± SD of at least three independent experiments; statistical differences were analyzed by a Student's t-test between treated and non-treated (NT) conditions (**P <0.01; *** P< 0.001).
H. Quantification of FANCD2 positive or negative cells in the γH2AX positive population presented in (E-F). Results present the mean ± SD of at least three independent experiments; statistical differences were analyzed by a Student's t-test comparing treated and non-treated conditions for a same staining (**P <0.01; *** P< 0.001).

The Fanconi anemia pathway implicated in the replication fork stability is activated and important to respond to CDT

To gain further information about the cellular pathways involved in the management of the CDT-mediated S-phase perturbation, we investigated the role of the Fanconi anemia (FA) pathway. In addition to its specific function during ICL repair, FA pathway is activated in response to a variety of primary lesions that result in fork stalling and DSB formation, and defective FA cells exhibit mildly sensitivity to many replicative stresses (Kennedy and D'Andrea, 2005, Jones and Huang, 2012).

First, we generated a stable FA-deficient HCT116 cell line by targeting FANCC (Fig. S1F), a component of the FA core complex (Gurtan and D'Andrea, 2006). When subjected to MCA, shFANCC cells show hypersensitivity to the catalytically active form of CDT, but not to the mutant form (Fig. 3B). This suggests that the FA machinery is required to overcome the replicative stress induced by the CDT-mediated DNA damage. Similarly, FANCD2-deficient fibroblasts (PD20), derived from a FA patient, displayed reduced clonogenic survival relative to their FANCD2-complemented counterpart (PD20-D2) after CDTwt, and not CDTH153A (Fig. 3C). In the same way, FANCD2-depleted HeLa cells were more sensitive to CDTwt than control cells (Fig. S6). This indicates an overall involvement of the FA pathway in response to CDT that is not restricted to FANCC.

FANCD2 acts downstream of the core complex and is recognized to be central during the FA pathway. The core complex-dependent monoubiquitination of FANCD2 is critical for its mobilization to chromatin and is a marker of FA pathway activation (Jones and Huang, 2012). When HeLa cells are intoxicated with CDTwt or with the interstrand crosslinking agent MMC, FANCD2 monoubiquitination is observed by Western blot analyses through the increase of the FANCD2 L/S form ratio (Fig. 3D). In contrast, the inactive toxin does not impact on the level of monoubiquitinated FANCD2. Such FANCD2 L form accumulation is severely impaired in cells lacking the FA core complex component FANCC, showing that the CDTWT-induced FANCD2 monoubiquitination requires an intact FA pathway. Thus, CDT-induced DNA lesions promote FA pathway

activation through FANCD2 monoubiquitination. Once monoubiquitinated, FANCD2 is recruited to chromatin damaged loci and forms nuclear foci (Garcia-Higuera et al., 2001). To investigate FANCD2 mobilization to the CDT-induced DSBs that can be either direct (high doses) or replication-dependent (moderate doses), HeLa cells were subjected to two different treatments (Fig. 3E-F). When exposed to 7,5 ng/ml of CDTwt for 6 h to induce direct DSBs, 65 % of cells accumulate γH2AX foci. However, the proportion of FANCD2-positive cells does not increase compared to untreated cells, representing approximately a third of the total population. These cells reflect the proportion of S-phase cells, as FANCD2 foci are spontaneously formed during unperturbed S-phase (Taniguchi et al., 2002). In contrast, a 40 h treatment with 0,25 ng/ml of CDTwt results in 50 % of γH2AX positive cells, these DSBs being cell cycle-dependent and thus generated during replication, as we previously reported (Fedor et al., 2013). Indeed, 55 % of cells also accumulate FANCD2 foci, indicative of replicative stress signaling. To associate the DSB formation with the FA-related replicative stress signaling, the correlation of γH2AX and FANCD2 staining was quantified (Fig. 3G). In control cells, almost all γH2AX positive cells also accumulate FANCD2 foci, demonstrating that spontaneous DSB are mainly formed during S-phase. In the same way, 80% of cells that accumulate DSB in response to moderate dose of CDT are FANCD2 positive (Fig. 3H). In comparison, only 52 % of cells undergoing CDT-induced direct DSBs exhibit FANCD2 foci. These results clearly show that the two modes of CDT-induced DSB formation, depending on the CDT dose, involve different signaling pathways. Thus, the replication-dependent DSBs are processed by the FA machinery whereas the direct DSBs are not.

In conclusion, the CDT-mediated DSBs arising during replication induce an ATR-dependent replicative stress signaling that also involves the FA repair mechanism. Impairment of one of these pathways highly sensitizes cells to CDT-related genotoxicity, demonstrating that both are essential for cells to survive CDT-induced injuries.

Discussion

CDT producing bacteria have been implicated in numerous diseases, including cancer. In many cases, the CdtB catalytic activity has been shown to directly drive the bacterial pathogenic potential through induction of DNA damage. It is therefore of crucial concern to better characterize the cellular processes involved in the repair of the CdtB-induced DNA lesions. In this study, we have depicted the importance of the major mammalian repair mechanisms in response to CDT. Our results compete with the classical posture supporting that resistance to CDT genotoxicity exclusively relies on the DSB repair machinery, and establishes SSBR and FA pathway as essential repair mechanisms for cells intoxicated by CDT.

In order to deal with the numerous types of lesions that genomic DNA may suffer, cells display a battery of repair pathways (Iyama and Wilson, 2013). The primary aim of this study was to unravel the importance of each of the major repair mechanisms after CDT exposure. As we used the CDT from E. coli, a major component of the intestinal flora, we worked with the human colon cancer HCT116 cell line. The strategy developed here derived from MCA that has been successfully used to identify genes involved in DNA repair (Smogorzewska et al., 2007, Hurov et al., 2010). Indeed, unrepaired DNA lesions can result in cell death or prolonged cell cycle arrest, both of which leading to a decreased proliferation rate when considering the entire cell population. Thus, MCA is particularly adapted to observe the consequences of DNA repair defects. To alter the different repair pathways, HCT116 cells were treated with shRNA to downregulate target genes (table 1) rather than being knocked-out by endonuclease-driven gene inactivation (Kim and Kim, 2014), because knockout of essential genes is lethal at the cellular level, as previously shown for ATR (Brown and Baltimore, 2000). Moreover, a complete loss of a gene function may totally abolish a repair pathway, leading to the accumulation of spontaneous DNA lesions and subsequently to a proliferation defect in the absence of exogenous damage. We

assumed that in the shRNA-mediated knockdown situation, the residual protein expression would be sufficient to overcome the endogenous DNA lesions without affecting cell proliferation. Besides, the decreased repair capacity of shRNA-depleted cells would induce a pronounced proliferation decrease, compared to control cells, when the DNA damage level exceed a certain threshold after genotoxic insults. In fact, even a modest reduction of PALB2 expression level in the shPALB2 HCT116 cells (Fig. S1A) was sufficient to induce a dose-dependent reduction in proliferation, after MMC or CDT, detectable by MCA (Fig. 1A and B). Moreover, except for ATR that is an essential gene, all the MCA positive results were confirmed by clonogenic survival in knockout models. To conclude, the MCA strategy developed here allowed for an unambiguous overview of the repair processes required to survive to CDT-induced genotoxicity, and could be used –in the future- for the screening of genotoxic compounds of unknown DNA damaging properties.

Before this study, information concerning the repair systems implicated in response to CDT was limited. Two screens performed in yeast concluded that the CdtB-induced DNA lesions are exclusively processed by HR (Kitagawa et al., 2007, Matangkasombut et al., 2010). Evidence of HR implication in CDT-intoxicated human cells was likewise demonstrated after RAD51 depletion and in a human pancreatic adenocarcinoma cell line deficient for BRCA2 (Fedor et al., 2013, Fahrer et al., 2014). The data presented here further illustrates the role of HR by reporting the importance of PALB2 after CDT exposure (Fig. 1B). HR involvement was expected since the CDT-induced DSB formation in human cells is highly documented (Li et al., 2002, Hassane et al., 2003, Guerra et al., 2010). However, the role of NHEJ, the second canonical DSB repair system, was still controversial. If data from yeast showed that NHEJ mutants were not hypersensitive to CdtB expression (Kitagawa et al., 2007, Matangkasombut et al., 2010), one has to remember that in contrast to mammalian cells, DSB repair in yeast predominantly relies on HR processes. In addition, it has been shown that MO59J cells depleted for DNA-PK catalytic subunit (DNA-PKcs), the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-related kinase involved in NHEJ, undergo a higher CDT-induced apoptotic cell death compared to control cells (Fahrer et al., 2014). DNA-PK activity was also shown to regulate replication checkpoint and homologous recombination through RPA32 phosphorylation (Ashley et al., 2014). Moreover, at least a part of the repair defects in M059J cells may be attributable to low expression and truncating mutation in ATM, the major kinase involved in DSB signaling (Tsuchida et al., 2002, Ng et al., 2010). Here, we induced NHEJ impairment by targeting XRCC4, which only known function is to stimulate the DNA ligase IV activity during the NHEJ process (Grawunder et al., 1997). Our results clearly show, both by MCA and clonogenic survival on knockout MEFs, that XRCC4 is implicated in the resistance to CDT-induced genotoxicity (Fig. 1C and D). Finally, the CDT-dependent XRCC4 phosphorylation demonstrates that NHEJ is activated (Fig. 1E). Taken together, these data support that the two major DSB repair mechanisms, HR and NHEJ, are implicated in the resistance to the CDT-mediated DSBs.

Several lines of evidence indicate that the CdtB DNase activity does not induce direct DSBs. First, comparison between yeast mutant strains hypersensitive to CdtB and direct DSB inducing agents (such as ionizing radiation or HO and EcoRI endonucleases) indicates that the CdtB-induced DSBs are atypical (Lewis and Resnick, 2000, Bennett et al., 2001, Kitagawa et al., 2007). DSB formation in HeLa cells is delayed for several hours after CDT intoxication, whereas irradiated cells immediately accumulate DSBs (Frisan et al., 2003). We previously demonstrated that another type of DNA lesion precedes DSB formation in CDT-exposed cells (Fedor et al., 2013), and many clues argue that these lesions are SSBs (see (Bezine et al., 2014) for detail). To test this hypothesis, we decided to observe the behavior of XRCC1 depleted cells after CDT treatment. XRCC1 is a scaffold protein that interacts with the different enzymatic components of SSBR in order to stabilize and/or stimulate them (Caldecott, 2014). As expected, human and rodent XRCC1 deficient cells were hypersensitive to CDT (Fig. 2B and C). Furthermore, the absence of sensitivity in the shXPA HCT116 after CDT compared to UV, prompted us to exclude bulky adducts as possible CdtB-induced DNA lesions. Besides, yeast data showed that DNA glycosylases involved in early steps of BER are not required to survive CDT intoxication, implying that the toxin does not generate base modifications (Kitagawa et al., 2007,

Matangkasombut et al., 2010). Thus, these findings strongly suggest that CdtB, through its nuclease activity, only induces DNA strand breaks, and no other type of lesion.

Alkaline comet assay showed that CDT-treated cells accumulate DNA strand breaks over time, even 48 h after a pulse treatment (data not shown), and this effect is aggravated by reduced SSBR capacity in XRCC1 deficient cells. This indicates that CDT retains its DNase activity for at least two days once entered into host cells, as shown for the Haemophilus ducreyi toxin (Fahrer et al., 2014). Thus, once internalized, CdtB continuously generates SSBs, some of which are repaired by SSBR. The unrepaired SSBs sustain the CdtB-mediated genotoxicity, underpinning the well-characterized cellular consequences of CDT intoxication that are cell cycle arrest, cell distension and cell death. Indeed, shXRCC1 HCT116 cells, which accumulate more unrepaired SSBs, exhibit a more pronounced G2/M block (Fig. 2F) and cell distension (data not shown) compared to control cells. The CDT-mediated cell cycle arrest and apoptosis depends on ATM (Cortes-Bratti et al., 2001, Alaoui-El-Azher et al., 2010). This implies that the CdtB-induced SSBs must be converted to DSBs to activate the ATM-dependent pathway. Nevertheless, we cannot rule out that the ATM-dependent response is partially mediated by SSBs, as recently reported (Khoronenkova and Dianov, 2015).

Depending on the dose, CDT can directly induce DSBs (high doses), when two SSBs face each other, or indirectly during S-phase (moderate doses), associated with the presence of single-stranded DNA coated by RPA (Fedor et al., 2013). The latter condition implicates the activation of the ATR-dependent replicative stress response (Zou and Elledge, 2003). Farher and colleagues have shown that CDT induces a rapid phosphorylation of ATR and CHK1 that increases over time, but failed to see an aggravated apoptosis in an ATR deficient cell line (Fahrer et al., 2014). However, these cells still express some functional ATR and are from lymphoblastoid origin. Yet, lymphoblasts have been shown to display an atypical response to CDT, involving the reduction of the intracellular phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate pool implicated in the Akt signaling pathway (Shenker et al., 2007). Here, we observed a hypersensitivity to CDT in two different ATR-depleted fibroblasts cell lines (Fig. 3A and S5D). This result pinpoints the need for ATR-dependent replicative stress signaling to recover from the CdtB-mediated DNA lesions in S-phase, and, in comparison with the results obtained in the ATR-deficient lymphoblasts, reinforces the assumption that the CDT-related toxicity engages different mechanisms between lymphocytes and fibroblasts.

To further characterize the cellular response to the CDT-induced replicative stress, attention has been drawn to the FA pathway. Besides its well-established role in the repair of ICL, the FA pathway seems to play a more general role in the recovery from replication stress (Jones and Huang, 2012). Indeed, wide ranges of agents that impede replication fork progression, without crosslinks, activate the FA pathway. Here we show that CDT promotes FA pathway activation through FANCD2 monoubiquitination (Fig. 3D), strongly supporting that CDT-mediated DNA damage induce a replicative stress. To further confirm this statement, we demonstrate that under moderate doses of CDT, that induce replication-dependent DSBs, FANCD2 is recruited to damaged sites of intoxicated cells (Fig. 3E-H). In contrast, treatment with a high dose of CDT does not increase the rate of FANCD2 positive cells (Fig. 3G), indicating that direct DSB formation is not associated with a replicative stress. Nevertheless, half of the □H2AX positive cells after high dose also accumulate FANCD2 foci (34 % of the total cells; Fig. 3H), these representing the proportion of the FANCD2 positive cells in the entire untreated population (35 % of the total cells). As FANCD2 spontaneously forms foci in S-phase cells (Taniguchi et al., 2002), this result suggests that even at high doses, CDT preferentially induces DSBs during replication through the same mechanism as for moderate doses. Finally, we observed CDT hypersensitivity in cells deficient for FANCC or FANCD2. Compared to ICL inducing agents, FA cells only exhibit mild-sensitivity to other sources of replicative stress. Indeed, the PD20 cells were less sensitive to CDT than to MMC that induces ICL (data not shown). So what is the function of the FA pathway in response to CDT? FANCD2 is highly enriched at stalled and collapsed replication forks (Sirbu et al., 2013), suggesting that CDT-induced SSBs block the replication

fork progression. FA proteins have been shown to protect stalled replication forks (Schlacher et al., 2012), to prevent the accumulation of replication-associated DSBs (Sobeck et al., 2006) and stabilize collapsed replication forks (Wang et al., 2008). Thus, it seems that during CDT intoxication, the FA pathway is required to overcome the SSB-mediated replication fork blockage. However, the way CdtB-induced SSBs block replication fork progression and create replication-dependent DSBs still need to be elucidated. CdtB may continuously create SSBs into double-stranded DNA, resulting in fork collapse during S-phase as the replicative helicase unwinds the damaged strand before SSBR processing. Otherwise, CdtB may preferentially cut single-stranded DNA at the replication fork, directly generating one-ended DSBs. Lastly, the possibility that CdtB induces irreparable SSBs by remaining associated to the nicked DNA, in a similar mechanism as for trapping of the topoisomerase-I cleavage complex by topoisomerase-I inhibitors, cannot be excluded (Fedor et al., 2013). Deciphering between these assumptions is complicated by the fact that CdtB seems to remain active in cells for at least two days after a pulse treatment, and will require further analyses.

In conclusion, we have demonstrated that cellular survival to CDT-mediated genotoxicity involves a battery of repair mechanisms. Our results emphasize the implication of the SSBR and FA pathways, reinforcing the model in which the unrepaired CDT-induced SSBs degenerate into replication-associated DSBs (Fig. 4). CdtB continuously forms SSBs that impair replication progression by inducing replication fork collapse. FA proteins stabilize the blocked fork and trigger the HR-mediated replication fork restart. On the other hand, two unrepaired SSBs can directly form a DSB that will be repaired by HR or NHEJ, particularly at high CDT doses. This model underlines the cell proliferation status to generate CDT-mediated DSBs, and demonstrates the importance of possessing functional DNA repair processes during a CDT-producing bacteria infection to counteract the mutagenic potential of this toxin. Chronic infection with Salmonella enterica serovar Typhi is associated with an increased risk of hepatobiliary carcinoma (Samaras et al., 2010), and the possible contribution of CDT-producing bacteria to other types of human cancers still needs to be explored. In mouse, chronic infection with CDT-expressing Campylobacter jejuni or Helicobacter hepaticus is associated with gastric or liver dysplasia, respectively (Fox et al., 2004, Ge et al., 2007). Finally, chronic exposure of human cells to CDT promotes genomic instability with impaired DNA damage response (Guidi et al., 2013). Our findings provide critical insight into the molecular mechanism by which CDT acts, coupling its genotoxic effect with the proliferation status of the host cells, thereby inducing a replicative stress that could ultimately lead to genetic instability and cancer (Gaillard et al., 2015). In addition, constant exposure to CDT-induced DNA lesions may result in alteration of key genes (involved in DDR, cell-cycle regulation or DNA repair mechanisms), therefore feeding the genomic instability and enhancing the risk of tumor development (Janssen and Medema, 2013). Future studies will necessarily provide further insight into the mechanisms contributing to the pathogenesis of disease involving CDT-producing bacteria, including cancer, particularly in the context of epithelia where cells are highly proliferating.

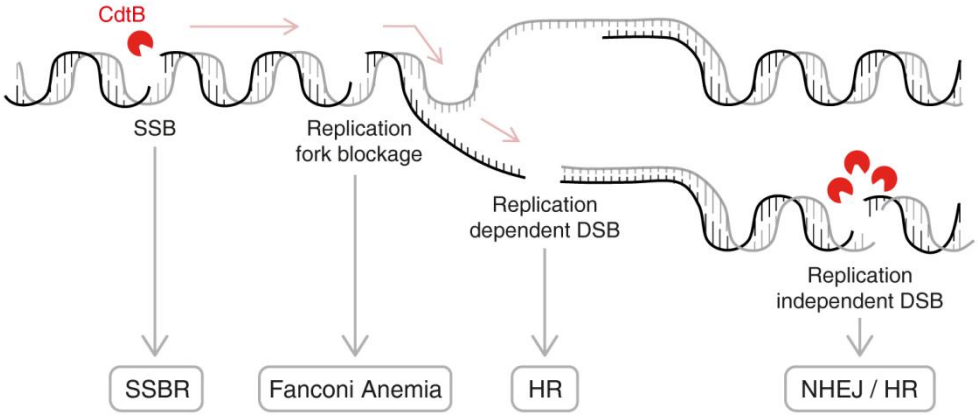


Fig. 4. Model for repair of CDT-induced DNA damage.
Moderate CDTwt doses induce SSBs, repaired by SSBR. SSBs left unrepaired or produced during S-phase block the replication fork, inducing a replicative stress signaled by ATR and activating the Fanconi Anemia pathway. The stalled replication fork will eventually collapse to form a one-ended DSB, which is specifically processed by HR. On the other hand, high doses of CDTwt directly induce replication-independent DSBs by creating two SSBs facing each other on the two DNA strands. These DSBs can be repaired either by HR or NHEJ

Acknowledgements

We are grateful to Dr Patrick Calsou for AA8, EM9 and MEF cells, Dr Jean-Yves Masson for PD20 and PD20 D2 cells. We thank Pfizer for the gift of calicheamicin, Pr Eric Oswald, Dr Jean-Philippe Nougayrède and Dr Frédéric Taieb for their help with the E. coli CDT-I purification. We also thank the members of the 3R-Toulouse group for fruitful discussions and James Grey for his help with the manuscript. This work was supported by an ANR program to GM (Grant number ANR-10-CESA-011) and by the INRA support to JV (Animal Health department, young scientist program). Elisabeth Bezine was supported by a doctoral fellowship from French Ministry of Higher Education and Scientific Research.

References

Alaoui-El-Azher, M., Mans, J.J., Baker, H.V., Chen, C., Progulske-Fox, A., Lamont, R.J. and Handfield, M. (2010). Role of the ATM-checkpoint kinase 2 pathway in CDT-mediated apoptosis of gingival epithelial cells. PLoS One 5, e11714.

Aparicio, T., Baer, R. and Gautier, J. (2014). DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. DNA Repair (Amst) 19, 169-175.

Ashley, A.K., Shrivastav, M., Nie, J., Amerin, C., Troksa, K., Glanzer, J.G., et al. (2014). DNA-PK phosphorylation of RPA32 Ser4/Ser8 regulates replication stress checkpoint activation, fork restart, homologous recombination and mitotic catastrophe. DNA Repair (Amst) 21, 131-139.

Bennett, C.B., Snipe, J.R., Westmoreland, J.W. and Resnick, M.A. (2001). SIR functions are required for the toleration of an unrepaired double-strand break in a dispensable yeast chromosome. Mol Cell Biol 21, 5359-5373.

Bezine, E., Vignard, J. and Mirey, G. (2014). The cytolethal distending toxin effects on Mammalian cells: a DNA damage perspective. Cells 3, 592-615.

Brem, R. and Hall, J. (2005). XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. Nucleic Acids Res 33, 2512-2520.

Brown, E.J. and Baltimore, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. Genes Dev 14, 397-402.

Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., et al. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. Science 282, 1497-1501.

Caldecott, K.W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. Nat Rev Genet 9, 619-631.

Caldecott, K.W. (2014). DNA single-strand break repair. Exp Cell Res 329, 2-8.

Cannan, W.J. and Pederson, D.S. (2015). Mechanisms and Consequences of Double-strand DNA Break Formation in Chromatin. J Cell Physiol.

Clauson, C., Scharer, O.D. and Niedernhofer, L. (2013). Advances in understanding the complex mechanisms of DNA interstrand cross-link repair. Cold Spring Harb Perspect Med 3, a012732.

Cortes-Bratti, X., Karlsson, C., Lagergard, 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.

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.

Drouet, J., Delteil, C., Lefrancois, J., Concannon, P., Salles, B. and Calsou, P. (2005). DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks. J Biol Chem 280, 7060-7069.

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.

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.

Eshraghi, A., Dixon, S.D., Tamilselvam, B., Kim, E.J., Gargi, A., Kulik, J.C., et al. (2014). Cytolethal distending toxins require components of the ER-associated degradation pathway for host cell entry. PLoS Pathog 10.

Fahrer, J., Huelsenbeck, J., Jaurich, H., Dorsam, B., Frisan, T., Eich, M., et al. (2014). Cytolethal distending toxin (CDT) is a radiomimetic agent and induces persistent levels of DNA double-strand breaks in human fibroblasts. DNA Repair (Amst) 18, 31-43.

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.

Fox, J.G., Rogers, A.B., Whary, M.T., Ge, Z., Taylor, N.S., Xu, S., et al. (2004). Gastroenteritis in NF-kappaB-deficient mice is produced with wild-type Camplyobacter jejuni but not with C. jejuni lacking cytolethal distending toxin despite persistent colonization with both strains. Infect Immun 72, 1116-1125.

Frisan, T., Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Stenerlow, 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.

Gaillard, H., Garcia-Muse, T. and Aguilera, A. (2015). Replication stress and cancer. Nat Rev Cancer 15, 276-289.

Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M.S., Timmers, C., Hejna, J., et al. (2001). Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. Mol Cell 7, 249-262.

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.

Gillet, L.C. and Scharer, O.D. (2006). Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. Chem Rev 106, 253-276.

Godon, C., Cordelieres, F.P., Biard, D., Giocanti, N., Megnin-Chanet, F., Hall, J. and Favaudon, V. (2008). PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. Nucleic Acids Res 36, 4454-4464.

Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., Mann, M. and Lieber, M.R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. Nature 388, 492-495.

Guerra, L., Albihn, A., Tronnersjo, S., Yan, Q., Guidi, R., Stenerlow, B., et al. (2010). Myc is required for activation of the ATM-dependent checkpoints in response to DNA damage. PLoS One 5, e8924.

Guidi, R., Guerra, L., Levi, L., Stenerlow, B., Fox, J.G., Josenhans, C., et al. (2013). Chronic exposure to the cytolethal distending toxins of Gram-negative bacteria promotes genomic instability and altered DNA damage response. Cell Microbiol 15, 98-113.

Gurtan, A.M. and D'Andrea, A.D. (2006). Dedicated to the core: understanding the Fanconi anemia complex. DNA Repair (Amst) 5, 1119-1125.

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.

Hu, X. and Stebbins, C.E. (2006). Dynamics and assembly of the cytolethal distending toxin. Proteins 65, 843-855.

Hurov, K.E., Cotta-Ramusino, C. and Elledge, S.J. (2010). A genetic screen identifies the Triple T complex required for DNA damage signaling and ATM and ATR stability. Genes Dev 24, 1939-1950.

Imamichi, S., Sharma, M.K, Kamdar, R.P, Fukuchi, M., Matsumoto, Y. (2014). Ionizing radiation-induced XRCC4 phosphorylation is mediated through ATM in addition to DNA-PK. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 90, 365-372.

Iyama, T. and Wilson, D.M., 3rd (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. DNA Repair (Amst) 12, 620-636.

Janssen, A. and Medema, R.H. (2013). Genetic instability: tipping the balance. Oncogene 32, 4459-4470.

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.

Jones, M.J. and Huang, T.T. (2012). The Fanconi anemia pathway in replication stress and DNA crosslink repair. Cell Mol Life Sci.

Jones, R.M. and Petermann, E. (2012). Replication fork dynamics and the DNA damage response. Biochem J 443, 13-26.

Kennedy, R.D. and D'Andrea, A.D. (2005). The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. Genes Dev 19, 2925-2940.

Khoronenkova, S.V. and Dianov, G.L. (2015). ATM prevents DSB formation by coordinating SSB repair and cell cycle progression. Proc Natl Acad Sci U S A 112, 3997-4002.

Kim, H. and Kim, J.S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. Nat Rev Genet 15, 321-334.

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.

Lara-Tejero, M. and Galan, J.E. (2000). A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. Science 290, 354-357.

Lebailly, P., Mirey, G., Herin, F., Lecluse, Y., Salles, B. and Boutet-Robinet, E. (2015). DNA damage in B and T lymphocytes of farmers during one pesticide spraying season. Int Arch Occup Environ Health 88, 963-972.

Lewis, L.K. and Resnick, M.A. (2000). Tying up loose ends: nonhomologous end-joining in Saccharomyces cerevisiae. Mutat Res 451, 71-89.

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.

Lieber, M.R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. Annu Rev Biochem 79, 181-211.

Matangkasombut, O., Wattanawaraporn, R., Tsuruda, K., Ohara, M., Sugai, M. and Mongkolsuk, S. (2010). Cytolethal distending toxin from Aggregatibacter actinomycetemcomitans induces DNA damage, S/G2 cell cycle arrest, and caspase- independent death in a Saccharomyces cerevisiae model. Infect Immun 78, 783-792.

Nesic, D., Hsu, Y. and Stebbins, C.E. (2004). Assembly and function of a bacterial genotoxin. Nature 429, 429-433.

Ng, W.L., Yan, D., Zhang, X., Mo, Y.Y. and Wang, Y. (2010). Over-expression of miR-100 is responsible for the low-expression of ATM in the human glioma cell line: M059J. DNA Repair (Amst) 9, 1170-1175.

Petermann, E., Orta, M.L., Issaeva, N., Schultz, N. and Helleday, T. (2010). Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. Mol Cell 37, 492-502.

Samaras, V., Rafailidis, P.I., Mourtzoukou, E.G., Peppas, G. and Falagas, M.E. (2010). Chronic bacterial and parasitic infections and cancer: a review. J Infect Dev Ctries 4, 267-281.

Schlacher, K., Wu, H. and Jasin, M. (2012). A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. Cancer Cell 22, 106-116.

Shechter, D., Dormann, H.L., Allis, C.D. and Hake, S.B. (2007). Extraction, purification and analysis of histones. Nat Protoc 2, 1445-1457.

Shenker, B.J., Dlakic, 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.

Sirbu, B.M., McDonald, W.H., Dungrawala, H., Badu-Nkansah, A., Kavanaugh, G.M., Chen, Y., et al. (2013). Identification of proteins at active, stalled, and collapsed replication forks using isolation of proteins on nascent DNA (iPOND) coupled with mass spectrometry. J Biol Chem 288, 31458-31467.

Smogorzewska, A., Matsuoka, S., Vinciguerra, P., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., et al. (2007). Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. Cell 129, 289-301.

Sobeck, A., Stone, S., Costanzo, V., de Graaf, B., Reuter, T., de Winter, J., et al. (2006). Fanconi anemia proteins are required to prevent accumulation of replication-associated DNA double-strand breaks. Mol Cell Biol 26, 425-437.

Song, J., Gao, X. and Galan, J.E. (2013). Structure and function of the Salmonella Typhi chimaeric A(2)B(5) typhoid toxin. Nature 499, 350-354.

Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Grompe, M. and D'Andrea, A.D. (2002). S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. Blood 100, 2414-2420.

Tsuchida, R., Yamada, T., Takagi, M., Shimada, A., Ishioka, C., Katsuki, Y., et al. (2002). Detection of ATM gene mutation in human glioma cell line M059J by a rapid frameshift/stop codon assay in yeast. Radiat Res 158, 195-201.

Wang, L.C., Stone, S., Hoatlin, M.E. and Gautier, J. (2008). Fanconi anemia proteins stabilize replication forks. DNA Repair (Amst) 7, 1973-1981.

Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., et al. (2006). Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. Mol Cell 22, 719-729.

Zou, L. and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. Science 300, 1542-1548.

Supplementary data

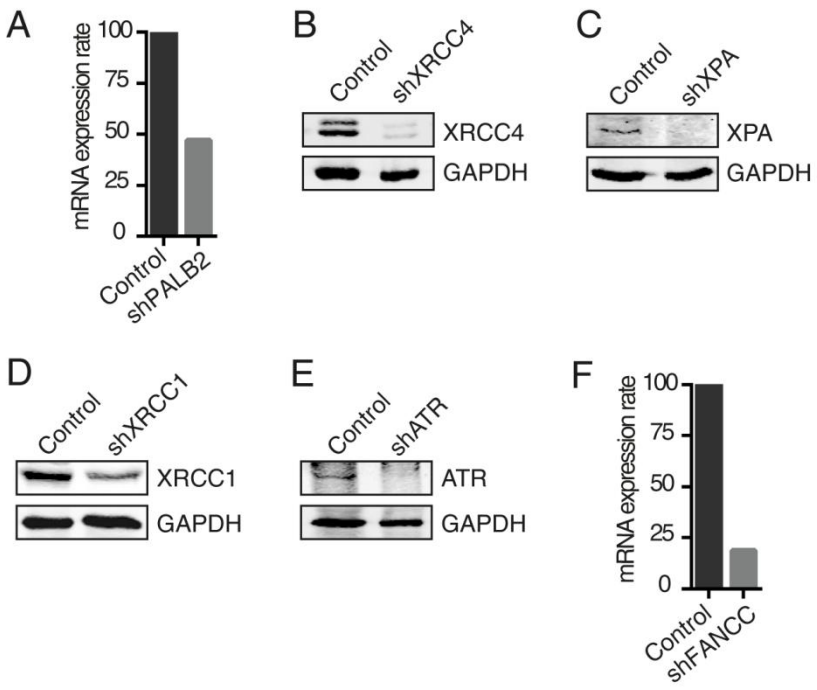


Fig. S1. Efficiency of shRNA-mediated depletion of the proteins of interest in HCT116 stable cell lines.
The mRNA expression levels in HCT116 cell lines down-regulated for PALB2 (A) or FANCC (F) were analyzed by RT-qPCR. The protein levels were analyzed by western blotting in soluble cell extracts of HCT116 cell lines down-regulated for XRCC4 (B), XPA (C), XRCC1 (D) or ATR (E).

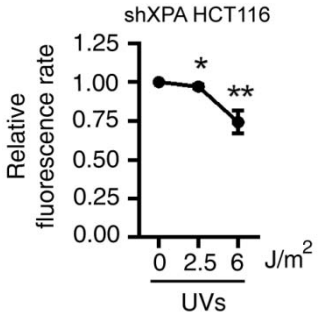


Fig. S2. The NER protein XPA is important to survive a UV exposure.
MCA analyses of HCT116 cells down-regulated for XPA, treated for 6 days after a treatment with 2.5 or 6 J/m2. Data are expressed as the mean ± SD of at least 3 independent experiments; statistical differences between the means of treated compared to non-treated cells were identified by paired Student's t-test (*P <0.05; **P < 0.01).

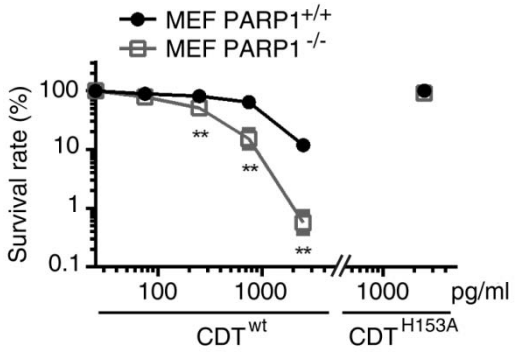


Fig. S3. The SSBR protein PARP-1 is important to survive to CDT.
Clonogenic survival of PARP+/+ and PARP-/- MEFs after a CDTwt or CDTH153A treatment. Results present the mean ± SD of at least 3 independent experiments; statistical analyses present differences between means of the two cells types for a same treatment, and are analyzed by an unpaired Student's t-test (** P < 0.01).

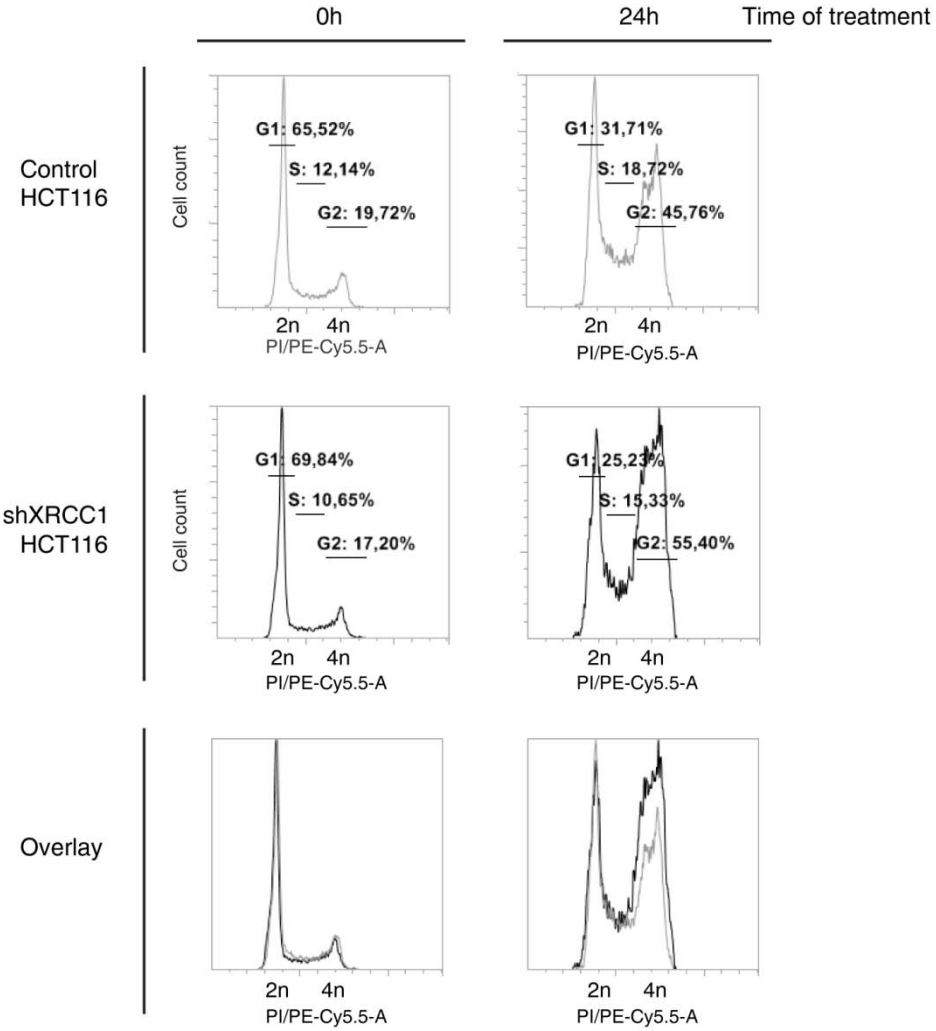


Fig. S4. CDT induces a more pronounced G2/M arrest in shXRCC1 HCT116 cells compared to control cells.
Graphs show the cell cycle profiles obtained for one representative experiment of the data presented in figure 2F.

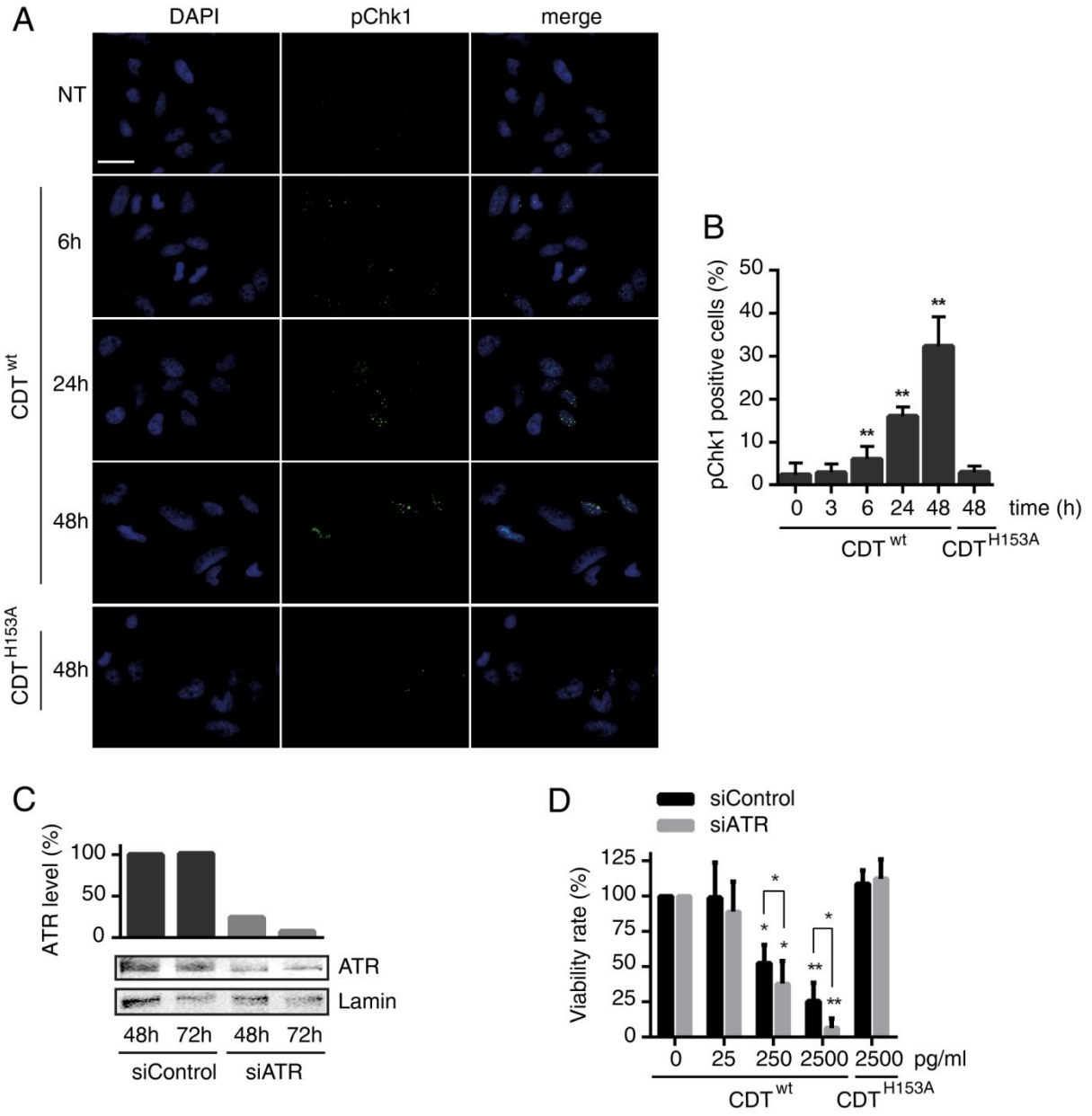


Fig. S5. Replicative stress signaling in HeLa cells in response to CDT.

A. Representative images of phospho-Chk1 immunostaining in HeLa cells treated with 50 pg/ml of CDTwt or CDTH153A for the indicated times. NT represents non-treated cells. Scale bar = 50µm.

B. Quantification of phospho-Chk1 positive cells presented in (A). Results present the mean ± SD of at least three independent experiments; statistical differences were analyzed by a Student's t-test between treated and non-treated conditions (**P < 0.01).

C. Analysis of ATR protein level by western blotting in soluble cell extracts of HeLa cells treated with control or ATR siRNA. The ATR protein level was normalized to Lamin and assessed 48 h and 72 h after transfection thanks to the Odyssey software. The histogram above immunoblots represents ATR protein level normalized to 100 for the control conditions.

D. HeLa cells treated with control or ATR siRNA were exposed for 5 days to CDTwt or CDTH153A and cell viability was analyzed by Crystal violet staining. Results present the mean ± SD of at least three independent experiments; statistical differences were analyzed by a Student's t-test, between treated and non-treated conditions (identified by an asterisk above the SD bar), or between the two siRNA for a same condition (identified by an asterisk above a horizontal bracket (*P < 0.05; ** P <0.01).

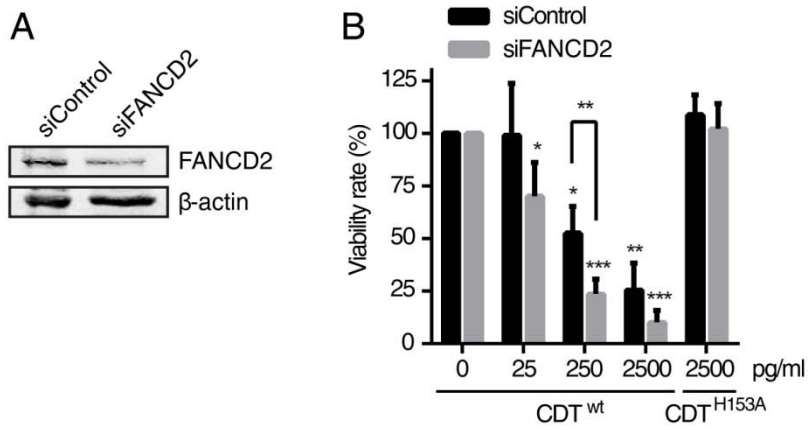


Fig. S6. FANCD2 depletion sensitizes HeLa cells to CDT.

A. FANCD2 protein level analyzed by western blotting in soluble cell extracts of HeLa cells treated with control or FANCD2 siRNA for 72 h.

B. HeLa cells treated with control or FANCD2 siRNA were exposed for 5 days to CDTwt or CDTH153A and cell viability was analyzed by crystal violet staining. Results present the mean ± SD of at least three independent experiments; statistical differences were analyzed by a Student's t-test, between treated and non-treated conditions (identified by an asterisk above the SD bar), or between the two siRNA for a same condition (identified by an asterisk above a horizontal bracket (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

b) Résultats additionnels : Cinétique de réparation des dommages induits par CDT

◊ *Matériels et Méthodes*

Les cellules sont traitées à une dose de 25 ng/ml de CDT pendant 4 heures avant d'être relarguées dans du milieu complet DMEM 10% SVF, 0,5 mg/ml Penicillin/Streptomycin, pendant les temps indiqués. Le test des comètes a été réalisé comme décrit dans notre article (Bezine *et al*., 2015, *under review*).

Lors de traitements contrôles, les différents agents génotoxiques sont dilués dans du milieu de culture complet (DMEM, 10% SVF, 1% Pénicilline/Streptomycine). Les agents génotoxiques utilisés sont le Méthanesulfonate de méthyle (MMS), la Mitomycine C (MMC), l'Etoposide (VP16) ou la Calicheamicine (don de Pfizer).

◊ *Résultats*

Afin de caractériser la cinétique de réparation des dommages induits par CDT, nous avons étudié, par un test des comètes en condition alcaline, l'évolution du taux de dommages après un traitement de courte durée à CDT (Figure 14). Dans l'article inséré ci-dessus nous avons démontré l'importance du SSBR, *via* la protéine XRCC1, dans la réparation des dommages induits par CDT. Nous avons donc choisi d'étudier la réparation des dommages dans des cellules XRCC1 proficientes ou déficientes.

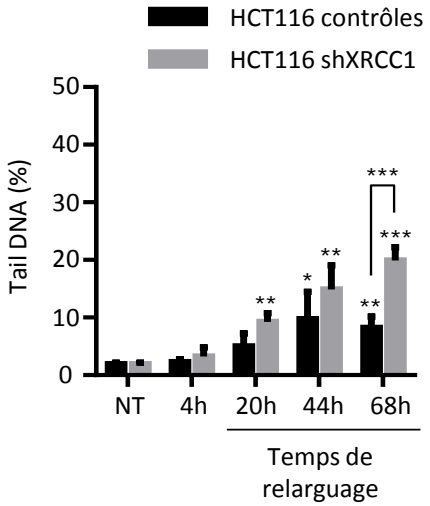


Figure . in court traitement de 4h par CDT

Le test des comètes en conditions alcaline permet de quantifier les dommages CSBs, CDBs et sites alcali-labiles, de manière globale. Concernant la lignée contrôle, possédant une réparation par SSBR fonctionnelle, aucune augmentation significative du taux de dommage n'est observée après 4h de traitement ainsi que après 20h de relargage, par rapport à la condition non traitée. En revanche le taux de dommage augmente de façon significative après 44h de relargage avant de se stabiliser après 68h. La même tendance d'apparition des dommages est obtenue avec la lignée déplétée pour XRCC1, à l'exception que cette lignée semble accumuler plus de dommages que la lignée contrôle. En effet, contrairement à la lignée contrôle, une augmentation significative du taux de dommages est observée dès 20h de relargage. De plus, le taux de dommages après 68h de relargage ne semble pas se stabiliser et est significativement plus important que dans la lignée contrôle.

Nos résultats montrent donc que les cellules déficientes pour XRCC1 accumulent plus de dommages que les lignées contrôles, même après relargage dans du milieu sans toxine. Toutefois, dans la lignée sauvage, aucune diminution du taux de dommage signant la réparation de ces dommages, n'est observée.

III. Conclusions et Perspectives

1) Conclusion

Pendant longtemps, CDT a été considérée comme une nucléase induisant des CDBs de l'ADN. Nos résultats appuient le modèle avancé par notre laboratoire en 2013, selon lequel CDT induit des dommages à l'ADN complexes, probablement de type CSBs qui dégénèrent en CDBs suite au passage de la réplication. De plus, dans la littérature, seules les voies de réparations des CDBs avaient jusqu'alors été étudiées.

Lors de ce travail, nous avons pu démontrer, pour la première fois, l'implication d'autres voies de réparations dans la prise en charge de dommages plus précoces que les CDBs. Dans un premier temps, nous avons démontré que le SSBR, une sous-voie du BER, est important pour la survie des cellules eucaryotes à CDT. L'importance du BER lors d'un traitement CDT avait déjà été étudié dans le modèle de levure *Saccharomyces cerevisae*, mais aucune sensibilisation de la souche n'avait été observée (Matangkasombut *et al.*, 2010). Dans cette étude, les protéines Ntg1 et Ntg2 du BER avaient été déplétées (ces protéines sont des glycosylases, qui interviennent lors des premières étapes du BER, dans la réparation des bases modifiées). Or, la réparation d'une CSB implique des étapes en aval des glycosylases, notamment la protéine XRCC1, déplétée dans notre étude. Nous avons également montré que le NER, *via* la protéine XPA, n'est pas essentiel dans la réparation des dommages induits par CDT. Ensemble, ces données démontrent que les dommages précoces induits par CDT sont de types CSB, et non des adduits de l'ADN ou des modifications de bases.

Nous avons également étudié la réparation des dommages induits par CDT après 4h de traitement. Pendant les 44 premières heures de relargage, une augmentation des dommages est observée et aucune réparation significative n'a été obtenue après 68h. Si le relargage permet d'enlever la toxine présente dans le milieu, la toxine qui a déjà été internalisée demeure. Aucune donnée concernant la stabilité de CdtB dans la cellule eucaryote n'est connue à ce jour. Toutefois, Fahrer et ces collaborateur ont également observé une accumulation de CDBs dans des cellules traitée à CDT puis relarguées pendant au moins 48h (Jörg Fahrer *et al.*, 2014). Il a donc est proposé que la sous-unité CdtB resterait active pendant au moins 48h dans la cellule eucaryote.

Nous avons également démontré l'importance de la voie de l'Anémie de Fanconi dans la prise en

charge des dommages induits par CDT. La voie FA est importante pour la réparation des pontages inter-brins et la stabilisation des fourches de réplication bloquées. Toutefois, les cellules déficientes pour FANCD2 sont beaucoup plus sensibles à un agent induisant des pontages inter-brin comme la MMC, qu'à CDT. Ceci suggère que la voie de l'Anémie de Fanconi serait importante pour la stabilisation des fourches bloquées par les CSBs générées par CDT, plus que pour une réparation de potentiels pontages inter-brins qu'induirait la toxine. Bien que l'activation d'une réponse de stress réplicatif, *via* l'activation des protéines ATR et CHK1 en réponse à CDT, ait déjà été étudiée, nous avons donc confirmé ces données par MCA en montrant l'importance de la protéine ATR ainsi que de la protéine FANCD2 dans la résistance à CDT.

Enfin, nos résultats confirment l'importance des deux mécanismes de réparation des CDBs, HR et NHEJ, respectivement *via* les protéines PALB2 et XRCC4.

Dans l'ensemble, ce travail a permis de proposer un modèle plus complet et global des dommages à l'ADN induits par CDT, et de leur prise en charge par les différentes voies de réparations.

2) Perspectives

a) Préciser la cinétique d'activation des systèmes de réparation

La réparation des CDBs induites par CDT est dépendante des voies HR et NHEJ. Toutefois, les CDBs ne sont pas prises en charge par les deux systèmes en même temps. En effet, les CDBs dépendantes de la réplication entraînent un recrutement de Rad51, protéine clé de la HR, alors que des CDBs indépendantes de la réplication (ou CDBs « directes ») ne semblent pas être prises en charge par ce système de réparation (Fedor *et al.*, 2013). Ceci est concordant avec les données montrant que la HR est la voie majoritaire de réparation des CDBs liées à la réplication alors que le NHEJ est impliqué dans la réparation des CDBs dont les deux extrémités sont accessibles et ne présentent pas de résection importante (Petermann *et al.*, 2010). Il serait donc intéressant d'étudier par immunofluorescence la cinétique d'activation de ces deux voies de réparation, en réponse à différentes doses de CDT : une dose induisant majoritairement des CDBs dépendantes de la réplication et une dose induisant des CDBs « directes ». Le recrutement de la protéine Rad51 aux sites de réparation est un marqueur de l'activation de la HR, et est visible en immunofluorescence sous forme de foyer, colocalisant avec γH2AX et 53BP1, marqueurs des CDBs (Rodrigue *et al.*, 2006). Pendant longtemps, l'activation de la

voie NHEJ a été étudiée par western blot. Ce n'est que récemment qu'un protocole d'immunofluorescence a été publié, montrant la formation de foyers Ku80 aux sites de cassures (Britton *et al.*, 2013). Ce protocole a été testé au laboratoire avec un anticorps anti-XRCC4 dans des cellules HeLa exposées à différents traitements contrôles induisant des CDBs (Etoposide et Calicheamicine). Aucun marquage spécifique n'ayant été obtenu, une mise au point approfondie de ce protocole s'avère donc nécéssaire pour étudier l'activation du NHEJ par immunofluorescence, et ainsi comparer sa cinétique d'activation à celle de la HR suite à un traitement CDT.

b) Etude de la cinétique de réparation des dommages induits par CDT

Comme décrit dans la conclusion, l'étude de la cinétique de réparation des dommages induits par CDT rencontre certaines difficultés. Tout d'abord, il est crucial de connaitre la stabilité de CdtB dans les cellules eucaryotes après son internalisation, afin de savoir après quel temps minimum de relargage une réparation est analysable. Pour cela, une immunofluorescence anti-CdtB sur des cellules eucaryotes traitées à CDT puis relarguées pendant différent temps est envisageable. Il est également possible de réaliser des immunoblots dirigés contre CdtB, sur des extraits nucléaires et cytoplasmiques de cellules traitées à CDT puis relarguées, à condition de posséder un anticorps spécifique. Or, des variabilités entre les CdtB existent en fonction de la souche bactérienne productrice. Il est donc nécessaire de générer un anticorps spécifique de la toxine avec laquelle nous travaillons. Cet anticorps (polyclonal de lapin) a été obtenu au cours de ma dernière année de thèse. Des tests préliminaires ont été réalisés, montrant une utilisation possible en immunoblot, mais une utilisation qui reste à mettre au point en immunofluorescence.

Si CDT reste fonctionnelle dans la cellule pendant au moins 48h, l'étude de la réparation des dommages ne va pouvoir se faire qu'après ce laps de temps. Ceci peut être envisageable pour l'étude des CDBs mais est impossible pour l'étude de la réparation de dommages précoces comme les CSB ou le blocage des fourches de réplication. En effet, les cellules HeLa ou HCT116 ayant un temps de doublement de 24h maximum, après 48h de relargage, les dommages primaires non réparés auront déja dégénéré en CDBs.

Une autre possibilité afin d'étudier la réparation des dommages induits par CDT, serait d'inhiber la toxine CdtB intracellulaire. Sous forme d'holotoxine, CdtB est inactivée par l'extrémité N-terminale de CdtC qui s'insère dans le sillon catalytique de CdtB afin de bloquer le site (Nesić *et al.*, 2004). Il

serait donc intéressant de faire exprimer de façon inductible dans des cellules eucaryotes ce peptide N-terminal de CdtC afin d'inhiber l'induction de dommages par CdtB. Toutefois, même si il a été montré que la déplétion du « peptide C » restaure *in vitro* l'activité nucléase de CdtB au sein de l'holotoxine (Nesić *et al.*, 2004), l'inhibition de CdtB par le « peptide C » seul n'a jamais été étudiée. Il sera donc nécessaire dans un premier temps d'étudier *in vitro* l'inhibition de CdtB par ce peptide. Dans un second temps il faudra vérifier en cellules de mammifères que l'expression du « peptide C » seul n'induise pas de dommages et que son expression inhibe bien l'induction de dommages par CdtB. Enfin, si notre hypothèse est correcte, il sera intéressant d'étudier la réparation des dommages induits suite à un traitement court à CDT, suivie d'une expression du peptide N-ter de CdtC.

Enfin, afin de mieux caractériser l'activité nucléase de CdtB, le type de dommages qu'elle génère, ainsi que le substrat sur lequel elle opère, des études *in vitro* approfondies sont nécessaires. Ce projet fait l'objet de la troisième partie de ma thèse.

PARTIE III

CARACTERISATION *IN VITRO* DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE CDTB

PARTIE III : Caractérisation *in vitro* de l'activité catalytique de CdtB

I. Introduction

1) La désoxyribonuclease-like CdtB

La toxine CDT a été découverte en 1987, chez des patients infectés par *E. coli* (Johnson and Lior, 1987). Ce n'est qu'en 1994 que les gènes codant pour CDT ont été clonés et séquencés pour la première fois (Pickett *et al.*, 1994; Scott and Kaper, 1994). Grâce à ces données, de nouvelles bactéries ont pu être caractérisées comme productrices de CDT, et certaines continues d'être découvertes aujourd'hui (Cope *et al.*, 1997; Sugai *et al.*, 1998; Samosornsuk *et al.*, 2015).

En plus de fournir une séquence codant pour CDT, les données de séquençage ont permis de montrer que CDT est constituée de trois protéines dont les gènes sont organisés en opéron. Même si de nombreuses espèces bactériennes produisent CDT, elles présentent une certaine variabilité de séquence. D'après des données d'alignements, le gène codant pour CdtB est plus conservé entre les espèces que les gènes codant pour CdtA et CdtC (Tableau 2) (Hu *et al.*, 2006). Sachant que les sous-unités CdtA et CdtC sont impliquées dans l'interaction avec la cellule eucaryote, et que les espèces bactériennes sont localisées au niveau de différentes niches, il est proposé que la variabilité de CdtA et CdtC permette une reconnaissance spécifique des cellules environnantes (cellules coliques, cellules buccales, etc.).

TABLE I. Percentage of Amino Acid Identities and Similarities (in Parentheses) in Different Bacterial CDTs Shared with *Haemophilus ducreyi* CDT (HdCDT)

Species	CDT designation	CdtA	CdtB	CdtC
Haemophilus ducreyi	HdCDT	—	—	—
Actinobacillus actinomycetemcomitans	AaCDT	93 (95)	97 (98)	95 (97)
Helicobacter hepaticus	HhCDT	36 (55)	51 (69)	18 (32)
Campylobacter jejuni	CjCDT	30 (55)	50 (69)	19 (36)
Escherichia coli (6468/62)	EcCDT I	38 (59)	49 (67)	22 (45)
Escherichia coli (9142-88)	EcCDT II	26 (51)	48 (65)	19 (38)
Escherichia coli (S5)	EcCDT III	26 (51)	49 (65)	19 (41)
Salmonella typhi	StCdtB	—	50 (67)	—

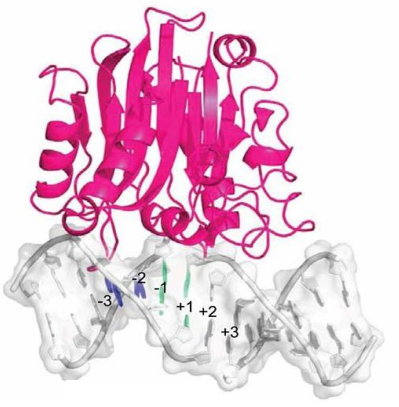
Tableau 2 : Comparaison des séquences des gènes CdtA, CdtB et CdtC de différentes espèces bactériennes par rapport à ceux de H. ducreyi (Hu and Stebbins, 2006)

Afin de déterminer le potentiel rôle de CdtB, des alignements de séquence nucléotidiques et protéiques par BLAST ont été réalisés dés 1994 (Pickett *et al.*, 1994; Scott and Kaper, 1994). Aucune homologie de séquence avec un gène ou une protéine connue n'ayant été retrouvée, ce n'est que six ans plus tard qu'une homologie de séquence (protéique) a été caractérisée, grâce à un alignement par Position-Specific Iterated (PSI) BLAST (Cherilyn A Elwell and Dreyfus, 2000). L'alignement par PSI-BLAST se base sur des homologies de motifs obtenues grâce aux données structurales et/ou fonctionnelles. Ainsi, le PSI-BLAST permet de révéler des protéines éloignées de la protéine d'intérêt, mais dont la fonction peut être proche. CdtB possède des homologies structurales avec les protéines de la famille des Endonucleases/Exonucléases/Phosphatases dont fait partie la Désoxyribonuclease I (DNaseI) (Cherilyn A Elwell and Dreyfus, 2000; Nesić *et al.*, 2004).

a) La DNase I

La DNase I est une enzyme digestive produite de façon importante par les glandes exocrines comme le pancréas. Elle est également exprimée de façon ubiquitaire par les cellules de mammifères, dans lesquelles elle joue un rôle important, lors de l'étape de fragmentation de l'ADN du processus apoptotique (Oliveri *et al.*, 2001). Hors apoptose, la DNase I se lie à l'actine G qui l'inhibe et la retient dans le cytoplasme, l'empêchant de dégrader l'ADN génomique (Lacks, 1981).

La DNase I est une endonucléase Ca^{2+}, Mg^{2+} dépendante, qui hydrolyse les liaisons phosphodiesters de l'ADN. En présence de magnésium, la DNase I forme des CSBs à l'ADN. L'ajout de calcium augmente l'activité de la DNase I, qui génère alors un important taux de CSBs proches, détectées comme des CDBs (Campbell and Jackson, 1980). La DNase I est une des enzymes les mieux caractérisées que ce soit au niveau fonctionnel ou structural. De ce fait, les résidus impliqués dans la liaison de l'enzyme avec l'ADN et dans son activité catalytique (activité d'hydrolyse ou de liaison des ions) sont décris (Figure 15 et 16) (Campbell and Jackson, 1980; Weston *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 1999).



Lazarovici et al., 2013

Figure 15 : Structure du complexe DNase I / ADN obtenu à partir des données de cristallographie (Lazarovici et al., 2013)

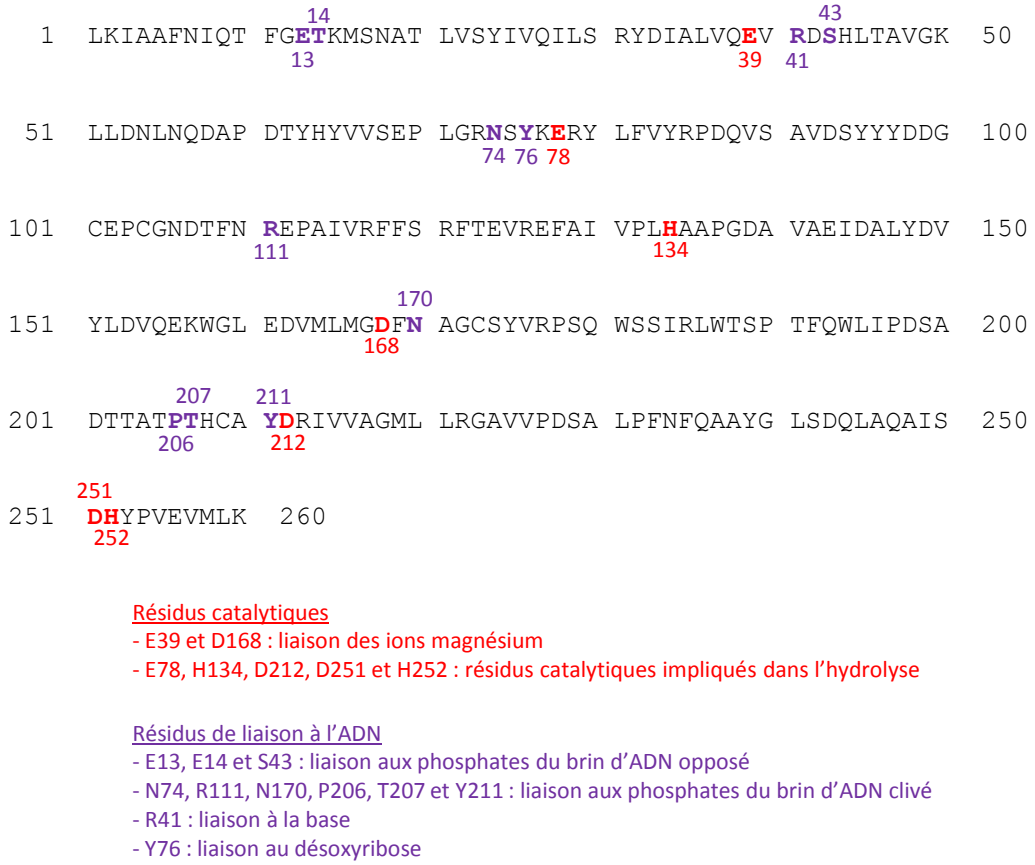


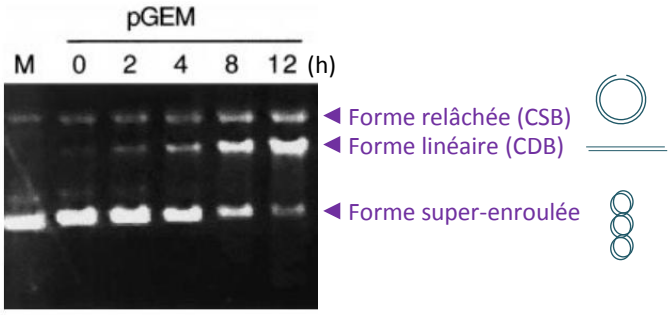
Figure 16 : Résidus impliqués dans l'activité nucléase de la DNase I

La séquence protéique utilisée dans cette figure est celle de la DNase I humaine. En rouge sont annotés les résidus catalytiques importants dans l'hydrolyse de l'ADN et en violet les résidus impliqués dans la liaison de l'enzyme avec l'ADN.

b) Homologie structurale de CdtB avec la DNAseI

A partir des données de PSI-BLAST démontrant une homologie structurale entre CdtB et la DNase I, différents mutants prédictifs de CdtB ont été réalisés. Comme pour la DNase I, différents résidus sont importants pour que CdtB soit fonctionnelle. Il y a des résidus catalytiques essentiels dans la fixation des ions et/ou essentiels à l'exercice de l'activité en elle-même, mais aussi des résidus importants dans la liaison de CdtB avec l'ADN, qui ne vont pas intervenir dans l'activité catalytique mais dont l'absence rend difficile l'action de cette dernière. Enfin, une mutation d'un résidu peut changer la conformation de la protéine, de telle manière que le site catalytique ne soit plus fonctionnel

ou plus accessible. Elwell et Dreyfus furent les premiers à montrer que CdtB est une nucléase, dont l'activité est responsable de la distension et de la cytotoxicité associées à CDT. En effet, grâce à un test nucléase *in vitro*, ils ont pu démontrer que CdtB est capable de cliver un plasmide super-enroulé en ses formes relâchées et linéaires (Figure 17). Le principe de ce test *in vitro* est le suivant. En absence d'enzymes, les plasmides sont majoritairement sous une forme super-enroulée. Lors de l'incubation avec des agents clastogènes, le plasmide peut subir des dommages de type CSBs ou CDBs. Les CSBs enlèvent les tensions présentes dans le plasmide (sous forme de supertours), qui sera alors visible sous une forme relâchée. Les CDBs clivent le plasmide et génèrent une forme linéaire. Or la mobilité électrophorétique de ces trois formes n'est pas la même : la forme super-enroulée, plus compacte, migre plus vite que la forme linéaire alors que la forme relâchée est la plus lente à migrer (et donc retrouvée au-dessus des deux autres formes) (Figure 17). Ces propriétés permettent d'analyser, par migration sur gel d'électrophorèse, la capacité d'enzymes comme CdtB à cliver un plasmide super-enroulé (pRSET-A) *via* la formation de CSBs ou de CDBs à l'ADN.



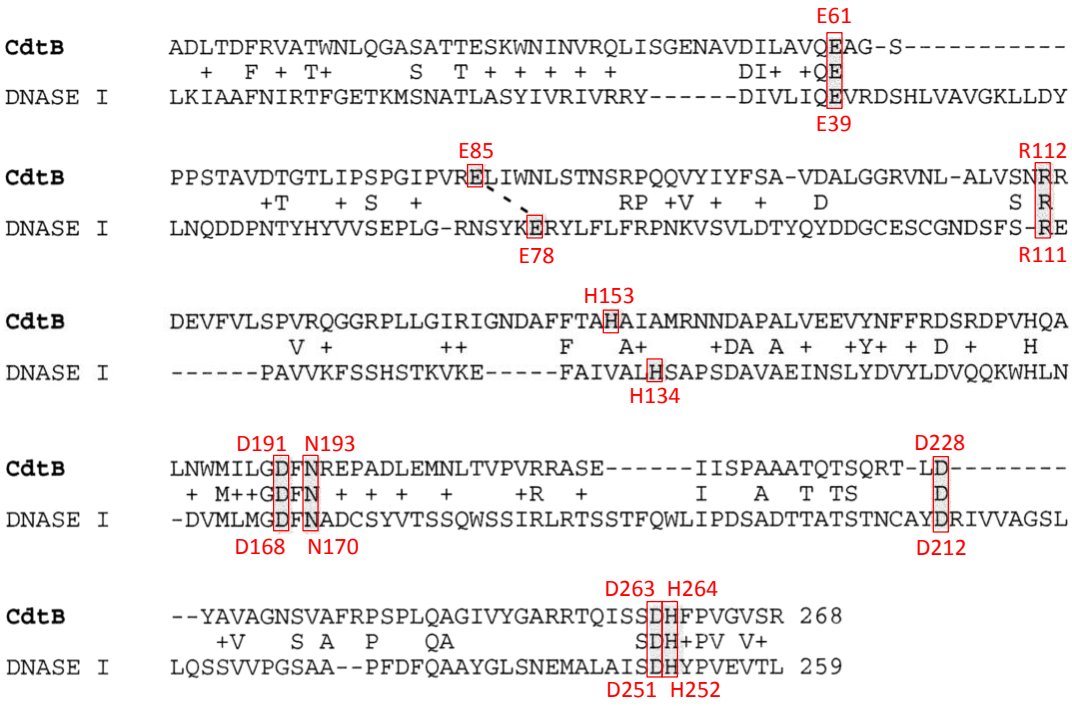
Adapté de Elwell et Dreyfus., 2000

Figure 17 : Clivage in vitro, d'un plasmide super-enroulé par la sous-unité CdtB

Un plasmide pGEM super-enroulé seul (M) ou en présence de HdCdtB sauvage, est incubé pendant différents temps (2 à 12 heures) à 37°C. La forme super-enroulée du plasmide est sa forme intacte. En présence de dommages, le plasmide est soit relâché (CSB) soit linéarisé (CDB).

Dans leur étude, Elwell et Dreyfus ont également pu caractériser de nombreux résidus essentiels à l'activité de CdtB comme les résidus de liaison à l'ADN R112 et N193, ainsi que les résidus catalytiques H153, D191, D228, D263 et H264 (Cherilyn A Elwell and Dreyfus, 2000) (Figure 18). Ces données ont par la suite été confirmées par de nombreuses études *in vitro*, et sur cellules eucaryotes (Lara-Tejero and Galàn, 2000; Nesić *et al.*, 2004; Shenker *et al.*, 2007).

Jusqu'à présent, aucune structure du complexe CdtB/ADN n'a été réalisée. Toutes les données acquises proviennent d'une modélisation, en se basant sur les données d'homologie avec la DNase I et du complexe que forme cette dernière avec l'ADN (Nesić *et al.*, 2004; Hu and Stebbins, 2006). Ces études de modélisation ont permis d'identifier de nouveaux résidus potentiellement important pour l'activité de CdtB, comme le résidu de liaison à l'ADN R144 de HdCdtB (R137 chez EcCdtB).



Adapté de Elwell et Dreyfus., 2000

Figure 18 : Homologie de séquence entre CdtB et la DNase I réalisée par Elwell et Dreyfus

Homologie obtenue suite à un alignement PSI-BLAST réalisé par Elwell et Dreyfus en 2000. Les résidus entourés en rouge sont ceux mutés dans leur étude : deux résidus potentiellement impliqués dans la liaison à l'ADN : R112 de EcCdtB (R111 de la DNase I) et N193 (N170) ainsi que sept résidus potentiellement impliqués dans l'activité catalytique : E61 (E39), E85 (E78), H153 (H134), D191 (D168), D228 (D212), D263 (D251) et le H264 (H252).

De nombreuses études ont étudié l'activité catalytique de CdtB *in vitro*. Cependant, seul un test de clivage sur plasmide super-enroulé a été réalisé. L'activité exacte de CdtB (endonucléase, exonucléase, etc.) et son type de substrat préférentiel (ADN double-brin, simple brin, etc.) restent à déterminer.

2) CdtB possède une double activité nucléase/phosphatase

Même si l'homologie au niveau structural et catalytique de CdtB avec la DNase I n'est pas remise en doute dans la littérature, la famille des endonucléases/exonucléases/phosphatases contient de nombreuses autres protéines, parmi lesquelles se trouve comme son nom l'indique des phosphatases. Les premiers indices suggérant que CdtB possèderait également une activité phosphatase viennent des études réalisées sur des cellules lymphocytaires. En effet, CDT induit une mort par apoptose des cellules immunitaires très rapide comparé à la cinétique de mort d'autres types cellulaires (Shenker *et al.*, 2006). Or les lymphocytes, ainsi que d'autres cellules immunitaires comme les macrophages et les cellules dendritiques, sont extrêmement sensibles aux changements du taux de phosphatidylinositol triphosphate (PIP3), dans la composition de leur membrane plasmique. En 2010, Shenker et ses collaborateurs ont confirmé cette hypothèse, et démontré que CdtB possède une activité Phosphoinositide-3,4,5-triphosphate phosphatase, déphosphorylant spécifiquement le $PI(3,4,5)P_3$ en $PI(3,4)P_2$.

II. Partie expérimentale

Afin de mieux caractériser le mode d'action de CdtB sur ses substrats, nous avons purifié cette sous-unité, en conditions natives et dénaturantes. Dans le but de tester l'activité nucléase de CdtB et de déterminer comment CdtB clive l'ADN, nous avons décidé d'étudier dans un premier temps l'activité *in vitro* de CdtB sur un ADN purifié. Dans un second temps, nous espérons pouvoir étudier la spécificité de CdtB pour différents substrats de type ADN ou lipidique, et ainsi mieux caractériser son activité par des tests innovants développés dans l'équipe. Enfin, la purification de CdtB nous permettra d'étudier *in vitro,* par cristallographie aux rayons X, l'interaction de CdtB avec l'ADN.

1) Matériels et Méthodes

a) Souches bactériennes, plasmides utilisés et conditions de culture

Le plasmide pDS7.96 contenant l'opéron codant pour les protéines EcCdtA, EcCdtB et EcCdtC (Scott and Kaper, 1994), à partir duquel ont été réalisées les mutagénèses dirigées, nous a été fourni par l'équipe du Pr Eric Oswald (CPTP, Toulouse). Le clonage de EcCdtB a été réalisé dans i) le plasmide pRSET-A portant un gène de résistance à l'Ampicilline (AmpR) et permettant d'étiqueter

EcCdtB en N-ter avec 6-Histidines (6His), ii) le plasmide pet16b portant le gène AmpR et étiquetant EcCdtB 10His en N-ter, et iii) le plasmide pGEX portant le gène AmpR et étiquetant EcCdtB en N-ter avec une étiquette GST. Les plasmides pACYCDuet-1 (résistant au Chloramphénicol – CmR) contenant le gène HdCdtA ou le gène HdCdtC, ainsi que le plasmide pRSFDuet-1 (résistant pour la Kanamycine – KanR) contenant le gène HdCdtB, sont des dons du Dr Teresa Frisan (Karolinska Institutet, Stockholm, Suède). Les étapes de clonages sont réalisées *in vitro* avant transformation dans la souche bactérienne *E. coli* DH5-alpha (NEB#C2987I) rendue chimiocompétente, et l'expression de CdtB est réalisée dans la souche *E. coli* BL21(DE3) (NEB#C2527I). Les bactéries sont transformées avec les plasmides d'intérêt selon les instructions du fournisseur. Les bactéries sont cultivées dans un milieu LuriaBroth (LB) (Tryptone 10g/L, NaCl 10g/L, extrait de levure 5g/L, CONDA Dutscher) ou sur LB agar (ajout de 15g/L de agar agar au milieu LB classique), complémenté ou non avec les antibiotiques appropriés (Ampicilline à 100µg/ml, Kanamycine à 30µg/ml, ou Chloramphénicol à 30µg/ml (Euromedex)).

b) Mutagénèse dirigée et Clonage de EcCdtB-6His

Les amorces utilisées ont été produites chez Sigma-Aldrich et sont résumées dans la figure19a. La mutagénèse dirigée de CdtB a été réalisée grâce à la méthode de « PCR-mediated overlap extension » (Heckman and Pease, 2007), avec pour matrice le plasmide pDS7.96. Brièvement, deux premières PCR, utilisant chacune une amorce contenant la mutation et une amorce s'hybridant à l'extrémité du gène (et contenant un site de restriction), sont réalisées. Ensuite, une seconde PCR, contenant les deux fragments précédemment synthétisés et les deux amorces des extrémités du gène, est accomplie (Figure 19b). Les PCRs sont réalisées grâce à l'ADN Polymérase Phusion High-Fidelity et son tampon spécifique (ThermoFisher Scientific). Les fragments PCR et le plasmide pRSET-A sont ensuite incubés pendant au moins 15 minutes à 37°C avec les enzymes de restriction « FastDigest » XhoI et EcoRI de chez ThermoFisher Scientific. La T4 DNA Ligase (ThermoFisher Scientific) est utilisée pour la ligation entre les deux fragments ADN compatibles. Enfin, les produits du clonage sont transformés dans les bactéries chimiocompétentes DH5-alpha suivant les instructions du fournisseur. Les plasmides des clones bactériens sélectionnés sont purifiés et envoyés à GATC Biotech pour vérification par séquençage.

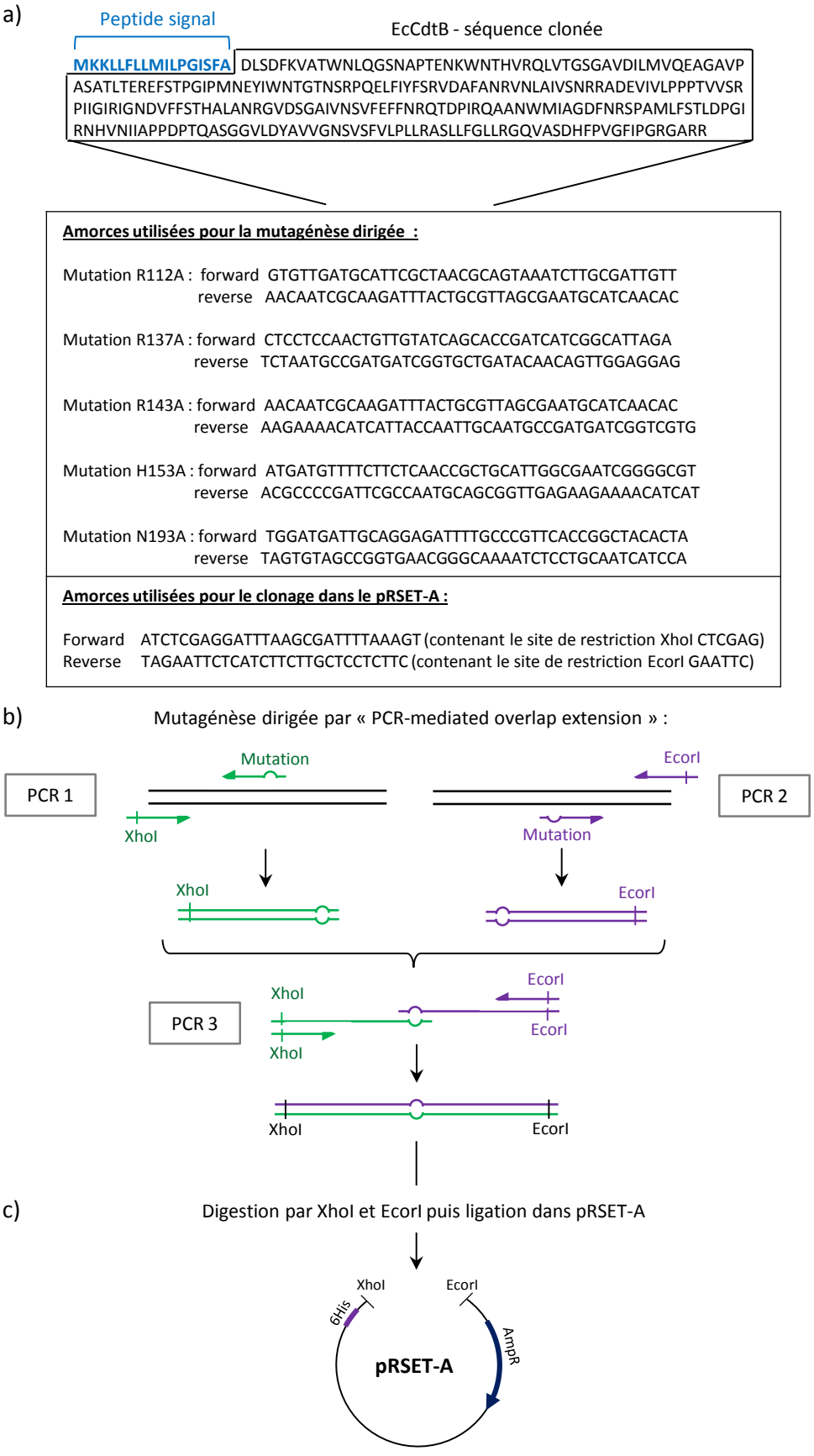


Figure 19 : Mutagénèse dirigée et clonage de EcCdtB dans le pRSET-A

Figure 19 : Mutagénèse dirigée et clonage de EcCdtB dans le pRSET-A.
(a) Séquence du gène EcCdtB clonée et liste des amorces utilisées lors de la mutagénèse dirigée. Le peptide signal de EcCdtB est enlevé lors de la première étape de la mutagénèse dirigée. (b) Modèle de la mutagénèse dirigée par « PCR-mediated overlap extension » utilisée dans nos travaux. Suite aux PCRs 1 et 2, deux fragments contenant chacun une partie du gène et possédant une séquence identique autour de la mutation insérée sont obtenus. La PCR 3 permet l'élongation des parties manquantes du gène EcCdtB. Ce n'est qu'après cette PCR qu'un fragment d'ADN contenant le gène EcCdtB entier, muté et présentant à ces deux extrémités des sites de restriction spécifiques (XhoI et EcoRI), est obtenu. (c) Clonage par digestion du fragment PCR et du plasmide receveur pRSET-A par les enzymes de restriction XhoI et EcoRI, et ligation de l'insert avec le plasmide.

Les clonages de EcCdtB dans les plasmides pet16b et pGEX ont été réalisés en utilisant comme matrice les plasmides des clones pRSET-A, issus de la mutagénèse dirigée décrite ci-dessus. Les amorces utilisées sont listées dans la Figure 20a. Le protocole utilisé est le même que pour le clonage en pRSET-A, exceptées les PCRs 1 et 2 qui ne sont pas réalisées (Figure 20b).

a)

Amorces utilisées pour le clonage dans le pet16b :	**Amorces utilisées pour le clonage dans le pGEX :**
Forward TTATTATCATATGGATTTAAGCGATTTTAAAGT (contenant le site de restriction NdeI CATATG)	Forward TATTATAGAATTCTAGATTTAAGCGATTTTAAAGT (contenant le site de restriction EcorI GAATTC)
Reverse ATTATTACTCGAGTCATCTTCTTGCTCCTCTTC (contenant le site de restriction XhoI CTCGAG)	Reverse ATTATTACTCGAGTCATCTTCTTGCTCCTCTTC (contenant le site de restriction XhoI CTCGAG)

b) Clonage de EcCdtB(mutée ou non) dans les plasmides pet16b ou pGEX :

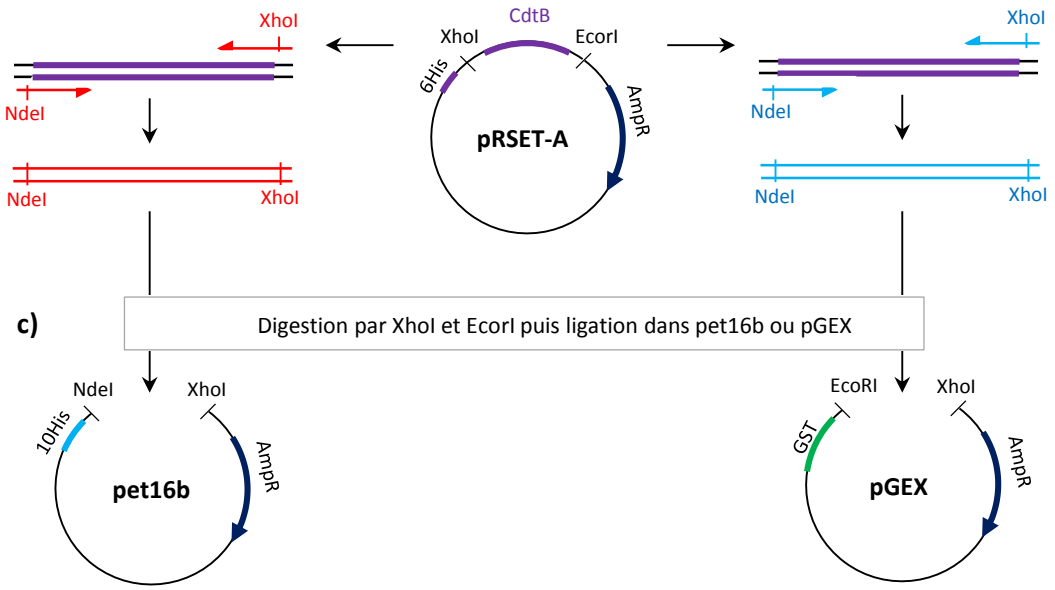


Figure 20 : Clonage de EcCdtB dans les plasmides pet16b et pGEX

Figure 20 : Clonage de EcCdtB dans les plasmides pet16b et pGEX.
(a) Liste des amorces utilisées lors du clonage de EcCdtB dans les plasmides pet16b et pGEX. (b) Modèle du clonage de EcCdtB dans les plasmides pet16b ou pGEX. L'étape de mutagénèse dirigée n'est pas nécessaire, puisque la matrice peut être un pRSET-A portant le gène EcCdtB sauvage ou une de ses formes mutées. (c) Etape finale du clonage par digestion et ligation du fragment PCR et des plasmides receveurs pet16b ou pGEX.

c) Production et Purification de CdtB

La production de EcCdtB et HdCdtB se fait dans des bactéries BL21 (DE3) préalablement transformées. Les bactéries exprimant la toxine d'intérêt sont mises en culture dans du milieu LB complémenté avec l'antibiotique approprié, sur la nuit, à 37°C, sous agitation à 250rpm. Le lendemain, la culture est diluée au 100e et remise en culture. Lorsque la DO600 atteint une valeur comprise entre 0,4 et 0,8 l'IPTG est ajouté dans le milieu, aux concentrations indiquées (Tableau 3). Les bactéries sont remises à incuber (Tableau 3), puis les bactéries induites sont récupérées, centrifugées et stockées en culot sec à -80°C.

	Purification de ECdtB	Purification de HdCdtB
Concentration en IPTG	0.04 mM	0.5 mM
Température d'induction	16 °C	37 °C
Temps d'induction	Over-Night	3 heures

Tableau 3 : Conditions d'induction de l'expression de EcCdtB et HdCdtB dans les BL21(DE3)

◊ *Purification de EcCdtB taguée Histidine*

Toutes les étapes de purification sont réalisées dans la glace ou à 4°C. Les culots bactériens sont repris et lysés pendant environ 30 minutes dans un tampon T5 (40mM Tris-HCl pH8, 500mM Nacl, 10% Glycérol, 5mM Imidazole) auquel est ajouté 1mg/ml de lysozyme et des inhibiteurs de protéases 1X (ThermoFisher Scientific). Les extraits sont ensuite lysés par sonication avant d'être centrifugés à 20 000g pendant 40min. Les protéines contenues dans le surnageant sont incubées 1h en présence de billes magnétiques de chitine (NEB) pré-équilibrées dans le tampon T5. Les bactéries BL21 (DE3)

utilisées ici ont comme particularité d'exprimer des protéines, retrouvées fréquemment comme contaminants lors de purifications sur colonne Ni/Co, étiquetées CBD (Chitin Binding Domain). Cette étape de purification sur colonne de chitine permet donc d'enlever une partie des potentiels contaminants. Les protéines non fixées (dont EcCdtB) sont ensuite récupérées dans le surnageant, grâce à une agrégation des billes magnétiques au niveau d'un barreau aimanté, avant d'être incubées pendant 2h avec des billes HisPur Cobalt (ThermoFisher Scientific), également pré-équilibrées dans le tampon T5. Les billes sont ensuite récupérées et lavées grâce à trois cycles de centrifugations (700g, 1min) et d'incubations de 5min dans un tampon T80 (40mM Tris-HCl pH8, 500mM Nacl, 10% Glycérol, 80mM Imidazole). Enfin, les protéines sont éluées suite à l'incubation avec un tampon T500 (40mM Tris-HCl pH8, 500mM Nacl, 10% Glycérol, 500mM Imidazole). Cette étape d'élution est répétée si nécessaire. Avant l'élution, un lavage plus stringent à l'aide d'un tampon T80 complémenté avec 5mM ATP et 15mM MgCl2 est réalisable (les raisons de son utilisation seront détaillées dans la partie résultats). De plus, les purifications en conditions dénaturantes nécessitent l'ajout de 2M d'Urée, dans les tampons T5, T80 et T500 à partir des étapes de liaison aux billes de chitine.

Suite à l'étape d'élution, les protéines purifiées sont dialysées à l'aide de cassettes ayant un seuil de coupure de 10kDa (Slide-A-Lyzer®DialysisCassette-ExtraStrength, ThermoFisher Scientific), dans un tampon de dialyse (Tris HCl 20mM pH 8, Glycérol 10%, Tween 0.05%, NaCl 250mM, DTT 0.5mM). Les protéines dialysées sont congelées dans de l'azote liquide et stockées à -80°C. Les protéines purifiées en condition dénaturante sont dialysées dans des bains successifs (24h) dans des tampons de dialyse contenant 1M puis 0M Urée (pour les purifications en 2M Urée).

◊ *Purification de EcCdtB taguée GST*

Les culots bactériens sont repris et lysés dans un tampon de lyse PBS-T (PBS 1X, Triton 1%, DTT 0,5mM) auquel sont ajouté les inhibiteurs de protéases 1X. Les extraits sont ensuite lysés par sonication avant d'être centrifugés à 20 000g pendant 1h. Les protéines contenues dans le surnageant sont incubées 2h en présence de billes Gluthationes pré-équilibrées dans le tampon PBS-T. Les billes sont ensuite récupérées et lavées grâce à trois cycles de centrifugations (1000g, 3min) et d'incubations de 5min dans le tampon PBS-T. Enfin, les protéines sont éluées grâce à l'incubation avec un tampon d'élution (PBS 1X, Triton 1%, DTT 0,5mM, Gluthatione 10mM). Cette étape d'élution est répétée si nécéssaire. Les protéines purifiées sont ensuite dialysées (cassettes Slide-A-Lyzer®DialysisCassette-ExtraStrength - ThermoFisher Scientific), dans un tampon de dialyse (Tris HCl 20mM pH8, Glycérol

10%, Tween 0.05%, NaCl 250mM, DTT 0.5mM). Les protéines dialysées sont congelées dans de l'azote liquide et stockées à -80°C.

◊ *Purification de HdCdtB-6His à partir des corps d'inclusion*

Le culot sec bactérien est décongelé et repris dans un tampon de lyse (Tris HCl 0.05M pH7.5, Sucrose 0.75M, EDTA 500mM, lysozyme 1X, antiprotéase-antiphosphatase 1X). Les bactéries sont ensuite lysées par sonication, jusqu'à ce que l'extrait soit homogène et fluide. Est alors ajouté à l'extrait protéique un tampon détergeant (Tris HCl 0.02M pH 7.5, NaCl 0.18M, Sodium Déoxycholate 1%, Igepal 1%, EDTA 2mM, 2-β-ME 0.07%, PMSF 0.1mM) (ajout du double du volume de tampon de lyse). Les extraits sont centrifugés (10 000g, 10min) et les culots sont resuspendus dans un tampon Triton (Tris HCl 0.02M pH7.5, Triton X-100 0.5%, EDTA 1mM, 2-β-ME 0.07%, PMSF 0.1mM), puis soniqués et centrifugés. Ces trois dernières étapes sont répétées jusqu'à l'obtention d'un culot blanc. Les corps d'inclusions contenus dans le culot blanc sont alors resuspendus dans un tampon Tris (Tris HCl 0.05M pH7.5, EDTA 1mM, DTT 10mM, PMSF 0.1mM), puis centrigugés (10 000g, 10min). Le culot est ensuite repris et incubé (20 min) dans un tampon de Binding dénaturant (Urée 7M, NaCl 0.5M, Sodium Phosphate 20mM pH7.2, Imidazole 20mM, PMSF 0.1mM). Une centrifugation (10 000g, 10min) est nécessaire afin de récupérer le surnageant dans lequel se trouvent les protéines extraites des corps d'inclusion. La purification des protéines CdtB taguées (6 ou 10His) est réalisée grâce à l'incubation du surnageant de l'extrait protéique avec des billes HisPur Cobalt (ThermoFisher Scientific) pendant au moins 2h à 4°C, sous agitation (10rpm). Les protéines non fixées aux billes sont éliminées par centrifugation (4°C, 700g, 2min). Deux lavages dans le tampon de binding suivis de deux lavages successifs avec des concentrations croissantes en Imidazole sont alors utilisés (Tampon de lavage 1 : Urée 7M, NaCl 0.5M, Sodium Phosphate 20mM pH 7.2, Imidazole 40mM, PMSF 0.1mM ; Tampon de lavage 2 : Urée 7M, NaCl 0.5M, Sodium Phosphate 20mM pH 7.2, Imidazole 80mM, PMSF 0.1mM). Entre chaque lavage les billes sont centrifugées (700g, 2min). Enfin, les protéines CdtB sont éluées dans un tampon d'Elution (Urée 7M, NaCl 0.5M, Sodium Phosphate 20mM pH7.2, Imidazole 500mM, PMSF 0.1mM), pendant au moins 1h à 4°C. Le surnageant contenant les protéines éluées est récupéré après centrifugation (700g, 2min), puis dialysé à 4°C (cassettes de dialyse laissant passer les molécules de moins de 10kDa). Les cassettes contenant les protéines purifiées sont incubées dans 4 tampons successifs avec des concentrations en Urée décroissantes (tampon Tris HCl 100mM pH7.5, L-Arginine 400mM, Glycérol 20%, PMSF 0.1mM, contenant 5M Urée, 3M, 1.5M ou 0M). Le premier bain est changé après 12h de dialyse et les trois

autres toutes les 24h. Après dialyse, les protéines purifiées sont récupérées, congelées dans de l'azote liquide et stockées à -80°C.

d) Gels SDS-PAGE

Les culots secs bactériens sont lysés suivant la méthode de lyse décrite dans leur protocole de purification respectif. Les protéines sont ensuite dénaturées (5min à 95°C) dans du Laemmli 1X (50mM Tris HCl pH6,8, 2% SDS, 0,1% Bleu de Bromophénol, 10% Glycérol, 100mM DTT), avant d'être séparées par migration en gel SDS-PAGE (6-15%) à 170V dans du tampon TGS (Tris-Glycine 1X, 2,5mM SDS). Les gels sont ensuite colorés avec une solution PageBlue Protein Staining (Bleu de Coomassie, ThermoScientific) suivant les instructions du fournisseur. La décoloration est réalisée grâce à des bains d'H_20 successifs.

e) Tests de l'activité nucléase in vitro

Le plasmide pRSET-A super-enroulé (250ou 500ng) est mis en présence de protéines CdtB purifiées (quantités indiquées sur les figures), dans un tampon Tris (Tris HCl 20mM ph 7,5, NaCl 50mM, CaCl2 5mM, MgCl2 5mM, BSA 100 µg/mL). Le mix réactionnel est incubé pendant les temps indiqués à 37°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 2mM de EDTA et de bleu de charge. Les produits de la réaction sont déposés sur un gel d'agarose (Agarose 1%, TAE 1X) contenant du BET, et mis à migrer (100V, 20 min).

f) Chromatographie d'exclusion de taille

Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec Valérie Guillet, au sein de l'équipe Biophysique Structurale dirigée par le Dr L. Mourey (IPBS, Toulouse). La chromatographie d'exclusion de taille a été effectuée sur une colonne analytique Superdex 75 HR10/300 (22mL, limite d'exclusion 70kDa), montée sur un système chromatographique AKTA Purifier10 (GE Healthcare). La détection se fait par mesure de l'absorbance à 215nm, 260nm et 280nm. L'élution de la protéine sur la Superdex 75 est réalisée à un débit de 0,450mL/min par équilibration dans un tampon TrisHCl 100mM, NaCl 100mM, glycérol 10%, pH 7,5. Des fractions de 250µL sont récoltées lors de l'élution, pour les analyses ultérieures.

g) Spectrométrie de masse

L'analyse des échantillons protéiques par spectrométrie de masse a été réalisée par Philippe. Hammann (plateforme protéomique de Strasbourg), en Nano-LC-MSMS (Liquid Chromatography-Mass spectrometry tandem). Chaque échantillon a été précipité, réduit, alkylé puis digéré à la trypsine. Les peptides extraits ont été injectés sur le spectromètre de masse avec des gradients de 1 ou 2 heures suivant la concentration de l'échantillon.

2) Résultats

a) Génération de mutants de CdtB

Afin d'étudier l'activité nucléase mais également l'activité phosphatase de CdtB, plusieurs mutants ont été réalisés (Figure 21).

Dans le cadre de notre projet, nous avons décidé de muter le résidu catalytiques H153A (essentiel pour l'activité nucléase de CdtB) et les résidus importants dans la liaison de CdtB avec l'ADN (R112A, R137A et/ou N193A). Le mutant catalytique D263R n'a pas été réalisé pour EcCdtB, mais nous a été fourni par le Dr T. Frisan, pour la toxine HdCdtB. Enfin, le mutant R143A, résidu que nous suspectons impliqué dans l'activité phosphatase de CdtB, a également été muté dans notre étude. En effet, ce résidu est la seconde arginine d'un motif RX_5R, proche du motif CX_5R souvent retrouvé dans les phosphatases (Moorhead *et al.*, 2009). La première arginine (R137) étant potentiellement impliquée dans l'activité nucléase et dans l'activité phosphatase, un découplage des deux activités catalytiques ne serait donc pas possible avec une telle mutation. En revanche, le deuxième résidu arginine (R143) n'a pas été montré comme impliqué dans la liaison de l'ADN. Nous supposons donc que sa mutation pourrait permettre de découpler les activités phosphatase et DNase. Toutes les constructions permettant l'expression des différentes formes de EcCdtB (wt ou mutantes) ont été clonées dans les vecteurs pRSET-A, pet16b et pGEX (permettant respectivement d'étiqueter les protéines avec 6His, 10His ou la GST, en N-terminal), et ont été confirmées par séquençage.

En résumé, les différentes constructions de EcCdtB générées sont :

- EcCdtB sauvage (wt)
- EcCdtB R112A
- EcCdtB R137A
- EcCdtB R143A
- EcCdtB H153A
- EcCdtB N193A
- EcCdtB R112A R137A N193A (triple mutant de liaison à l'ADN)

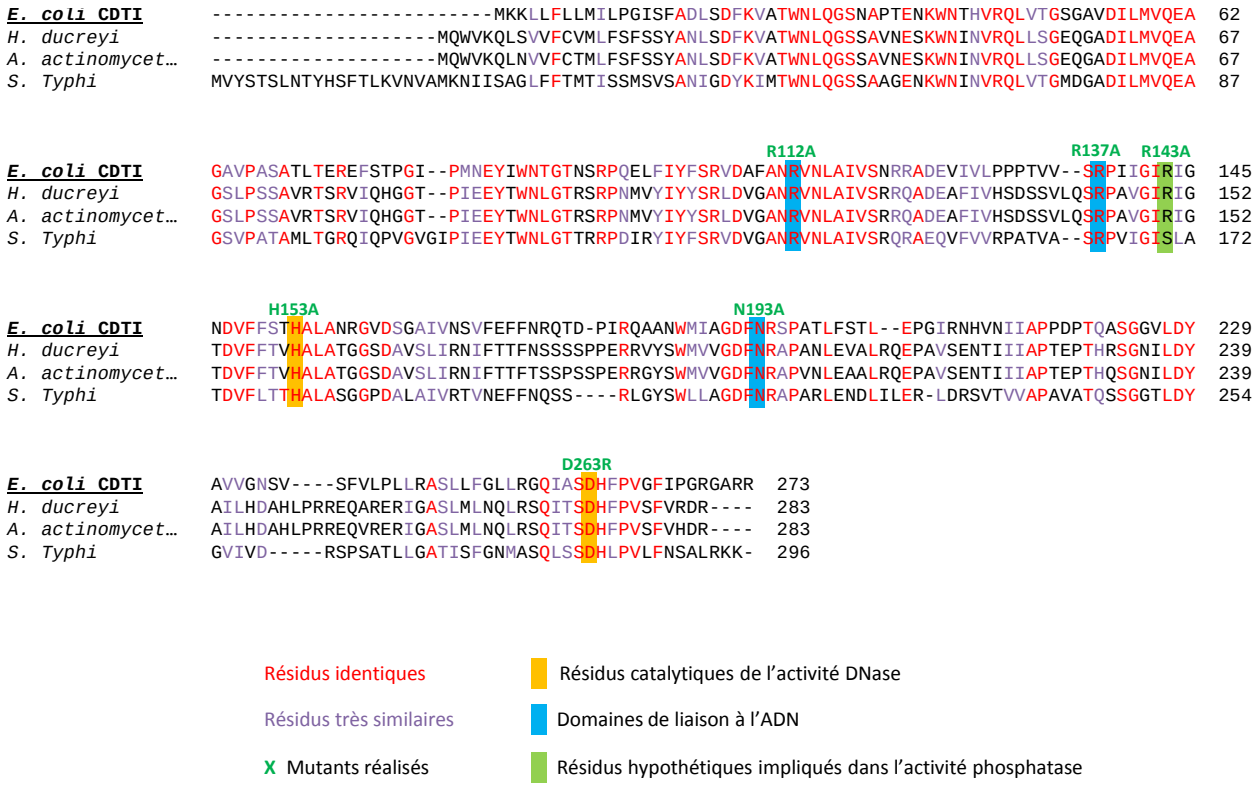


Figure 21 : Alignement de CdtB et carte des résidus mutés dans notre étude

Alignement des protéines CdtB exprimées par *E. coli*, *H. ducreyi*, *A. actinomycetemcomitans* et *S.* Typhi par PSI-Blast. Les résidus mutés dans notre étude sont annotés en vert.

L'intérêt de cloner les gènes EcCdtB dans différents plasmides est multiple. Tout d'abord, suivant le plasmide et la construction générée, la production de la toxine ne sera pas la même. De plus, les différentes étiquettes en N-terminal apportent deux avantages pour : s'affranchir d'un potentiel biais du tag lors des tests nucléases et s'affranchir de faux positifs induits par les tags histidines lors des tests d'activité phosphatase. Quelle que soit la construction utilisée, une séquence de clivage de l'étiquette est présente entre la protéine CdtB et le peptide étiquette. Ainsi, un site de clivage par l'endonucléase A est présent entre EcCdtB et le tag 6His, un site de clivage par le Facteur XA est

présent entre EcCdtB et le tag 10His et un site de clivage par l'enzyme PreScission est présent entre EcCdtB et la GST. La possibilité de cliver ces différentes étiquettes nous permettra donc de travailler potentiellement avec une protéine unique après élution, non étiquetée, sous une forme proche de sa forme physiologique.

b) Expression de EcCdtB en BL21

Afin d'étudier l'activité nucléase de CdtB, la première étape est de la faire produire. Les constructions plasmidiques (pRSET-A, pet16b ou pGEX) sont donc transformées dans des bactéries BL21(DE3), qui sont des souches non pathogènes utilisées couramment en laboratoire pour la production en grande quantité de protéines. Après transformation, plusieurs clones (au moins trois) sont testés pour leur capacité à produire CdtB, et le meilleur clone (en termes de production/dégradation selon les conditions testées) est retenu.

Obtenir une protéine bien repliée (avec une structure correcte) est primordial lorsqu'on souhaite réaliser des tests d'activité catalytique. Notre objectif premier a donc été de purifier CdtB dans les conditions les moins stringentes et dénaturantes possibles. Pour cela, plusieurs mises au point ont été nécessaires. Il est primordial que la protéine soit soluble dans les bactéries BL21(DE3). En effet, une protéine soluble est le signe d'une protéine correctement repliée, alors qu'une protéine mal structurée sera localisée dans les corps d'inclusion. De plus, seule une protéine soluble pourra être purifiée en condition native. Pour obtenir une protéine correctement repliée, il est important de ne pas trop "forcer" la production de CdtB dans les bactéries. En effet, plus la production est forcée et importante, moins les protéines ont le temps de bien se conformer. Différents paramètres lors de la production de CdtB peuvent donc être modulés : la concentration d'IPTG utilisée pour l'induction, la température, et les temps durant lesquels sont incubées les bactéries en présence d'IPTG. Lors de cette étude nous avons testé différentes conditions pour chacun de ces paramètres (Tableau 4).

Température et Temps d'induction	3h - 37°C	5h – 25°C	Over Night – 16°C
Concentration en IPTG	0.4 mM	0.1 mM	0.04 mM

Tableau 4 : Conditions d'induction testées pour la production de EcCdtB dans les BL21(DE3)

Concernant les températures et le temps d'induction, il est reconnu que l'induction à 16°C sur la nuit est moins brutale pour les protéines induites. Des expériences réalisées au laboratoire sur des bactéries transformées avec les constructions pet16b-CdtB et pGEX-CdtB montrent bien, dans des conditions de culture 3h-37°C ou 5h-25°C, une augmentation du taux de protéine CdtB produite. Cependant, leur solubilité est fortement réduite, comparée à une culture sur la nuit à 16°C. En revanche les protéines CdtB-6His produites à partir de bactéries transformées avec le plasmide pRSET-A-CdtB présentent peu de changement entre les conditions de culture, que ce soit au niveau du taux de production de CdtB ou de sa solubilité. Afin de rester homogène dans nos conditions d'induction, nous avons décidé de produire la toxine CdtB, à 16°C sur la nuit, quelle que soit la construction utilisée. Concernant la quantité d'IPTG utilisée, différentes doses ont également été testées (Tableau 4 et Figure 22).

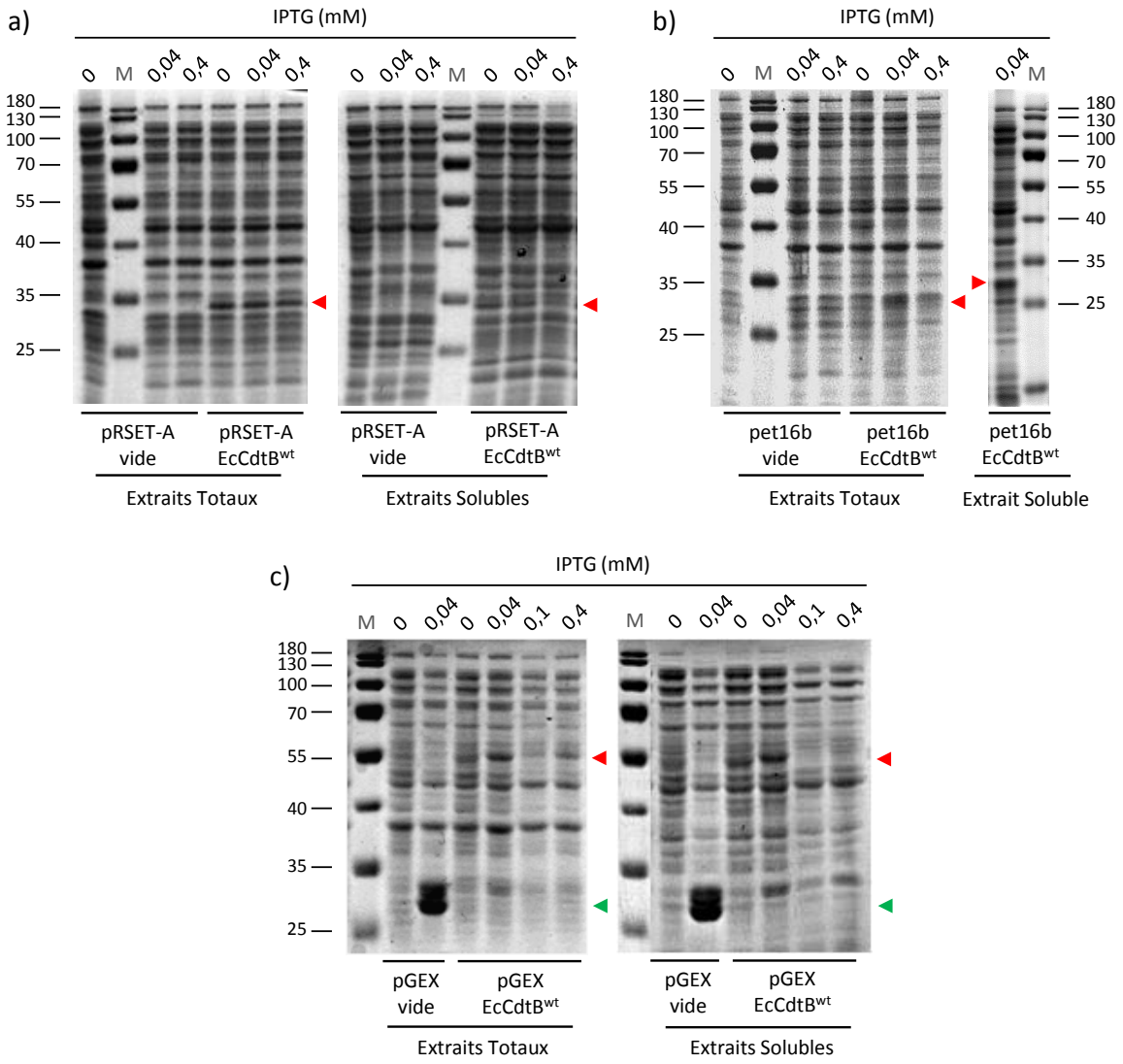


Figure 22 : Etude de l'induction et de la solubilisation de EcCdtB

Figure 22 : Etude de l'induction et de la solubilisation de EcCdtB.
Protéines produites par les bactéries BL21(DE3) transformées avec les plasmides vides, servant de contrôles négatifs (pRSET-A, pet16b et pGEX), ou avec les constructions plasmidiques (a) pRSET-A-EcCdtB, (b) pet16b-EcCdtB, et (c) pGEX-EcCdtB. Les bactéries sont induites sur la nuit, à 16°C sous agitation, en présence ou non de différentes concentrations d'IPTG. Les extraits totaux et solubles sont mis à migrer en gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. Les protéines EcCdtB sont indiquées par des flèches rouges et la protéine GST seule par une flèche verte. M : Marqueur

Les protéines CdtB-6His produites ont une taille d'environ 29kDa (désignées par une flèche rouge dans la figure 22a), et sont uniquement exprimées lorsque la souche bactérienne est transformée avec le plasmide pRSET-A-CdtB et non avec le plasmide pRSET-A seul. Toutefois, le niveau d'expression de EcCdtB-6His est le même que les bactéries soient induites ou non à l'IPTG, témoignant d'une expression constitutive de la protéine. De plus, une faible quantité de EcCdtB-6His est retrouvée dans les extraits solubles, et cette solubilité de la protéine diminue avec des doses croissantes d'IPTG (Figure 22a).

Dans le cas des bactéries transformées avec le plasmide pet16b-CdtB exprimant une protéine EcCdtB-10His de 29kDa, la production de CdtB est beaucoup plus faible qu'avec la construction en pRSET-A (Figure 22b). Cependant, cette production de EcCdtB-10His semble être inductible, avec une meilleure synthèse à faible dose d'IPTG (0,04mM), comparée aux fortes doses. De surcroît, la protéine CdtB est soluble dans ces conditions d'inductions.

Enfin, les bactéries BL21(DE3) transformées avec une construction pGEX-EcCdtB produisent une protéine recombinante EcCdtB-GST d'environ 55kDa (Figure 22c) (flèches rouges). La production de la sous-unité EcCdtB-GST est spécifique et inductible, puisque elle n'est pas retrouvée dans les bactéries transformées avec le plasmide pGEX vide (exprimant la GST seule, désignée par une flèche verte), et retrouvée en faible quantité dans les bactéries non induites possédant le gène EcCdtB. La production optimale de EcCdtB-GST semble être en présence de 0,04mM d'IPTG, et la protéine est soluble dans ces conditions.

Pour résumer, la condition optimale d'induction permettant d'avoir une augmentation de la synthèse de protéine EcCdtB, soluble, est la condition d'induction à 16°C sur la nuit, en présence de 0,04mM d'IPTG. Ce résultat est valable quelle que soit la construction transformée dans les bactéries BL21. Cependant, les bactéries transformées avec la construction pRSET-A-EcCdtB présentent une

production de CdtB indépendante de l'induction à l'IPTG. De plus, en présence d'IPTG, la majorité de la protéine EcCdtB semble être insoluble, suggérant une mauvaise conformation d'une partie de la protéine. Pour ces raisons, nous avons décidé de travailler, pour la suite du projet, avec les protéines EcCdtB-10His et EcCdtB-GST uniquement.

c) Activité catalytique de protéines EcCdtB purifiées en conditions natives

◊ *Purification*

Différents protocoles de purification existent. Les protéines peuvent être séparées les une des autres en fonction de leur solubilité, de leur charge, de leur taille ou de leur capacité de liaison à un substrat. Nous avons choisi d'utiliser cette dernière méthode de purification, dite par affinité, afin de purifier en conditions natives les protéines EcCdtB-10His, ainsi que les protéines EcCdtB-GST.

Suivant l'étiquette de la protéine recombinante, différents protocoles de purification (décris dans la partie Matériels et Méthodes) ont été mis au point. Tout d'abord, la matrice/les billes auxquelles se fixent les protéines étiquetées diffèrent pour un tag 10His (billes de Cobalt) ou pour un tag GST (billes de Glutathione). Il en va de même pour les agents utilisés afin d'éluer la protéine d'intérêt à la fin de la purification. Ainsi, l'Imidazole à forte concentration (500mM) est utilisé pour éluer les protéines étiquetées Histidines alors que la Gluthatione (10mM) est utilisée pour l'élution des protéines couplées à la GST.

Tous les mutants tagués 10His ou GST n'ont pas été purifiés. En effet, pour les premiers essais de ce projet, nous nous sommes focalisés sur la purification des EcCdtB wt et H153A (10His et GST). Nous avons également réalisé la purification des protéines EcCdtB R143A et Triple mutant (R112A R137A N193A) afin de compléter nos donner d'activité catalytiques présentées ci-après.

Après purification, les protéines sont dialysées dans un tampon Tris (voir Matériels et Méthodes) contenant du glycérol (bénéfique pour leur stabilité), puis mises à migrer sur un gel SDS-PAGE et révélées par coloration au Bleu de Coomassie.

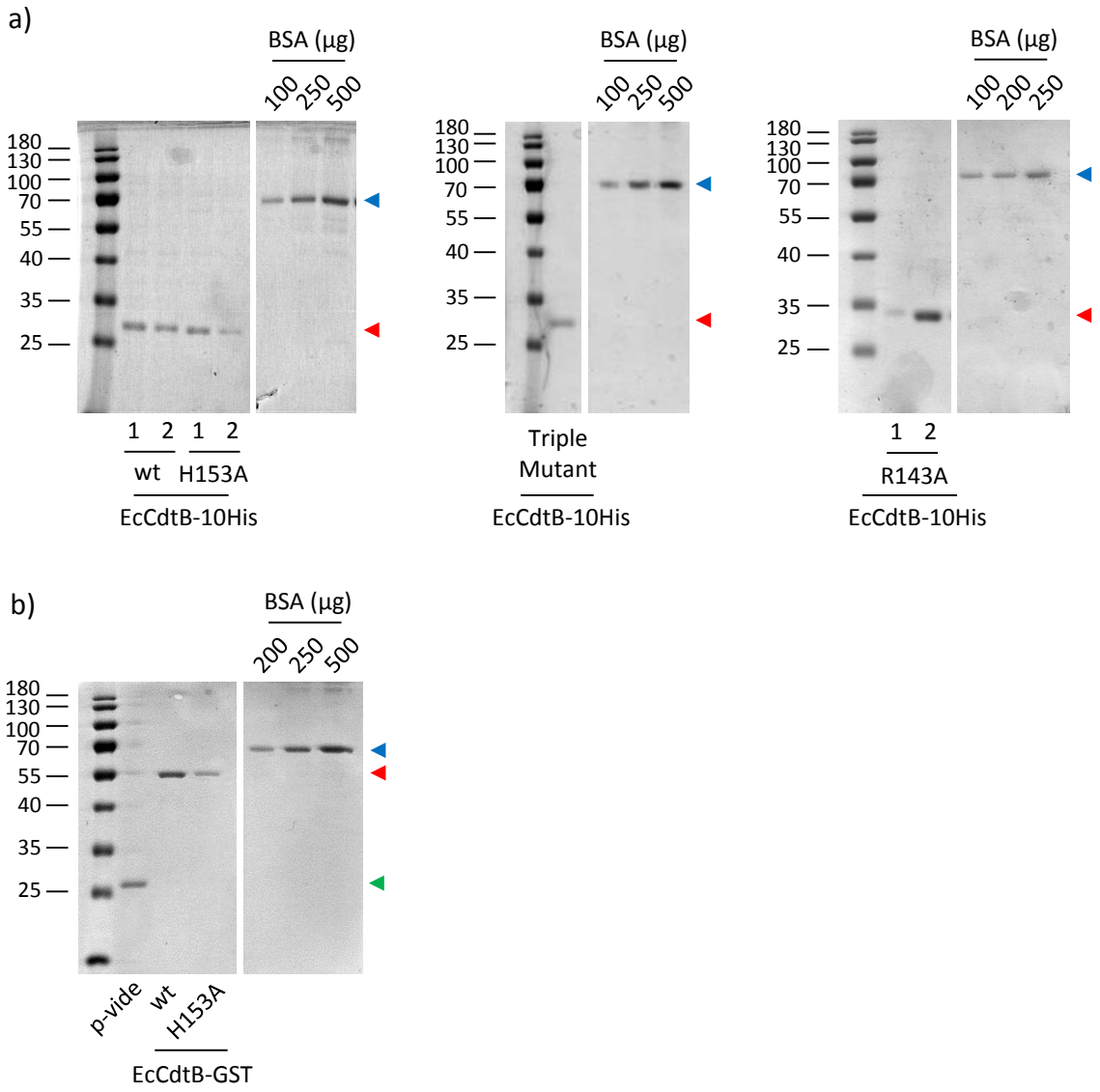


Figure 23 : Protéines EcCdtB taguées 6His et GST purifiées en conditions natives

a) Protéines EcCdtB-10His wt, H153A, Triple mutant (R112A R137A N193A) et R143A, purifiées en conditions natives à partir des extraits solubles de bactéries BL21(DE3). Les pistes annotées 1 et 2 représentent les élutions n°1 et n°2 réalisées à la fin de la purification. b) Protéines EcCdtB-GST wt et H153A purifiées en conditions natives. La piste p-vide représente les protéines GST purifiées à partir de bactéries BL21(DE3) transformées avec le plasmide pGEX seul. Les flèches rouges désignent les protéines CdtB, les flèches bleues la BSA, et la flèche verte la GST seule. Quel que soit le gel, 5µl de protéines purifiées sont déposés dans chaque puits.

Quelle que soit la construction utilisée, la protéine CdtB obtenue est relativement pure (dans la limite de détection du Bleu de Coomassie, de l'ordre de la dizaine de ng) (Figure 23). Toutefois, le rendement d'une purification à l'autre n'est pas le même. Le rendement dépend de la quantité de protéine induite et soluble, mais il existe également une variabilité inter-expérience importante. Pour

réaliser les tests catalytiques *in vitro*, il est important d'avoir une protéine purifiée à, au moins, 10ng /µl. Sachant que 5µl de chaque purification ont été déposés sur gel SDS-PAGE, et que la quantité de protéine présente dans ces 5µl peut être estimée grâce à la gamme BSA, les concentrations suivantes sont obtenues :

- Purification EcCdtB-10His wt : environ 35 ng/µl (élution 1) et 20ng/µl (élution 2)
- Purification EcCdtB-10His H153A : environ 30 ng/µl (élution 1) et 10 ng/µl (élution 2)
- Purifcation EcCdtB-10His Triple mutant : environ 25 ng/µl
- Purification EcCdtB-10His R143A : environ 10ng/µl (élution 1) et 150 ng/µl (élution 2)

- Purification EcCdtB-GST wt : environ 50 ng/µl
- Purification EcCdtB-GST H153A : environ 40 ng/µl

Peu de contaminants sont visibles, ou du moins présents en de très faible quantités comparé aux protéines EcCdtB (désignées par les flèches rouges). En effet, si les protéines CdtB sont bien identifiables, nous pouvons également deviner la présence de quelques contaminants, notamment aux alentours de 70kDa (probablement une chaperonne bactérienne) et 45kDa (Figure 23a). Il est donc possible, même probable, que les extraits protéiques obtenus après purification contiennent majoritairement de la EcCdtB mais également de petites quantités d'autres protéines bactériennes. Quel que soit le niveau d'optimisation réalisé, il est rare qu'une protéine pure soit obtenue en une seule étape de purification. Toutefois, nous avons estimé la qualité des protéines EcCdtB purifiées suffisante pour pouvoir réaliser des premiers tests *in vitro*.

◊ *Tests de l'activité nucléase*

Afin de tester l'activité nucléase des EcCdtB purifiées, nous avons réalisé un test classique de digestion d'un plasmide super-enroulé (décris dans l'introduction de cette partie III) (Figure 24).

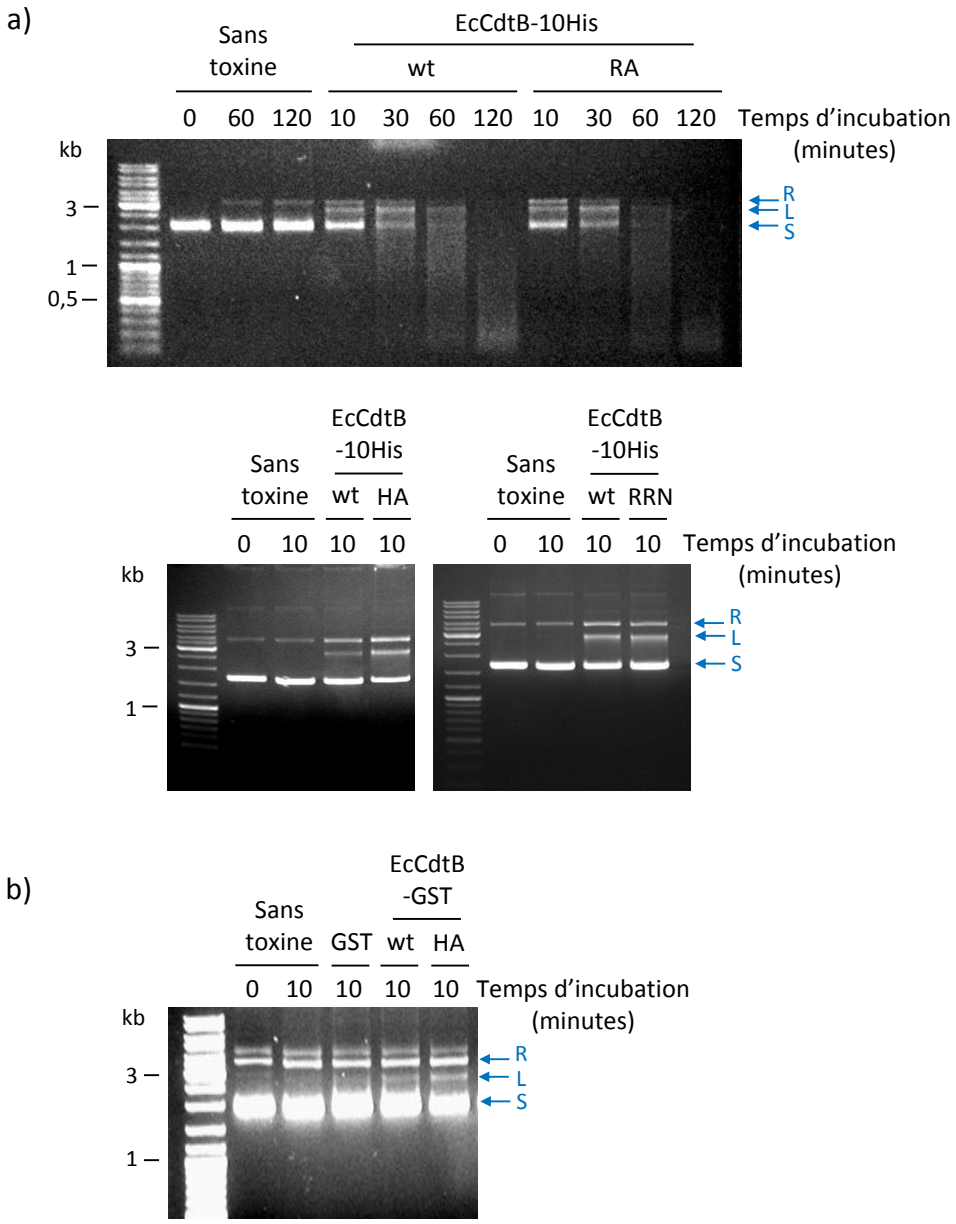


Figure 24 : Test de l'activité nucléase des protéines EcCdtB purifiées en conditions natives

a) Test de l'activité nucléase des protéines EcCdtB wt, R143A (RA), H153A (HA) et Triple mutant R112A R137A N193A (RRN). b) Etude de la capacité des protéines EcCdtB-GST (wt et H153A) à digérer un plasmide super-enroulé. Le plasmide (pRSET-A, 500ng) est incubé en présence de 250ng de protéines purifiées et dialysées. Après migration du gel d'agarose, trois fragments ADN peuvent être observés : une forme super-enroulé (S), une forme relâchée (R) et une forme linéaire (L).

Concernant l'activité des protéines EcCdtB-10His wt (Figure 24a), une forme linéaire du plasmide est observée dès 10 minutes d'incubation. Cette forme linéaire, clivée, n'est pas due à la

température ou à un composé du tampon, puisqu'un plasmide incubé pendant 10 min ou 3 h dans ces conditions, en absence de toxine, ne présente pas cette forme linéaire. Nous pouvons donc en conclure que, dans ces conditions *in vitro*, EcCdtB possède une activité nucléase capable de cliver un plasmide super-enroulé en 10 min. Ensuite, plus l'incubation de l'ADN avec la protéine EcCdtB est longue, plus l'ADN est clivé, jusqu'à être totalement digéré après 2 h d'incubation, supposant une persistance de l'activité de EcCdtB pendant ce laps de temps. Ces données démontrent la présence d'une nucléase active dans les extraits purifiés en conditions natives. Il est difficile d'estimer si l'apparition de la forme relâchée est observée avant celle de la forme linéaire. Nous ne pouvons donc conclure quant à l'induction de CDBs directes ou indirectes par EcCdtB avec ces expériences. De façon surprenante, la même activité (avec la même cinétique de digestion du plasmide) est observée lors d'une incubation avec la protéine EcCdtB-10His H153A. La perte de fonction associée à la mutation de ce résidu est décrite dans plusieurs publications, que ce soit dans des tests *ex vivo*, ou *in vitro* (Cherilyn a. Elwell and Dreyfus, 2000; Lara-Tejero and Galàn, 2000). De plus, une activité similaire est observée pour les EcCdtB-10His triple mutant et R143A. Autant l'activité du mutant R143A était inconnue, autant nous nous attendions à observer une perte, voire une diminution de l'activité, lorsque le résidu H153 (du site catalytique) ou les trois résidus de liaison de l'ADN (R112 R137 N193, Triple mutant) sont mutés. Ces données montrent donc la présence d'une activité, potentiellement due à la présence d'une protéine contaminante (ayant une activité nucléase), ou bien la présence d'une activité nucléase de ces formes mutées de EcCdtB, du moins dans ces conditions *in vitro*. Afin de déterminer si le tampon utilisé dans le test *in vitro*, pouvait influencer l'activité des EcCdtB (wt et mutantes), différents tampons ont été testés. Toutefois, quel que soit le tampon, aucune différence d'activité entre les deux protéines purifiées n'a été observée.

Concernant l'activité des protéines EcCdtB-GST (wt et H153A) purifiées en conditions natives, une digestion du plasmide est observée dans les deux cas, après une incubation de 10 minutes. De plus, nous n'observons pas d'apparition de forme plasmidique linéaire lors d'une incubation de 10 minutes en présence de protéine GST seule. Ces résultats suggèrent que les tags 10His et GST ne sont pas responsables de l'activité contaminante observée.

Afin de mieux caractériser l'activité de ces fractions purifiées, nous avons étudié la capacité de doses décroissantes en EcCdtB à cliver un plasmide super-enroulé en 10 min d'incubation à 37°C et comparé ces activités à celle de la DNase I (Figure 25).

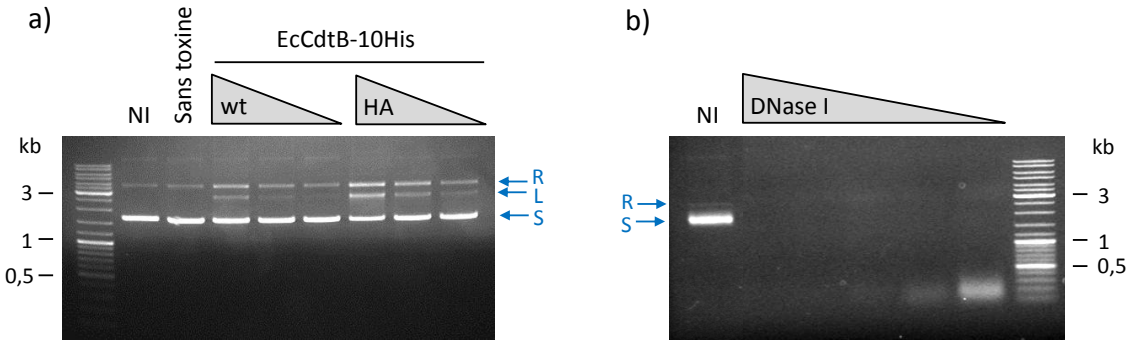


Figure 25 : Dose-réponse des activités nucléases de EcCdtB et de la DNase I

Etude de la digestion d'un plasmide pRSET-A super-enroulé (250ng), suite à une incubation (10 min) en présence de concentrations décroissantes de a) EcCdtB-10His wt ou H153A (250ng, 125ng ou 62,5ng), ou en présence de b) DNase I

La quantité de plasmide linéaire formé en présence de EcCdtB diminue en fonction des doses décroissantes (Figure 25a). Dans la figure 24, il était possible que l'activité inattendue des EcCdtB mutantes soit due à une activité non spécifique, à cause d'une trop importante quantité de protéine en contact avec l'ADN. Par exemple, dans le cas du Triple mutant de liaison, lors du test *in vitro*, si la concentration en toxine ou en plasmide est trop importante, le contact entre la nucléase et l'ADN se fera indépendamment de ces résidus (intéractions fortuites dues aux grandes concentrations). Toutefois, dans le cas du mutant H153A, aucune diminution importante de l'activité (comparé à l'activité de la forme sauvage) n'est observée en présence de quantités décroissantes de protéine EcCdtB.

Enfin, la DNase I est capable de digérer entièrement un plasmide en 10 minutes même à des concentrations faibles correspondant à 1/64e de son Unité (une Unité correspond à la quantité d'enzyme capable de digérer 1µg de plasmide super-enroulé en 10 min à 37°C). En comparaison, l'activité des différentes EcCdtB est minime. Ce résultat est en accord avec les données déjà montrées dans la littérature (Elwell *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002).

Dans la suite du projet, notre objectif a été de comprendre la provenance de cette nucléase « contaminante ». Pour cela, nous nous sommes focalisés sur la purification des protéines EcCdtB taguées 10His, en travaillant uniquement avec deux constructions : wt et H153A

◊ *Analyse par Spectrométrie de Masse des protéines EcCdtB purifiées*

Afin de déterminer la pureté des protéines purifiées et de potentiellement caractériser le contaminant responsable de l'activité nucléase observée *in vitro*, nous avons analysé les purifications par Spectrométrie de Masse. En plus de EcCdtB, de très nombreuses protéines contaminantes ont été retrouvées, parmi lesquelles se trouvent une DNA gyrase (GYRB de *E. coli*) ainsi que des ribonucléases (RNPH et RNH2 de *E. coli*). Une optimisation du protocole de purification est donc nécessaire afin d'enlever au moins une partie de ces contaminants.

d) Activité de protéines EcCdtB purifiées en conditions stringentes, voire dénaturantes

Afin d'éliminer un potentiel contaminant purifié avec la protéine EcCdtB, nous avons réalisé des purifications dans des conditions plus ou moins stringentes, et en présence ou non d'agents dénaturants.

◊ *Purification de EcCdtB wt et H153A*

Dans une première purification, nous avons décidé d'ajouter une étape de lavage, avec un tampon de lavage T80 complémenté avec 5mM d'ATP et 15mM de MgCl2 (Figure 26a), l'ATP et le MgCl2 permettant de décrocher certaines chaperonnes pouvant être liées à la protéine purifiée.

Dans un second temps, une purification en conditions partiellement dénaturantes a été réalisée. La dénaturation des protéines est réalisée grâce à l'ajout de 2M Urée dans les tampons de binding, de lavage et d'élution. La dénaturation des protéines permet de défaire les interactions non-spécifiques entre protéines et donc, potentiellement, de se libérer de certains contaminants. Le tag 10His ne nécessitant pas une conformation spéciale pour se lier aux billes Talon lors de la purification, l'efficacité de la purification de la protéine EcCdtB-10His ne devrait donc pas être diminuée en présence d'Urée. A la fin de la purification, lors de la dialyse, des bains successifs dans des tampons de moins en moins concentrés en Urée sont nécessaire afin que la protéine puisse se replier. Toutefois, il est possible qu'une partie de la protéine se replie mal lors de cette étape, et donc qu'une partie de l'activité soit perdue.

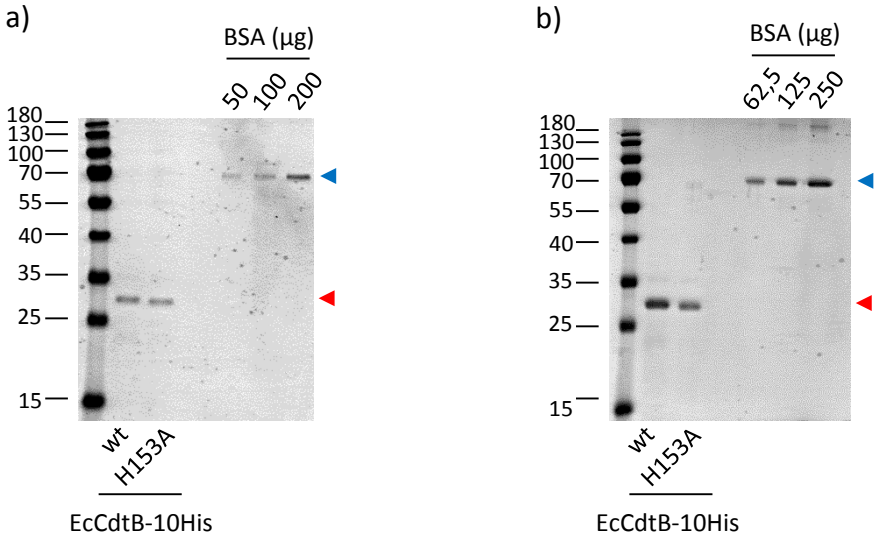


Figure 26 : Purification de EcCdtB wt et H153A en conditions stringentes et dénaturantes

a) Protéines EcCdtB-10His wt et H153A purifiées en conditions natives avec une étape de lavage ATP/MgCl2 supplémentaire. b) Protéines EcCdtB wt et H153A purifiées en conditions dénaturantes en présence de 2M Urée. Les flèches rouges désignent la protéine EcCdtB, les flèches bleues la BSA.

L'ajout d'une étape de lavage ATP/MgCl2 ou de 2M Urée n'empêche pas la purification des protéines EcCdtB taguées 10His. Peu de bandes contaminantes sont visibles après coloration au bleu de Coomassie. En se basant sur la gamme BSA déposée, nous pouvons estimer les concentrations suivantes :

- Purification EcCdtB-10His wt (Lavage ATP/MgCl2) : environ 30 ng/µl
- Purification EcCdtB-10His H153A (Lavage ATP/MgCl2) : environ 30 ng/µl
- Purification EcCdtB-10His wt (2M Urée) : environ 60 ng/µl
- Purifcation EcCdtB-10His H153A (2M Urée) : environ 20 ng/µl

Afin de déterminer si l'ajout de ces étapes a permis d'enlever un potentiel contaminant, les tests d'activité nucléase de ces purifications ont été réalisés.

◊ *Etude de l'activité nucléase de EcCdtB wt et EcCdtB H153A*

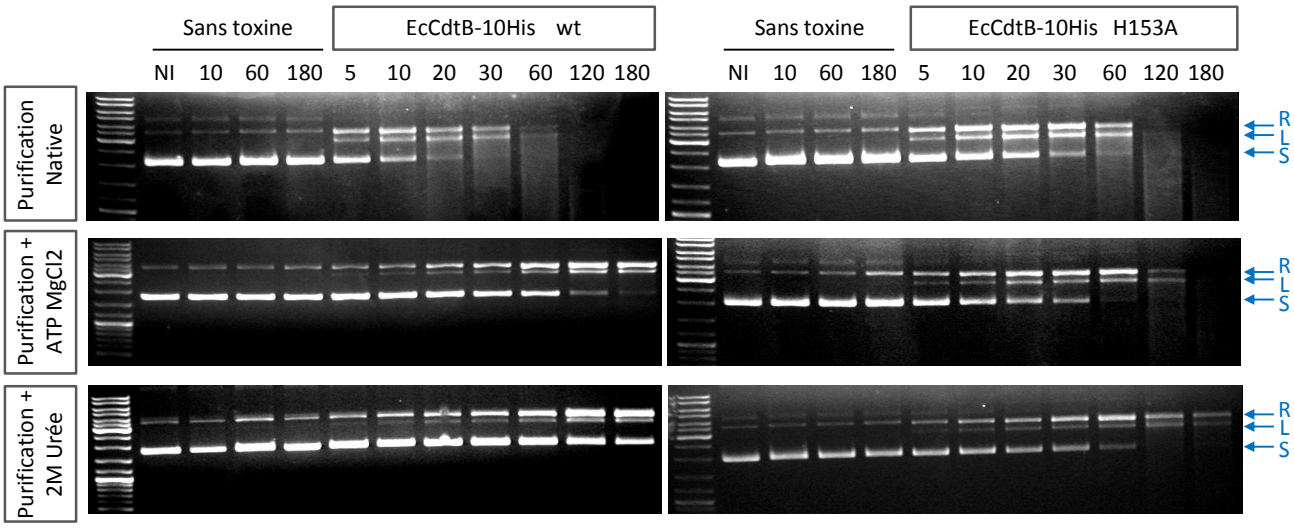


Figure 27 : Comparaison des activités nucléases des protéines EcCdtB wt et H153A purifiées dans différentes conditions

250ng d'ADN plasmidique pRSET-A a été incubé pendant différents temps en présence de 62,5ng de protéine purifiée dans des conditions natives, avec un lavage ATP/MgCl2 ou en conditions dénaturantes (2M Urée).

En accord avec les données démontré dans la figure 24, les protéines EcCdtB wt et H153A purifiées dans des conditions natives sont capables de cliver un plasmide super-enroulé et de le digérer totalement en 2 h. En comparaison, les protéines purifiées avec un lavage supplémentaire ATP/MgCl2 présentent une activité réduite (Figure 27). Cependant, de façon intéressante, une augmentation de la forme relâchée est observée en même temps que l'apparition de la forme linéaire, suggérant une induction de CSBs qui n'était pas observée avant. Lors d'une purification en présence de 2M Urée, le même type de réponse est obtenu, mais avec une activité encore plus réduite. En effet, les protéines purifiées en conditions dénaturantes n'arrivent pas à cliver la totalité de l'ADN super-enroulé en 3 h d'incubation, contrairement aux protéines purifiées en conditions natives ou avec un lavage ATP/MgCl2. Ces résultats démontrent qu'une augmentation de la stringence et de la dénaturation des protéines induit une diminution de l'activité de la protéine purifiée *in vitro*, comme attendu. Cependant, quel que soit le protocole de purification utilisé, la protéine EcCdtB-10His H153A présente la même activité que la protéine sauvage (conditions native), voire une activité plus importante (conditions ATP/MgCl2 et dénaturantes). L'augmentation de la stringence et la dénaturation des protéines n'a donc pas résolu le problème d'activité catalytique du mutant.

III. Conclusions et Perspectives

1) Conclusions

Au cours de ce projet, la sous-unité EcCdtB a été purifiée dans différentes conditions plus ou moins stringentes et plus ou moins dénaturantes. L'activité nucléase des protéines purifiées a ensuite été testée par digestion d'un plasmide super-enroulé, test classiquement utilisé dans la littérature. Toutes les protéines EcCdtB présentent une activité nucléase, quelle que soit la forme de EcCdtB (sauvage ou mutée) et quelle que soit l'étiquette (10His ou GST), ou le protocole de purification utilisé. Il est toutefois important de noter que l'augmentation de la stringence des conditions de purifications, par l'ajout d'une étape de lavage ATP/MgCl2 ou par l'ajout d'Urée, conduit à une diminution de l'activité de la protéine purifiée. Le mutant H153A a déjà été caractérisé dans la littérature, avec ce même type de test *in vitro*, comme étant catalytiquement inactif comparé à une CdtB sauvage (Cherilyn a. Elwell and Dreyfus, 2000; Shenker *et al.*, 2007). Toutefois, toutes ces études ont utilisés des protocoles extrêmement dénaturants afin de purifier leurs sous-unités CdtB, ce qui pourrait avoir un impact sur la bonne conformation et la bonne fonctionnalité de la protéine, même après repliement. Deux hypothèses peuvent alors être suggérées pour expliquer nos résultats.

La première, est qu'un contaminant, possédant une activité nucléase, est peut être co-purifié avec CdtB. La limite de détection des gels SDS-PAGE colorés au bleu de Coomassie étant d'environ 10ng, il est donc possible que des contaminants en très faible quantité -comparé à CdtB- soient présents mais indétectables. Afin de répondre à cette question, une étude réalisée en collaboration avec Mélissa Hanique (stagiaire M2bProfessionnel Expression Génique et protéines recombinantes) et l'équipe du Dr T. Frisan (Karolinska Institutet, Stockholm, Suède) a été réalisée. Au cours de cette étude, la sous-unité HdCdtB-6His (forme wt ou mutée sur le résidu D276), dont la construction a été fournie par le Dr T. Frisan, a été purifiée dans les conditions utilisées dans leur laboratoire (protocoles décris dans le Matériels et Méthodes). Dans leurs conditions d'induction (3h à 37°C), la protéine HdCdtB est insoluble et est présente dans les corps d'inclusion. Une étape d'extraction de la protéine HdCdtB des corps d'inclusion a donc été réalisée (protocole dénaturant mais permettant de s'affranchir de nombreux contaminants bactériens), avant de purifier HdCdtB-6His par affinité. Pour augmenter la pureté de l'éluat, nous avons ajouté une étape de purification par chromatographie d'exclusion de taille (étape réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr L. Mourey, IPBS, Toulouse). La solution protéique obtenue a ensuite été analysée par Spectrométrie de Masse. Seule la protéine HdCdtB a été

détectée dans ces fractions, démontrant la pureté de la protéine (dans la limite de détection des techniques utilisées). L'activité de cette protéine a été testée *in vitro* (dans les mêmes conditions que celles utilisées dans nos travaux), et une activité catalytique identique a été obtenue pour la forme wt et la forme mutée (D273R, connue pour être inactive dans des cellules de mammifères). Ces résultats suggèrent une activité des deux protéines purifiées, indépendamment de la présence d'un contaminant. Toutefois, sachant que la DNase I est cent fois plus active que la toxine CdtB (Elwell *et al.*, 2001), nous ne pouvons totalement exclure la présence d'un contaminant (dont l'activité nucléase serait comparable à celle de la DNase I) qui serait présent en très faible quantité (quantité en dessous du seuil de détection de la Spectrométrie de masse).

La deuxième hypothèse serait que les protéines soient pures, mais que les deux formes (wt et H153A) de CdtB aient une activité DNase *in vitro*, dans nos conditions. Cependant, des tests préliminaires réalisés au laboratoire montrent que l'expression en cellules eucaryotes de la forme EcCdtBwt induit un fort taux de dommages à l'ADN alors que l'expression de EcCdtB H153A n'en induit pas. Ces données laissent supposer que le problème rencontré dans notre projet pourrait être imputé à un test *in vitro* trop simple et pas assez compétitif pour discriminer les activités des deux formes (wt et mutante) de la toxine, plus qu'à une mauvaise purification. En effet, peut être que dans un test *in vitro* avec un ADN plus complexe (en présence d'histones, de modifications post-réplicatives, d'hétérochromatine, de cofacteurs cellulaires, etc.), une perte d'activité du mutant H153A comparé à la EcCdtB wt pourrait être observée.

2) Perspectives

a) Etude de l'activité in vitro dans un contexte chromatinien plus complexe

Afin de déterminer si la perte d'activité des mutants EcCdtB-H153A et HdCdtB-D273R observée en cellules eucaryotes, est due à un défaut de prise en charge d'un ADN complexe, il serait intéressant d'étudier la capacité de ces mutants à cliver différents types d'ADN : plasmide super-enroulé (méthylé ou non), chromatine reconstituée / purifiée, ou encore sur une chromatine dans un contexte nucléaire direct (Lusser and Kadonaga, 2004; Nelson *et al.*, 2006).

De plus, l'activité de la DNase I est abolie en absence d'ions Mg^{2+} et Ca^{2+}, et fortement réduite

en présence de Mg^{2+} seul. Compte tenu de l'homologie structurale de CdtB avec la DNase I, il serait donc intéressant d'étudier l'activité de CdtB en présence ou en absence de ces deux ions essentiels. Il serait également informatif d'étudier l'activité de CdtB sur des ADNs plus ou moins flexibles, par exemple en fonction de leur teneur en bases G-C et A-T (la DNase I étant caractérisée pour être dépendante d'un certain type de séquence (même si son action n'est pas strictement séquence spécifique) (Lahm and Suck, 1991; Weston *et al.*, 1992; Heddi *et al.*, 2010)).

b) Etude de l'activité phosphatase de CdtB

Afin de compléter ce projet, il serait intéressant d'étudier l'activité phosphatase *in vitro* des protéines EcCdtB wt et mutées. Cette partie pourra être réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr B. Payrastre (I2MC, Toulouse). Les tests phosphatases nécessitent l'utilisation d'une protéine non taguée Histidine. En effet, les résidus histidines peuvent fausser le test et induire des faux positifs, nécessitant de travailler avec la toxine taguée GST ou de cliver l'étiquette 10-His. Entre le tag 10-His et la protéine CdtB se trouve un site de clivage au facteur XA. Des expériences préliminaires de clivage de l'étiquette ont été réalisées au cours de ma thèse, mais aucune dissociation n'a pu être obtenue. Il en va de même pour les expériences de clivage de l'étiquette GST. Il est vrai que la GST, n'est pas sensé induire de faux positifs lors du test de Malachite Green Phosphate. Cependant, ce peptide fait environ 25 kDa, ce qui équivaut à la taille de EcCdtB. Afin d'éviter un potentiel encombrement de CdtB par la GST, il serait donc préférable de cliver également ce tag. Une mise au point est donc encore nécessaire avant de pouvoir travailler avec une protéine CdtB non taguée.

Il serait également envisageable d'étudier l'activité phosphatase de CdtB sur cellules de mammifère *via* le dosage du taux de PIP3 dans des cellules lymphocytaires infectées ou non à CDT. L'entrée de CdtB dans les cellules eucaryotes est strictement dépendante de la présence des sous-unités CdtA et CdtC. Une telle étude nécessite donc de reformer une holotoxine CDT. Ces expériences ont été initiées au laboratoire. Toutefois, la purification de la sous-unité HdCdtA à partir des corps d'inclusion aboutit à la production d'une protéine mal formée, agrégée et donc non utilisable. Il est donc nécessaire d'affiner les conditions de purification de HdCdtA ainsi que celles de reconstitution de l'holotoxine. De plus, une fois reconstituée, une étape de purification par filtration sur gel sera certainement utile afin d'obtenir une holotoxine tripartite pure.

c) Etude du transport de EcCdtB dans la cellule eucaryote

Pour finir, il serait intéressant de caractériser le devenir des mutants de CdtB lors de traitements de cellules eucaryotes. L'implication de l'activité PI(3,4,5)P3 phosphatase de CdtB dans son action est, à ce jour, mal définie. La variation des taux des différents Phosphoinositides (PIP) est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, dont la régulation des transports des vésicules intra-cellulaire (Wenk and De Camilli, 2004; Carlton and Cullen, 2005; Bishé *et al.*, 2012). Une hypothèse émise au laboratoire serait que l'activité phosphatase de CdtB permettrait à la toxine d'être relocalisée au noyau et d'emprunter la voie de transport-rétrograde du RE. Il serait donc intéressant d'étudier si les mutations (notamment des sites phosphatases) ne perturbent pas la relocalisation de CdtB, depuis son internalisation à la membrane plasmique jusqu'au noyau.

PARTIE IV

DISCUSSION GENERALE

PARTIE IV : Discussion générale

Pendant longtemps, CDT a été considérée comme induisant des CDBs directes de l'ADN. Grâce à nos travaux, en particulier ceux présentés ici concernant les voies de réparations importantes pour la réponse de l'hôte à CDT, nous avons pu confirmer le modèle selon lequel CDT induit des CSBs qui dégénèrent en CDBs suivant deux modes. A forte dose, l'accumulation de CSBs proches va former des CDBs « directes », indépendantes du passage par la réplication, et donc du statut de prolifération des cellules. A des doses modérées induisant un taux plus faible de dommage, les CSBs vont soit être réparées par SSBR, soit persister, et dégénérer en CDBs suite au passage de la machinerie de réplication. Cet effet de doses modérées peut donc se produire uniquement dans des cellules proliférantes. En tenant compte du fait que CDT est produite par des bactéries Gram-négatives dont la niche se situe au niveau d'épithéliums, la plupart étant des tissus à renouvellement rapide, nous pouvons alors légitimement nous poser la question de l'effet de CDT sur ces tissus.

Cependant, ce modèle soulève également d'autres questions. A l'état physiologique, lors d'une infection, la dose de CDT peut-elle être considérée comme forte ou modérée ? Et selon ces doses, quelles peuvent être les conséquences au niveau cellulaire et tissulaire ?

I. Y a-t-il une dose physiologique de CDT ?

La dose physiologique de CDT est difficile à évaluer. Elle dépend en effet de nombreux facteurs variables : le taux de bactéries infectant ce tissu, l'espèce bactérienne productrice de CDT, le taux de production de la toxine, et l'accessibilité des cellules hôtes à infecter.

1) Quantité de bactéries présentent lors d'une infection

Le taux de bactéries infectant le tissu va varier au cours de l'infection, mais également d'une pathologie à l'autre, et d'un individu à l'autre. Toutefois, quelle que soit la pathologie, l'infection peut être divisée en plusieurs étapes : la période d'incubation (pas de symptômes visibles, implantation et colonisation du tissu par les bactéries), la période symptomatique (apparition des symptômes de la maladie, invasion voir dissémination des bactéries), et la période de rémission (disparition des symptômes, augmentation des défenses de l'hôte, réduction de la population bactérienne) (Figure 29) (Levin and Bull, 2004). On peut supposer que la quantité la plus importante de bactéries est retrouvée

pendant la 2e phase, lors de la manifestation des symptômes. Or, à part lors d'une exposition chronique, la phase symptomatique est assez courte comparée aux phases de latence et de rémission. A supposer que la toxine CDT soit produite constitutivement, les cellules de l'hôte seraient donc en contact avec des fortes doses de toxine de façon ponctuelle.

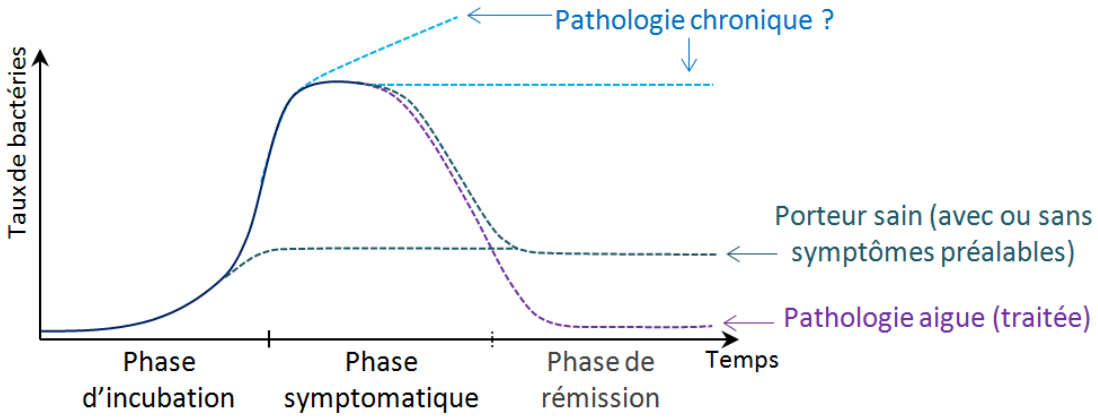


Figure 28 : Variation hypothétique du taux de bactéries au cours d'une infection

2) Production de CDT lors d'une infection

Tous les facteurs de virulence ne sont pas produits en permanence par les bactéries pathogènes. En effet, l'expression de certains gènes de virulence est régulée par « quorum sensing » (Raffa *et al.*, 2005). Le quorum sensing est un mécanisme permettant aux bactéries de capter, d'intégrer, de réagir et de s'adapter à des modifications de son environnement. Il s'agit d'un système de communication inter-bactérie, leur permettant de coordonner leur devenir. Ce mécanisme fonctionne grâce à la sécrétion par les bactéries de protéines de signalisations qui sont reconnues par les bactéries environnantes (appartenant à la même espèce bactérienne ou non, suivant la molécule sécrétée). Quand un seuil de molécule signal dans le milieu est atteint, des protéines contrôlant la transcription de gènes de virulence sont activées (Raffa *et al.*, 2005). Peu de données sont disponibles concernant la régulation de l'expression de CDT mais certaines données suggèrent une régulation partielle par quorum sensing de la transcription de l'opéron CDT chez *Campylobacter jejuni* (Jeon *et al.*, 2005).

Une autre bactérie caractérisée pour réguler sa production de toxine CDT est *S. enterica* serovar Typhi (*S.* Typhi). Chez *S.* Typhi, le gène codant pour la sous-unité CdtB est réprimé tant que la

bactérie n'a pas infecté la cellule eucaryote et qu'elle n'a pas atteint un compartiment spécifique (Haghjoo and Galán, 2004; Haghjoo and Galán, 2007). De plus, des bactéries *S.* Typhi cultivées dans du milieu de culture bactérien classique (LB Broth) ne produisent pas de CdtB (Haghjoo and Galán, 2004). Ainsi, la régulation de la production de CdtB chez S. Typhi ne dépend pas seulement de la quantité de bactéries environnantes, ce qui la différencie du quorum sensing.

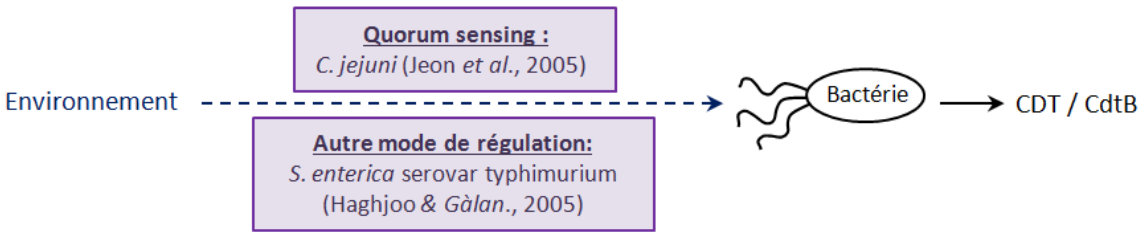


Figure 29 : Régulation de la production de CDT par des signaux environnementaux

Ces données concernant la régulation de la production de CDT sont donc spécifiques à une espèce bactérienne. Des travaux supplémentaires, réalisés sur diverses espèces bactériennes productrices de CDT, sont nécessaires afin d'évaluer le niveau de régulation de la production de CDT, dans les différentes pathologies.

3) Accessibilité des cellules eucaryotes à CDT

Après sa production, CDT va devoir interagir avec la cellule eucaryote. Certaines bactéries pourront sécréter la toxine à proximité des cellules, alors que d'autres la sécréteront dans un mucus plus ou moins épais, dans lequel diffusera la toxine (Johansson *et al.*, 2013). Ce paramètre de proximité entre bactéries / cellules hôtes ajoute une complexité supplémentaire au modèle.

Un dernier paramètre pouvant influencer l'action de CDT, va être sa capacité à interagir et à être internalisée dans les cellules eucaryotes. En effet, même si certaines études commencent à caractériser des récepteurs potentiels auxquels se fixerait CDT, il est également connu qu'il existe une importante variabilité dans la capacité de CDT à infecter différents types cellulaires eucaryotes. Par exemple, pour une même dose, deux types cellulaires différents (mais provenant du même organisme) ne présenteront pas la même sensibilité à CDT (Eshraghi *et al.*, 2010). Inversement, un même type cellulaire ne sera

pas endommagé de la même manière, suite à des traitements avec des doses égales de CDT issues de différentes espèces bactériennes (Eshraghi *et al.*, 2010). Enfin, une variabilité inter-organismes, pour un même type cellulaire, a également été observée (Eshraghi *et al.*, 2010). En s'appuyant sur ces résultats, nous pouvons supposer que des variabilités génétiques inter-individus (patients infectés), peuvent également exister.

Pour conclure, l'ensemble de ces paramètres peut faire varier de façon importante la quantité de toxine CDT pouvant infecter les cellules eucaryotes. Il est donc difficile d'estimer si la dose physiologique de CDT est faible, modérée ou forte. Toutefois ces données peuvent être réconciliées par rapport aux effets induits, sur les cellules hôtes eucaryotes, qui seront différents suivant la dose de CDT.

II. Potentiels impacts de différentes doses de CDT

1) Effets à courts et longs termes

Lors d'une infection, l'équilibre entre mort et survie est en permanence modifié, que ce soit au niveau cellulaire ou de l'individu entier. Dans le cas où une forte concentration de bactéries pathogènes est présente, les cellules eucaryotes peuvent être endommagées de façon importante. Si les tissus de l'hôte sont fortement altérés, les symptômes seront sévères. Pour le patient, la pathologie va, soit être traitée (par des soins externes ou par le système immunitaire), soit mettre en danger sa survie (Levin and Bull, 2004). Toutefois, si la pathologie n'est pas trop agressive, une persistance de celle-ci peut être observée. Dans ce cas, les tissus de l'hôte peuvent être endommagés mais dans une moindre mesure. Par exemple, lors d'une infection par *A. actinomycetemcomitans*, une inflammation et une déstabilisation de la barrière épithéliale sont observées sans que cela ne mette en danger la vie de l'hôte.

Il en va de même pour la concentration de CDT. En effet, deux devenirs cellulaires sont possibles après une infection par un génotoxique : la mort ou la survie cellulaire. Dans la population de cellules survivantes, certaines auront correctement réparé leur génome alors que d'autres risquent d'avoir accumulé des mutations (Guidi *et al.*, 2013). Une forte dose de toxine entraîne une mort abondante des cellules eucaryotes alors qu'une dose modérée en tuera une partie, certaines cellules pouvant survivre et même proliférer. Notamment, dans les études *ex vivo* réalisées dans l'équipe, la

dose induisant les CDBs indépendamment de la réplication tue 95% des cellules en 72h. En revanche, la dose modérée induisant les CDB dépendantes de la réplication tue, dans ce même laps de temps, 50% des cellules eucaryotes (Fedor *et al.*, 2013). Les conséquences (s'il y en a) d'une mort cellulaire abondante seront visibles à court terme. En revanche, dans le cas où les cellules gardent et accumulent des mutations, les cellules qui survivent peuvent également représenter un danger pour l'organisme, à plus long terme. Ainsi, l'instauration d'une mutagénèse et potentiellement d'une tumorigénèse, sera visible bien plus tard, parfois même des années après.

De plus en plus de liens entre bactérie/microbiote et cancers sont documentés dans la littérature (Schwabe and Jobin, 2013). Le cas le plus connu est l'induction de cancers gastriques et duodénaux par l'espèce bactérienne *H. pylori*, *via* son facteur de virulence CagA (Conteduca *et al.*, 2013). CagA promeut la cancérogénèse à plusieurs niveaux en induisant un endommagement des tissus *via* la déstabilisation des jonctions inter-cellulaires, une instabilité génétique suite à la production de ROS, une prolifération incontrôlée *via* la modulation de la voie des MAPK, une inflammation … (Conteduca *et al.*, 2013). Concernant CDT, des données montrant son potentiel carcinogène commencent à émerger depuis quelques années (Ge *et al.*, 2007; Guidi *et al.*, 2013).

2) CDT et cancérogénèse : Quels sont les indices connus ?

Comme décrit par Hanahan et Weinberg, les cancers peuvent être caractérisés par 10 particularités : une prolifération incontrôlée (dérégulation du contrôle du cycle cellulaire), une prolifération indépendante des facteurs environnants, un échappement du système immunitaire, un échappement de la sénescence réplicative, la présence d'une inflammation pro-tumorale, une acquisition des capacités d'invasion et de migration (métastases), l'induction d'une angiogénèse, une instabilité génétique permettant l'accumulation de mutations, l'échappement à la mort cellulaire et une dérégulation des voies métaboliques cellulaires (Figure 31) (Hanahan and Weinberg, 2011). A ce jour, il a été démontré que CDT peut moduler six de ces caractéristiques (voir ci-dessous).

a) Instabilité génétique et prolifération incontrôlée

Comme décrit dans la partie II du manuscrit, un lien de causalité a été établi entre les dommages à l'ADN, la mutagénèse et la cancérogenèse (Hanahan *et al.,* 2011). Les données montrant la génotoxicité de CDT sont nombreuses. Néanmoins, peu de publications détaillent le devenir de ces

dommages et des cellules endommagées. Il est supposé qu'après son endocytose dans la cellule eucaryote, CDT reste active pendant au moins 48h, ce qui rend difficile l'analyse de la cinétique de réparation des dommages qu'elle induit (Fahrer *et al.*, 2014). Toutefois, suite à un traitement avec des doses sub-létales (donc modérées), les cellules présentent des micronoyaux, démontrant une persistance d'une partie des dommages induits par CDT (Guidi *et al.*, 2013). Or, les micronoyaux sont des biomarqueurs du risque de transformation tumorale, dont la détection est reconnue par l'OCDE afin de caractériser des substances clastogènes et aneugènes (Kang *et al.*, 2013; Maffei *et al.*, 2014; OECD/OCDE, 2014). De plus, suite à un traitement long (220 jours) à CDT, ces cellules présentent des caractéristiques de cellules tumorales comme une instabilité génétique (accumulation de mutations et présence de réarrangements chromosomiques) et une prolifération incontrôlée indépendante des signaux d'ancrage et de la régulation par les inhibiteurs du cycle cellulaire (Guidi *et al.*, 2013) (Figure 31).

b) Induction d'une inflammation et d'une immunodépression localisée

Le processus inflammatoire est essentiel pour l'organisme, notamment dans la lutte contre les pathogènes. Toutefois, une inflammation chronique peut être néfaste, et il existe également un lien de causalité entre inflammation et cancer. En effet, de plus en plus de données démontrent l'implication d'un environnement pro-inflammatoire dans l'initiation et la progression tumorale (Grivennikov *et al.*, 2010; Morrison, 2012). La production de toxine CDT par différents pathogènes a été montrée comme inductrice d'une réponse inflammatoire (Figure 31) (Ge *et al.*, 2007; Jain *et al.*, 2008; Pokkunuri *et al.*, 2012). Nous pouvons donc supposer que dans le cas d'une infection de longue durée, une inflammation chronique localisée peut être générée, favorisant la mise en place d'un environnement pro-tumoral.

Les cytokines pro-inflammatoires sont sécrétées par les cellules immunitaires relocalisées au niveau de l'infection. L'importance du système immunitaire dans le contrôle de l'initiation et de la progression tumorale chez l'homme n'est pas encore claire. Toutefois, des données dans un modèle murin immunodéficient démontre une accumulation de tumeurs dans ce modèle, comparé à un modèle immunocompétent (Nikonova, 2013). De plus, la greffe d'une tumeur issue d'une souris immunodéficiente dans une souris immunocompétente ne conduit pas au développement de tumeurs secondaires (contrairement à la greffe d'une tumeur développée dans un modèle immunocompétent). L'échappement au système immunitaire est donc proposé comme une caractéristique des cellules

tumorales. Comme détaillé dans la partie III du manuscrit, les cellules immunitaires sont extrêmement sensibles à CDT et entrent en apoptose dans les heures qui suivent l'infection. Cet effet suggère que CDT induirait une immunodéplétion localisée, pouvant favoriser la persistance de la bactérie dans le tissu, essentielle dans le cas d'une infection chronique. De plus, un impact de cette immunodéplétion sur la persistance de cellules transformées dans l'organisme peut également être supposé (Figure 31).

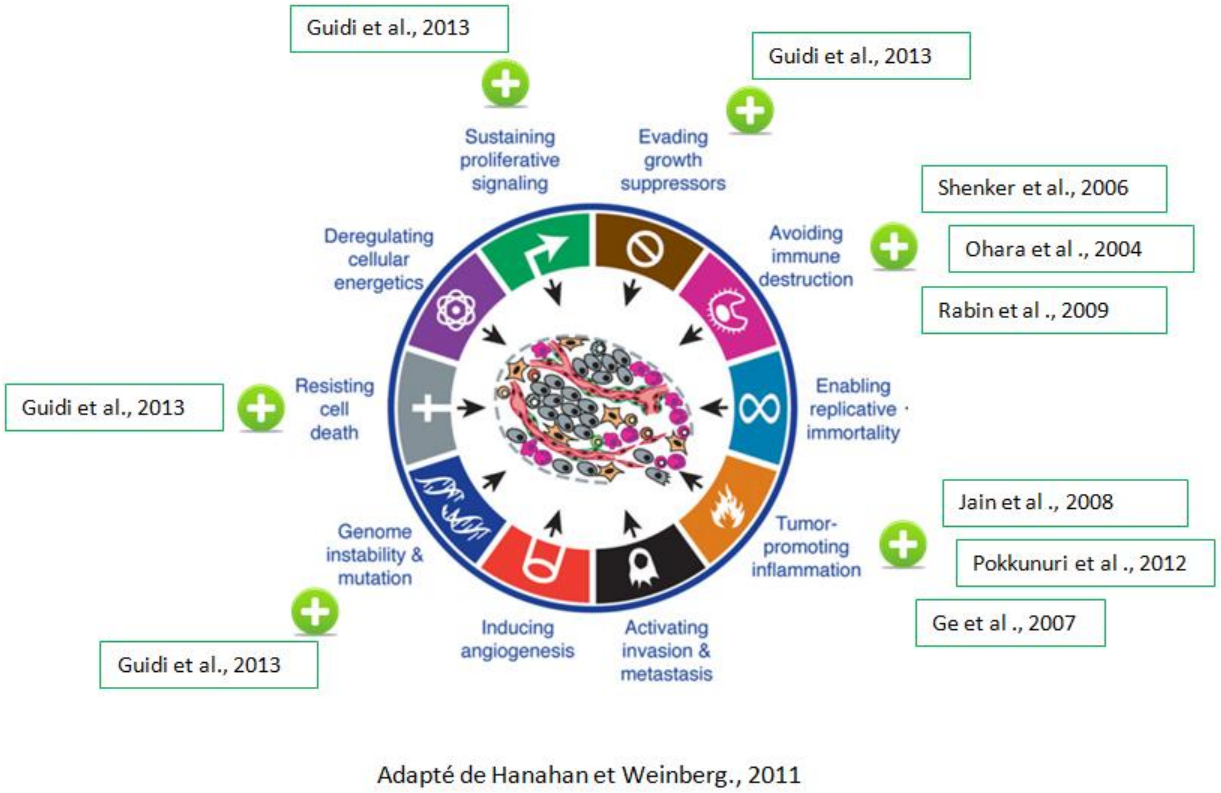


Figure 30 : Caractéristiques tumorales influencées par l'action de CDT

L'ensemble de ces données démontre l'implication de CDT dans l'acquisition de caractéristiques tumorales importantes, aussi bien au niveau de l'initiation que dans la progression tumorale.

3) CDT et Cancérogénèse : Où et Quand regarder ?

Peu de résultats *in vivo* reliant CDT et cancers ont été publiées. Plusieurs critères peuvent influencer ce lien, par exemple une exposition répétée (ou chronique) à un génotoxique favorise les

risques de développer une tumeur, comparé à une exposition aigue. De plus, le statut de prolifération des cellules endommagées est important.

Nos travaux ont permis de démontrer qu'à des doses modérées, les CDBs générées par CDT sont dépendantes du passage par la réplication. Ceci suggère qu'à ces doses, des cellules proliférantes accumuleront plus de CDBs et seront donc plus sensibles que des cellules quiescentes. Or, les bactéries productrices de CDT sont au niveau d'épithéliums. Les épithéliums sont des tissus à renouvellement plus ou moins rapide, constitués d'une ou plusieurs couches cellulaires. Différents types d'épithéliums sont retrouvés dans l'organisme et nous pouvons donc nous demander si l'effet de CDT peut être différent, suivant la structure de l'épithélium sur lequel elle agit.

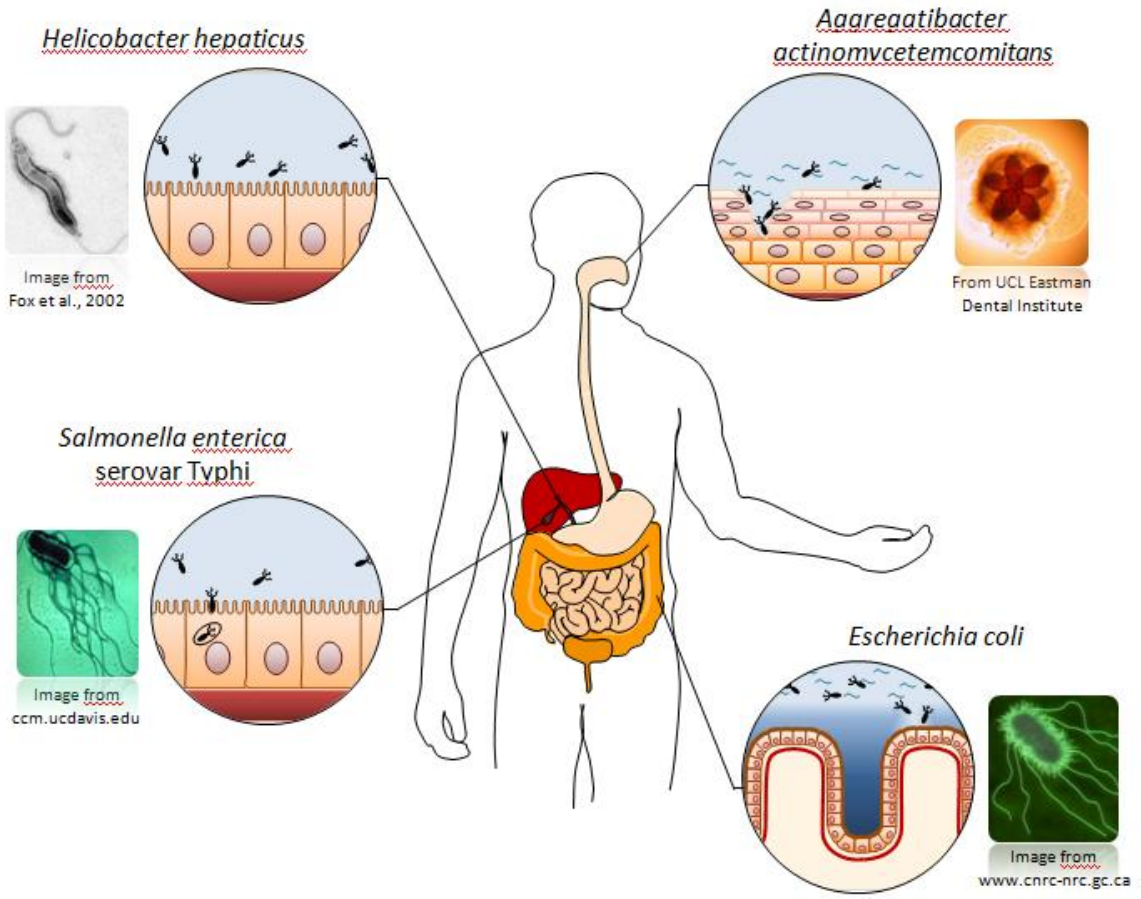


Figure 31 : Sites d'infections chroniques par des bactéries productrices de CDT, et épithélia associés.

a) Epithélium buccal et infection par A. actinomycetemcomitans

A. Actinomycetemcomitans est l'agent responsable de la maladie parodontale, dont le symptôme principal est une déstabilisation de la gencive et un déchaussement des dents. La maladie parodontale est une pathologie chronique qui ne met pas la vie du patient en danger à court terme. Les bactéries persistent au niveau de l'épithélium et dans le cas d'une production de CDT, la toxine peut induire des dommages de façon chronique. L'épithélium buccal est un épithélium pluristratifié et les cellules apicales sont des cellules différenciées quiescentes. *A. actinomycetemcomitans* déstabilise la barrière épithéliale (DiRienzo, 2014), rendant possible le contact des bactéries avec les cellules souches proliférantes situées dans les couches basales. *A actinomycetemcomitans* n'est pas la seule souche bactérienne responsable de parodontites. Même si de plus en plus d'associations entre maladie parodontale et cancer sont publiées, l'implication d'une infection par *A. actinomyctemcomitan* sur la cancérogénèse reste donc à déterminer (Rajesh *et al.*, 2013).

b) Epithélium biliaire et infection par H. hepaticus

H. hepaticus est un pathogène murin, qui colonise de façon persistante les voies biliaires ainsi que le colon (Fox *et al.*, 2011). Les épithéliums des voies biliaires et du colon sont des épithéliums simples, composés d'une seule couche cellulaire. L'épithélium des voies biliaires est un canal où les bactéries peuvent ainsi être directement en contact avec les cellules. En revanche, l'épithélium colorectal est organisé en cryptes, protégées par une première couche dense de mucus, empêchant le passage de toute bactérie, et d'un mucus plus lâche que peuvent coloniser les bactéries. Lors de certaines infections, la couche interne dense de mucus peut être déstabilisée, permettant ainsi le passage de bactéries dans les cryptes, au niveau des cellules souches proliférantes (Johansson *et al.*, 2013). Il est donc possible, lors d'une infection chronique par *H. hepaticus*, que CDT endommage les cellules proliférantes, que ce soit dans les canaux biliaires ou dans le colon. Dans la littérature, les liens entre *H. hepaticus* et cancers sont identifiés puisque l'infection par *H. hepaticus* de différents modèles murin est responsable de l'induction de cancers hépatiques (Fox *et al.*, 1996) ou colorectaux (Erdman *et al.*, 2003).

L'importance de la production de CDT dans l'effet carcinogène de *H. hepaticus* a également été montrée. Il s'agit à ce jour, de la seule donnée, *in vivo*, montrant directement l'impact de CDT sur le développement tumoral. Dans l'étude réalisée par Ge et collaborateurs, des souris immunocompétentes

ont été infectées avec une souche de *H. hepaticus* exprimant une toxine CDT sauvage ou avec une sous-unité CdtB (et donc CDT) mutée et inactive. Une hépatite est développée, quelle que soit la souche injectée. En revanche, seuls les individus infectés par une souche exprimant la CDT sauvage développent des nodules dysplasiques pré-cancéreux (Ge *et al.*, 2007). Ces données démontrent le potentiel carcinogène de CDT, *in vivo*.

H. hepaticus a longtemps été considéré comme un pathogène strictement murin. Cependant, des données récentes montrent que *H. hepaticus* est également capable d'infecter l'homme (Shimoyama *et al.*, 2010; Murakami *et al.*, 2011), et est retrouvé dans des biopsies de patients atteints de cancers hépatiques (Yang *et al.*, 2013). Ceci soulève la question de l'implication de *H. hepaticus*, et de sa production de CDT, chez des patients atteints d'un cancer hépatique ou colorectal.

c) Epithélium colorectal et infection par E. coli

Les souches commensales et pathogènes de *E. coli* ne colonisent pas obligatoirement les mêmes microbiotes. Effectivement, les souches commensales de *E. coli* colonisent l'épithélium intestinal au niveau du colon. Les souches pathogènes possèdent des capacités de colonisation et d'invasion qui leur permettent de coloniser d'autres niches en plus du colon, comme l'intestin grêle, les voies urinaires ou les voies sanguines. Les épithéliums rencontrés vont être, dans la majorité des cas, des épithéliums simples, à l'exception de celui des voies urinaires qui est stratifié. De plus en plus de données semblent associer une colonisation par *E. coli* avec l'augmentation de l'incidence et de la progression de cancers colorectaux (Swidsinski *et al.*, 1998; Bonnet *et al.*, 2014). La présence de souches de *E. coli* produisant des génotoxines dans la flore intestinale pourrait donc représenter un facteur prédisposant au développement du cancer du côlon.

d) Epithélium biliaire et infection par S. enterica serovar typhi

S. enterica serovar Typhi est l'agent responsable de la fièvre typhoïde. Cette pathologie est strictement humaine et aigüe. *S. enterica* serovar typhi est une bactérie intra-cellulaire qui colonise l'intestin où elle induit une importante déstabilisation de l'épithélium. Elle infecte ensuite les macrophages et est rapidement propagée dans tout l'organisme par voie systémique. Cette souche bactérienne étant extrêmement virulente, nous pouvons supposer qu'elle ne va pas coloniser de façon persistante l'intestin. De plus, aucune donnée reliant *S.* Typhi et cancer colorectal n'est détaillée dans

la littérature. Toutefois, des porteurs sains existent. Dans leur cas, la bactérie est retrouvée de façon chronique au niveau de l'épithélium de la vésicule biliaire. Il s'agit d'un épithélium simple prismatique, que les bactéries pourront directement infecter. Or, il est reconnu que l'infection chronique par *S.* Typhi est responsable du développement de cancer biliaire (Nath *et al.*, 2008; Scanu *et al.*, 2015). L'implication de CdtB dans l'induction de la fièvre typhoïde ayant déjà été montrée (Song *et al.*, 2013), il serait donc intéressant d'étudier l'implication de CdtB dans l'induction de cancers biliaires par *S.* Typhi.

III. Conclusion

Notre travail a permis d'éclaircir l'action de la toxine CDT sur les cellules eucaryotes. De plus en plus d'études sur l'implication de CDT dans la pathogénicité des bactéries qui la produisent sont réalisées. Notamment, un intérêt croissant entre bactérie, production de CDT et cancers commence à émerger. Les études réalisées *ex vivo* permettent d'éclaircir les potentiels acteurs pro-tumoraux que peut influencer CDT. *In vivo*, les données épidémiologiques permettent de faire des liens entre bactéries et cancers. Cependant, peu de publications regardent la présence des gènes codant pour CDT dans ces souches. De plus, il ne faut pas oublier que les cancers sont des pathologies multifactorielles. Ce sont des maladies complexes, dont l'initiation et la progression ne se résument pas seulement à l'acquisition de caractéristiques particulières mais dépendent également de la composition du microenvironnement tumoral. Dans ce contexte, il apparait primordial de caractériser le mécanisme d'action des CDTs sur le génome eucaryote, par des études *ex vivo*, mais également par des études *in vivo*, faisant le lien entre les données mécanistiques et la pathogénicité liée à CDT.

REFERENCES

Références

Ahaduzzaman, M. (2014) Updates on tetanus toxin: a fundamental approach. *J Adv Vet Anim Res* **2**: 1.

Alani, E., Thresher, R., Griffith, J.D., and Kolodner, R.D. (1992) Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of y-RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *J Mol Biol* **227**: 54–71.

Alaoui-El-Azher, M., Mans, J.J., Baker, H. V., Chen, C., Progulske-Fox, A., Lamont, R.J., and Handfield, M. (2010) Role of the ATM-checkpoint kinase 2 pathway in CDT-mediated apoptosis of gingival epithelial cells. *PLoS One* **5**: 1–10.

Aleem, E., and Arceci, R.J. (2015) Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. *Front Cell Dev Biol* **3**: 1–22.

Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. (2004) Involvement of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 and XRCC1/DNA Ligase III in an Alternative Route for DNA Double-strand Breaks Rejoining. *J Biol Chem* **279**: 55117–55126.

Beamish, H., Williams, R., Ghen, P., and Lavin, M.F. (1996) Defect in multiple cell cycle checkpoints in ataxia-telangiectasia postirradiation. *J Biol Chem* **271**: 20486–20493.

Bennet, C.B., Lewis, A.L., Baldwin, K.K., and Resnick, M.A. (1993) Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid. *Proc Natl Acad Sci* **90**: 5613–5617.

Berlanda Scorza, F., Doro, F., Rodríguez-Ortega, M.J., Stella, M., Liberatori, S., Taddei, A.R., *et al.* (2008) Proteomics characterization of outer membrane vesicles from the extraintestinal pathogenic Escherichia coli DeltatolR IHE3034 mutant. *Mol Cell Proteomics* **7**: 473–85.

Bezine, E., Vignard, J., and Mirey, G. (2014) The cytolethal distending toxin effects on Mammalian cells: a DNA damage perspective. *Cells* **3**: 592–615.

Bezine, E., Vignard, J., and Mirey, G. (2015) Effects of the Cytolethal Distending Toxin from Gram-Negative Bacteria on Mammalian Cells. In *Prokaryotes: Physiology, Biochemistry and Cell Behavior*. pp. 109–147.

Bieging, K.T., Mello, S.S., and Attardi, L.D. (2014) Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **14**: 359–70.

Bishé, B., Syed, G., and Siddiqui, A. (2012) Phosphoinositides in the hepatitis C virus life cycle. *Viruses* **4**: 2340–2358.

Blaser, M.J., Perez-perez, G.I., Kleanthous, H., Cover, T.L., Peek, R.M., Chyou, P.H., *et al.* (1995) Infection with Helicobacter pylori Strains Possessing cagA Is Associated with an Increased Risk of Developing Adenocarcinoma of the Stomach Infection with Helicobacter pylori Strains Possessing cagA Is Associated with an Increased Risk of Developing Adeno. *Cancer Res* **55**: 2111–2115.

Boboila, C., Oksenych, V., Gostissa, M., Wang, J.H., Zha, S., Zhang, Y., *et al.* (2012) Robust chromosomal DNA repair via alternative end-joining in the absence of X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1). *PNAS* **109**: 2473–2478.

Bonner, W.M., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Sedelnikova, O.A., Solier, S., and Pommier, Y. (2008) γH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* **8**: 957–967.

Bonnet, M., Buc, E., Sauvanet, P., Darcha, C., Dubois, D., Pereira, B., *et al.* (2014) Colonization of the human gut by E. coli and colorectal cancer risk. *Clin Cancer Res* **20**: 859–67.

Brandsma, I., and Gent, D.C. (2012) Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr* **3**: 9.

Brem, R., and Hall, J. (2005) XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic Acids Res* **33**: 2512–2520.

Breslin, C., Hornyak, P., Ridley, A., Rulten, S.L., Hanzlikova, H., Oliver, A.W., and Caldecott, K.W. (2015) The XRCC1 phosphate-binding pocket binds poly (ADP-ribose) and is required for XRCC1 function. *Nucleic Acids Res* **43**: 6934–6944.

Britton, S., Coates, J., and Jackson, S.P. (2013) A new method for high-resolution imaging of Ku foci to decipher mechanisms of DNA double-strand break repair. *J Cell Biol* **202**: 579–595.

Budman, J., and Chu, G. (2005) Processing of DNA for nonhomologous end-joining by cell-free extract. *EMBO J* **24**: 849–860.

Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., *et al.* (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science (80-)* **282**: 1497–1501.

Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* **276**: 42462–7.

Caldecott, K.W. (2008) Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* **9**: 619–631.

Caldecott, K.W. (2014) DNA single-strand break repair. *Exp Cell Res* **329**: 2–8.

Cameron, S.B., Nawijn, M.C., Kum, W.W., Savelkoul, H.F., and W., C.A. (2001) Regulation of helper T cell responses to staphylococcal superantigens. *Eur Cytokine Netw* **12**: 210–222.

Campbell, V.W., and Jackson, D.A. (1980) The effect of divalent cations on the mode of action of DNase I. *J Biol Chem* **255**: 3726–3735.

Cannan, W.J., and Pederson, D.S. (2015) Mechanisms and Consequences of Double-strand DNA Break Formation in Chromatin. *J Cell Physiol* .

Carlton, J.G., and Cullen, P.J. (2005) Coincidence detection in phosphoinositide signaling. *Trends Cell Biol* **15**: 540–547.

Casadevall, A., and Pirofski, L. (1999) Host-Pathogen Interactions : Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. *Infect Immun* **67**: 3703–3713.

Casadevall, A., and Pirofski, L. (2000) Host-Pathogen Interactions : Basic MINIREVIEW Host-Pathogen Interactions : Basic Concepts of Microbial Commensalism , Colonization , Infection , and Disease. *Infect Immun* **68**: 6511–6518.

Castor, D., Nair, N., Déclais, A.C., Lachaud, C., Toth, R., Macartney, T.J., *et al.* (2013) Cooperative control of holliday junction resolution and DNA Repair by the SLX1 and MUS81-EME1 nucleases. *Mol Cell* **52**: 221–233.

Cerezo, A., Guadamillas, M.C., Goetz, J.G., Sánchez-Perales, S., Klein, E., Assoian, R.K., and Pozo, M. a del (2009) The absence of caveolin-1 increases proliferation and anchorage- independent growth by a Rac-dependent, Erk-independent mechanism. *Mol Cell Biol* **29**: 5046–5059.

Chaturvedi, R., Asim, M., Romero-Gallo, J., Barry, D.P., Hoge, S., Sablet, T. De, *et al.* (2011) Spermine oxidase mediates the gastric cancer risk associated with Helicobacter pylori CagA. *Gastroenterology* **141**: 1696–1708.

Chen, X., Velmurugu, Y., Zheng, G., Park, B., Shim, Y., Kim, Y., *et al.* (2015) Kinetic gating mechanism of DNA damage recognition by Rad4/XPC. *Nat Commun* **6**: 5849.

Chun, J., Buechelmaier, E.S., and Powell, S.N. (2013) Rad51 paralog complexes BCDX2 and CX3 act at different stages in the BRCA1-BRCA2-dependent homologous recombination pathway. *Mol Cell Biol* **33**: 387–95.

Claesson, M.J., Jeffery, I.B., Conde, S., Power, S.E., O'Connor, E.M., Cusack, S., *et al.* (2012) Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. .

Clemens, J., Shin, S., Sur, D., Nair, G.B., and Holmgren, J. (2011) New-generation vaccines against cholera. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**: 701–710.

Comayras, C., Tasca, C., Pe, S.Y., Oswald, E., and Rycke, J.D.E. (1997) Escherichia coli cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G2/M transition by preventing cdc2 protein kinase dephosphorylation and activation . Escherichia coli Cytolethal Distending Toxin Blocks the HeLa Cell Cycle at the G 2 / M Tr. *Infect Immun* **65**: 5088–5095.

Conteduca, V., Sansonno, D., Lauletta, G., Russi, S., Ingravallo, G., and Dammacco, F. (2013) H. pylori infection and gastric cancer: State of the art (Review). *Int J Oncol* **42**: 5–18.

Cope, L.D., Lumbley, S., Latimer, J.L., Klesney-Tait, J., Stevens, M.K., Johnson, L.S., *et al.* (1997) A diffusible cytotoxin of Haemophilus ducreyi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 4056–4061.

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.

Coulthard, R., Deans, A.J., Swuec, P., Bowles, M., Costa, A., West, S.C., and McDonald, N.Q. (2013) Architecture and DNA recognition elements of the fanconi anemia FANCM-FAAP24 complex. *Structure* **21**: 1648–1658.

Cover, T.L., and Blanke, S.R. (2005) Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* **3**: 320–332.

Cuevas-Ramos, G., Petit, C.R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2010) Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 11537–11542.

Damek-Poprawa, M., Jang, J.Y., Volgina, A., Korostoff, J., Dirienzo, J.M., and Jang, Y. (2012) Localization of Aggregatibacter actinomycetemcomitans Cytolethal Distending Toxin Subunits during Intoxication of Live Cells. *Infect Immun* **80**: 2761–2770.

DiRienzo, J.M. (2014) Breaking the Gingival Epithelial Barrier: Role of the Aggregatibacter actinomycetemcomitans Cytolethal Distending Toxin in Oral Infectious Disease. *Cells* **3**: 476–99.

Elsen, S., Collin-Faure, V., Gidrol, X., and Lemercier, C. (2013) The opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa activates the DNA double-strand break signaling and repair pathway in infected cells. *Cell Mol Life Sci* **70**: 4385–4397.

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., Poutahidis, T., Tomczak, M., Rogers, A.B., Cormier, K., Plank, B., *et al.* (2003) CD4+ CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit microbially induced colon cancer in Rag2-deficient mice. *Am J Pathol* **162**: 691–702.

Eshraghi, A., Maldonado-arocho, F.J., Gargi, A., Cardwell, M.M., Prouty, M.G., Blanke, S.R., and Bradley, K.A. (2010) Cytolethal Distending Toxin Family Members Are Differentially Affected by Alterations in Host Glycans and Membrane Cholesterol. *J Biol Chem* **285**: 18199–18207.

Evans, S.J., Shipstone, E.J., Neil Maughan, W., and Connolly, B.A. (1999) Site-Directed Mutagenesis of Phosphate-Contacting Amino Acids of Bovine Pancreatic Doxyribonuclease I. *Biochemistry* **38**: 3902–3909.

Fahrer, J., Huelsenbeck, J., Jaurich, H., Dörsam, B., Frisan, T., Eich, M., *et al.* (2014) Cytolethal Distending Toxin (CDT) is a radiomimetic agent and induces persistent levels of DNA double-strand breaks in human fibroblasts. *DNA Repair (Amst)* .

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.

Feng, W., Rienzi, S.C. Di, Raghuraman, M.K., and Brewer, B.J. (2011) Replication stress-induced chromosome breakage is correlated with replication fork progression and is preceded by single-stranded DNA formation. *G3 Genes Genomes Genet* **1**: 327–35.

Fousteri, M., and Mullenders, L.H.F. (2008) Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res* **18**: 73–84.

Fox, J.G., Ge, Z., Whary, M.T., Erdman, S.E., and Horwitz, B.H. (2011) Helicobacter hepaticus infection in mice: models for understanding lower bowel inflammation and cancer. *Mucosal Immunol* **4**: 22–30.

Fox, J.G., Li, X., Yan, L., Cahill, R.J., Hurley, R., and Lewis, R. (1996) Chronic proliferative hepatitis in A / JCr mice associated with persistent Helicobacter hepaticus infection : a model of helicobacter-induced carcinogenesis . Chronic Proliferative Hepatitis in A / JCr Mice Associated with Persistent Helicobacter hepaticu. **64**: 1548–1558.

Gatei, M., Sloper, K., Sorensen, C., Syljuäsen, R., Falck, J., Hobson, K., *et al.* (2003) Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* **278**: 14806–14811.

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., Schauer, D.B., and Fox, J.G. (2008) In vivo Virulence Properties of Bacterial Cytolethal Distending Toxin. *Cell Microbiol* **10**: 1599–1607.

Gearhart, P.J., and Wood, R.D. (2001) Emerging links between hypermutation of antibody genes and DNA polymerases. *Nat Rev Immunol* **1**: 187–192.

Godon, C., Cordelières, F.P., Biard, D., Giocanti, N., Mégnin-Chanet, F., Hall, J., and Favaudon, V. (2008) PARP inhibition versus PARP-1 silencing: Different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. *Nucleic Acids Res* **36**: 4454–4464.

Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., Mann, M., and Lieber, M.R. (1997) Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* **388**: 492–495.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**: 883–899.

Guidi, R., Guerra, L., Levi, L., Stenerlöw, B., Fox, J.G., Josenhans, C., *et al.* (2013) Chronic exposure to the cytolethal distending toxins of Gram-negative bacteria promotes genomics instability and altered DNA damages response. *Cell Microbiol* **15**: 98–113.

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.

Haghjoo, E., and Galán, J.E. (2007) Identification of a transcriptional regulator that controls intracellular gene expression in Salmonella Typhi. *Mol Microbiol* **64**: 1549–1561.

Hammel, M., Yu, Y., Mahaney, B.L., Cai, B., Ye, R., Phipps, B.M., *et al.* (2010) Ku and DNA-dependent protein kinase dynamic conformations and assembly regulate DNA binding and the initial non-homologous end joining complex. *J Biol Chem* **285**: 1414–1423.

Hamon, M.A., Ribet, D., Stavru, F., and Cossart, P. (2012) Listeriolysin O: The Swiss army knife of Listeria. *Trends Microbiol* **20**: 360–368.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011) Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell* **144**: 646–674.

Hanssen-Bauer, A., Solvang-Garten, K., Akbari, M., and Otterlei, M. (2012) X-ray Repair Cross Complementing protein 1 in base excision repair. *Int J Mol Sci* **13**: 17210–17229.

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.

Heckman, K.L., and Pease, L.R. (2007) Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc* **2**: 924–932.

Heddi, B., Abi-Ghanem, J., Lavigne, M., and Hartmann, B. (2010) Sequence-Dependent DNA Flexibility Mediates DNase I Cleavage. *J Mol Biol* **395**: 123–133.

Hinz, J.M. (2014) Impact of abasic site orientation within nucleosomes on human APE1 endonuclease activity. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* **766-767**: 19–24.

Hodson, C., and Walden, H. (2012) Towards a molecular understanding of the fanconi anemia core complex. *Anemia* **2012**.

Hoeijmakers, J.H.J. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366–374.

Holland, A.J., and Cleveland, D.W. (2009) Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 478–487.

Hoogstraten, D., Bergink, S., Ng, J.M.Y., Verbiest, V.H.M., Luijsterburg, M.S., Geverts, B., *et al.* (2008) Versatile DNA damage detection by the global genome nucleotide excision repair protein XPC. *J Cell Sci* **121**: 2850–2859.

Horton, J.K., Watson, M., Stefanick, D.F., Shaughnessy, D.T., Taylor, J. a, and Wilson, S.H. (2008) XRCC1 and DNA polymerase beta in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. *Cell Res* **18**: 48–63.

Hu, X., Nesic, D., and Stebbins, C.E. (2006) Comparative Structure-Function Analysis of Cytolethal Distending Toxins. *Proteins* **62**: 421–434.

Hu, X., and Stebbins, C.E. (2006) Dynamics and Assembly of the Cytolethal Distending Toxin. *Proteins Struct Funct Bioinforma* **65**: 843–855.

Hühn, D., Bolck, H. a., and Sartori, A. a. (2013) Targeting DNA double-strand break signalling and repair: recent advances in cancer therapy. *Swiss Med Wkly* **143**: 1–14.

Iyama, T., and Wilson, D.M. 3rd (2013) DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)* **12**: 620–636.

Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**: 1071–8.

Jackstadt, R., Jung, P., and Hermeking, H. (2013) AP4 directly downregulates p16 and p21 to suppress senescence and mediate transformation. *Cell Death Dis* **4**: e775.

Jain, D., Prasad, K.N., Sinha, S., and Husain, N. (2008) Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative Campylobacter jejuni strains. *J Med Microbiol* **57**: 267–72.

Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C.M., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2006) ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* **8**: 37–45.

Jensen, R.B., Carreira, A., and Kowalczykowski, S.C. (2010) Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* **467**: 678–683.

Jeon, B., Itoh, K., and Ryu, S. (2005) Promoter analysis of cytolethal distending toxin genes (cdtA , B, and C) and effect of a luxS mutation on CDT production in Campylobacter jejuni. *Microbiol Immunol* **49**: 599–603.

Johannes, L., and Römer, W. (2010) Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* **8**: 105–116.

Johansson, M.E. V, Sjövall, H., and Hansson, G.C. (2013) The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**: 352–61.

Johnson, W.M., and Lior, H. (1987) Response of Chinese Hamster Ovary Cells to a Cytolethal Distending Toxin (CDT) of Escherichia coli and Possible Misinterpretation as Heat-labile (LT) enterotoxin. *FEMS Microbiol Lett* **43**: 19–23.

Johnson, W.M., and Lior, H. (1988) A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by Campylobacter spp. *Microbiol Pathol* **4**: 115–126.

Jones, R.M., and Petermann, E. (2012) Replication fork dynamics and the DNA damage response. *Biochem J* **443**: 13–26.

Jones, S.J., Worrell, A.F., and Connolly, B.A. (1996) Site-directed Mutagenesis of the Catalytic Residues of Bovine Pancreatic Deoxyribonuclease I. *J Mol Biol* **264**: 1154–1163.

Kang, S.H., Kwon, J.Y., Lee, J.K., and Seo, Y.R. (2013) Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. *J cancer Prev* **18**: 277–88.

Kidane, D., Murphy, D.L., and Sweasy, J.B. (2014) Accumulation of abasic sites induces genomic instability in normal human gastric epithelial cells during Helicobacter pylori infection. *Oncogenesis* **3**: e128.

Kim, J.J., Tao, H., Carloni, E., Leung, W.K., Graham, D.Y., and Sepulveda, A.R. (2002) Helicobacter pylori impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* **123**: 542–553.

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.

Klement, K., and Googarzi, A.A. (2014) DNA double-strand break responses and chromatin alterations within the aging cell. *Exp Cell Res* **329**: 42–52.

Koeppel, M., Garcia-Alcalde, F., Glowinski, F., Schlaermann, P., and Meyer, T.F. (2015) Helicobacter pylori Infection Causes Characteristic DNA Damage Patterns in Human Cells. *Cell Rep* **11**: 1703–1713.

Kolodner, R. (1996) Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev* **10**: 1433–1442.

Krasner, D.S., Daley, James, M., Sung, P., and Niu, H. (2015) Interplay between Ku and Replication Protein A in the Restriction of Exo1-mediated DNA Break End Resection. *J Biol Chem* **290**: 18806–18816.

Lacks, S. a. (1981) Deoxyribonuclease I in mammalian tissues. Specificity of inhibition by actin. *J Biol Chem* **256**: 2644–2648.

Lafrance-Vanasse, J., Williams, G.J., and Tainer, J.A. (2015) Envisioning the dynamics and flexibility of Mre11-Rad50-Nbs1 complex to decipher its roles in DNA replication and repair. *Prog Biophys Mol Biol* **117**: 182–193.

Lahm, A., and Suck, D. (1991) DNase I-induced DNA Conformation, 2A Structure of a DNase I-Octamer Complex. *J Mol Biol* **221**: 645–667.

Lara-Tejero, M., and Galàn, J.E. (2000) A Bacterial Toxin That Controls Cell Cycle Progression as a Deoxyribonuclease I-Like Protein. *Science (80-)* **290**: 354–357.

Lazarovici, A., Zhou, T., Shafer, A., Dantas Machado, A.C., Riley, T.R., Sandstrom, R., *et al.* (2013) Probing DNA shape and methylation state on a genomic scale with DNase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 6376–81.

Lee, J.-H., and Paull, T.T. (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science (80-)* **308**: 551–4.

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.

Leslie, J.L., and Young, V.B. (2015) The rest of the story: the microbiome and gastrointestinal infections. *Curr Opin Microbiol* **23**: 121–125.

Levin, B.R., and Bull, J.J. (2004) Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nat Rev Microbiol* **2**: 166–173.

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.

Liu, F.T., Newland, A.C., and Jia, L. (2003) Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* **310**: 956–962.

Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., *et al.* (2000) Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* **14**: 1448–1459.

Liu, S., Moayeri, M., and Leppla, S.H. (2014) Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis. *Trends Microbiol* **22**: 317–325.

Loeb, L. a, and Monnat, R.J. (2008) DNA polymerases and human disease. *Nat Rev Genet* **9**: 594–604.

Longerich, S., Kwon, Y., Tsai, M.S., Hlaing, A.S., Kupfer, G.M., and Sung, P. (2014) Regulation of FANCD2 and FANCI monoubiquitination by their interaction and by DNA. *Nucleic Acids Res* **42**: 5657–5670.

Lusser, A., and Kadonaga, J.T. (2004) Strategies for the reconstitution of chromatin. *Nat Methods* **1**: 19–26.

Maffei, F., Zolezzi Moraga, J.M., Angelini, S., Zenesini, C., Musti, M., Festi, D., *et al.* (2014) Micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes as a biomarker for the early detection of colorectal cancer risk. *Mutagenesis* **29**: 221–5.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* **9**: 153–166.

Mani, V., Weber, T.E., Baumgard, L.H., and Gabler, N.K. (2012) GROWTH AND DEVELOPMENT SYMPOSIUM : Endotoxin , infl ammation , and intestinal function in livestock. *J Anim Sci* **90**: 1452–1465.

Marsland, B.J., and Gollwitzer, E.S. (2014) Host–microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol* **14**: 827–835.

Matangkasombut, O., Wattanawaraporn, R., Tsuruda, K., Ohara, M., Sugai, M., and Mongkolsuk, S. (2010) Cytolethal Distending Toxin from Aggregatibacter actinomycetemcomitans Induces DNA Damage , S/G2 Cell Cycle Arrest , and Caspase-Independent Death in a Saccharomyces cerevisiae Model. *Infect Immun* **78**: 783–792.

Mateos-gomez, P. a, Gong, F., Nair, N., Miller, K.M., Lazzerini-denchi, E., and Sfeir, A. (2015) Mammalian polymerase θ promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature* **518**: 254–257.

Matsuoka, S., Ballif, B. a, Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., *et al.* (2007) ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science (80-)* **316**: 1160–1166.

McCulloch, S.D., and Kunkel, T.A. (2008) The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Res* **18**: 148–161.

Melvin, J.A., Scheller, E. V., Miller, J.F., and Cotter, P.A. (2014) Bordetella pertussis pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol* **12**: 274–288.

Miranti, C.K., and Brugge, J.S. (2002) Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* **4**: E83–E90.

Mladenov, E., Magin, S., Soni, A., and Iliakis, G. (2013) DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. *Front Oncol* **3**: 113.

Moorhead, G.B.G., Wever, V. De, Templeton, G., and Kerk, D. (2009) Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochem J* **417**: 401–409.

Moran, D.M., Gawlak, G., Jayaprakash, M.S., Mayar, S., and Maki, C.G. (2008) Geldanamycin promotes premature mitotic entry and micronucleation in irradiated p53/p21 deficient colon carcinoma cells. *Oncogene* **27**: 5567–5577.

Morrison, W.B. (2012) Inflammation and cancer: a comparative view. *J Vet Intern Med* **26**: 18–31.

Moscariello, M., Wieloch, R., Kurosawa, A., Li, F., Adachi, N., Mladenov, E., and Iliakis, G. (2015) Role for Artemis nuclease in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks by alternative end joining. *DNA Repair (Amst)* **31**: 29–40.

Murakami, K., Takahashi, R., Ono, M., Watanabe, K., Okimoto, T., Kodama, M., *et al.* (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.

Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 379–393.

Nagamatsu, K., Hannan, T.J., Guest, R.L., Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Binkley, J., *et al.* (2015) Dysregulation of Escherichia coli α-hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci* 201500374.

Naka, K., Tachibana, A., Ikeda, K., and Motoyama, N. (2004) Stress-induced Premature Senescence in hTERT-expressing Ataxia Telangiectasia Fibroblasts. *J Biol Chem* **279**: 2030–2037.

Nath, G., Singh, Y.K., Kumar, K., Gulati, A.K., Shukla, V.K., Khanna, A.K., *et al.* (2008) Association of carcinoma of the gallbladder with typhoid carriage in a typhoid endemic area using nested PCR. *J Infect Dev Ctries* **2**: 302–307.

Negrini, S., Gorgoulis, V.G., and Halazonetis, T.D. (2010) Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 220–8.

Nelson, J.D., Denisenko, O., and Bomsztyk, K. (2006) Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nat Protoc* **1**: 179–185.

Nesić, D., Hsu, Y., and Stebbins, C.E. (2004) Assembly and function of a bacterial genotoxin. *Nature* **429**: 429–433.

Nikonova, O.F.G.T.M. (2013) Development of Experimental Tumors Formed by Mouse and Human Embryonic Stem and Teratocarcinoma Cells After Subcutaneous and Intraperitoneal Transplantations Into Immunodeficient and Immunocompetent Mice. *Cell Transplant* **22**: 1901–1914.

Nimonkar, A. V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., *et al.* (2011) BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev* **25**: 350–362.

Nipič, D., Podlesek, Z., Budič, M., Črnigoj, M., and Žgur-Bertok, D. (2013) Escherichia coli uropathogenic-specific protein, USP, is a bacteriocin-like genotoxin. *J Infect Dis* **208**: 1545–1552.

Nougayrède, J., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., *et al.* (2006) Escherichia coli Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *Science (80-)* **313**: 848–851.

Odumosu, O., Nicholas, D., Yano, H., and Langridge, W. (2010) AB toxins: A paradigm switch from deadly to desirable. *Toxins (Basel)* **2**: 1612–1645.

OECD/OCDE (2014) Test du Micronoyau in vitro sur cellules de mammifères. In *Ligne Directrice de l'OCDE Pour les Essais de Produits Chimiques*. p. Essais n°487.

Oliver, A.W., Swift, S., Lord, C.J., Ashworth, A., and Pearl, L.H. (2009) Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. *EMBO Rep* **10**: 990–996.

Oliveri, M., Daga, A., Cantoni, C., Lunardi, C., Millo, R., and Puccetti, A. (2001) DNase I mediates internucleosomal DNA degradation in human cells undergoing drug-induced apoptosis. *Eur J Immunol* **31**: 743–751.

Pabla, N., Huang, S., Mi, Q.S., Daniel, R., and Dong, Z. (2008) ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* **283**: 6572–6583.

Parsons, J.L., Dianova, I.I., Allinson, S.L., and Dianov, G.L. (2005) DNA polymerase beta promotes recruitment of DNA ligase III alpha-XRCC1 to sites of base excision repair. *Biochemistry* **44**: 10613–10619.

Peek, R.M., and Crabtree, J.E. (2006) Helicobacter infection and gastric neoplasia. *J Pathol* **208**: 233–248.

Petermann, E., Orta, M.L., Issaeva, N., Schultz, N., and Helleday, T. (2010) Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair. *Mol Cell* **37**: 492–502.

Petrini, John, H.J., and Stracker, Travis, H. (2003) The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol* **13**: 458–462.

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.

Pokkunuri, V., Pimentel, M., Morales, W., Jee, S.-R., Alpern, J., Weitsman, S., *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**: 434–42.

Puyo, S., Montaudon, D., and Pourquier, P. (2014) From old alkylating agents to new minor groove binders. *Crit Rev Oncol Hematol* **89**: 43–61.

Raffa, R.B., Iannuzzo, J.R., Levine, D.R., Saeid, K.K., Schwartz, R.C., Sucic, N.T., *et al.* (2005) Bacterial communication ("quorum sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* **312**: 417–423.

Rajesh, K.S., Thomas, D., Hegde, S., and Kumar, A.M.S. (2013) Poor periodontal health: A cancer risk ? *J Indian Soc Periodontol* **17**: 706–710.

Ramachandran, G. (2014) Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. *Virulence* **5**: 213–8.

Rasko, D. a, and Sperandio, V. (2010) Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat Rev Drug Discov* **9**: 117–128.

Raynard, S., Bussen, W., and Sung, P. (2006) A double holliday junction dissolvasome comprising BLM, topoisomerase III??, and BLAP75. *J Biol Chem* **281**: 13861–13864.

Reijns, M. a M., Rabe, B., Rigby, R.E., Mill, P., Astell, K.R., Lettice, L. a., *et al.* (2012) Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome integrity and development. *Cell* **149**: 1008–1022.

Riedl, T., Hanaoka, F., and Egly, J.M. (2003) The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *EMBO J* **22**: 5293–5303.

Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W. a M., Muñoz, D.P., Raza, S.R., *et al.* (2009) Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* **11**: 973–979.

Rodrigue, A., Lafrance, M., Gauthier, M.-C., McDonald, D., Hendzel, M., West, S.C., *et al.* (2006) Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break in vivo. *EMBO J* **25**: 222–231.

Rödström, K.E.J., Elbing, K., and Lindkvist-Petersson, K. (2014) Structure of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B in Complex with TCR and Peptide-MHC Demonstrates Absence of TCR-Peptide Contacts. *J Immunol* **193**: 1998–2004.

Roos, W.P., and Kaina, B. (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* **12**: 440–450.

Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L.H., and Löbrich, M. (2003) Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle. *Mol Cell Biol* **23**: 5706–5715.

Rowland, L.P. (2002) Stroke, Spasticity, and Botulinum Toxin. *N Engl J Med* **347**: 382–383.

Samba-Louaka, A., Pereira, J.M., Nahori, M.A., Villiers, V., Deriano, L., Hamon, M.A., and Cossart, P. (2014) Listeria monocytogenes dampens the DNA damage response. *PLoS Pathog* **10**: e1004470.

Samosornsuk, W., Kamei, K., Hatanaka, N., Taguchi, T., Asakura, M., Somroop, S., *et al.* (2015) A new variant of cytolethal distending toxin in a clinical isolate of Campylobacter hyointestinalis. *J Med Microbiol* .

Sansonetti, P.J. (2011) To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question. *Mucosal Immunol* **4**: 8–14.

Scanu, T., Spaapen, R.M., Bakker, J.M., Pratap, C.B., Wu, L., Hofland, I., *et al.* (2015) Salmonella Manipulation of Host Signaling Pathways Provokes Cellular Transformation Associated with Gallbladder Carcinoma. *Cell Host Microbe* **17**: 763–774.

Schwabe, R.F., and Jobin, C. (2013) The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer* **13**: 800–812.

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.

Seiler, J. a, Conti, C., Syed, A., Aladjem, M.I., and Pommier, Y. (2007) The intra-S-phase checkpoint affects both DNA replication initiation and elongation: single-cell and -DNA fiber analyses. *Mol Cell Biol* **27**: 5806–5818.

Shenker, B.J., Demuth, D.R., and Zekavat, A. (2006) Exposure of Lymphocytes to High Doses of Actinobacillus actinomycetemcomitans Cytolethal Distending Toxin Induces Rapid Onset of Apoptosis-Mediated DNA Fragmentation. *Infect Immun* **74**: 2080–2092.

Shenker, B.J., Dlakic, M., Walker, L.P., Besack, D., Jaffe, E., LaBelle, E., and Boesze-Battaglia, K. (2007) A Novel Mode of Action for a Microbial-Derivated Immunotoxin: The Cytolethal Distending Toxin Subunit B Exhibits Phosphatidylinositol3,4,5-Triphosphate Phosphatase Activity. *J Immunol* **178**: 5099–5108.

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**: 1–4.

Simon, N.C., Aktories, K., and Barbieri, J.T. (2014) Novel bacterial ADP-ribosylating toxins: structure and function. *Nat Rev Microbiol* **12**: 599–611.

Simsek, D., Brunet, E., Yan-Wai Wong, S., Katyal, S., Gao, Y., McKinnon, P.J., *et al.* (2011) DNA Ligase III Promotes Alternative Nonhomologous End-Joining during Chromosomal Translocation Formation. *PLoS Genet* **7**: e1002080.

Smogorzewska, A., Matsuoka, S., Vinciguerra, P., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., *et al.* (2007) Identification of the FANCI Protein, a Monoubiquitinated FANCD2 Paralog Required for DNA Repair. *Cell* **129**: 289–301.

Söderblom, T., Laestadius, A., Oxhamre, C., Aperia, A., and Richter-Dahlfors, A. (2002) Toxin-induced calcium oscillations: a novel strategy to affect gene regulation in target cells. *Int J Med Microbiol* **291**: 511–515.

Sommer, F., and Bäckhed, F. (2013) The gut microbiota - master of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* **11**: 227–238.

Song, J., Gao, X., and Galán, J.E. (2013) Structure and function of the Salmonella Typhi chimaeric A2B5 typhoid toxin. *Nature* **499**: 350–354.

Souza-Pinto, N.C. De, Eide, L., Hogue, B. a., Thybo, T., Stevnsner, T., Seeberg, E., *et al.* (2001) Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial DNA depends on the oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial DNA of OGG1-defective mice. *Cancer Res* **61**: 5378–5381.

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.

Sugai, M., Kawamoto, T., Pérès, S.Y., Ueno, Y., Komatsuzawa, H., Fujiwara, T., *et al.* (1998) The Cell Cycle-Specific Growth-Inhibitory Factor Produced by Actinobacillus actinomycetemcomitans is a Cytolethal Distending Toxin. *Infect Immun* **66**: 5008–5019.

Sugiyama, T., Zaitseva, E.M., and Kowalczykowski, S.C. (1997) A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the Saccharomyces cerevisiae Rad51 protein. *J Biol Chem* **272**: 7940–7945.

Sung, P., and Robberson, D.L. (1995) DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell* **82**: 453–461.

Swidsinski, A., Khilkin, M., Kerjaschki, D., Schreiber, S., Ortner, M., Weber, J., and Lochs, H. (1998) Association Between Intraepithelial. **1**: 281–286.

Swift, L.H., and Golsteyn, R.M. (2014) Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *Int J Mol Sci* **15**: 3403–3431.

Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Grompe, M., and D'Andrea, A.D. (2002) S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* **100**: 2414–2420.

Taylor, E.M., Cecillon, S.M., Bonis, A., Ross Chapman, J., Povirk, L.F., and Lindsay, H.D. (2009) The Mre11/Rad50/Nbs1 complex functions in resection-based DNA end joining in Xenopus laevis. *Nucleic Acids Res* **38**: 441–454.

Toller, I.M., Neelsen, K.J., Steger, M., Hartung, M.L., Hottiger, M.O., Stucki, M., *et al.* (2011) Carcinogenic bacterial pathogen Helicobacter pylori triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 14944–14949.

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.

Urbina, P., Collado, M.I., Alonso, A., Goñi, F.M., Flores-Díaz, M., Alape-Girón, A., *et al.* (2011) Unexpected wide substrate specificity of C. perfringens α-toxin phospholipase C. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1808**: 2618–2627.

Vermeij, W.P., Hoeijmakers, J.H.J., and Pothof, J. (2014) Aging : not all DNA damage is equal. *Curr Opin Genet Dev* **26**: 124–130.

Vizcaino, M.I., and Crawford, J.M. (2015) The colibactin warhead crosslinks DNA. *Nat Chem* **7**: 1–7.

Volker, M., Moné, M.J., Karmakar, P., Hoffen, A. Van, Schul, W., Vermeulen, W., *et al.* (2001) Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell* **8**: 213–224.

Vousden, K.H., and Lane, D.P. (2007) P53 in Health and Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 275–283.

Walden, H., and Deans, A.J. (2014) The Fanconi Anemia DNA Repair Pathway: Structural and Functional Insights into a Complex Disorder. *Annu Rev Biophys* **43**: 257–278.

Walker, M., Black, E.J., Oehler, V., Gillespie, D. a, and Scott, M.T. (2009) Chk1 C-terminal regulatory phosphorylation mediates checkpoint activation by de-repression of Chk1 catalytic activity. *Oncogene* **28**: 2314–23.

Wang, A.T., Kim, T., Wagner, J.E., Conti, B.A., Lach, F.P., Huang, A.L., *et al.* (2015) A Dominant Mutation in Human RAD51 Reveals Its Function in DNA Interstrand Crosslink Repair Independent of Homologous Recombination. *Mol Cell* **59**: 478–490.

Wang, H., Shao, Z., Shi, L.Z., Hwang, P.Y.H., Truong, L.N., Berns, M.W., *et al.* (2012) CtIP protein dimerization is critical for its recruitment to chromosomal DNA double-stranded breaks. *J Biol Chem* **287**: 21471–21480.

Wang, M., McIntee, E.J., Cheng, G., Shi, Y., Villalta, P.W., and Hecht, S.S. (2000) Identification of DNA adducts of acetaldehyde. *Chem Res Toxicol* **13**: 1149–1157.

Wenk, M.R., and Camilli, P. De (2004) Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8262–8269.

Weston, S.A., Lahm, A., and Suck, D. (1992) X-ray structure of the DNase Id (GGTATACC) 2 complex at 2· 3Å resolution. *J Mol Biol* **226**: 1237–1256.

Words, K.E.Y. (1999) Hydrogen Peroxide – Induced Apoptosis Mediated by p53 Protein in Glial Cells. **164**: 154–164.

Wu, M., Huang, H., Zhang, W., Kannan, S., Weaver, A., McKibben, M., *et al.* (2011) Host DNA repair proteins in response to pseudomonas aeruginosa in lung epithelial cells and in mice. *Infect Immun* **79**: 75–87.

Yang, J., Ji, S., Zhang, Y., and Wang, J. (2013) Helicobacter hepaticus infection in primary hepatocellular carcinoma tissue. *Singapore Med J* **54**: 451–457.

Yun, M.H., and Hiom, K. (2009) CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* **459**: 460–463.

Zhao, H., and Piwnica-Worms, H. (2001) ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* **21**: 4129–4139.

Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2011) Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community. *Cell Calcium* **50**: 211–221.

Zijnge, V., Kieselbach, T., and Oscarsson, J. (2012) Proteomics of protein secretion by Aggregatibacter actinomycetemcomitans. *PLoS One* **7**: e41662.

Zotter, A., Luijsterburg, M.S., Warmerdam, D.O., Ibrahim, S., Nigg, A., Cappellen, W. a van, *et al.* (2006) Recruitment of the nucleotide excision repair endonuclease XPG to sites of UV-induced dna damage depends on functional TFIIH. *Mol Cell Biol* **26**: 8868–8879.

Zou, L., and Elledge, S.J. (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science (80-)* **300**: 1542–8.