



Piste infectieuse à *Escherichia coli* toxigènes dans le cancer colorectal

Jennifer Raisch

► To cite this version:

Jennifer Raisch. Piste infectieuse à *Escherichia coli* toxigènes dans le cancer colorectal. Microbiologie et Parasitologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2014. Français. NNT : 2014CLF1MM09 . tel-01167785

HAL Id: tel-01167785

<https://theses.hal.science/tel-01167785>

Submitted on 24 Jun 2015

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

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

*ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

N° d'ordre :

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université
Spécialité : **Microbiologie cellulaire**

Soutenue le 27 Juin 2014

Jennifer RAISCH

*Piste infectieuse à *Escherichia coli* toxigènes
dans le cancer colorectal*

Rapporteurs

M. Patrick Di Martino, Professeur des Universités, Université de Cergy-Pontoise

M. Harry Sokol, Maître de Conférences des Universités et Praticien Hospitalier, Inserm U1057, UMR CNRS 7203/Université Paris 6 ; MICALIS INRA, Jouy en Josas

Examineurs

M. Jérôme Boudeau, Chargé de Recherche, CRBM-CNRS, UMR5237, Montpellier

M. Jean-Marc Lobaccaro, Professeur des Universités, CNRS UMR 6293/Inserm UMR 1103 GRd, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

M. Pierre Verrelle, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier, Université d'Auvergne, EA7283 CREaT, Clermont-Ferrand

Co-Directrices de thèse

Mme Arlette Darfeuille-Michaud, Professeur des Universités, UMR1071 Inserm/Université d'Auvergne, INRA USC2018, Clermont-Ferrand

Mme Marie-Agnès Bringer, Chargée de Recherche, UMR1071 Inserm/Université d'Auvergne, INRA USC2018, Clermont-Ferrand

Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte,
M2iSH, UMR1071 Inserm/Université d'Auvergne, INRA USC2018
28 place Henri Dunant – 63001 Clermont-Ferrand Cedex

Remerciements

Je tiens à remercier très sincèrement Monsieur le Professeur Patrick Di Martino et Monsieur le Docteur Harry Sokol d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de doctorat, d'avoir consacré du temps à la lecture, l'analyse et la critique de ce manuscrit. Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Pierre Verrelle et Monsieur le Docteur Jérôme Boudeau d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je remercie Monsieur le Professeur Jean-Marc Lobaccaro de me faire l'honneur de présider ce jury.

Je tiens également à remercier mes deux directrices de thèse, Mesdames Marie-Agnès Bringer et Arlette Darfeuille-Michaud. Je vous remercie de m'avoir encadrée, soutenue et suivie tout au long de ces quatre années depuis mon stage de Master II jusqu'à cet aboutissement que représentent la rédaction et la soutenance. Travailler à vos côtés aura été formateur, stimulant et avant tout une très belle expérience.

***Arlette**, je t'adresse mes remerciements les plus sincères pour m'avoir accueillie dès l'IUT dans ton unité et pour m'avoir de nouveau fait confiance lors de mon arrivée en stage de Master II. Je te remercie pour tous les bons conseils que tu as su me prodiguer tout au long de ces quatre années, mais également pour les excellentes pâtisseries que tu as souvent apportées et qui ont souvent permis de regrouper tout le monde en salle café. J'ai appris énormément de choses lors de ces quatre années passées à tes côtés et te remercie de m'avoir soutenue. Merci pour tout.*

***Marie**, je te remercie d'avoir co-encadrée ce travail de thèse et d'avoir bien voulu placer ta confiance en moi pour le stage de Master II, qui marque le début de notre collaboration. Et je pense que ni l'une ni l'autre n'oubliera le jour de l'impression du rapport clôturée à 3h du matin avec de nombreuses péripéties dont la cerise sur le gâteau restera certainement la panne de batterie de ma voiture sur le parking de la fac à trois heures du matin... Ces quatre années de travail ont été rythmées par plusieurs échecs mais tu as su malgré tout me soutenir et me pousser, et pour cet élan de motivation et de soutien je te remercie sincèrement. Je vous souhaite à Pierre, Camille et toi bonne chance pour cette nouvelle aventure qui va démarrer à Dijon. D'ailleurs **Pierre**, un Parisien-Clermontois qui fut doctorant du laboratoire qui deviendra bientôt Dijonnais, un immense merci pour tous ces conseils et ces produits que tu as su me livrer...certaines manips seraient allées beaucoup moins vite sans ta complicité.*

Remerciements

Richard, je vous remercie d'avoir bien voulu participer à la relecture de mon manuscrit et d'apporter vos suggestions. Je ne vous remerciera jamais assez des formules de calculs sous Excel que j'ai pu apprendre à vos côtés, elles m'ont énormément aidé pour l'analyse des résultats du papier B2.

Valérie, je te remercie pour ta bonne humeur, ton aide précieuse lors des instants mots-croisés de la pause déjeuner. Je te remercie également pour la disponibilité dont tu as souvent fait preuve malgré un emploi du temps souvent chargé.

Nico B, mon maître de stage à l'IUT, c'est un peu grâce à toi également que je suis ici aujourd'hui. Peut-être que si je n'étais pas venue faire mon stage d'IUT dans le laboratoire d'Arlette sous ta direction, mon engouement pour la recherche n'aurait pas été aussi fort. Je te remercie pour tous les bons conseils que tu as su m'apporter durant ces quatre années et pour ta bonne humeur au quotidien. Je suis sûre qu'avec Nathan et Isa, le meilleur est à venir et je vous souhaite à tous les trois beaucoup de bonheur.

Elisabeth, Zabou, ma petite immunologiste préférée venue de la planète «dendritic cells», nos langages sont bien différents mais quand il s'agit d'apporter du soutien et du réconfort ton langage devient universel. Je te remercie d'avoir su et pris le temps de m'éclairer parfois sur les merveilleux mondes de l'immunité innée et acquise que je connais tellement peu. Je te remercie pour ces moments où tu as su poser ton clavier ou tes copies afin de m'écouter et de me réconforter. Merci pour tout ma petite Zabou. J'espère qu'avec ton petit anticorps, Mattieu, et son lymphocyte B mature, Benoit, tout se passera pour le mieux. Je vous souhaite plein de bonnes choses. Au fait y a-t-il bien 100 trombones dans les boîtes de 100 ?

Mathilde, mon petit ange gardien, c'est avec beaucoup d'émotion que j'écris tes remerciements. Je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi durant ces quatre dernières années, pour tous les conseils scientifiques que tu as su m'apporter notamment en ce qui concerne les qPCR et les statistiques. Je pense que c'est grâce à toi que j'ai compris l'importance de cette discipline que je maîtrise encore trop peu à mon grand regret. J'aimerais remercier la copine, l'amie que j'ai trouvé en toi, toujours prête quoi qu'il arrive et quelle que soit l'heure, pour écouter mes petits malheurs, tes conseils concernant mon avenir m'ont beaucoup aidée dans ma prise de décision. Je ne compte plus le nombre de fois où je t'ai appelé à la rescousse car cela n'allait pas fort... Ce n'est pas pour rien que nous t'avons surnommée « SOS doctorants en détresse ». Pour tout ce que tu as fait MERCI.

Hang, ma petite Toy-Toy, je ne peux malheureusement pas te faire l'accent en écrivant mais le cœur y est. Je vais beaucoup regretter nos séances papotages lorsque nous avions des manips qui n'en finissaient plus. Tu es une scientifique brillante et j'espère un jour être ne serait-ce que la moitié du chercheur que tu es. Je remercie bien évidemment ta moitié, **Guillaume** ou Gui-Gui pour les intimes. Merci pour toutes ces blagues et âneries que tu as pu nous raconter et qui ont parfois bien détendu l'atmosphère. Merci à tous les deux pour les conseils que vous avez su m'apporter, surtout pour la robe que je souhaitais mettre le jour de ma soutenance et les boucles d'oreille qui vont avec. Hang, je continuerai de t'envoyer des tenues de mes vêtements les plus « in », et toi Gui-Gui de mes boucles d'oreilles les plus originales!! Bon courage à vous deux et plein de belles choses avec le petit schtroumpf à venir.

Emilie V, ma petite Emilie jolie, les mots vont me manquer pour verbaliser l'ensemble des choses que je souhaiterais exprimer. Tu as été d'un soutien absolument merveilleux pendant ces quatre années et pas uniquement en ce qui concerne les Western Blot (dont tu es sans aucun doute la championne au labo!), mais également en ce qui concerne les nombreux doutes qui m'ont habité durant ces quatre années et que tu as su dissiper. Je me souviendrai pendant de nombreuses années de nos footings aux alentours du golf des volcans qui nous a valu une sortie de 2h pour cause de sens de l'orientation déplorable. J'embrasse également ma petite Jeanne et lui dit que j'ai bien gardé le collier de perles en bois qu'elle m'avait fait, il a trouvé sa place dans ma voiture et habille parfaitement mon rétroviseur. Avec Fabien, Jeanne et Lison, l'un des petits miracles de l'année 2013, je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Amélie, ma gazelle du désert, ma complice de cette dernière année de thèse, ahlala on s'est bien poilé ma grande !! Je te remercie pour ton soutien inconditionnel durant ces quatre années qui a atteint son maximum en 2014, tu as su m'écouter, rester jusqu'à 23h la veille de l'impression de la version finale de ma thèse. A qui je vais raconter mes blagues nulles et trouver un fou rire en retour ? Je vais partir le cœur plein de très bons souvenirs tels que nos vacances à Marrakech avec Lucie. Nos petits repas du midi l'une chez l'autre vont beaucoup me manquer tu sais. Qui sait...rendez-vous peut-être au Canada ;-). Et merci d'être venue me voir alors que ce n'était pas prévu pour me remonter le moral !

Adeline, ma petite maman, ces quatre années passées au laboratoire m'ont permises de côtoyer un petit bout de femme, petite par la taille mais grande par le caractère ! J'ai été ravie d'avoir eu l'occasion de te connaître un peu mieux dans le cercle privé. Je te remercie d'avoir pris le temps de m'écouter quand cela n'allait vraiment pas. Tu as été dans certaines situations vraiment très courageuse et avec une capacité de détachement que je t'envie. J'espère

Remerciements

vraiment qu'avec JB vous trouverez un équilibre professionnel tous les deux et je suis sûre qu'avec Maël le meilleur est à venir. PS : je ne t'en veux plus de m'avoir piqué mes clés pendant deux semaines alors que tout le monde pensait que je les avais encore perdues quelques part...cela a coûté la serrure de mon casier que l'on a dû couper à la pince !!!

Pierre, ou Pedro pour les intimes....c'est à dire tout le monde, merci d'avoir pris de ton temps pour passer toutes nos commandes de dernière minute. Au passage j'en profite pour remercier **Flodie**, notre secrétaire éphémère qui a su reprendre le flambeau l'espace d'une petite année. Même si ta paillasse voisine de la mienne «était souvent encombrée, la cohabitation ne fut pas si désagréable que cela. Bon courage pour la suite

Caroline, merci pour ta bonne humeur et la gaieté que tu as su apporter avec ton gilet jaune poussin. Merci également de t'être en partie occupé de l'achat des nouveaux équipements même si je suis persuadée que les discussions avec le commercial de chez... (pas de pub) pour l'appareil qPCR n'ont jamais été contraignantes.

J'adresse également mes remerciements aux post-docs que j'ai côtoyés depuis mon arrivée. Je pense tout d'abord à **Nico D**, dont j'étais la voisine de paillasse pendant mon M2. Nico D, je te remercie pour les conseils que tu m'as prodigués, la bonne humeur et l'amabilité dont tu as fait preuve.

Marga, ma petite calinetta, j'ai adoré ton passage au laboratoire. Tu as apporté tellement de bonne humeur. J'ai beaucoup regretté ton départ et nos soirées tapas. J'espère que tu t'épanouiras à Gironna avec Narcisse.

Estelle, arrivée en octobre 2013, tu as su rapidement t'intégrer de par ta sociabilité et ta gentillesse. Merci beaucoup pour les conseils que tu m'as donnés, pour avoir participé à ma recherche de post-doc (tu remercieras d'ailleurs ta petite sœur Amélie qui a su prendre du temps pour moi...). J'espère que tu trouveras rapidement un poste et que tout se passera pour le mieux en ce qui concerne ta vie privée.

Je remercie également la communauté des Assistants Ingénieurs qui ont au quotidien amélioré notre qualité de travail. **Michaël** et **Emilie C**, mes collègues de promo de l'IUT, quelle ne fut pas ma surprise quand je vous ai vu arriver au laboratoire, cette promo 2007 était vraiment un bon cru ! Une petite pensée particulière à Emilie C pour tes talents de couturière impressionnants et ta douceur. Je te souhaite bon courage à Nantes, qui est une très jolie ville et où je suis sûre que tu vas t'épanouir.

Virginie, la petite rouquine râleuse du labo, je suis encore une fois désolée d'avoir parfois été un peu envahissante et d'avoir souvent débordé sur ta paillasse...merci de l'avoir, dans la majorité des cas, pris avec bonne humeur.

Remerciements

Anaëlle, mon petit chat, j'ai beaucoup apprécié ta compagnie, ton sourire et ta bonne humeur, même si tu m'as « viré » de ma paillasse et me réclame de faire le tri dans mes affaires... au -20°C et -80°C !! Je suis sûre que notre petite collaboration du mois de juillet va être agréable.

Je remercie également les ATER qui ont séjourné au laboratoire, **Sandra**, **Seb** et **Amandine**. Je vous remercie pour vos conseils et votre bonne humeur au quotidien.

Sandra, je te remercie pour ces petites discussions que nous avons eu et qui ont meublé les surveillances d'examens que nous avons en commun et j'espère que tu t'épanouies dans ton rôle de maman.

Seb, ton arrivée dans le labo a été rythmée par de la bonne humeur, des soirées et de nombreuses discussions et je t'en remercie. Je te souhaite bon courage pour la suite, pour la recherche de post-doc, d'un poste et espère sincèrement que tu sauras t'épanouir dans ce que tu aimes...la microbio et la biomol.

Je remercie également l'ensemble de mes collègues Doctorants que j'ai côtoyé.

Jessica, nos petites « méchancetés gentilles » vont un peu me manquer je dois dire. Ces deux années de thèse t'ont quelque peu transformée et tu as beaucoup murie, je suis sûre que tout se passera bien pour toi, et...tout se décante en 3^{ème} et 4^{ème} années de thèse.

Rafaëlla, notre petite brésilienne, comme tu m'as fait de la peine cet hiver où tu étais obligée d'enfiler 3 ou 4 pantalons pour ne pas avoir froid, c'est à peine si tu ne manipulais pas avec ta doudoune. Malgré cela tu as su rester chaleureuse et je t'en remercie.

Charlotte, comme je te comprends et compatis à ce que tu vis parfois, les résultats négatifs qui s'enchaînent, mais ne te fais pas de soucis ce petit paquet de nœud se dénouera bientôt j'en suis sûre. Je te remercie pour la légèreté que tu as apportée au laboratoire.

Je remercie également **Jonathan**, pour son soutien, les pauses passerelle et les discussions statistiques jusqu'à 20h parfois. J'espère que tout ira bien pour toi et que tu trouveras ce que tu cherches.

Allison, mon petit ange, je ne compte plus le nombre de fois où je t'ai envoyé un sms le matin en panique pour que tu viennes me chercher car j'avais laissé ma voiture au labo la veille. Tu as été un petit rayon de soleil dès ton arrivée, bon un peu tout fou quand même, mais chaleureux. Tu as beaucoup mûri au cours de ces deux dernières années. Si je peux te donner un petit conseil de vieille doctorante...tout se fait, il faut juste respirer...et regarder un épisode des reines du shopping (ça vaut mieux que les petites crottouilles que tu regardes pour décompresser) !! Je suis sûre que tout se passera bien et te souhaite avec Johan, plein de bonnes choses et déjà un voyage en Grèce qui sera j'en suis sûre très reboostant.

Remerciements

Les stagiaires M2 du moment, **Gwladys** et **Alexis**, je vous souhaite à tous les deux de briller les 8 et 10 juillet. Ma petite Gwladys, merci pour ces bons moments décompression que tu m'as fait passer et nos petits « pétages de câble » dance floor ! Merci aussi pour ta bonne humeur. Au fait, je t'ai déjà dit que tu me faisais penser à ma sœur ? Alexis, même si tu as été plus discret, j'ai apprécié ta compagnie dans le bureau. Malgré cela je lègue mon bureau à Gwladys !

Je remercie nos Docs **Johan** alias Bright white, **Manu** alias notre 'doc' préféré et **Anthony** alias le fêtard. Merci pour les innombrables conseils que vous avez su nous prodiguer concernant la médecine.

Manu un merci tout particulier pour avoir égayé nos journées les 5 mois que tu as passé à temps plein avec nous. C'était un vrai bonheur et sache qu'en 2015 les taux d'intérêt vont augmenter de nouveau ;-)

Johan, nos longues discussions m'ont beaucoup intriguée mais ravie. Ce qui a surtout été plaisant c'était ce mercredi 18 juin où tu as enfin pu passer une soirée entière en notre compagnie !

Je remercie également le personnel qui nous a permis de travailler dans des conditions plus qu'agréables. Donc merci à **Marie-Pierre**, **Christine**, **Agnès**, **Laurent**, **Alix**, **Sandrine** et **Josette**.

Un merci également à l'ensemble des habitants du R3, **Julien**, **Antony**, **Lucie**, **Racha**, **Typhanie**. Une petite pensée plus particulière pour la future Australienne **Laëtitia** et ses jolis yeux bleus qui vont beaucoup me manquer

Je remercie l'intégralité de l'équipe des « voisins » et plus particulièrement **Damien** et **Nico** que j'ai côtoyé tout au long de ces quatre années et qui n'ont jamais hésité à s'arrêter au détour de la chambre froide pour papoter 5 minutes. Merci à vous tous. Je vous souhaite à tous les deux de belles aventures avec respectivement votre petite fille (Ana) et petit garçon (Gabin). J'en profite au passage pour adresser mes remerciements à **Sylvie**, quelle bonheur de voir à quel point tu as réussi ce que tu as entrepris. Tu es pour moi une sorte d'exemple car malgré une thèse pas toujours très facile tu as su t'épanouir en post-doc, même si cela n'a pas toujours dû être évident loin de Nico, le petit Gabin est je trouve une belle récompense de ta détermination et de ta motivation. Je vous souhaite à tous les trois tout le bonheur auquel vous avez droit. Et je te remercie surtout de m'avoir légué ton bureau et ta chaise qui sont au top !

Je remercie également **Nathalie**, pour ses nombreux conseils lors de mon stage IUT et par la suite au cours de mon cursus universitaire. Cela a été un vrai plaisir de travailler un peu avec toi sur le papier COX-2. Je suis sûre que tu vas

Remerciements

t'épanouir dans tes nouvelles fonctions à Paris. J'espère que le concert d'Indochine sera chouette !

Je remercie également **Fred**, pour m'avoir écoutée et soutenue, et aussi pour les pauses mots croisés du vendredi !

Benoît et **Emilie**, un gros merci à vous deux pour votre patience, vos conseils et vos mots réconfortants. Benoît, Ben', je suis contente d'avoir partagé ces 2 années de thèse avec toi. Tes conseils m'ont souvent beaucoup servi, tant sur le plan professionnel que personnel. Tu m'as souvent beaucoup dépanné, arrêté les manips que tu étais en train de faire pour me montrer comment fonctionnait l'appareil PCR ou encore quand il s'agissait de redémarrer ma voiture sur le parking de la fac ou lorsque j'étais en panne d'essence sur le trottoir, sans oublier les 3 semaines de kiné à raison de trois séance par semaine, ou avec Lucie vous avez assuré mon transport. Merci beaucoup pour tout le soutien que tu m'as apporté et vous souhaite à Emilie et toi que votre aventure soit la plus douce possible, ce dont je ne doute pas.

Jérémy, mon mimi, le plus frenchy des anglais. Tu m'as beaucoup manqué quand tu es parti à Cambridge. Tu as souvent été une épaule sur laquelle j'ai pleuré pour mes petits malheurs sur la passerelle et je t'en remercie ainsi que pour les pizzas chèvre/miel que nous dévorions certains soirs. Je pense que je n'oublierai jamais toutes les mimiques que tu faisais quand tu rédigeais ta thèse ou que tu montais tes figures ! Un truc que je ne t'envierai jamais je pense...ce sont tes western blot CEACAM6 (ne m'en veux pas). J'espère et je suis sûre que tout va se dérouler pour le mieux là-haut parmi les gens de ton peuple ! Et je t'attends de pied ferme le 27 !! Je te dis un immense MERCI d'avoir été là tout simplement.

Lucie, ma bichette, l'un des soutiens les plus forts que j'ai eu au cours de cette belle aventure. Même si au début tu me trouvais un peu ouèch ouèch toute droit sortie de la téci (moonnn diieuuu !), tu as appris à creuser un peu et nous voilà près de 5 ans après à nous écrire tous les jours et attendre jusqu'à 1h du matin pour faire un skype. Je m'excuse encore une fois pour mon agenda...tu comprendras ! Nous avons partagé beaucoup de choses mais les plus belles sont certainement les plus simples tels qu'un sms proposant une pause passerelle, la minute « on se plaint » ou un petit déjeuner place de Jaude avant d'aller au travail. Si en quelques mots je devais qualifier ces dernières années j'utiliserais : simplicité et efficacité. Je te remercie d'avoir toujours été là pour moi à n'importe quelle heure, d'avoir relu avec attention plusieurs parties de ma thèse pour les fautes d'orthographe notamment. Plus qu'une collègue j'ai trouvé une vraie amie et je te remercie de tout ce soutien que tu as su m'apporter au QUOTIDIEN. Des flots de mots ne suffiraient pas alors tout

Remerciements

simplement et sincèrement MERCI. J'en profite également pour remercier **Jacky** et **Michèle** pour leur gentillesse.

Je remercie également **Laurie** et **Marine**, mes collègues de L3-M1 et M2 pour m'avoir fait boire jusqu'à vomir lors des résultats de M2 ! Et aussi pour votre soutien ! J'espère que vous vous épanouirez toutes les deux.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à **Manu**, qui m'a coaché pendant mon stage de M1 et grâce à qui je suis devenue une fane inconditionnelle du SAV des émissions. Je te remercie d'avoir fait de moi la joueuse de bowling que je suis aujourd'hui...Gutter power ! Et surtout je te remercie pour ta bonne humeur et tes nombreux conseils qui m'ont souvent bien éclairée.

Je tiens tout particulièrement à remercier mes co-équipières de Pont-du-Château avec qui j'ai partagé de nombreuses années sur le praticable, la poutre, les barres et le saut. Je remercie tout particulièrement **Mandine** (la fayotte), **Kiki** (la persévérante) et **Lucie** (la piplette). Les filles si je pouvais comparer ce que je ressens à ce moment-là je dirais que c'est à peu équivalent à la première fois où on met un twist, une diago ou une souplesse flip en poutre....Merci les filles d'avoir été là toutes années sans faillir, j'arrête je vais pleurer. Je n'oublie bien évidemment pas mes coachs du 1^{er} jour **Ginette** et **Mireille** avec qui une complicité s'est installée dès mes jeunes années. C'est certainement un peu grâce à vous que je suis là aujourd'hui, grâce à vos « on ne lâche rien Snifette »... et je n'ai rien lâché, bon le 27 je ne peux pas vous garantir de serrer les abdos mais je ne lâcherai rien. Je remercie également **Fernande** et **Sandrine** qui ont su à un moment donné prendre le relai. Fernande il faut vraiment que je te le dise un jour et je profite de cette occasion...au début tu me faisais un peu peur... ;-). Merci beaucoup à toutes. Sur les bords de l'Allier...tout près du Puy-de-Dôme...lalalala...hé !!!

Je remercie également ma plus vieille amie qui m'a suivie depuis la 5^{ème} et que je n'ai jamais quitté, **Nelly**, Chounette, ma complice d'un jour et certainement de toujours. Tu m'as toujours soutenue durant toutes ces années (18 ans, notre relation fête bientôt sa majorité...champagne !!) je n'oublierais jamais nos mercredi après-midi blagounettes au téléphone ! Ces dernières années ne t'ont pas épargnée mais tu t'en es sortie avec brio et je suis très fière de toi. Je te remercie pour toutes ces années de fidélité, de soutien, de fous rires et d'amitié tout simplement.

Je souhaiterai également adresser mes remerciements à mon binôme d'IUT **Julie**, que personne n'aurait soupçonné voir soutenir sa thèse, mais j'ai toujours cru en toi. Je te remercie de m'avoir très souvent donné le sourire en cours et autre. Ma deuxième année d'IUT est certainement l'une des meilleures que j'ai

Remerciements

passé et c'est grâce à toi. Je te remercie pour toutes les belles choses que tu m'as apportées et la franchise qui te caractérise.

Céline et **Rémy**, je vous remercie également pour votre simplicité, vous avez fait de chaque soirée passée ensemble un véritable moment de pur bonheur. Par contre ne comptez plus sur moi pour aspirer votre moquette ! Je vous remercie tous les deux et vous souhaite plein de belles choses.

Je remercie **Marion** et **Christophe**, et mon petit **Elouen** qui est depuis ce 4 janvier un vrai rayon de soleil....Merci pour votre soutien, vos paroles réconfortantes et merci d'avoir été là. Les déjeuners que nous avons partagés lors de la rédaction et la préparation de thèse m'ont beaucoup aidée à me changer les idées.

J'adresse également mes remerciements à la team Corrèze Freeride et plus particulièrement **Flo**, **Yannick**, le **Vialle** et **Julien** ! Merci les garçons, les week-ends où nous rentrions étaient de vrais moments de décompression et pour cela merci beaucoup. Et je remercie plus particulièrement Flo et le Vialle pour vos nombreuses visites Clermontoises. Merci aussi à **Marichou** pour nous avoir conviés avec Yannick à partager vos séjours en Dordogne. Je remercie également **Bob** et **Valérie** pour leur bonne humeur.

Je remercie également l'ensemble des personnes qui m'ont vu grandir et m'épanouir. Merci à **Thierry** mon parrain et sa femme **Pascale**, **Foufou** et **Pat**, **Grand-Jacques** et **Cathy**. Merci à vous.

Je remercie également **Micha**, mon loulou, mon ronflosaure, fidèle membre de Corrèze Freeride, qui a intégré cette aventure en début de deuxième année et qui a su m'épauler, m'écouter et surtout me consoler au quotidien. Merci pour tout ton soutien, même si sur la fin cela t'a fait faire du mauvais sang. Merci d'être toujours venu avec moi les soirs tard et week-ends au labo, tu n'étais pas obligé de t'impliquer autant mais tu l'as fait. Et j'espère que tu ne regrettes pas ces fameux quatre mois...Un grand merci pour TOUT. Merci d'avoir partagé cette belle aventure et de l'avoir rendue bien plus douce et palpitante.

C'est un peu émue que j'adresse enfin mes remerciements à l'ensemble des personnes qui m'ont accompagnée depuis mon plus jeune âge et sans qui, indubitablement, je ne serais parvenue jusqu'ici. C'est ainsi que je remercie tout d'abord mes parents pour leur soutien infaillible, leur écoute et tout leur amour. Vous m'avez toujours soutenue tout au long de ces années et je vous en remercie. Je vous remercie de l'amour que vous m'avez apporté. **Maman**, merci d'avoir toujours été là quand j'avais besoin, pour mes coups de blues, mes craintes, mes doutes, merci aussi pour ma robe de thèse (mais c'est autre

Remerciements

chose !!). **Papa**, malgré certains désaccords je te remercie de m'avoir également toujours soutenue et aimée. Cindy (**Nini**) et Yannick (**Kanou**) je vous remercie pour tout l'amour fraternel que vous m'avez témoigné tout au long de ces années. Même si au cours de certaines années la discorde régnait, je suis fière du lien qui nous unit.

Enfin, merci à toi qui t'es arrêté(e) au détour d'un couloir ou d'une pause-café dans le but de chercher un renseignement au sein de ma prose ou tout simplement pour lire les pages que nous lisons tous en 1^{er}...celles des remerciements.

Sommaire

Résumé	1
Liste des abréviations	2
Index des figures	6
Index des tableaux	8
Introduction	9

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le cancer colorectal	11
I.1 Généralités sur le cancer colorectal.....	11
I.1.1 Epidémiologie	11
I.1.2 Facteurs pronostiques	12
I.1.2.1 Facteurs histopathologiques.....	12
I.1.2.2 Facteurs moléculaires et cellulaires	13
Phénotype MSI.....	13
ACE ou CEACAM5.....	13
CEACAM6.....	14
I.1.3 Traitements.....	14
I.1.3.1 Cancers du côlon de stade TNM I et II.....	15
I.1.3.2 Cancers du côlon de stade TNM III et IV	15
I.1.4 Cancer du rectum	16
I.2 Etiologies des cancers colorectaux.....	16
I.2.1 Les cancers colorectaux d'origine héréditaire.....	16
I.2.1.1 La polypose adénomateuse familiale	17
I.2.1.2 Le cancer héréditaire sans polype	18
I.2.2 Les cancers colorectaux sporadiques	18
I.2.2.1 Syndrome métabolique et obésité	19
I.2.2.2 Consommation d'alcool	20
I.2.2.3 Tabagisme actif.....	20
I.2.2.4 Alimentation et cancer colorectal	21

I.2.3	Les cancers colorectaux associés aux MICI et survenant chez les patients atteints de pathologies inflammatoires des voies biliaires	22
I.3	La séquence adénome-cancer	23
I.3.1	Généralités sur l'épithélium intestinal et son renouvellement	24
I.3.1.1	Organisation de l'épithélium intestinal	24
I.3.1.2	Le renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal.....	25
I.3.2	De l'épithélium normal au carcinome : évènements cellulaires.....	26
I.3.3	De l'épithélium normal au carcinome : évènements moléculaires.....	27
I.3.3.1	Séquence mutationnelle et perte d'hétérozygotie	27
I.3.3.2	Instabilité microsatellitaire et modifications épigénétiques.....	28
II.	Inflammation et cancer colorectal	30
II.1	Généralités.....	30
II.2	Rôle des macrophages dans la carcinogenèse colorectale.....	31
II.2.1	Recrutement des macrophages au site tumoral	31
II.2.2	Implication des macrophages dans la carcinogenèse colorectale.....	32
II.2.3	Potentiels anti- ou pro-tumoral des macrophages associés aux tumeurs	33
II.3	COX-2/PGE2 et cancer colorectal	34
II.3.1	Cyclo-oxygénases et prostaglandines.....	34
II.3.2	Implication de COX-2 dans la carcinogenèse colorectale.....	36
II.3.3	Implication de PGE2 dans la carcinogenèse colorectale.....	37
II.3.3.1	COX-2/PGE2 : mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogenèse colorectale	39
	Stimulation de la prolifération cellulaire.....	39
	Propriétés anti-apoptotiques	39
	Stimulation de l'angiogenèse et la migration cellulaire	40
	PGE2 et macrophages associés aux tumeurs.....	41
III.	Microbiote intestinal et cancer colorectal	43
III.1	Dérégulation des mécanismes de défense de l'hôte dans le CCR.....	44
III.1.1	Les récepteurs de l'immunité innée dans le cancer colorectal	45
III.1.1.1	TLRs et cancer colorectal	45
III.1.1.2	NLRs et cancer colorectal	46
III.1.2	Fonction de barrière de l'épithélium intestinal et cancer colorectal	48
III.1.2.1	Barrière physique	48
III.1.2.2	Barrière chimique.....	49

Le mucus	49
Les peptides antimicrobiens	50
III.2 Dysbiose et cancer colorectal	51
III.2.1 Implication du microbiote dans la carcinogenèse colorectale.....	51
III.2.2 Altération de la composition du microbiote intestinal	51
III.2.3 Origine inflammatoire du microbiote dysbiotique chez les patients atteints de CCR.....	53
III.3 Piste infectieuse dans le développement de cancer colorectal	53
III.3.1 Modifications fonctionnelles du microbiote et cancer colorectal	54
III.3.1.1 Activité β -glucuronidase	54
III.3.1.2 Activité 7 α -dehydroxylase	55
III.3.1.3 Butyrate.....	55
III.3.2 Bactéries intestinales carcinogènes	56
III.3.2.1 <i>Bacteroides fragilis</i>	57
Inflammation	58
Prolifération et résistance à l'apoptose.....	59
III.3.3 <i>Streptococcus gallolyticus</i> sous-espèce <i>gallolyticus</i>	59
Inflammation	60
Prolifération cellulaire.....	60
III.3.3.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	61
Inflammation et prolifération cellulaire	61
Production de composés génotoxiques	61
III.3.3.2 <i>Fusobacterium nucleatum</i>	62
III.3.3.3 <i>Escherichia coli</i>	64
Diversité des souches et pathogénécité	64
Les <i>E. coli</i> pathogènes intestinaux	65
Les <i>E. coli</i> entéropathogènes et entérohémorragiques (EPEC et EHEC)	65
Les <i>E. coli</i> entérotoxinogènes (ETEC).....	66
Les <i>E. coli</i> entéroinvasifs (EIEC).....	67
Les <i>E. coli</i> entéoaagregatifs producteurs ou non de Siga-toxines (EAEC et STEAEC)	68
Les <i>E. coli</i> a adhésion diffuse (DAEC)	69
Les <i>E. coli</i> adhérents et invasifs (AIEC)	69
Les <i>E. coli</i> pathogènes extra-intestinaux (ExPEC)	70

<i>E. coli</i> et carcinogenèse colorectale	72
Inflammation	72
Potentiel génotoxique	73
Implication de la colibactine	73
Implication de CDT	74
Implication de Cif.....	75
Implication d’EspF	75
Prolifération cellulaire	76
Résistance à l’apoptose	77

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Présentation des résultats	78
----------------------------------	----

<u>Partie 1</u> : Capacité de souches d' <i>Escherichia coli</i> isolées de patients atteints de cancer du côlon et appartenant au phylogroupe B2 à coloniser la muqueuse intestinale et à promouvoir la prolifération cellulaire	79
---	----

Introduction à la publication n°1	80
---	----

Publication n°1	82
-----------------------	----

Commentaires de la publication n°1	89
--	----

<u>Partie 2</u> : Réplication intramacrophagique de souches d' <i>Escherichia coli</i> associées au cancer du côlon et expression de la cyclo-oxygénase pro-tumorale COX-2.....	92
---	----

Introduction de la publication n°2	93
--	----

Publication n°2	94
-----------------------	----

Commentaires de la publication n°2	112
--	-----

DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	116
--	------------

CONCLUSION	27
-------------------------	-----------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	128
--	------------

ANNEXES

Annexe 1 : High prevalence of mucosa-associated <i>E. coli</i> producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer	146
---	-----

Annexe 2 : Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer	152
--	-----

Annexe3 : Carcinogénèse colorectale : impact des bactéries toxigènes ou pro-inflammatoires.....	159
---	-----

Résumé

Le cancer colorectal (CCR) est au 3ème rang des cancers les plus répandus dans le monde. Il est bien établi que l'inflammation est un acteur clé de la carcinogenèse colorectale. Parmi les cellules de l'infiltrat inflammatoire tumoral, les macrophages jouent un rôle moteur dans la carcinogenèse en sécrétant un arsenal de cytokines/chimiokines et facteurs pro-tumoraux tels que la prostaglandine E₂ (PGE₂), produit enzymatique de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2). Des dysbioses du microbiote intestinal, en particulier une augmentation d'*Escherichia coli* (*E. coli*) appartenant au phylogroupe B2 et producteurs de cyclomodulines ont été rapportées chez les patients atteints de CCR. Mon doctorat s'inscrit dans la caractérisation du potentiel carcinogène de souches d'*E. coli* B2 isolées de patients atteints de CCR, et ceci notamment au travers de leur interaction avec les macrophages, principale population de l'infiltrat inflammatoire tumoral.

La caractérisation de souches d'*E. coli* de phylogroupe B2 isolées de patients atteints de CCR a révélé qu'elles possèdent de faibles capacités d'adhésion et d'invasion aux cellules épithéliales intestinales comparativement à la souche adhérente et invasive d'*E. coli* LF82. En revanche, les *E. coli* associés au CCR sont capables d'induire l'expression du récepteur CEACAM6 par les cellules épithéliales coliques humaines T-84. Nous avons également montré que la souche d'*E. coli* 11G5 associée au CCR est capable, dans un modèle murin d'infection chronique exprimant CEACAM6, de coloniser la muqueuse colique, d'induire une inflammation colique et des dommages épithéliaux, ainsi qu'une augmentation de la prolifération cellulaire, suggérant que les *E. coli* associés au CCR pourraient participer à l'établissement d'un épithélium hyperprolifératif. Par ailleurs, nous avons montré que les *E. coli* isolés de patients atteints de CCR sont capables de survivre en macrophages humains THP-1, suggérant que les macrophages pourraient représenter un niche de réplication pour ces bactéries. Les souches d'*E. coli* isolées de CCR sont capables d'induire des niveaux de COX-2 significativement supérieur à celui induit par une souche de la souche d'*E. coli* commensale ED1a. L'expression de COX-2 induite par les souches d'*E. coli* associées au CCR est dépendante du nombre et de la viabilité des bactéries internalisées. Enfin, l'analyse des voies de signalisation a révélé que la voie de signalisation p38 permet de contrôler le nombre de bactéries intracellulaires et l'expression de COX-2, suggérant que cette voie de signalisation pourrait être impliquée dans la survie et la multiplication des *E. coli* associés au CCR.

Ce travail de thèse a contribué à une meilleure caractérisation des souches d'*E. coli* associés au cancer du côlon et à ouvert de nouvelles pistes sur la compréhension de leur capacité à influencer la carcinogenèse colorectale. Plus largement, ces données suggèrent que les bactéries associées aux tumeurs pourraient jouer un rôle actif dans la progression tumorale, et ceci notamment au travers de leur interaction avec les macrophages. En plus d'être une cible, le tropisme particulier des *E. coli* associés au CCR pour les macrophages en ferait de bons candidats pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Liste des abréviations

AA : acide arachidonique
AAEC : attaching and effacing *Escherichia coli*
AAF : aggregative adherence fimbriae
A/E : attachement-effacement
Afa : Adhésines afimbriales
AINS anti-inflammatoire non stéroïdien
ADN : acide desoxyribonucléique
ACE : antigène carcino-embryonnaire
AIEC : adherent-invasive *Escherichia coli*
APC : adenomatous polyposis coli
ARN : acide ribonucléique
ARP2/3 : actin-related protein 2/3
AOM : azoxyméthane

BCL-2 : B-cell lymphoma 2
BFP : bundle forming pili
BFT : *Bacteroides fragilis* toxin

CAC : colitis associated colorectal cancer
CBC : crypt base columnar
CCL : chemokine ligand
CCR : cancer colorctal
CDT : cytolethal distending toxin
CDKi : cyclin-dependent kinase inhibitor
CEACAM : carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule
Cellule M : cellule Microfold
CF : facteur de colonisation
cIAP2 : cellular inhibitor of apoptosis protein 2
Cif : cycle inhibiting factor
CNF : cytotoxic necrotizing factor
CSF-1 : colony stimulating factor
CSP : cholangite sclérosante primitive
CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
COX : cyclooxygénase

DAEC : diffusely-adhering *Escherichia coli*
DAF : decay-accelerating factor
DCA : acide désoxycholique
DMH : diméthylhydrazine
DSS : dextran sulfate sodium

EAEC : enteroaggregative *Escherichia coli*
EAST1 : enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin
ECP : *Escherichia coli* common pilus
Efa-1 : *Escherichia coli* factor for adherence
EibG : *E. coli* immunoglobulin-binding protein
EIEC : enteroinvasive *Escherichia coli*
EHEC : enterohemorrhagic *Escherichia coli*

Liste des abréviations

EhaA : enterohemorrhagic *Escherichia coli* autotransporter encoding gene
EPEC : enteropathogenic *Escherichia coli*
EspFU : *Escherichia coli* secreted protein F in prophage U
ETBF : enterotoxinogenic *Bacteroides fragilis*
ETEC : enterotoxinogenic *Escherichia coli*
Etpa :ETEC autotransporter A

EXO1 : exonuclease 1

FGF : fibroblaste growth factor
FIP : fusobacterial immunosuppressive protein
FSH : follicle-stimulating hormone

GC-C : guanylate cyclase-C
GM-CSF : granulocytes colony stimulating factor

HCP : Hemorrhagic *coli* pilus
HIF α : hypoxia-inductible factor 1 alpha
HlyA : hémolysine A
4-HNE : 4-Hydroxy-2-Nonenal
HNP : human neutrophile peptide
HNPCC : hereditary non polyposis colorectal cancer

IBC : intracellular bacterial community
IL : interleukine
INF- γ : interféron gamma
IRTKS : insulin receptor tyrosine kinase substrate

KGF2 : keratinocyte growth factor 2
KO : knock-out
K-RAS : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LCA : acide lithocholique
LH : luteinizing hormone
LPF : long polar fimbriae
LPS : lipopolysaccharide
LOH : loss of heterozygoty
LT : thermolabile enterotoxin

MA : mucinous adenocarcinoma
MAM : méthylazoxyméthanol
Map : mitochondrial-associated protein
MC : maladie de Crohn
MCP-1 : monocyte chemotactic protein-1
M-CSF : macrophages colony stimulating factor
miARN : microARN
MCI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin
MIP-2 : macrophages inflammatory protein 2
MMP : métalloprotéase
MNEC : neonatal meningitis *Escherichia coli*

Liste des abréviations

MPO : myéloperoxydase
MSI : microsatellite instability
MSI-H : high frequency microsatellite instability
MSI-L : low frequency microsatellite instability

NF- κ B : nuclear factor-kappa B
NHE3: Na⁺/H⁺ exchanger 3
NK : natural killer
NleA: non-LEE-encoded effector
NLR : NOD-like receptor
NNK : 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
NO : monoxyde d'azote
NRP : non ribosomal protein
NRPS : non ribosomal protein synthase
N-WASP : neural Wiskott–Aldrich syndrome protein

OmpA : outer protein membrane A
OMV : outer membrane vesicle

Paa : porcine attaching and effacing associated adhesin
PAF : polypose adénomateuse familiale
PAMP : pathogens associated molecular pattern
PCNA : proliferating cell nuclear antigen
Pet : plasmide-encoded toxin
PG : prostaglandine
15-PGDH : 15-hydroxyprostaglandine déshydrogénase
PK : polyketide
PKS : polyketide synthase
PMN : polymorphonuclear leukocyte
PRR : pattern recognition receptor

RCH : rectocolite hémorragique
RTX : Repeats in toxin

Saa : Shiga-toxin producing *Escherichia coli* autoagglutinating adhesion
Sat : secreted autotransporter toxin
ShET : *Shigella* enterotoxin
SIGIRR : single immunoglobuline IL-1R-related molécule
SMO : spermine oxydase
SST3 : système de sécrétion de type III
STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3
Stx : Shiga-toxin

TccP : translocated intimine receptor cycloskeleton-coupled protein
TGF- β : transforming growth factor beta
TiA : Toxigenic invasion loci A
Tir : Transmembrane intimine receptor
TJ: tight junction
TLR : Toll-like receptor
TNF- α : tumor necrosis factor alpha

Liste des abréviations

TNM : tumor nodes and metastasis

TP53 : tumor protein gene p53

TS : thermostable enterotoxin

UDCA : acide ursodeoxycholique

UPEC : uropathogenic *Escherichia coli*

VEGF : vascular endothelial growth factor

ZO : zonula occludens

Index des figures

Figure 1 : Incidence et mortalité du cancer colorectal dans le monde.

Figure 2 : Répartition des différentes formes de cancers colorectaux.

Figure 3 : Voie de signalisation Wnt/ β -caténine.

Figure 4 : Paroi intestinale de l'intestin grêle.

Figure 5 : Représentation schématique de la structure de l'épithélium intestinal.

Figure 6 : Organisation et renouvellement cellulaire des cryptes intestinales.

Figure 7 : Implication du gradient de signalisation Wnt dans la prolifération la différenciation des cellules épithéliales intestinales.

Figure 8 : Foyers de cryptes aberrantes.

Figure 9 : Séquence adénome-cancer chez les patients atteints de cancers colorectaux sporadique et associés à une colite.

Figure 10 : Implication des oncomiRs et miARNs suppresseurs de tumeurs dans le cancer colorectal.

Figure 11 : Rôle de l'inflammation sur la carcinogenèse colorectale.

Figure 12 : Recrutement et polarisation des macrophages dans le microenvironnement tumoral.

Figure 13 : Polarisation des macrophages.

Figure 14 : Synthèse des prostaglandines et du thromboxane.

Figure 15 : Rôle de COX-2/PGE₂ dans la prolifération cellulaire et l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs.

Figure 16 : Rôle de COX-2/PGE₂ dans la résistance à l'apoptose.

Figure 17 : Rôle de COX-2/PGE₂ dans l'angiogenèse.

Figure 18 : Rôle de COX-2/PGE₂ dans la migration cellulaire et l'invasion tumorale.

Figure 19 : Composition et concentration des espèces microbiennes dominantes dans les différentes régions du tractus gastro-intestinal humain.

Figure 20 : Activation des récepteurs de l'immunité innée TLR et NLR par des ligands bactériens.

Figure 21 : Activation des NLRs par des composés bactériens.

Figure 22 : Jonctions cellulaires de l'épithélium intestinal.

Figure 23 : Modèle « driver-passenger » dans le cancer colorectal.

Figure 24 : Structure de la toxine de *Bacteroides fragilis* (BFT).

Figure 25 : Rôle pro-inflammatoire et pro-tumoral de *Bacteroides fragilis*.

Figure 26 : Rôle pro-inflammatoire et pro-tumoral de *Streptococcus gallolyticus*.

Figure 27 : Rôle pro-inflammatoire et génotoxique d'*Enterococcus faecalis*.

Figure 28 : Implication de *Fusobacterium nucleatum* dans la carcinogenèse colorectale.

Figure 29 : Tropisme des différents pathovars d'*Escherichia coli*.

Figure 30 : Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC).

Figure 31 : Mécanisme d'action de la Shiga-toxine.

Figure 32 : Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* entérotoxigènes (ETEC).

Figure 33 : Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* entéroinvasifs (EIEC).

Figure 34 : Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* entéroaggrégatifs producteurs ou non de Shiga-toxine (EAEC et STEAEC) et à adhésion diffuse (DAEC).

Figure 35 : Caractéristiques phénotypiques des *E. coli* adhérents et invasifs associés à la maladie de Crohn.

Figure 36 : Facteurs de virulence identifiés chez les bactéries AIEC associées à la maladie de Crohn permettant leur adhésion à l'épithélium iléal.

Figure 37 : Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* uropathogènes (UPEC) et à l'origine de méningites néonatales (NMEC).

Figure 38 : Organisation de l'îlot génomique *pks*.

Figure 39 : Organisation des mégasynthèses d'une chaîne d'assemblage.

Figure 40 : Mécanisme d'action de la cyclomoduline colibactine.

Figure 41 : Contrôle du cycle cellulaire par la cyclomoduline CDT.

Figure 42 : Mécanisme d'action de la cyclomoduline Cif.

Figure 43 : Mécanisme d'action de la cyclomoduline CNF.

Figure 44 : Expression de CEACAM6 et colonisation par des *E. coli* chez les patients atteints de CCR.

Figure 45 : Capacité de survie et de réplication en macrophages des *E. coli* associés au CCR appartenant aux phylogroupes A, D, B1 et B2.

Figure 46 : Expression de facteurs pro-tumoraux par les macrophages infectés par la souche d'*E. coli* 11G5 associée au CCR.

Index des Tableaux

Tableau 1: Classification TNM.

Tableau 2 : Critères d'Amsterdam I et II.

Tableau 3: Etudes de la composition des microbiotes intestinaux chez des patients atteints de CCR.

Introduction



Actuellement, le cancer colorectal (CCR) se place au 3^{ème} rang des cancers chez l'homme, derrière celui de la prostate, et au 2nd rang chez la femme derrière celui du sein. Dans le monde, 1,2 million de nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année et il est responsable d'environ 600 000 décès chaque année. L'accumulation de mutations et de modifications épigénétiques sont à l'origine de la transformation d'un épithélium normal en carcinome colorectal en passant par des stades d'épithélium hyperprolifératif, d'adénomes précoces et tardifs. La chronologie de ces événements, décrite par Fearon et Vogelstein, a été nommée séquence adénome-cancer et s'étend sur 10 à 15 ans d'évolution (Fearon and Vogelstein, 1990). Plus de 90% des cas de CCR sont d'origine sporadique et surviennent chez des personnes ayant peu ou pas d'antécédents familiaux, ce qui montre l'importance des facteurs environnementaux dans son développement. Certains facteurs de risque tels que l'alimentation et le tabagisme ont été identifiés. De plus, un lien fort entre inflammation et développement de CCR a clairement été établi. Enfin, des dysbioses du microbiote intestinal ont été mises en évidence chez les patients atteints de CCR mettant notamment en évidence une surreprésentation anormale de bactéries appartenant aux espèces *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum* et *Escherichia coli* productrices de génotoxines/cyclomodulines.

Les macrophages sont des acteurs cellulaires à part entière de la carcinogenèse. Ils représentent la population majeure de l'infiltrat inflammatoire tumoral. Au sein du microenvironnement tumoral, les macrophages peuvent présenter des fonctions anti- ou pro-tumorales, ces dernières incluant la promotion de la prolifération et de la survie des cellules malignes, le remodelage de la matrice extracellulaire facilitant l'invasion tissulaire et la stimulation de l'angiogenèse. L'orchestration des activités pro-tumorales des macrophages est assurée par certains acteurs clés tels que la cyclooxygénase COX-2 et son produit de synthèse la prostaglandine E₂ (PGE₂). La plasticité fonctionnelle des macrophages est directement liée à la nature des stimuli auxquels ils sont confrontés. Si l'on considère les bactéries colonisant les tissus tumoraux en tant qu'entité du microenvironnement tumoral, celles-ci pourraient être capables de moduler l'état fonctionnel d'activation des macrophages et donc d'influencer la carcinogenèse.

La première partie de ce manuscrit est une synthèse bibliographique s'articulant autour de trois chapitres. Un premier chapitre introduit le CCR, la séquence adénome-cancer et les facteurs étiologiques et de risque associés au CCR. Un second chapitre est consacré au rôle de

l'inflammation et plus particulièrement des macrophages et de COX-2/PGE₂ dans la carcinogenèse colorectale. Enfin, dans un dernier chapitre sont synthétisées les données actuelles sur le microbiote intestinal et les espèces bactériennes associées au CCR, à potentiel oncogénique.

Les résultats de mon travail de doctorat sont exposés dans la seconde partie du manuscrit sous forme de commentaires d'article. L'objectif d'un premier article était la caractérisation de souches d'*E. coli* isolées de patients atteints de CCR. Nous avons plus particulièrement étudié leur interaction avec les cellules épithéliales intestinales *in vitro* (adhésion, invasion, formation de biofilm, induction de l'expression du récepteur CEACAM6), et leur capacité à coloniser la muqueuse intestinale, à promouvoir l'inflammation et la prolifération cellulaire *in vivo* dans un modèle d'infection chronique. Un deuxième travail a été consacré à l'étude de l'interaction de souches d'*E. coli* associées au CCR avec les macrophages. En particulier, nous avons analysé la capacité des souches d'*E. coli* à résister à l'activité bactéricide des macrophages et à moduler l'expression de facteurs pro-tumoraux tels que la COX-2.

Enfin, dans une troisième partie, l'ensemble des résultats sera discuté et des perspectives à l'ensemble de ce travail seront proposées.

Synthèse
Bibliographique



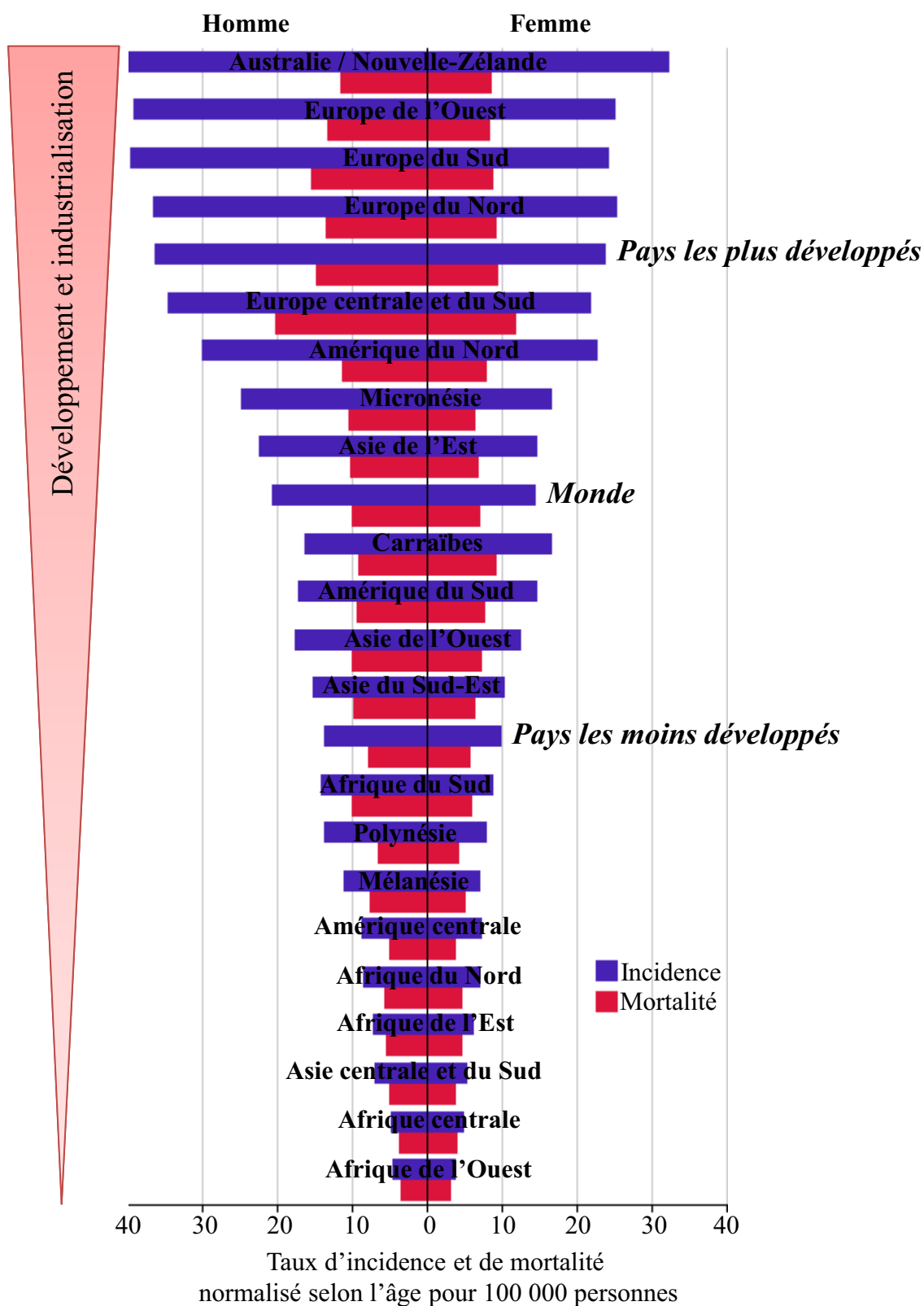


Figure 1 : Incidence et mortalité du cancer colorectal dans le monde.

Les taux d'incidence (en bleu) et de mortalité (en rouge) sont exprimés pour 100 000 personnes et sont plus élevés dans les pays industrialisés comparativement aux pays en voie de développement.

(Modifiée d'après le Globocan 2012, <http://globocan.iarc.fr>)

I. Le cancer colorectal

I.1 Généralités sur le cancer colorectal

Les cancers colorectaux (CCR) sont, dans 98% des cas, des adénocarcinomes, c'est-à-dire qu'ils proviennent de la transformation maligne des cellules épithéliales de la muqueuse colique et plus particulièrement des glandes (*adéno*) de Lieberkühn.

I.1.1 Epidémiologie

Avec une incidence, en Europe, de 446 800 nouveaux cas par an et un taux de mortalité de 12.2% en 2012, le cancer colorectal (CCR) est le 3ème cancer chez l'homme, après le cancer de la prostate et du poumon, et le second chez la femme, après le cancer du sein (Ferlay *et al.*, 2013). L'incidence et le taux de mortalité par cancer colorectal varient de manière importante selon la localisation géographique. Il est plus fréquent dans les pays industrialisés tels que l'Amérique du Nord, l'Australie, la Nouvelle-Zélande et dans certaines parties de l'Europe qu'en Afrique ou en Asie (Institut de veille sanitaire, 2013) (**Figure 1**). Ces différences peuvent s'expliquer par l'alimentation, le mode de vie et les facteurs héréditaires. En Europe, l'incidence ne varie pas de manière très importante entre les différents pays mais la France est l'un des pays où l'incidence du cancer colorectal est la plus élevée pour les deux sexes. Ainsi, 41 820 nouveaux cas et 4770 décès ont été répertoriés pour l'année 2012, avec une incidence plus élevée pour les hommes (Ferlay *et al.*, 2013). Une diminution de l'incidence et de la mortalité a été observée depuis 1980 avec une stabilisation au cours de l'année 2005, similaire à celle observée pour les Etats-Unis (Institut de veille sanitaire, 2013).

En France, l'accès au dépistage s'est beaucoup amélioré au cours de cette dernière décennie. Ce programme de dépistage contre le cancer colorectal propose des tests de détection de sang dans les selles (Hémocult®) tous les deux ans aux personnes de plus de 50 ans puisque l'âge est un facteur de risque. Une coloscopie complète doit être pratiquée lorsque le test Hémocult® est positif. Les personnes présentant un risque élevé de développer un cancer colorectal, à savoir les personnes ayant des antécédents d'adénomes colorectaux et/ou

Tableau 1 : Classification TNM.

Dans cette classification sont répertoriés les critères recherchés pour l'évaluation de l'extension locale de la tumeur (T), l'extension ganglionnaire (N) et l'extension métastatique viscérale (M).

(Modifié d'après l'UICC/AJCC)

T (Tumor) – Tumeur primitive

Tx	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
T0	Pas de signe de tumeur primitive
Tis	Carcinome <i>in situ</i> : intra-épithélial ou envahissant la <i>lamina propria</i>
T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
T2	Tumeur envahissant la musculuse
T3	Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péri-coliques ou péri-rectaux non péritonéalisées
T4	Tumeur envahissant directement d'autres organes ou d'autres structures et/ou perforant le péritoine viscéral T4a : Tumeur perforant le péritoine viscéral T4b : Tumeur envahissant directement d'autres organes ou d'autres structures

N (Nodes) – Extension ganglionnaire

Nx	Renseignements insuffisants pour classer les ganglions lymphatiques régionaux
N0	Pas de métastase ganglionnaire régionale
N1	Métastases dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux N1a : Métastases dans 1 seul ganglion régional N1b : Métastases dans 2 à 3 ganglions régionaux N1c : Nodules tumoraux (c'est-à-dire satellites) dans la sous-séreuse ou dans les tissus mous non péritonéalisées péri-coliques ou péri-rectaux sans atteintes ganglionnaire lymphatique
N2	Métastases dans 4 ou moins ganglions lymphatiques régionaux N2a : Métastases dans 4 à 6 ganglions lymphatiques régionaux N2b : Métastases dans 7 ou plus ganglions lymphatiques régionaux

M (Metastasis) – Extension métastatique

M0	Pas de métastase à distance
M1	Présence de métastases à distance M1a : Métastases dans un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s) non régional(aux)) M1b : Métastases dans plus d'un organe ou dans le péritoine

ayant un parent au premier degré atteint de CCR avant l'âge 65 ans se voient proposer une coloscopie dès 45 ans (Institut de veille sanitaire, 2013).

I.1.2 Facteurs pronostiques

De nombreux facteurs tels que par exemple l'âge, le sexe, le statut TNM (Tumor Nodes and Metastasis), les taux sériques de l'albumine, de la protéine réactive C, de l'antigène carcino-embryonnaire (ACE ou CEACAM5, Carcinoembryonic Antigen Cell Adhesion Molecule 5) ou les complications post-opératoires influencent le pronostic d'un cancer colorectal. Néanmoins, le facteur pronostique le plus important reste le stade d'avancement de la maladie au moment du diagnostic déterminé notamment grâce au stade TNM.

I.1.2.1 Facteurs histopathologiques

Ils correspondent aux facteurs pronostiques identifiés sur la tumeur elle-même, le plus souvent après résection chirurgicale de la tumeur. Plusieurs facteurs histopathologiques sont décrits tels que l'invasion lymphatique, veineuse et péri-neurale, le bourgeonnement tumoral, le grade tumoral et le statut TNM. Dans cette partie, nous décrirons seulement le statut TNM, qui correspond au facteur histopronostique de référence sur laquelle repose le traitement du cancer colorectal (Edge and Compton, 2010).

La classification TNM des CCR est actualisée régulièrement par « The American Joint Committee on Cancer ». Elle décrit l'extension anatomique des cancers en séparant l'extension tumorale (T, Tumor), le statut ganglionnaire (N, Nodes) et le statut métastatique (M, Metastasis) à l'aide d'indices numériques croissants. Ainsi sont répertoriés 5 niveaux d'envahissement de la paroi du côlon (T0 ou Tis pour T *in situ*, T1, T2, T3, T4), 3 niveaux d'extension ganglionnaire (N0, N1, N2) et la présence ou non de métastases (M0, M1) (**Tableau 1**). Quatre stades tumoraux sont alors définis en fonction de ce statut TNM, avec chacun une survie à 5 ans et un risque de récurrence (Adloff *et al.*, 1989).

En fonction de l'envahissement local (T), la survie à 5 ans est de l'ordre de 100% pour les tumeurs Tis, 90 à 95% pour les tumeurs T1 et T2, 85% pour les T3 et 72% pour les T4

(O'Connell *et al.*, 2004). Il est difficile de chiffrer l'impact sur la survie qu'implique la présence de métastases ganglionnaires, notamment parce que tout patient N+ (N1 ou N2) reçoit une chimiothérapie adjuvante, ce qui n'est pas forcément le cas des patients N- (N0) (Moertel *et al.*, 1990; Wolmark *et al.*, 1993). Cependant, on peut estimer que les taux de survie à 5 ans chutent de 70-85% pour les patients N- à 27-42% pour les patients N+, et le nombre de ganglions envahis constitue également un facteur pronostique, puisque l'envahissement N2 fait chuter de 20% la survie à 5 ans, indépendamment du stade T (Adloff *et al.*, 1989; Greene *et al.*, 2002; O'Connell *et al.*, 2004). Les métastases viscérales, et notamment hépatiques, ne sont accessibles à la résection chirurgicale complète que dans 20% des cas et la survie à 5 ans s'améliore alors considérablement, avec un taux de survie à 5 ans d'environ 30% (Simmonds *et al.*, 2006). Elles signent une maladie généralisée dont l'évolution spontanée est très péjorative, avec une survie à 5 ans proche de 0% en l'absence de résection chirurgicale (Scheele *et al.*, 1990).

I.1.2.2 Facteurs moléculaires et cellulaires

Phénotype MSI

Le CCR répond à 2 grandes voies moléculaires, que sont la voie de l'instabilité chromosomique (75 à 85% des CCR) et la voie de l'instabilité des séquences microsatellites (MSI, MicroSatellite Instability, 15 à 20% des CCR) (Bond *et al.*, 2012; Pritchard and Grady, 2011) (cf. partie I.3.3). Les tumeurs de phénotype MSI ont un meilleur pronostic que les tumeurs sans instabilité génomique (Gafà *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1994; Vogelstein *et al.*, 1989). Cependant, bien que les tumeurs MSI soient de meilleur pronostic, elles semblent être plus résistantes à certains traitements chimiothérapiques à base de 5-fluoro-uracile (Benatti *et al.*, 2005; Carethers *et al.*, 2004; Ribic *et al.*, 2003).

ACE ou CEACAM5

L'antigène carcino-embryonnaire (ACE, ou CEACAM5, Carcinoembryonic Antigen Cell Adhesion Molecule 5) appartient à la famille des CEACAM, glycoprotéines de membranes jouant un rôle clé dans les phénomènes biologiques d'adhésion cellulaire, d'immunité et d'apoptose (Duffy, 2001; Gold and Freedman, 1965; Hammarström, 1999).

L'ACE est exprimé au niveau de nombreux organes dont le côlon et le rectum et des variations physiologiques sont observées notamment avec le sexe et l'âge (concentration plus élevée chez le sujet âgé). Le taux d'ACE sérique est associé à de nombreuses pathologies tumorales et n'est pas spécifique du CCR. Cependant, un taux d'ACE préopératoire élevé est un facteur de mauvais pronostic chez un patient présentant un CCR (Chapman *et al.*, 1998; Dixon *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007, 2000). L'analyse de l'expression tissulaire de l'ACE n'est quasiment pas employée en pratique quotidienne dans l'évaluation pronostique du CCR. Une seule étude a évalué ce critère et trouvait une valeur pronostique supérieure à l'ACE sérique (Li *et al.*, 2009).

CEACAM6

La molécule CEACAM6 appartient à la même famille que l'ACE. Moins connu et moins étudié car de découverte plus récente, CEACAM6 reprend cependant beaucoup des propriétés et caractéristiques de l'ACE. Il est localisé au pôle apical des entérocytes tout au long du développement et intervient dans les mécanismes d'adhésion, d'invasion et de migration cellulaire (Schölzel *et al.*, 2000). CEACAM6 est surexprimé dans de nombreux cancers dont le CCR, avec une spécificité meilleure que l'ACE pour ce cancer (Blumenthal *et al.*, 2007; Hammarström, 1999; Higashide *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2013a). Cependant, son dosage sérique n'est pas utilisé en pratique courante et ce n'est qu'au niveau tissulaire que son expression est évaluée actuellement. C'est un facteur pronostique indépendant plus spécifique que l'ACE lorsque ces 2 marqueurs sont comparés dans les mêmes populations (Jantscheff *et al.*, 2003).

D'autres facteurs pronostiques moléculaires, non spécifiques du CCR, existent tels que l'albumine sérique et la protéine C-réactive, mais ne seront pas détaillés dans ce manuscrit.

I.1.3 Traitements

La chirurgie reste à l'heure actuelle le seul traitement curatif du CCR. Elle consiste en la résection de la tumeur avec des marges de sécurité suffisantes et un curage ganglionnaire. La chimiothérapie est administrée dans trois situations dans la prise en charge du CCR : (i) avant la chirurgie (néo-adjuvante) dans le but de stabiliser ou de faire régresser la pathologie,

(ii) après la chirurgie (adjuvante), en fonction de facteurs pronostiques histopathologiques, dans le but de diminuer les risques de récurrences en éliminant d'éventuelles cellules tumorales résiduelles, et (iii) dans le cadre d'une chimiothérapie palliative, administrée lorsque la chirurgie n'est pas possible du fait d'une tumeur trop avancée et/ou lorsque l'état général du patient est trop précaire (Cunningham *et al.*, 2010). La radiothérapie n'est indiquée que dans le cas de cancer du rectum.

I.1.3.1 Cancers du côlon de stade TNM I et II

Après résection chirurgicale, les patients atteints de tumeurs de stade I (T1 ou T2 N-) ont une survie à 5 ans inférieure à 90%, il n'y a donc aucun bénéfice prouvé à la réalisation d'une chimiothérapie adjuvante à la chirurgie. La survie à 5 ans des patients atteints de tumeurs de stades II (T3, T4, N-) est comprise entre 72 et 100% selon l'envahissement local T (O'Connell *et al.*, 2004). Par ailleurs, concernant les tumeurs de stade II, bien qu'il ne soit pas prouvé qu'elle soit efficace, une chimiothérapie adjuvante pourra être proposée selon le protocole FOLFOX 4 à base de 5-fluorouracile, acide folinique et éloxatine (O'Connor *et al.*, 2011).

I.1.3.2 Cancers du côlon de stade TNM III et IV

Comme pour les stades I et II, la base du traitement des CCR de stade III (N+, M0) est l'exérèse chirurgicale avec curage ganglionnaire associée à une chimiothérapie adjuvante qui apportent un bénéfice de 25 à 33% sur la survie à 5 ans (André *et al.*, 2006; Moertel *et al.*, 1990). Le protocole de référence est une tri-chimiothérapie selon le protocole FOLFOX4 (André *et al.*, 2004). Dans le cas d'un CCR de stade IV (M1), la tumeur colorectale est au stade métastatique, il s'agit donc d'une maladie généralisée dont le traitement de base n'est plus la chirurgie mais la chimiothérapie. En cas de métastases résécables, une chimiothérapie néo-adjuvante est réalisée afin d'éliminer les micrométastases invisibles dans le but de contrôler la maladie avant la réalisation de la chirurgie. En cas de réponse à la chimiothérapie, les lésions tumorales (tumeur primitive et métastases) vont être réséquées par chirurgie et une chimiothérapie permettra d'éliminer les micrométastases résiduelles et de pallier à l'immunodépression qui fait suite à tout geste chirurgical. La survie à 5 ans est de l'ordre de 40% pour les stades IV dont les métastases sont résécables (Jones *et al.*, 2012). En cas de

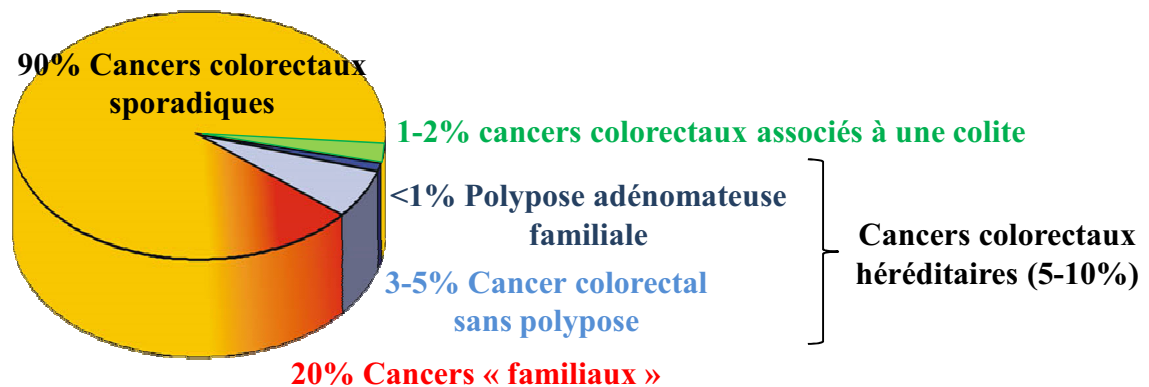


Figure 2 : Répartition des différentes formes de cancers colorectaux.

Les cancers colorectaux sporadiques, dont l'étiologie n'est à ce jour pas clairement définie, représentent la forme majoritaire (90%) des cancers colorectaux suivi par les cancer colorectaux dits « familiaux » (environ 20%) s'ils possèdent au moins deux parents du 1er degré atteint de cette pathologie. Les cancers héréditaires représentent 5 à 10% des CCR dont la polypose adénomateuse familiale (<1%) et les cancers colorectaux héréditaires sans polypose (3-5%). Un contexte de maladie inflammatoire chronique de l'intestin représente un facteur de risque de développer un cancer colorectal et est observé dans 1 à 2% des cas.

(Modifiée d'après Half et *al.*, 2009)

lésions non résécables, une chimiothérapie palliative est administrée, afin de rendre les lésions tumorales résécables, et de revenir au cas précédent et/ou d'améliorer la survie des patients

1.1.4 Cancer du rectum

Pour les cancers du rectum, les stratégies précédemment décrites sont applicables. La spécificité de la prise en charge du cancer du rectum réside en l'indication d'un traitement néo-adjuvant par radiothérapie et chimiothérapie concomitantes pour les cancers T3, T4 et/ou N+. En effet, l'association d'une chimiothérapie concomitante à la radiothérapie augmente la réponse tumorale et diminue de moitié le taux de récurrence locale à 5 ans. L'association d'une irradiation et d'une chimiothérapie concomitante néo-adjuvantes est donc recommandée dans ces indications (Kapiteijn *et al.*, 2001; Sauer *et al.*, 2004, 2012).

1.2 Etiologies des cancers colorectaux

Si 5 à 10% des CCR ont une origine héréditaire, les principaux syndromes étant la polyposse adénomateuse familiale (PAF) et le cancer héréditaire sans polype (HNPCC, Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer), la grande majorité (90%) des CCR sont sporadiques (**Figure 2**). Environ 20% des patients atteints de CCR présentent un risque dit « familial » 2 à 3 fois plus élevé de développer un CCR, s'ils possèdent au moins deux parents du 1^{er} degré atteint de cette pathologie (Weitz *et al.*, 2005). De plus, 1 à 2% des CCR sont associés à une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI, maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) et plus de 20% des patients atteints de MICI développent un CCR dans les 30 années après le début de leur maladie (Terzić *et al.*, 2010).

1.2.1 Les cancers colorectaux d'origine héréditaire

Les deux syndromes majeurs de CCR héréditaires connus à ce jour sont la polyposse adénomateuse familiale (PAF) et le cancer héréditaires sans polype (HNPCC) ou syndrome de Lynch (Weitz *et al.*, 2005). Le HNPCC est plus représenté que la PAF chez les patients atteints de CCR (1/300 vs 1/7000, respectivement) (Cunningham *et al.*, 2010). D'autres syndromes moins fréquents tels que les syndromes de Peutz-Jeghers et de Cowden ou encore la polyposse juvénile sont également associés à un risque augmenté de développer un cancer

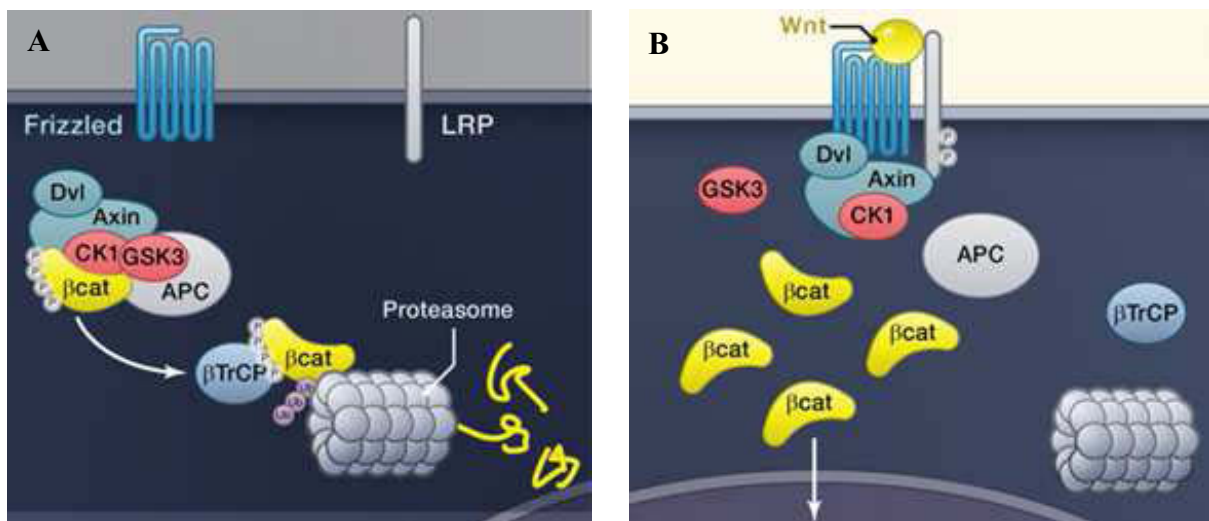


Figure 3 : Voie de signalisation Wnt/β-caténine.

A. En absence de ligand Wnt, la localisation du complexe de destruction de la β-caténine, composé des protéines APC (*adenomatous polyposis coli*), GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*), CK1 (*casein kinase 1*) et AXIN, est cytoplasmique. Ce complexe est chargé de lier et phosphoryler la β-caténine, qui est ensuite ubiquitinée et dégradée par le protéasome. **B.** Le fixation du ligand Wnt sur son récepteur Frizzled induit la dissociation du complexe de destruction de la β-caténine, ce qui a pour conséquence sa stabilisation dans le cytoplasme et sa translocation nucléaire où elle peut activer la transcription de gènes cibles tels que les oncogènes *c-myc* et *cycline D1*, impliqués notamment dans la prolifération cellulaire.

(Modifié d'après Clevers and Nusse, 2012).

colorectal (Weitz *et al.*, 2005). Dans cette partie ne seront développés que la PAF et le HNPCC.

I.2.1.1 La polypose adénomateuse familiale

Les patients atteints de PAF développent de nombreux adénomes colorectaux dès le plus jeune âge qui évoluent en cancer colorectaux vers l'âge de 40 ans (Cunningham *et al.*, 2010; Lynch and de la Chapelle, 2003; Weitz *et al.*, 2005).

Les patients atteints de PAF présentent, dans 80% des cas, une mutation germinale dans le gène *Adenomatous Polyposis Coli* (*APC*) impliqué dans la régulation de la voie WNT/ β -caténine qui joue notamment un rôle dans la prolifération cellulaire (Weitz *et al.*, 2005). Le gène *APC*, organisé en 15 exons, est un gène suppresseur de tumeur présent chez l'Homme au niveau du locus 5q21. Le produit de ce gène est impliqué, de par son domaine d'oligomérisation et sa capacité à interagir avec d'autres protéines, dans de nombreux processus biologiques et mécanismes intracellulaires, tels que l'adhésion cellulaire et le contrôle de la prolifération cellulaire de par son appartenance au complexe de destruction de la β -caténine (Half *et al.*, 2009) (**Figure 3**). De nombreuses mutations du gène *APC* peuvent être à l'origine de la survenue de la PAF. La majorité des mutations identifiées induisent l'apparition prématurée d'un codon stop conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée au niveau de la région C-terminale (Galiatsatos and Foulkes, 2006). Une autre mutation a également été identifiée comme augmentant le risque de développer un cancer colorectal. Il s'agit d'une mutation par transversion de la thymine 1307 par une adénine. Cette mutation n'altère en rien la fonction de la protéine APC, cependant la présence de 8 adénines consécutives augmente le risque d'apparition de mutations lors de la réplication de l'ADN (Fearon, 2011; Galiatsatos and Foulkes, 2006; Lynch and de la Chapelle, 2003).

Une minorité de patients atteints de PAF ou de formes atténuées (patients présentant moins de 100 polypes, représentant 1/18000 patients atteints de CCR) ne présentent pas de mutation du gène *APC* mais possèdent une mutation biallélique dans le gène *MYH* codant une protéine intervenant dans la réparation des dommages de l'ADN par excision de bases (BER, Base Excision Repair) (Galiatsatos and Foulkes, 2006; Sampson *et al.*, 2003). Ces patients sont plus sensibles aux mutations de l'ADN, qui lorsqu'elles interviennent dans des

Tableau 2 : Critères d'Amsterdam I et II.

L'absence de caractéristiques phénotypiques particulières rend le diagnostic du cancer colorectal héréditaire sans polypose difficile (HNPCC). C'est pourquoi les critères d'Amsterdam ont été établis en 1991 et 1999 en prenant en compte plusieurs paramètres, tels que l'âge d'apparition du CCR, le nombre de parents proches atteints et les examens anatomo-pathologiques.

(Modifié d'après Cunningham *et al.*, 2010 et Weitz *et al.*, 2005)

Critères d'Amsterdam I et II

Diagnostic du CCR avant 50 ans

Trois parents doivent être atteints de CCR dont un au premier degré

Deux générations successives doivent être atteintes de CCR

Exclusion des patients atteints de polypose adénomateuse familiale

Vérification des tumeurs par examen anatomo-pathologique

oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs, participent activement au développement tumoral.

1.2.1.2 Le cancer héréditaire sans polype

Le développement de tumeurs colorectales chez les patients atteints de HNPCC survient à l'âge médian de 45 ans (Steinke *et al.*, 2013). L'absence de caractéristique phénotypique particulière rend le diagnostic difficile. C'est pourquoi les critères d'Amsterdam I et II, répertoriés dans le **Tableau 2**, ont été établis respectivement en 1991 et 1999 afin de diagnostiquer plus facilement les personnes atteintes de HNPCC. Ils prennent en compte notamment l'âge du développement tumoral qui doit être inférieur à 50 ans et la présence de HNPCC sur deux générations successives (Cunningham *et al.*, 2010; Palumbo *et al.*, 2013; Vasen *et al.*, 1991, 1999; Weitz *et al.*, 2005).

Le développement tumoral observé chez les patients atteints de HNPCC est causé par une instabilité microsatellitaire (MSI). Tout comme les cancers colorectaux sporadiques, dans le cas de HNPCC l'instabilité microsatellitaire observée fait intervenir une défaillance des systèmes de réparation de l'ADN. Le développement tumoral chez les personnes atteintes de HNPCC est plus rapide (3-5 ans) que chez les personnes atteintes de CCR sporadiques présentant une MSI (20-40 ans) (Dove-Edwin *et al.*, 2006; Fearon, 2011). Des mutations non-sens, d'insertion ou de délétion dans les gènes *MLH1* et *MSH2*, impliqué dans les systèmes de réparation de l'ADN, ont été répertoriées dans 45 à 70% des cas de HNPCC (Kheirleiseid *et al.*, 2013; Peltomäki and Vasen, 1997). Elles conduisent à un décalage du cadre de lecture dans 60 et 40% des mutations touchant *MSH2* et *MLH1* respectivement, à la formation d'une protéine tronquée dans 23% des mutations touchant *MSH2* ou à une mutation non-sens dans 31% des mutations pour *MLH1*.

1.2.2 Les cancers colorectaux sporadiques

Les cancers colorectaux dits sporadiques, sans prédisposition génétique, représentent près de 90% des cancers colorectaux (Weitz *et al.*, 2005). L'âge constitue un facteur de risque important puisque 80% des CCR surviennent chez des individus de plus de 50 ans sans facteur de prédisposition connu. Une augmentation de l'incidence du CCR est observée dans

les pays émergents économiquement, désignant ainsi le mode de vie occidental comme facteur de risque (Cunningham, et al. 2010). Par ailleurs, le développement de pathologies telles que l'obésité et le syndrome métabolique constitue un facteur de risque de développer un CCR (Bardou *et al.*, 2013).

I.2.2.1 Syndrome métabolique et obésité

Le syndrome métabolique est défini par l'association d'une série de problèmes de santé, tels qu'une obésité, une résistance à l'insuline, une hyperglycémie, une dyslipidémie (une quantité anormale de lipides) qui augmentent le risque de développer un diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires. Les patients atteints de syndrome métabolique présentent un risque de développer un CCR augmenté de 2 à 10 fois par rapport à la population générale (Ishino *et al.*, 2012; Tal *et al.*, 2014). Plus de 60% des patients atteints de syndrome métabolique présentent une obésité également connue comme étant un facteur de risque du CCR. Un indice de masse corporelle élevé est associé à un risque accru de développer un CCR, surtout chez l'homme (Bardou *et al.*, 2013; Chen and Iverson, 2012). Chez la femme, ce facteur de risque pourrait être compensé en partie par un rôle protecteur des oestrogènes qui peut être attribué à des effets pro-apoptotiques et anti-prolifératifs. Une réduction de la masse corporelle est associée à une diminution de 40-60% de l'incidence des CCR chez les personnes obèses (Adams *et al.*, 2007; Bardou *et al.*, 2013; Sjöström *et al.*, 2007).

Le syndrome métabolique et l'obésité sont reconnus depuis longtemps comme des maladies inflammatoires chroniques, qui de ce fait pourraient favoriser le développement de CCR (John *et al.*, 2007). Un lien fort a également été établi entre l'obésité et le microbiote intestinal. Comparativement à des souris résistantes pour cette pathologie, il a été mis en évidence l'établissement d'un microbiote dysbiotique chez des souris prédisposées à développer une obésité et nourries avec un régime riche en graisses, avec notamment une augmentation de l'abondance des bactéries appartenant aux phyla Bacteroidetes et Prevotella au détriment des bactéries appartenant au phylum des Firmicutes (Duca *et al.*, 2014). En revanche, d'autres études ont montré une sous-représentation des bactéries appartenant aux phyla Bacteroidetes et Firmicutes chez les souris prédisposées à l'obésité (Ley *et al.*, 2005; Turnbaugh *et al.*, 2006). La présence de dysbioses chez les patients atteints d'obésité pourrait

être un facteur favorisant le développement de CCR, sachant que le microbiote intestinal jouerait un rôle important dans la carcinogenèse colorectale (cf. partie III).

I.2.2.2 Consommation d'alcool

La consommation d'alcool est associée à un risque de développer un CCR augmenté de 2 fois dès 30g d'alcool par jour (Cho *et al.*, 2004; Pericleous *et al.*, 2013). Le rôle que pourrait jouer l'alcool dans la carcinogenèse colorectale n'est à ce jour pas clairement défini. Son mécanisme d'action ferait intervenir sa capacité à réduire les folates et à modifier la composition des acides biliaires, à induire des méthylation anormales de l'ADN et à retarder la réparation de l'ADN (Choi *et al.*, 1999; Kune and Vitetta, 1992; Pericleous *et al.*, 2013; Seitz *et al.*, 1990). Cependant, la consommation quotidienne de vin rouge aurait un rôle protecteur sur la survenue de CCR *via* les polyphénols qu'il contient, connus pour leurs effets anti-oxidants, inhibiteurs de la prolifération cellulaire ou anti-angiogéniques (Pericleous *et al.*, 2013).

I.2.2.3 Tabagisme actif

Le tabagisme est également un facteur de risque dans la survenue du CCR (Hou *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2009). Les fumeurs ont un risque de développer un CCR augmenté de 17% comparativement aux non-fumeurs et anciens fumeurs. L'impact du tabagisme sur la carcinogenèse colorectale dépend de plusieurs facteurs tels que l'intensité de la consommation quotidienne, la consommation de cigarettes avec filtres, la durée et l'âge de début du tabagisme (Lüchtenborg *et al.*, 2007). Par ailleurs il a été rapporté que la présence d'un allèle à risque dans le gène *Exonuclease 1 (EXO1)*, qui est impliqué dans la réparation de l'ADN, la réplication et la stabilisation des télomères. Il augmente le risque de développer un CCR chez les fumeurs d'un facteur 2 comparativement aux non fumeurs (Gao *et al.*, 2011). La présence de cet allèle à risque pourrait augmenter la susceptibilité des fumeurs à développer un CCR en réduisant la capacité et l'efficacité d'EXO1 à réparer les dommages de l'ADN causés par le tabagisme. En se fixant sur les récepteurs adrénergiques β , des molécules issues du tabac, notamment le 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), une nitrosamine, et la nicotine sont capables d'induire la prolifération de cellules épithéliales intestinales en cultures, l'augmentation de l'expression de la cyclooxygénase 2 (COX-2) et la sécrétion de

son produit de synthèse majoritaire, la prostaglandine E₂ (PGE₂), qui est impliquée dans de nombreux processus pro-tumoraux (Wong *et al.*, 2007a, 2007b; Wu *et al.*, 2005). De plus, la nicotine induit également, dans un modèle de xénogreffe, une augmentation dose-dépendante du volume des tumeurs et une augmentation de l'expression du facteur de croissance des cellules endothéliales (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) connu pour ses effets pro-angiogénique (Wong *et al.*, 2007b).

I.2.2.4 Alimentation et cancer colorectal

Une consommation de viande rouge supérieure à 100-140 g/jour augmente le risque de développer du CCR (Chan *et al.*, 2011). La cuisson à haute température de la viande rouge, par exemple sur le « barbecue », conduit à la formation d'amines hétérocycliques tels que les composés mutagènes et carcinogènes N-nitrosés (Pericleous *et al.*, 2013). De plus, *via* un mécanisme méconnu à ce jour, la viande rouge augmente la production d'acides biliaires (Jänne and Mayer, 2000). Cependant, le rôle que pourrait jouer les acides biliaires dans la carcinogenèse colorectale n'est pas clairement défini.

L'observation en 1969 de la faible incidence des cancers colorectaux dans les populations africaines consommant une alimentation riche en fibres a permis d'émettre l'hypothèse d'un potentiel rôle protecteur des fibres dans la carcinogenèse colorectale. Une méta-analyse récente indique qu'une consommation de 10g/jour de fibres réduit de 10% le risque de développer un CCR (Aune *et al.*, 2011). Cependant, l'implication des fibres dans la protection contre la survenue du CCR est controversée. Il est tout de même proposé que les fibres agiraient notamment en ralentissant le transit gastro-intestinal, en absorbant les polyamines hétérocycliques, en altérant la prolifération des cellules épithéliales, en stimulant la production d'acides gras à courtes chaînes par le microbiote intestinal, ceux-ci jouant un rôle protecteur vis-à-vis de la carcinogenèse colorectale (Burkitt, 1969; Pericleous *et al.*, 2013).

Par ailleurs, une alimentation riche en fruits et légumes, par l'intermédiaire des acides foliques/folates (vitamine B9) et des fibres qu'ils contiennent, aurait un rôle protecteur dans le développement du CCR (Jänne and Mayer, 2000; Pericleous *et al.*, 2013). Une étude a permis de mettre en évidence un effet protecteur du folate après 15 ans de consommation à raison de

400µg/jour, avec un risque relatif de 0,66 pour les femmes et 0,63 pour les hommes (Giovannucci, 2002; Giovannucci *et al.*, 1998). Les folates sont des donneurs de groupements méthyl et interviendraient à ce titre dans le maintien d'une synthèse et d'une méthylation correcte de l'ADN (Giovannucci, 2002).

Le mode de vie et plus particulièrement l'alimentation, le tabagisme et la consommation d'alcool sont capables d'induire des altérations de la composition du microbiote intestinal. Il est aujourd'hui bien établi que le dialogue installé entre le microbiote et l'épithélium intestinal joue un rôle majeur dans le maintien d'un équilibre homéostatique. Le microbiote jouant un rôle majeur dans le développement de CCR (cf. partie III), le mode de vie pourrait donc favoriser le développement de CCR en modulant la composition du microbiote intestinal.

1.2.3 Les cancers colorectaux associés aux MICI et survenant chez les patients atteints de pathologies inflammatoires des voies biliaires

Le cancer colorectal associé à une colite (CAC, colitis-associated cancer) est un sous-type de cancer colorectal qui est précédé par le développement d'une maladie inflammatoire chronique intestinale (MICI), telle la maladie de Crohn (MC) ou la rectocolite hémorragique (RCH). Même si les patients atteints de MICI ne représentent qu'une faible proportion des cas de CCR (1-2%), ces patients sont parmi ceux qui ont le risque le plus élevé de développer un CCR par rapport à la population générale (Beaugerie *et al.*, 2013; Cunningham *et al.*, 2010). Il existe une grande variabilité quant à l'estimation du risque de développer un CCR chez les patients atteints de MICI notamment en raison de l'hétérogénéité des cohortes, de l'évolution des traitements et de la prise en charge des patients. Une méta-analyse prenant en compte 116 études indépendantes réalisées dans le monde a permis d'établir une prévalence du CCR s'élevant à 3,7% chez les patients atteints de RCH et à 5,4% chez ceux présentant une pancolite, c'est-à-dire une colite étendue à l'ensemble du côlon (Eaden *et al.*, 2001). Chez les patients atteints de MC, le risque relatif de développer un CCR est 0,8 à 20 fois plus élevé que dans la population générale (Averboukh *et al.*, 2011; Canavan *et al.*, 2006). On estime que le développement d'un CCR est responsable d'un décès sur 6 dans la RCH et d'un décès sur 12 dans la MC (Andersen and Jess, 2013). Les facteurs de risque reconnus comme étant associés au développement d'un CCR chez les patients atteints de MICI sont la durée et l'étendue de la

maladie, l'histoire familiale de cas de CCR sporadiques, la sévérité de l'inflammation intestinale et l'âge de survenue de la maladie (Cunningham *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2007; Lakatos and Lakatos, 2008; Mescoli *et al.*, 2013; Peyrin-Biroulet *et al.*, 2012; Renz *et al.*, 2013; Rutter *et al.*, 2006). L'ensemble de ces données cliniques mettent en avant le rôle majeur que joue l'inflammation dans la carcinogenèse colorectale. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la promotion du CCR par l'inflammation sont décrits dans la partie II de ce manuscrit.

La cholangite sclérosante primitive (CSP) est une maladie hépatique chronique qui se caractérise par une inflammation et une fibrose progressive des voies biliaires intra- et/ou extra-hépatiques. La CSP est un facteur de risque de cancer des voies biliaires (cholangiocarcinome) et de cancer de la vésicule biliaire, et peut-être associée au CCR. La prévalence des MICI, principalement la RCH, chez les patients atteints de CSP est estimé à 50%-80% selon les études (Sokol and Chazouilleres, 2012). La co-existence d'une CSP et d'une MICI constitue un facteur de risque significatif de CCR (Sokol *et al.*, 2008a). En plus du caractère inflammatoire de la maladie, une exposition de la muqueuse colique proximale à un excès d'acides biliaires secondaires non absorbés au niveau iléal est un facteur impliqué dans le développement d'un CCR chez les patients atteints de MICI (Lakatos and Lakatos, 2008).

1.3 La séquence adénome-cancer

La séquence adénome-cancer décrite par Volgenstein et Fearon fait référence à la chronologie des mutations et modifications épigénétiques intervenant au cours de la carcinogenèse colorectale. Ces altérations activent des proto-oncogènes en oncogènes, dont l'expression favorise la survenue de cancers, et inactivent des gènes suppresseurs de tumeurs. La chronologie de ces altérations est différente entre les CCR sporadiques et ceux associés aux MICI.

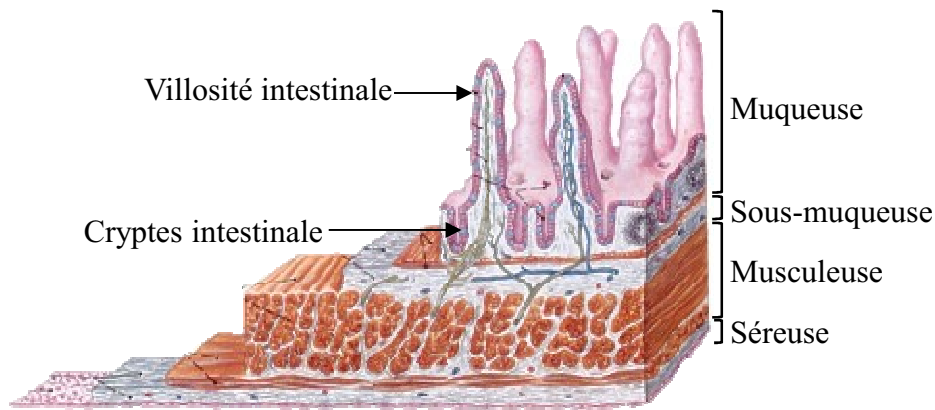
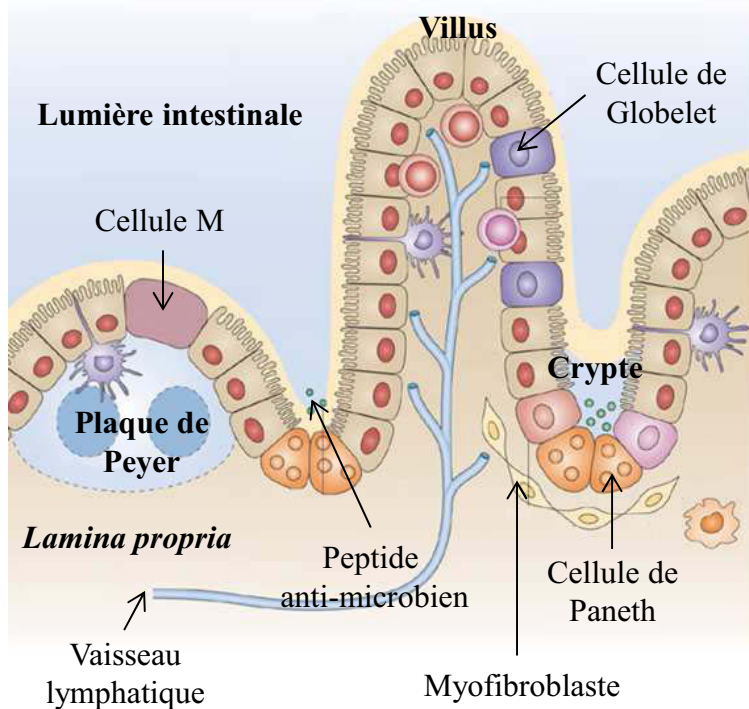


Figure 4 : Paroi intestinale de l'intestin grêle.

La paroi intestinale est composée de quatre couches concentriques nommées, de la lumière intestinale vers les couches les plus profondes, la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse.

(Modifiée d'après <http://www.corpshumain.ca>)

Intestin grêle



Côlon

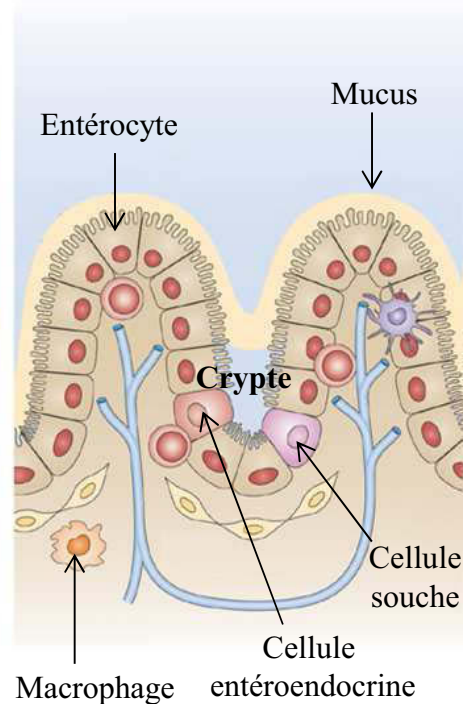


Figure 5 : Représentation schématique de la structure de l'épithélium intestinal.

Les cellules souches prolifèrent au sein des cryptes intestinales et migrent le long des villi et se différencient : (i) en cellules épithéliales intestinales (entérocytes) responsables de l'absorption des nutriments dans l'intestin grêle et de l'eau dans le côlon, (ii) en cellules entéroendocrines, qui sécrètent des hormones, (iii) en cellules de goblet qui sécrètent le mucus et (iv) en cellules de Paneth à la base des cryptes de l'intestin grêle responsables de la production des peptides antimicrobiens. L'intestin grêle possède des régions spécialisées nommées follicules associés à l'épithélium composé des cellules M à la surface des plaques de Peyer et responsable de l'échantillonnage de la lumière intestinale.

(Modifiée d'après Abreu, 2010)

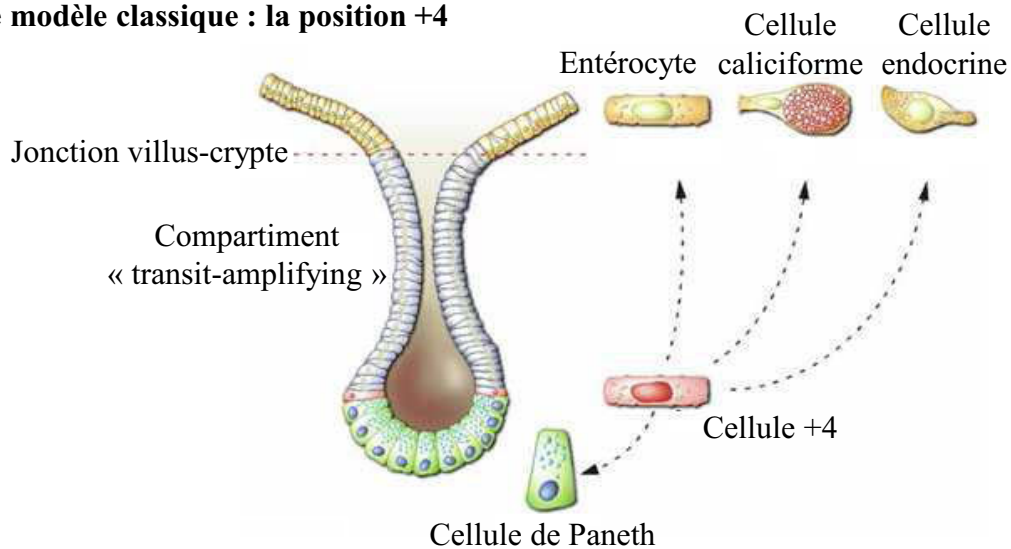
I.3.1 Généralités sur l'épithélium intestinal et son renouvellement

I.3.1.1 Organisation de l'épithélium intestinal

La paroi intestinale est composée de quatre couches principales nommées de la lumière intestinale vers les couches plus profondes : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (Sherwood, 2006) (**Figure 4**). La muqueuse est la couche la plus complexe. Elle est composée d'un épithélium et repose sur une lame basale (la *lamina propria*, riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques) et sur une fine couche musculaire de soutien appelée sous-muqueuse. L'épithélium intestinal est une structure riche en replis et invaginations nommés respectivement villi et cryptes de Lieberkühn. L'organisation de la muqueuse intestinale est différente entre l'intestin grêle et le côlon (**Figure 5**). Ainsi, les villi sont caractéristiques de l'épithélium de l'intestin grêle et permettent d'augmenter la surface de la muqueuse pour favoriser l'absorption intestinale. Les villi sont absents du côlon qui présente une structure plane (van der Flier and Clevers, 2009). Les cryptes de Lieberkühn découvertes par Jonathan Nathanael Lieberkühn au 19^{ème} siècle, jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie cellulaire et sont le siège du renouvellement des cellules de l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon (Clevers, 2013). En effet, le fond des cryptes intestinales est tapissé notamment de cellules souches qui permettent le renouvellement permanent de l'épithélium intestinal.

L'épithélium intestinal est monostratifié et composé de 6 populations cellulaires différentes qui dérivent de cellules souches pluripotentes et dont les proportions diffèrent selon les segments concernés (**Figure 5**). Les entérocytes, principale population cellulaire de l'épithélium intestinal, sont caractérisés par la présence d'une bordure en brosse permettant d'augmenter la capacité d'absorption en nutriments pour l'intestin grêle et en eau pour le côlon. Alors que les cellules caliciformes produisent une couche de mucus protecteur, les cellules entéro-endocrines sécrètent diverses hormones, et les cellules de Paneth, présentes uniquement dans les cryptes de l'intestin grêle, sont à l'origine de la production des peptides antimicrobiens. Les fonctions de senseurs des composants présents dans la lumière intestinale sont assurées par les cellules Tuft et les cellules Microfold (cellules M) résidant dans des zones spécialisées de l'intestin grêle nommées plaque de Peyer. Les cellules M jouent un rôle dans l'immunité en collectant par transcytose des antigènes présents dans le contenu luminal

A Le modèle classique : la position +4



B Le modèle « stem cell zone »

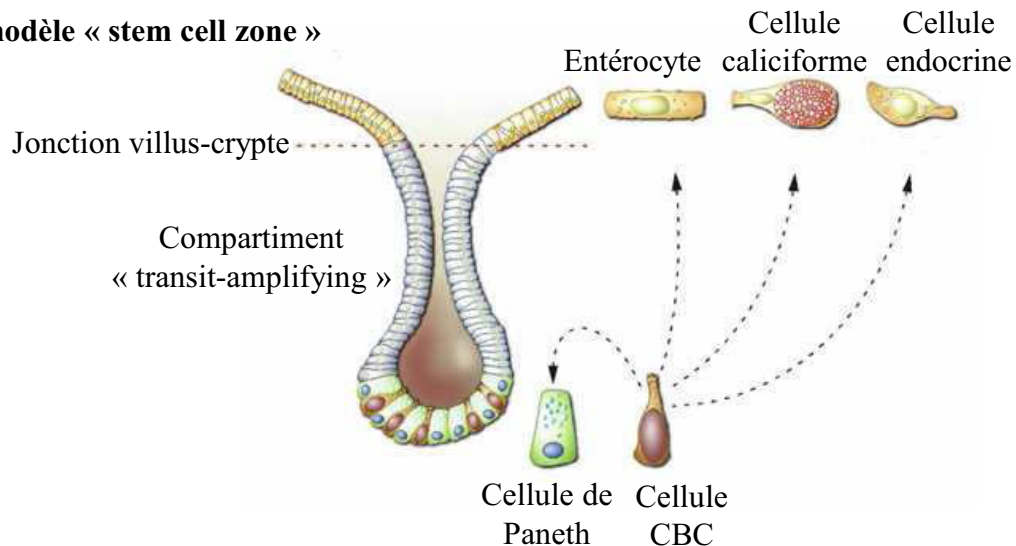


Figure 6 : Organisation et renouvellement cellulaire des cryptes intestinales.

A. Le modèle classique, décrit dans les années 1950, suggère que les cellules de Paneth tapissent le fond des cryptes intestinales (de l'intestin grêle uniquement car elles sont absentes des cryptes coliques) et sont bordées par les cellules souches pluripotentes placées en position +4 par rapport au fond de la crypte. Ce modèle propose que les entérocytes, les cellules endocrines et les cellules caliciformes dérivent de progéniteurs après différenciation et migration le long de l'axe crypte-villus. Les cellules de Paneth dérivent également de progéniteurs après migration vers le fond des cryptes. **B.** Le modèle « stem cell zone » propose que des cellules indifférenciées, nommées CBC, résident au fond des cryptes intestinales parmi les cellules de Paneth et sont les cellules souches à l'origine du renouvellement cellulaire. Les différentes lignées cellulaires composant l'épithélium intestinal dérivent de ces cellules souches après différenciation et migration le long de l'axe crypte-villus.

(Modifiée d'après Barker *et al.*, 2008)

et en les présentant aux cellules de l'immunité sous-jacentes (Abreu, 2010; van der Flier and Clevers, 2009; Hooper and Macpherson, 2010).

I.3.1.2 Le renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est le tissu qui possède le renouvellement le plus actif de tout l'organisme. Il est remplacé tous les 4-5 jours chez l'Homme, ce qui correspond à la production d'environ dix milliards de nouvelles cellules chaque jour et autant sont éliminées par desquamation (Zouiten-Mekki *et al.*, 2013). Le renouvellement de l'épithélium est assuré par les cellules souches pluripotentes localisées à la base des cryptes intestinales (van der Flier and Clevers, 2009; Heath, 1996). Deux théories ont été élaborées afin d'expliquer le mécanisme intervenant dans ce renouvellement : le modèle « classique » et le modèle « *stem cells zone* » (van der Flier and Clevers, 2009). Ces deux modèles ne diffèrent que par la localisation des cellules souches et des cellules de Paneth au fond des cryptes intestinales.

Proposé dans les années 1950, le « modèle classique » situe les cellules souches en position +4 par rapport au fond des cryptes, les cellules de Paneth occupant les 3 premières positions (Clevers, 2013; van der Flier and Clevers, 2009; Potten *et al.*, 1978, 2002) (**Figure 6A**). Après division les cellules néo-formées migrent et se différencient le long du villus, donnant les différents types cellulaires retrouvés au sein de l'épithélium intestinal. Cependant, ce modèle plaçant les cellules souches en position +4 n'a pas été confirmé et a laissé place quelques années plus tard au modèle de « *stem cells zone* », qui propose que les cellules souches CBC (Crypt Base Columnar) et les cellules de Paneth cohabitent dans un même compartiment à la base des cryptes intestinales (Clevers, 2013) (**Figure 6B**). Après division des cellules souches, les cellules filles quittent cette zone pour aller en position +5, définie comme une origine commune de différenciation (van der Flier and Clevers, 2009). Quarante-vingt-quinze pourcents des cellules souches se divisent de manière asymétrique donnant une nouvelle cellule souche et une cellule fille nommée « *transit-amplifying daughter* ». Une cellule souche peut parfois disparaître en donnant naissance à deux cellules filles, ou se dupliquer en donnant deux nouvelles cellules souches. Les cryptes intestinales peuvent donc disparaître. Pour compenser ce phénomène, les cryptes peuvent s'étendre par un phénomène de fission (Clevers, 2013; Edgar, 2012).

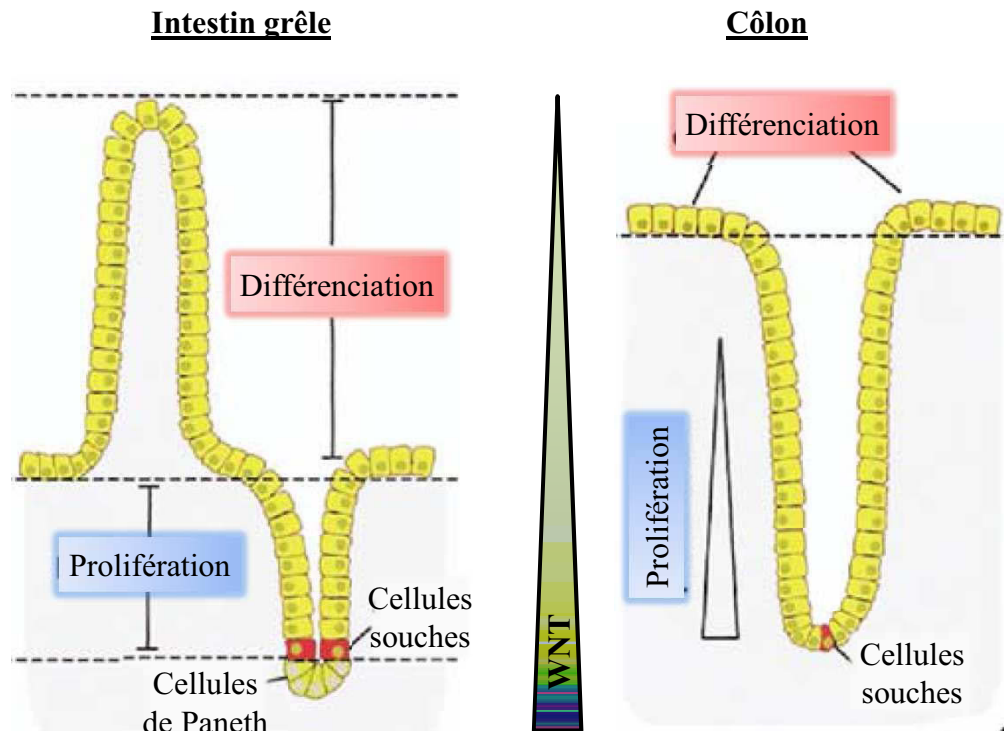
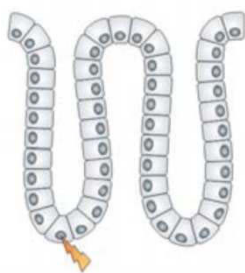


Figure 7 : Implication du gradient de signalisation Wnt dans la prolifération la différenciation des cellules épithéliales intestinales.

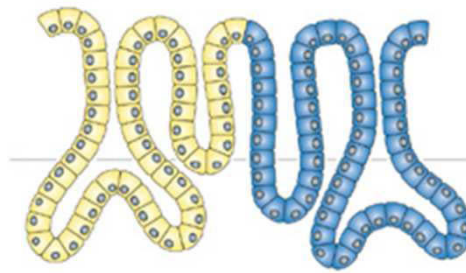
Au fur et à mesure que les cellules migrent le long de l'axe crypte-villus, elles perdent leur capacité à proliférer au profit de la différenciation cellulaire, ce mécanisme est dépendant d'un gradient de signalisation Wnt dont la source est au fond des cryptes intestinales. (Modifiée d'après Gregorieff *et al.*, 2005)

Cryptes normales

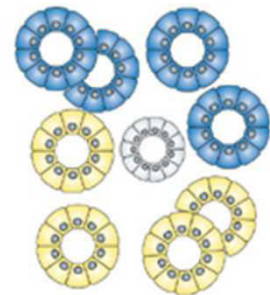


Mutations

Foyers de cryptes aberrantes



Vue longitudinale



Vue de face

Figure 8 : Foyers de cryptes aberrantes.

Les foyers de cryptes aberrantes correspondant à des anomalies de structure de la muqueuse intestinale.

(Modifié d'après Humphries *et al.*, 2008)

La maturation et la différenciation des cellules filles néo-formées en différent types cellulaires a lieu au cours de leur migration jusqu'à l'extrémité du villus. Seules certaines cellules migreront vers la base de la crypte pour renouveler les cellules de Paneth (Cheng and Leblond, 1974a, 1974b; Clevers, 2013; van der Flier and Clevers, 2009). L'activité de la voie de signalisation WNT (impliquée dans la prolifération cellulaire), de concert avec d'autres voies telles que Notch et BMP (impliquées respectivement dans le maintien des cellules progénitrices et dans l'inhibition de la voie WNT), est essentielle à une organisation correcte et au renouvellement de l'épithélium, ainsi qu'à la prolifération et au renouvellement des cellules souches (Vries *et al.*, 2010). L'absence de signalisation WNT *in vivo* bloque la prolifération cellulaire dans les cryptes intestinales et conduit à la destruction de l'épithélium. Un gradient de signalisation WNT existe le long de l'axe crypte-villus. A mesure que les cellules migrent et s'éloignent de la base des cryptes où se trouve la source de WNT, les cellules épithéliales intestinales perdent progressivement leur capacité à proliférer et se différencient (Gregorieff *et al.*, 2005) (**Figure 7**). La voie WNT est également nécessaire à l'expression de récepteurs de surface et de leurs ligands impliqués dans l'organisation de l'épithélium. Des études placent aujourd'hui le point d'origine du développement tumoral intestinal au niveau des cellules souches (Barker *et al.*, 2009).

I.3.2 De l'épithélium normal au carcinome : événements cellulaires

La carcinogenèse colorectale débiterait dans un premier temps, après accumulation de mutations ou de modifications épigénétiques, par la formation de foyers de cryptes aberrantes issues d'une hyperprolifération des cellules épithéliales pluripotentes des cryptes intestinales (Boland and Goel, 2010) (**Figure 8**). Ces foyers de cryptes aberrantes peuvent donner naissance à des polypes qui sont des structures hyperplasiques (ou hyperprolifératives). Les polypes adénomateux ou adénomes précoces sont des structures dysplasiques composées de cellules présentant des altérations morphologiques et une dédifférenciation cellulaire. Les adénomes correspondent aux lésions précancéreuses et évoluent en adénomes tardifs (Fearon, 2011; Markowitz and Bertagnolli, 2009). Plusieurs études ont montré que l'adénome est une lésion précoce dans le développement du CCR (Fearon, 2011; Rex *et al.*, 1993). De plus, il existe un risque augmenté de développer un CCR chez les patients pour lesquels les adénomes ne sont pas réséqués et la polypectomie diminue le risque de développer un CCR (Fearon, 2011; Winawer *et al.*, 1993).

Le stade suivant est la formation d'un carcinome, c'est-à-dire d'une tumeur maligne. Les cellules tumorales peuvent ensuite quitter le foyer primitif en migrant au travers de la lame basale située sous l'épithélium pour atteindre la circulation sanguine et/ou lymphatique en passant entre les cellules endothéliales. Après migration, les cellules cancéreuses peuvent rejoindre un foyer secondaire tel que le foie ou les poumons afin de se développer et former une nouvelle tumeur ou métastase. Dans le cas du CCR, les métastases sont hépatiques dans 75% des cas, pulmonaires dans 15%, osseuses dans 5% et cérébrales dans 5%. Elles peuvent être synchrones (découvertes en même temps que le cancer colique) ou métachrones (apparaissant de façon retardée, soit plus d'un an après l'exérèse de la tumeur primitive) (Scheele *et al.*, 1990). Cette longue séquence, depuis la première cellule dysplasique jusqu'au cancer invasif, a été nommée « séquence adénome-cancer » par Fearon et Vogelstein, et s'étend sur 10 à 15 ans d'évolution décrite par une succession d'événements moléculaires (Fearon and Vogelstein, 1990).

1.3.3 De l'épithélium normal au carcinome : événements moléculaires

Dans le CCR sporadique, les altérations génétiques sont bien caractérisées en fonction des différents stades de la transformation cellulaire. Deux grandes voies moléculaires ont été définies : (i) la voie classique de l'instabilité chromosomique (CIN, 75 à 85% des CCR) (ii) et celle de l'instabilité des séquences microsatellites (15 à 20% des CCR) (Bond *et al.*, 2012; Pritchard and Grady, 2011). La voie CIN est souvent associée à des mutations au niveau des gènes *V-Ki-ras2 Kirsten Rat sarcoma viral oncogene homolog (K-Ras)*, *APC*, *Tumor Protein p53 (TP53)* et une instabilité chromosomique avec perte d'hétérozygotie de certains chromosomes. Par contre la voie MSI est associée à des altérations épigénétiques (méthylation) ou des mutations somatiques au niveau de gènes tels que celui codant la protéine MLH1, un acteur de la réparation des mésappariements d'ADN (MMR, Mismatch Mesappariement Repair) qui ont pour conséquence une instabilité microsatellitaire.

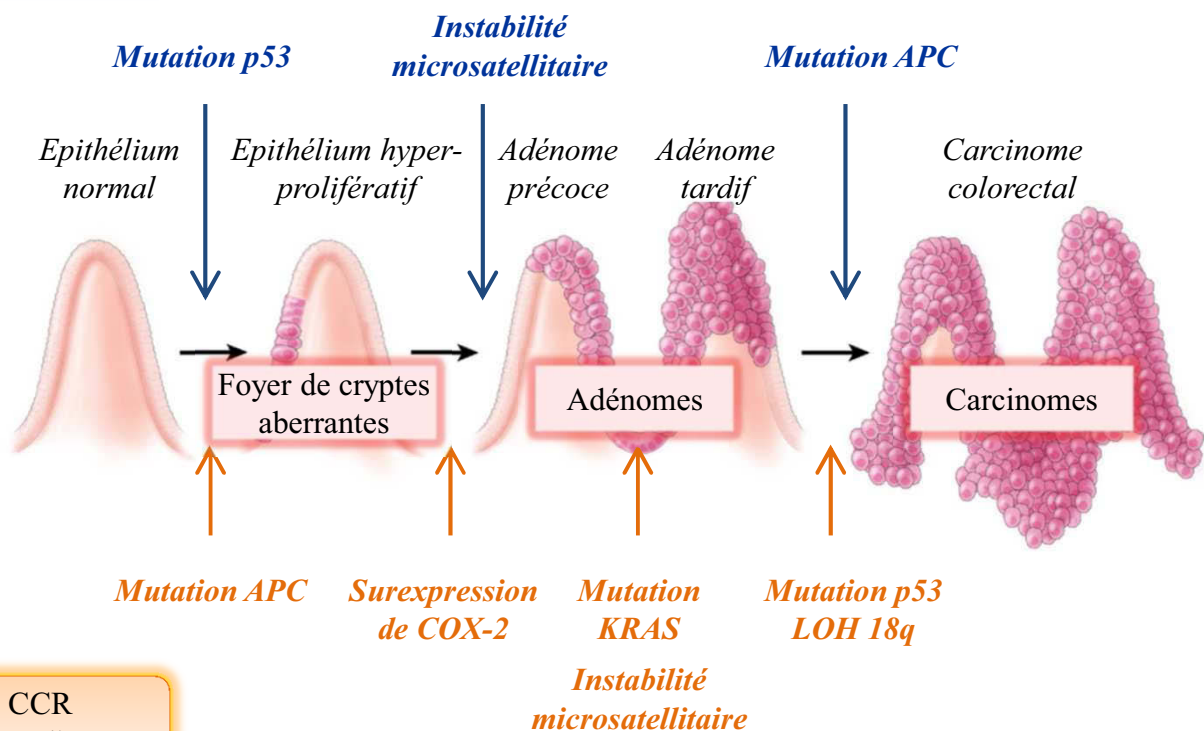
1.3.3.1 Séquence mutationnelle et perte d'hétérozygotie

Si les CCR dits sporadiques, sans prédisposition particulière, sont les CCR les plus représentés, il existe également des CCR héréditaires et des CCR associés aux MICI (ou

Mutations génétiques
Modifications épigénétiques

Séquence adénome-cancer

CCR associé à
une colite



CCR
sporadique

Figure 9 : Séquence adénome-cancer chez les patients atteints de cancers colorectaux sporadique et associés à une colite.

La transformation d'un épithélium normal en carcinome colorectal fait intervenir une accumulation de mutations génétiques et de modifications épigénétiques induisant tout d'abord la formation de foyers de cryptes aberrantes puis la formation d'adénomes précoces et tardifs. Cette longue séquence, depuis la première cellule dysplasique jusqu'au cancer invasif, a été baptisée « séquence adénome-cancer » par Fearon et Vogelstein. La séquence adénome-cancer des patients atteints de cancers colorectaux sporadiques diverge de celle observée chez les patients atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin de part l'ordre d'apparition des événements mutationnels et épigénétiques.

(Modifiée d'après Terzic et *al.*, 2010)

colites). La chronologie des événements mutationnels impliquée dans le développement tumoral diffère entre les CCR sporadiques et ceux associés aux colites (Terzić *et al.*, 2010) (**Figure 9**). Les cancers colorectaux sporadiques présentent dans un premier temps des mutations dans le gène *APC*, répresseur de la voie WNT/ β -caténine, qui sont à l'origine de la transition d'un épithélium normal à un épithélium hyperprolifératif. Le développement d'adénomes précoces et tardifs requiert, respectivement, une surexpression de COX-2 et des mutations de l'oncogène *K-Ras*. Enfin des mutations dans le gène *TP53*, impliqué dans les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire, et une perte d'hétérozygotie (LOH, Loss Of Heterozygoty) au locus 18q sont à l'origine de la formation d'un carcinome colorectal (Jänne and Mayer, 2000) (**Figure 9**). Dans le cas d'un CCR lié à une MICI, la mutation dans le gène *APC* intervient tardivement dans le développement alors que la mutation dans le gène *TP53* est un événement précoce (Jänne and Mayer, 2000) (**Figure 9**). Cette différence dans la chronologie des événements mutationnels intervenant dans les CCR sporadiques et ceux liés aux MICI est l'inflammation pourrait s'expliquer par l'inflammation (Grivennikov, 2013). En effet, les mutations p53 chez les patients atteints de CCR associés à une colite sont observées au sein de la muqueuse enflammée, suggérant le rôle important de l'inflammation dans le développement tumoral chez ces patients.

I.3.3.2 Instabilité microsatellitaire et modifications épigénétiques

L'instabilité microsatellitaire est due à une défaillance du système MMR composé des protéines MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS1 et PMS2. Elle joue un rôle important dans la carcinogenèse colorectale. Environ 10 à 15% des cancers sporadiques présentent une instabilité microsatellitaire, caractérisée par des altérations dans de courtes séquences répétées (Heinimann, 2013). Lorsque plusieurs séquences (2 ou plus) sont mutées, il s'agit de MSI-H (High frequency MicroSatellite Intability) et lorsqu'une seule séquence est mutée, il s'agit de MSI-L (Low frequency MicroSatellite Instability) décrite comme de meilleur pronostic (Fearon, 2011).

Dans de nombreux cas de CCR MSI sporadiques, la méthylation d'îlots CpG présents dans les promoteurs est à l'origine de l'instabilité microsatellitaire observée (Boland and Goel, 2010). En effet, la méthylation des cytosines comprises dans ces régions permet une régulation très fine de l'expression des gènes, soit (i) en empêchant la fixation d'un facteur de

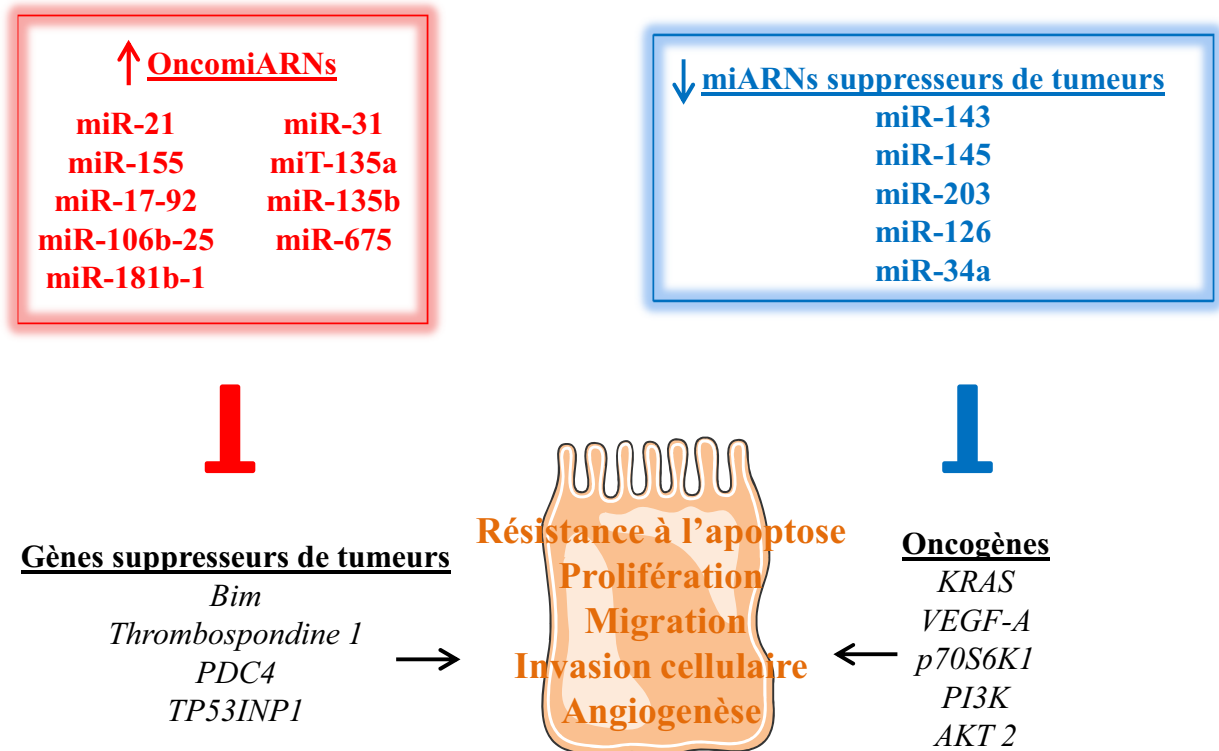


Figure 10 : Implication des oncomiRs et miARNs suppresseurs de tumeurs dans le cancer colorectal.

L'augmentation de l'expression des oncomiRs et la diminution de l'expression des miARNs suppresseurs de tumeurs participe à la mise en place de la carcinogenèse en modulant l'expression d'oncogènes tels que *KRAS*, *VEGF-A*, *PI3K*, *AKT2* et *p70S6K1* ou de gènes suppresseurs de tumeur comme *Bim*, *PDC4*, *TP53INP1*, *Thrombospondine 1*. Ceci participe à la mise en place et au maintien de processus pro-tumoraux tels que la prolifération cellulaire, la résistance à l'apoptose, la migration/invasion cellulaire et l'angiogenèse.

(Modifiée d'après Raisch et *al.*, 2013)

transcription, soit (ii) en induisant le recrutement de la machinerie de remodelage de la chromatine impliquée notamment dans sa condensation, conduisant à une extinction de l'expression génique (pour revue (Jones, 2012; Ordway and Curran, 2002)). Des études ont permis de montrer non seulement que la majorité des cancers sporadiques avec une MSI-H présentent une perte de l'expression de la protéine MLH1 (Herman *et al.*, 1998), mais également que cette diminution est due à une hyperméthylation de son promoteur au niveau d'îlots CpG (Heinimann, 2013; Herman *et al.*, 1998; Kane *et al.*, 1997; Sinicrope and Sargent, 2012). La diminution d'expression des autres protéines du MMR est rare dans les cancers colorectaux sporadiques (Kheirleiseid *et al.*, 2013; Plaschke *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'augmentation de la méthylation survenant avec l'âge est accélérée dans le côlon en réponse à l'inflammation chronique (Boland and Goel, 2010; Kondo and Issa, 2004).

Les microARNs (miARNs) sont de petits ARNs non codants de 21 à 24 nucléotides dont la fonction principale est la régulation post-transcriptionnelle des gènes en se fixant sur la région 3'UTR des ARNm, ce qui les conduit à la dégradation ou inhibe leur traduction. Une étude menée par Volinia et collaborateurs a permis d'établir, pour certains cancers dont le CCR, un profil d'expression des miARNs (Volinia *et al.*, 2006). Ainsi, les miR-21, miR-155 et les clusters miR-17-92 et miR-106b-25 sont définis comme des oncomiRs, surexprimés chez les patients atteints de CCR, possédant des effets pro-tumoraux (Nishida *et al.*, 2012; Schetter *et al.*, 2008; Shibuya *et al.*, 2010). En revanche, les miARNs suppresseurs de tumeurs tels que miR-143, miR-145 et miR-34a ont une activité anti-tumorale et sont diminués chez les patients atteints de CCR (Nugent *et al.*, 2012; Slaby *et al.*, 2007). La surexpression des oncomiRs et la diminution de l'expression des miARNs suppresseurs de tumeurs participent au développement tumoral en modulant les processus de prolifération et d'apoptose cellulaire, de migration cellulaire et d'angiogenèse (**Figure 10**).

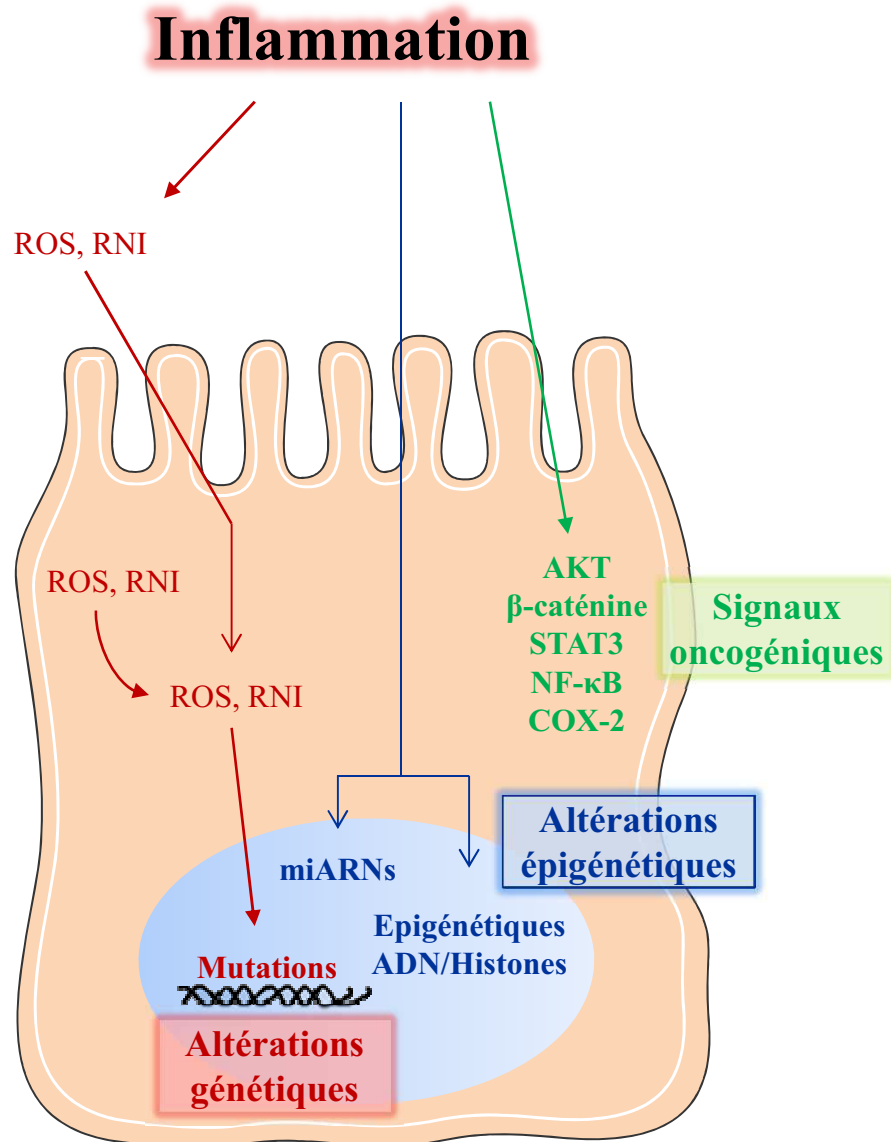


Figure 11 : Rôle de l'inflammation sur la carcinogenèse colorectale.

Les cellules immunitaires sont les principales cellules productrices de composés génotoxiques tels que les espèces oxygénées et nitrosées réactives (ROS/RNI) induisant notamment des lésions de l'ADN au niveau des cellules épithéliales intestinales par des mécanismes de transfert non identifiés à ce jour. Les signaux pro-inflammatoires peuvent également être à l'origine, au niveau de cellules épithéliales intestinales, de modifications épigénétiques (modulation de l'expression des miARNs et modifications des histones) et de l'activation de voies de signalisation de survie et de prolifération cellulaire telles que AKT, STAT3, NF-κB, COX-2, et la voie WNT/β-caténine qui joue un rôle pivot dans la formation et la croissance des adénomes.

(Modifiée d'après Grivennikov *et al.*, 2013)

II. Inflammation et cancer colorectal

II.1 Généralités

En 1863, le pathologiste Rudolph Virchow établissait pour la 1^{ère} fois une connexion entre inflammation et cancer en décrivant la présence de leucocytes au sein de lésions néoplasiques. Il émit l'hypothèse que l'origine du cancer pourrait se situer aux sites d'inflammation chroniques (Grivennikov *et al.*, 2010). Cette hypothèse a été depuis largement étayée. Un argument fort permettant de lier l'inflammation à la carcinogenèse colorectale est la diminution de 40 à 50% du risque de développer un CCR observée chez les patients qui utilisent à long terme (10-15 ans) des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et plus particulièrement l'aspirine (Chan *et al.*, 2007; Flossmann *et al.*, 2007; Rostom *et al.*, 2007a). La susceptibilité des patients atteints de MICI à développer un CCR étaye également l'hypothèse de l'implication de l'inflammation dans le développement tumoral (Cunningham *et al.*, 2010). De plus, une susceptibilité augmentée à développer des tumeurs dans des modèles murins de carcinogenèse (les souris *APC*^{Min/+} présentant une mutation dans le gène *APC* à l'état hétérozygote, et les souris traitées à l'azoxyméthane (AOM), un agent carcinogène) est observée lorsque les animaux sont traités avec du Dextran Sulfate Sodium (DSS), un agent chimique induisant des colites (Cooper *et al.*, 2001; Neufert *et al.*, 2007). Selon le type de CCR considéré, l'inflammation chronique observée chez les patients pourrait résulter d'altérations génétiques (comme c'est le cas par exemple chez les patients atteints de MICI), de l'exposition à certains facteurs environnementaux (alimentation, détergents, émulsifiants, aluminium) et/ou de la colonisation anormale de la muqueuse intestinale par des agents infectieux colitogènes (Boleij and Tjalsma, 2012; Kraus and Arber, 2009).

Les cellules immunitaires activées infiltrant la muqueuse intestinale et recrutées au sein de la tumeur joueraient un rôle promoteur dans la carcinogenèse en produisant des espèces oxygénées/nitrosées réactives tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le radical hydroxyle (HO[•]), l'anion superoxyde (O₂^{•-}) et le monoxyde d'azote (NO[•]) (Mantovani *et al.*, 2008) (**Figure 11**). Elles produisent également des cytokines/chimiokines telles que l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α , l'IL-1 β), des éicosanoïdes (PGE₂) et des facteurs de croissance tels que le facteur de croissance épidermique (EGF, Epidermal Growth Factor), le VEGF, le facteur de

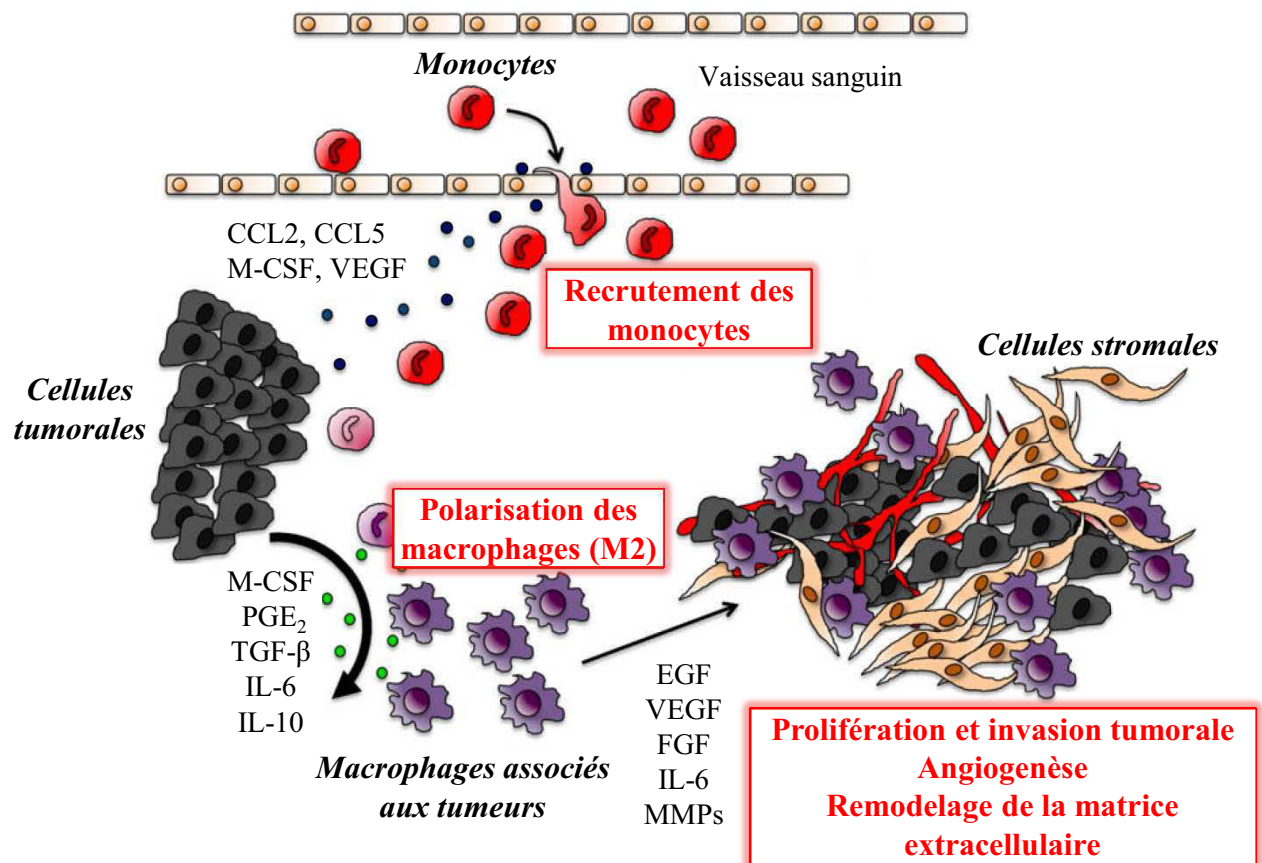


Figure 12 : Recrutement et polarisation des macrophages dans le microenvironnement tumoral.

La sécrétion par les cellules tumorales d'un cocktail de cytokines/chimiokines et molécules chimioattractantes induit au site tumoral le recrutement, la différenciation et la polarisation en macrophages de type M2 des monocytes sanguins. Ces macrophages associés aux tumeurs, en produisant des cytokines, des facteurs de croissance et des métalloprotéases, favorisent la mise en place de l'angiogenèse, de la prolifération et de l'invasion tumorale participant activement au développement tumoral.

(Modifiée d'après Erreni *et al.*, 2011)

croissance dérivé des plaquettes (PDGF, Platelet-Derived Growth Factor). La production de ces médiateurs de l'inflammation est orchestrée par des voies de signalisation clés telles que les voies NF- κ B, STAT3, AKT et la voie COX-2/PGE₂. Ces médiateurs de l'inflammation vont impacter sur le développement tumoral, en inhibant l'apoptose, en stimulant des processus pro-tumoraux tels que l'angiogenèse et la prolifération cellulaire et en favorisant le recrutement et l'activation de cellules immunitaires au sein du microenvironnement tumoral (Grivennikov *et al.*, 2010; Porta *et al.*, 2009).

L'infiltrat inflammatoire tumoral est principalement composé de macrophages, représentant la population cellulaire majoritaire, de neutrophiles, de cellules dendritiques et de cellules « *natural killer* » (NK) (Fridman *et al.*, 2012). Les cellules du système immunitaire adaptatif tels que les lymphocytes B et T sont également présents au sein du microenvironnement tumoral.

II.2 Rôle des macrophages dans la carcinogenèse colorectale

II.2.1 Recrutement des macrophages au site tumoral

Le recrutement des macrophages au site tumoral est un phénomène précoce dans la carcinogenèse colorectale et fait intervenir un cocktail de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance tels que le ligand de chimiokine 2 (CCL2, Chemokine Ligand 2 ou MCP-1, Monocyte Chemotactic Protein-1), le ligand de chimiokine 5 (CCL5, Chemokine Ligand 5), VEGF, le Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) ou les facteurs stimulant les colonies de granulocytes ou de macrophages tels que le GM-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) et M-CSF (Macrophages Colony Stimulating Factor) ou CSF-1 (Colony Stimulating Factor 1), qui sont impliqués dans l'attraction et la différenciation des monocytes sanguins en macrophages (Bingle *et al.*, 2002; Erreni *et al.*, 2011; Sica *et al.*, 2008) (**Figure 12**). Contrairement aux souris $APC^{Min/+}$, les animaux $APC^{Min/+}MCP1^{-/-}$ présentent une réduction d'environ 40% du nombre de macrophages au sein des polypes associée à une diminution de 20% et 45% du nombre et de la taille des tumeurs, respectivement (McClellan *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'implication majeure de l'hypoxie dans le recrutement des macrophages a été démontrée en modèle murin de carcinogenèse associée à une colite (AOM/DSS) dans lequel l'inhibition pharmacologique de la dimérisation du facteur de transcription HIF-1 α (Hypoxia-

Inducible Factor 1 alpha) induit une réduction de l'infiltration macrophagique au site tumoral associée à une diminution de la taille, du nombre et de la vascularisation des tumeurs (*Shay et al.*, 2014).

II.2.2 Implication des macrophages dans la carcinogenèse colorectale

Les macrophages jouent un rôle majeur dans la carcinogenèse colorectale, comme le suggère l'altération du développement tumoral et la diminution de 80% du nombre de polypes chez les souris $APC^{\Delta 716}op/op$ comparativement aux souris contrôles $APC^{\Delta 716}$. Les animaux $APC^{\Delta 716}op/op$ sont prédisposés au développement de CCR et présentent une diminution du nombre de macrophages dans la plupart des tissus due à une mutation dans le gène *CSF-1*, impliqué dans le recrutement des macrophages (*Oguma et al.*, 2008). De plus, une diminution du poids, du volume et de la vascularisation des tumeurs coliques et une absence de métastases a été mise en évidence dans un modèle murin orthotopique traité avec du chlorodate, une molécule induisant une déplétion en macrophages, comparativement aux animaux non traités (*Kruse et al.*, 2013).

Plusieurs études indépendantes ont démontré que l'infiltration des macrophages en périphérie de la tumeur corrèle avec un bon pronostic des patients atteints de CCR et une diminution des métastases hépatiques (*Algars et al.*, 2012; *Forssell et al.*, 2007; *Funada et al.*, 2003; *Sugita et al.*, 2002; *Zhou et al.*, 2010, 2010). L'activité anti-tumorale des macrophages péri-tumoraux nécessite un contact direct avec les cellules tumorales et contrairement aux macrophages présents en zone non tumorale, les macrophages péri-tumoraux expriment FasL, une molécule induisant un signal de mort cellulaire, ce qui est associé à une augmentation de l'apoptose des cellules tumorales chez les patients atteints de CCR (*Forssell et al.*, 2007; *Sugita et al.*, 2002). A l'inverse Bailey et collaborateurs ont mis en évidence que le recrutement des macrophages au sein des tumeurs, principalement dans les zones nécrotiques et hypoxiques *via* la sécrétion par les cellules tumorales de cytokines et chimiokines, IL-8 et CCL2, n'est pas un indicateur de bon pronostic (*Bailey et al.*, 2007). De plus, l'accumulation des macrophages et la sécrétion de ces chimiokines augmentent avec le stade TNM des patients.

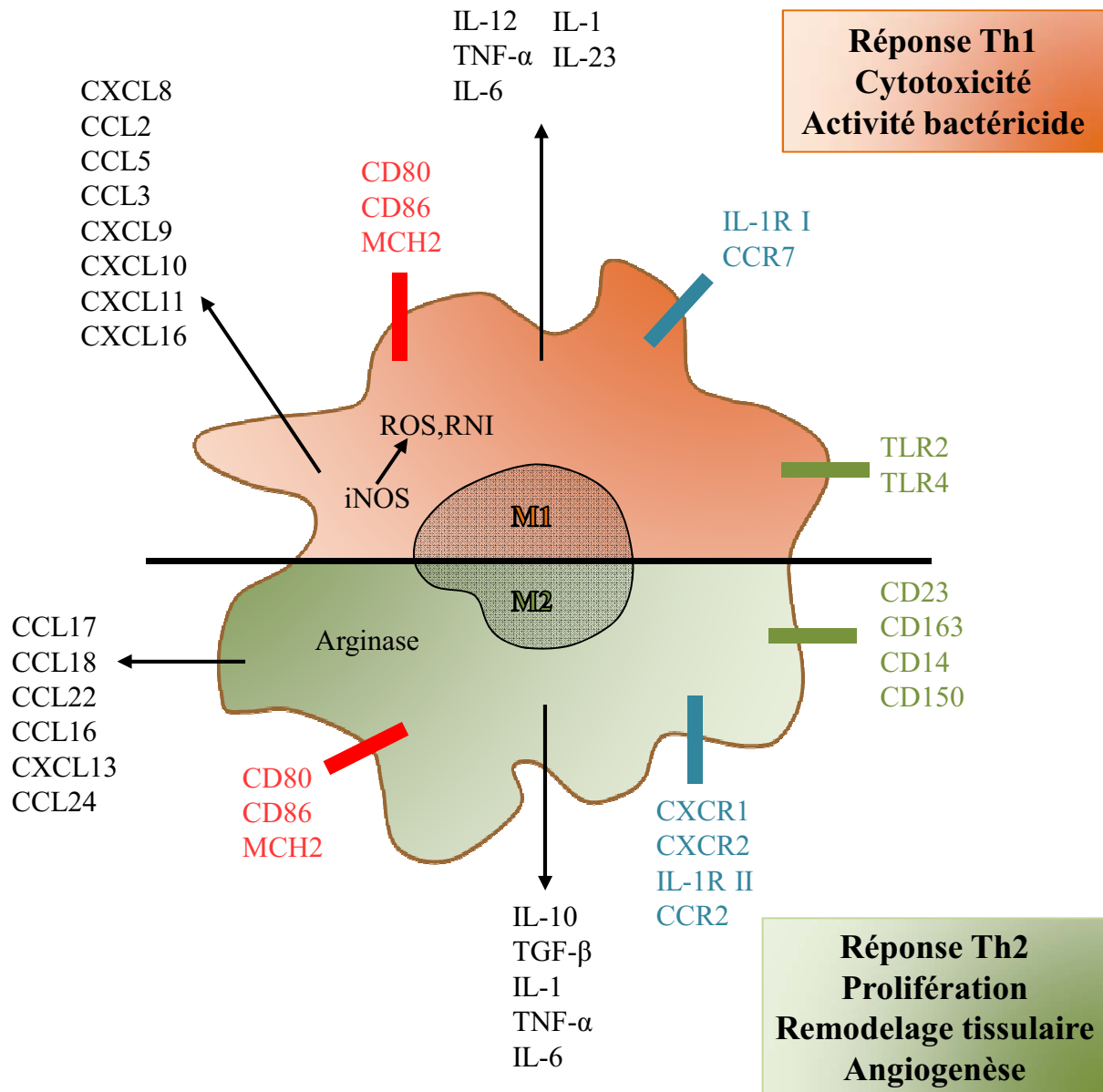


Figure 13 : Polarisation des macrophages.

En fonction des stimuli auxquels ces cellules sont confrontées, les macrophages peuvent subir des reprogrammations transcriptionnelles les conduisant à exprimer des fonctions différentes. Schématiquement les macrophages peuvent avoir une polarisation de type M1 (activation dite « classique ») ou de type M2 (activation dite « alternative »), ces deux états de polarisation représentant un continuum d'états fonctionnels. En fonction de leur polarisation, les macrophages vont notamment exprimer des marqueurs de surface différents et sécréter des profils de cytokines/chimiokines différents. De manière générale, les macrophages de types M1 sont de puissants producteurs de radicaux libres et de cytokines pro-inflammatoires et participent à la mise en place d'une réponse Th1. Ils sont impliqués dans l'élimination de pathogènes intracellulaires et ont des fonctions anti-tumorales. Les macrophages de type M2 sont impliqués dans l'établissement d'un environnement immunosuppresseur, d'une réponse Th2 et sont faiblement bactéricides. Ils possèdent des fonctions pro-tumorales en participant notamment au remodelage tissulaire et à la mise en place de l'angiogenèse.

(Modifiée d'après Benoit *et al.*, 2008)

En fonction de leur localisation et en réponse à des signaux environnementaux, les macrophages sont sujets à des reprogrammations transcriptionnelles conduisant à l'émergence de phénotypes distincts, M1 (activation classique) et M2 (activation alternative), représentant un continuum d'états fonctionnels (**Figure 13**). La différenciation et la polarisation en macrophages de type M1 requiert la présence de stimuli tels que le tumor necrosis factor alpha (TNF- α), l'interféron gamma (INF- γ), le lipopolysaccharide bactérien (LPS) et le GM-CSF (Erreni *et al.*, 2011). Alors que des molécules sécrétées par le microenvironnement tumoral telles que l'IL-6, M-CSF, PGE₂, TGF- β ou l'IL-10 sont capables d'orienter la polarisation des macrophages vers un phénotype de M2. Ainsi, l'exposition des macrophages péri-tumoraux aux cytokines/chimiokines sécrétées par le microenvironnement tumoral serait moins importante que celle des macrophages intra-tumoraux et ils se différencieraient donc en macrophages possédant un phénotype anti-tumoral (M1) plutôt que pro-tumoral (M2).

II.2.3 Potentiels anti- ou pro-tumoral des macrophages associés aux tumeurs

Les macrophages de type M1 sont décrits pour être de puissants producteurs de radicaux libres et de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 et IL-23) et participent à la mise en place d'une réponse immunitaire de type Th1 (Grivennikov *et al.*, 2010; Verreck *et al.*, 2004). Ils sont impliqués dans l'élimination de pathogènes et exercent également une activité cytotoxique vis-à-vis des cellules cancéreuses *via* le relargage de molécules cytotoxiques telles que le monoxyde d'azote (NO, Nitric Oxyde) ou d'intermédiaires des espèces oxygénées réactives (Gordon and Taylor, 2005; Mantovani *et al.*, 2005). Les macrophages de type M1 participeraient donc à une 1^{ère} ligne de défense contre les pathogènes et les cellules tumorales. D'ailleurs, l'infiltration de macrophages M1 au site tumoral serait associée à un bon pronostic chez les patients atteints de CCR (Edin *et al.*, 2012).

A l'inverse, les macrophages de type M2, dont la présence est augmentée dans les tissus tumoraux des patients de CCR et des souris *APC*^{Min/+}, possèdent une activité pro-tumorale (Bailey *et al.*, 2007; Biswas *et al.*, 2006; Nakanishi *et al.*, 2011; Siveen and Kuttan, 2009; Zhang *et al.*, 2013). Ils possèdent de faibles capacités de présentation de l'antigène et sont impliqués dans l'établissement d'une réponse de type Th2 (Erreni *et al.*, 2011). Ces macrophages sont capables de moduler de nombreux processus du développement tumoral. A

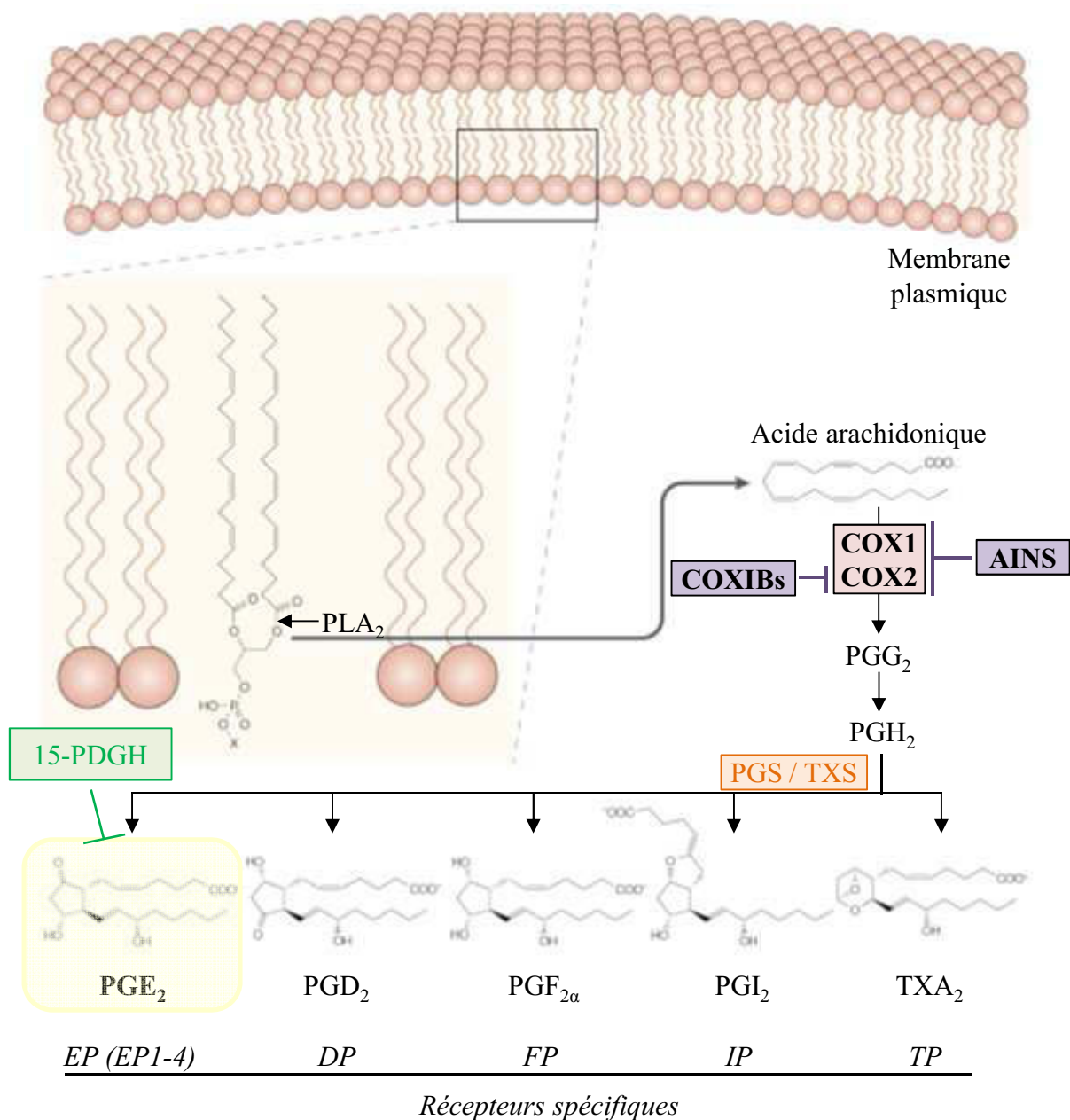


Figure 14 : Synthèse des prostaglandines et du thromboxane.

L'acide arachidonique (AA), libéré de la membrane plasmique par la phospholipase A₂ (PLA₂), est le point de départ de la synthèse des prostaglandines (PGs) et du thromboxane (TX). Les cyclooxygénases (COX) interviennent dans les premières étapes de la conversion de l'AA en PGG₂ puis PGH₂, à partir de laquelle les prostaglandines synthases (PGS) et thromboxane synthase (TXS) catalysent la synthèse de PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂, TXA₂. Les fonctions biologiques des PGs et TXs passent par leur fixation sur des récepteurs spécifiques que sont EP (PGE₂), DP (PGD₂), FP (PGF₂), IP (PGI₂), TP (TXA₂). L'enzyme 15-PDGH (*prostaglandin deshydrogenase*) est impliquée dans la dégradation de PGE₂.

(Modifiée d'après Gupta and Dubois, 2001)

titre d'exemple, une étude récente a mis en exergue l'implication des macrophages de type M2 dans le développement tumoral et plus particulièrement la croissance tumorale (Kaler *et al.*, 2009). Ceci fait intervenir la synthèse de la cytokine IL1- β , capable d'induire *in vitro* en cellules épithéliales intestinales la voie de signalisation PI3K (Phosphatidylinositol triphosphate Kinase)/AKT, impliquée notamment dans la survie/croissance cellulaire et la résistance à l'apoptose. Par ailleurs, les macrophages de type M2 sont également capables de moduler *in vivo* les processus angiogéniques, dont la mise en place est indispensable au développement tumoral, notamment *via* la sécrétion du facteur de croissance VEGF (Barbera-Guillem *et al.*, 2002). Les macrophages de type M2 participent également à la transition épithélio-mésenchymateuse, correspondant à une dédifférenciation cellulaire associée à la progression tumorale et à la formation de métastases, en sécrétant dans l'environnement tumoral la cytokine TGF- β (Erreni *et al.*, 2011). Ils sont aussi capables de promouvoir la migration et l'invasion des cellules tumorales en sécrétant les métalloprotéases MMP2 et MMP9, impliquées dans les processus d'invasion cellulaire *via* la dégradation de la matrice extracellulaire et le clivage de molécules d'adhésion cellulaire telle que l'E-cadhérine, et les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-8 et TNF- α (Zhang *et al.*, 2013).

II.3 COX-2/PGE₂ et cancer colorectal

II.3.1 Cyclo-oxygénases et prostaglandines

Les protéines appartenant à la famille des cyclo-oxygénases (COX) sont localisées dans le réticulum endoplasmique et près de la membrane nucléaire (Chandrasekharan and Simmons, 2004). Il en existe 3 isoformes nommées COX-1, COX-2 et COX-3, cette dernière étant un variant d'épissage de COX-1 dont le rôle est à ce jour mal défini (Greenhough *et al.*, 2009).

Les COXs sont des enzymes intervenant dans la synthèse des prostaglandines (PGs) à partir de l'acide arachidonique (AA) préalablement libéré de la membrane plasmique par l'action de la phospholipase-A2 (Chandrasekharan and Simmons, 2004; Chun and Surh, 2004; Greenhough *et al.*, 2009) (**Figure 14**). Les COXs interviennent dans les étapes initiales de la synthèse des prostaglandines en catalysant la transformation de l'AA en prostaglandine G2 (PGG₂) qui est rapidement transformée, étant instable, en prostaglandine H2 (PGH₂). PGH₂

est le précurseur de la synthèse des prostaglandines et du thromboxane qui sont formés suite à l'action de prostaglandines synthases pour donner le thromboxane A₂ (TXA₂), les prostaglandines I₂ (PGI₂), -D₂ (PGD₂), -F_{2α} (PGF_{2α}) et -E₂ (PGE₂). Le taux intracellulaire de PGE₂ est dépendant d'un équilibre entre sa synthèse par les COXs et sa dégradation par l'enzyme 15-hydroxyprostaglandine déshydrogénase (15-PGDH), dont l'expression est diminuée dans les carcinomes colorectaux comparativement au tissus sains (Backlund *et al.*, 2005; Wang and Dubois, 2010a). Chacun de ces lipides bioactifs exerce un rôle dans des processus physiologiques ou pro-tumoraux en se fixant sur des récepteurs spécifiques tels que DP pour PGD₂, EP (EP1-4) pour PGE₂, FP pour PGF_{2α}, IP pour PGI₂, et TP pour TXA₂ (Chandrasekharan and Simmons, 2004; Sobolewski *et al.*, 2010; Wang and Dubois, 2010a) (**Figure 14**).

L'expression de COX-1 est constitutive dans la plupart des tissus de l'organisme dont le rein, le poumon, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon. Elle permet le maintien d'un niveau basal de prostaglandines essentiel au maintien de l'homéostasie tissulaire, en modulant de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération ou l'angiogenèse (Chandrasekharan and Simmons, 2004; Sobolewski *et al.*, 2010). A l'inverse, COX-2 n'est pas exprimée en condition physiologique, sauf dans le système nerveux central, les reins et les vésicules séminales (Adegboyega and Ololade, 2004; Kirschenbaum *et al.*, 2000; Svensson and Yaksh, 2002). En revanche, COX-2 est surexprimée dans de nombreux cancers tels que les cancers colorectaux, pulmonaires, prostatiques, cervicaux, ovariens, gastriques, pancréatiques, et le cancer du sein (Allaj *et al.*, 2013). C'est une forme inductible, dont l'expression est induite par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1-β, le TNFα, l'INFγ, l'IL-6 ; le LPS bactérien ; des hormones telles que la FSH (Follicle-Stimulating Hormone), la LH (Luteinizing Hormone) et les œstrogènes ; des facteurs de croissance comme EGF, PDGF et le facteur de croissance des fibroblastes (FGF, Fibroblast Growth Factor) (Ramsay *et al.*, 2003; Tanabe and Tohnai, 2002). Une 3^{ème} isoforme COX-3, exprimée majoritairement dans le cerveau, a pu être identifiée chez le rat comme étant un variant d'épissage de COX-1 (Kis *et al.*, 2003). Cependant, son rôle physiologique reste à ce jour peu connu.

II.3.2 Implication de COX-2 dans la carcinogenèse colorectale

Chez l'Homme, une surexpression de COX-2 est observée dans 50% des adénomes et 85% des carcinomes colorectaux et une augmentation des ARNm COX-2 est observée dans 80% des tumeurs colorectales (Eberhart *et al.*, 1994; Roelofs *et al.*, 2014). La surexpression de COX-2 augmente avec l'agressivité des tumeurs, la localisation tumorale avec une expression plus importante sur le front invasif (correspondant au bord de la tumeur), comparativement au centre de la tumeur, et est associée à un mauvais pronostic des patients atteints de CCR (Cianchi *et al.*, 2010; Elzagheid *et al.*, 2013; Ogino *et al.*, 2008). Au sein des tumeurs colorectales, COX-2 est exprimée dans les cellules épithéliales, les fibroblastes, les macrophages et les cellules endothéliales (Gupta and Dubois, 2001).

Des études cliniques ont mis en évidence que les effets protecteurs de l'aspirine vis-à-vis du développement tumoral décrits précédemment ne sont observés que pour les patients développant des tumeurs colorectales où COX-2 est surexprimée comparativement aux patients porteurs des tumeurs colorectales sans expression de COX-2 (Chan *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'utilisation pendant 10 à 15 ans d'inhibiteurs de cyclo-oxygénases (COXIBs, Cyclo-Oxygenases Inhibitors) permet de réduire de 40 à 50% le risque de développer un CCR chez des patients qui avaient déjà développé des adénomes, et permet de diminuer le nombre de polypes développés par les patients atteints de PAF (Chan *et al.*, 2007; Flossmann *et al.*, 2007; Rostom *et al.*, 2007b; Sandler *et al.*, 2003; Steinbach *et al.*, 2000). Cependant, ces molécules possèdent des effets délétères. En effet, l'utilisation récurrente de Celecoxib® (un inhibiteur spécifique de COX-2) est associée à des pathologies du système cardio-vasculaire, avec notamment une augmentation de 2 à 3 fois du risque de développer une thrombose cardio-vasculaire (Bertagnolli *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2006). Les AINS, quant à eux, possèdent également des effets secondaires et sont connus pour induire l'apparition de nausées ainsi que d'ulcères gastriques pouvant aller jusqu'à la perforation de l'estomac (Wolfe *et al.*, 1999).

De nombreux arguments expérimentaux ont démontré le rôle pivot de COX-2 dans la carcinogenèse colorectale. La délétion du gène codant la protéine COX-2 ou l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques chez des souris *APC*^{Min/+} et *APC*^{Δ716}, prédisposées au développement d'un CCR, induit une diminution de moitié du nombre de tumeurs coliques (Chulada *et al.*,

2000; Lal *et al.*, 2001; Oshima *et al.*, 1996, 2001). COX-2 pourrait également jouer un rôle dans le développement du CCR chez des patients atteints de MICI comme le suggère la diminution du nombre de tumeurs coliques observées chez des souris traitées avec de l'AOM et du DSS (modèle de CCR associée à une colite) et un inhibiteur spécifique de COX-2 (Kohno *et al.*, 2005). Par ailleurs, une étude comparative récente portant sur l'effet des AINS, ciblant ou non spécifiquement COX-2, sur la formation des foyers de cryptes aberrantes dans un modèle de rat traité à l'AOM suggère que l'inhibition de COX-2 par les AINS conférerait une protection contre la formation de foyer de cryptes aberrantes (Martin *et al.*, 2013).

II.3.3 Implication de PGE₂ dans la carcinogenèse colorectale

Le rôle pivot de COX-2 dans la carcinogenèse colorectale est attribué à son produit de synthèse majoritaire PGE₂, dont la synthèse est augmentée dans les adénomes et carcinomes colorectaux comparativement à la muqueuse saine de ces mêmes patients (Pugh and Thomas, 1994; Rigas *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1998). De plus, chez des patients atteints de PAF, le taux de PGE₂ au site tumoral augmente avec la taille des adénomes (Yang *et al.*, 1998). Par ailleurs, la prévention du développement d'adénomes chez les patients PAF est plus efficace lorsque le taux de prostaglandines tissulaires est réduit par un traitement avec des AINS (Giardiello *et al.*, 2004). De nombreuses études menées en modèle animal ont permis d'appuyer le rôle clé joué par PGE₂ dans le développement du CCR. Il a été montré, en modèle de souris *APC*^{Min/+}, que le taux de PGE₂ au site tumoral augmente avec la taille des adénomes (Kettunen *et al.*, 2003). De plus, l'administration de PGE₂ induit une augmentation du nombre de tumeurs chez des souris *APC*^{Min/+} et des rats traités à l'AOM, comparativement à des animaux non traités avec PGE₂ (Kawamori *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004, 2005). Par ailleurs, la délétion du gène codant l'enzyme déshydrogénase des prostaglandines (15-PGDH, 15-ProstaGlandin DesHydrogenase), impliquée dans la dégradation de PGE₂, induit une augmentation du nombre de tumeurs chez des souris *APC*^{Min/+} et des souris traitées à l'AOM (Myung *et al.*, 2006). En revanche, le blocage spécifique de PGE₂ par l'administration d'un anticorps anti-PGE₂ induit un retard de croissance de tumeurs transplantées chez la souris (Stolina *et al.*, 2000).

Le rôle central qu'exerce PGE₂ dans la carcinogenèse colorectale repose sur des effets autocrines et paracrines et fait suite à sa fixation sur des récepteurs spécifiques membranaires

(EP1, EP2, EP3 et EP4) qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés à une protéine G (Wang and Dubois, 2010b). Ces récepteurs sont exprimés en condition physiologique au niveau de la membrane plasmique des cellules de l'épithélium colique, de la *lamina propria* et des cellules musculaires longitudinales (Hull *et al.*, 2004). Chez l'Homme, les 4 sous-types de récepteurs de PGE₂ sont surexprimés dans les tumeurs colorectales comparativement à la muqueuse non tumorale, EP4 présentant l'expression la plus élevée (Chell *et al.*, 2006; Doherty *et al.*, 2009a; Hawcroft *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2010). L'augmentation des ARNm d'EP2 et EP4 observée dans les tissus tumoraux des patients atteints de CCR est indépendante du stade tumoral. L'augmentation de l'expression d'EP4 est plus importante dans les carcinomes que dans les adénomes colorectaux chez les patients atteints de CCR, suggérant une augmentation séquentielle de l'expression EP4 au cours de la progression tumorale (Chell *et al.*, 2006; Gustafsson *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'analyse par PCR quantitative de l'expression des récepteurs de PGE₂ a révélé une augmentation de l'expression de EP1, EP2 et EP4 dans les tumeurs colorectales de souris traitées à l'AOM et des souris APC^{Δ716} comparativement à la muqueuse non tumorale adjacente (Kawamori *et al.*, 2003; Mutoh *et al.*, 2002; Sonoshita *et al.*, 2001).

Plusieurs études *in vivo* ont démontré que la délétion des récepteurs EP1 et EP4 ou l'utilisation d'antagonistes spécifiques de ces récepteurs réduisent la formation de foyers de cryptes aberrantes, l'incidence, le nombre et la taille des tumeurs colorectales des souris APC^{Min/+} et des souris et rats traitées à l'AOM, suggérant l'implication de ces récepteurs dans la carcinogenèse colorectale (Kawamori *et al.*, 2001, 2005; Mutoh *et al.*, 2002; Niho *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 1999). De plus, l'utilisation d'un antagoniste d'EP1 ou d'EP4 diminue la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe (O'Callaghan *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'inactivation du gène EP2 chez des souris APC^{Δ716} induit une diminution de la taille et du nombre de tumeurs colorectales comparativement aux animaux exprimant le récepteur (Shao *et al.*, 2003; Sonoshita *et al.*, 2001).

Microenvironnement tumoral
(cellules tumorales,
macrophages,...)

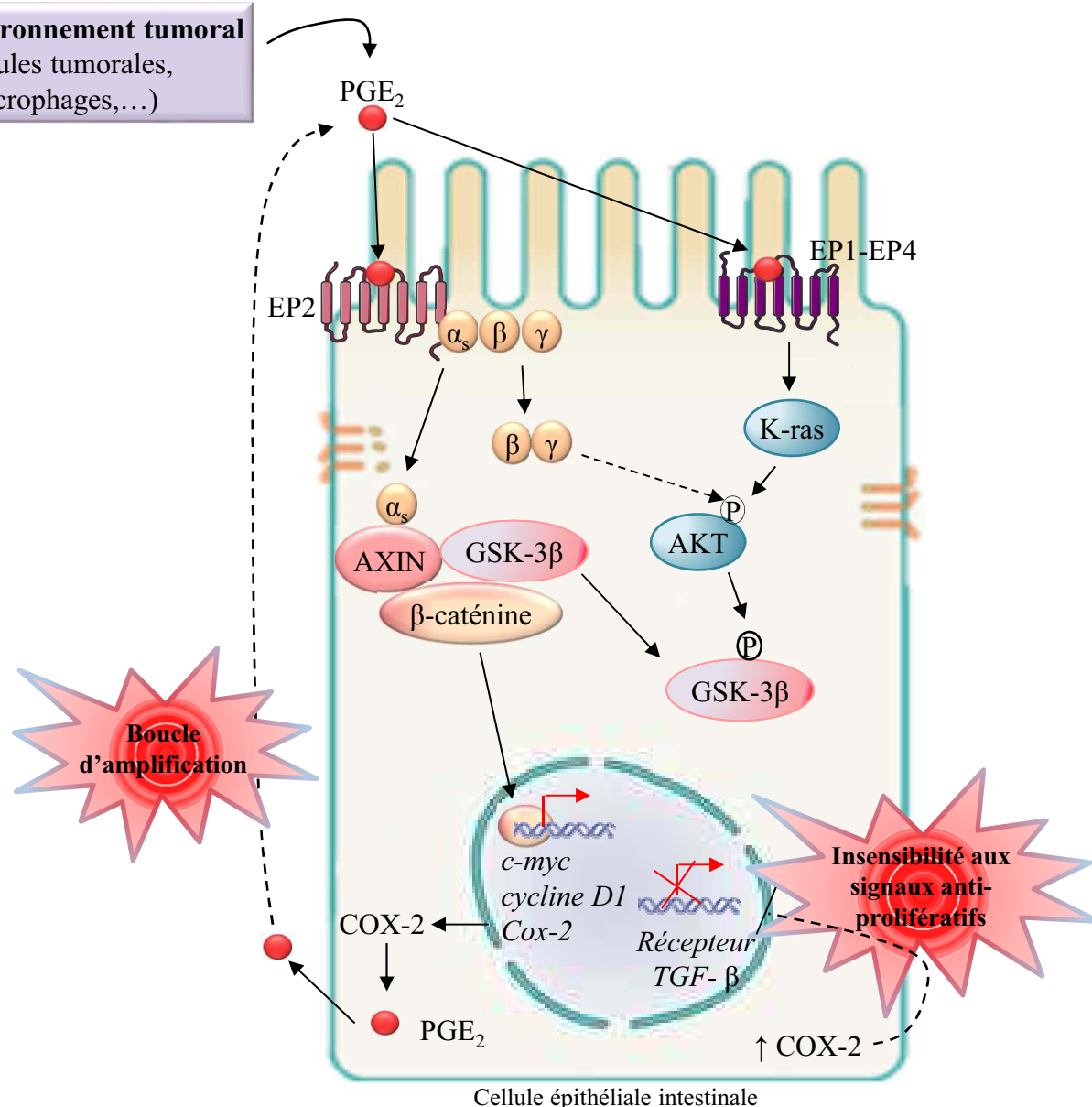


Figure 15 : Rôle de COX-2/PGE₂ dans la prolifération cellulaire et l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs.

A l'état basal, le complexe protéique composé de protéine APC, AXIN et GSK-3 β est impliqué dans la séquestration cytoplasmique, la phosphorylation et l'orientation vers une dégradation par le protéasome de la β -caténine. La fixation de PGE₂ sur son récepteur EP-4, couplé à une protéine G_s, induit la phosphorylation de l'AXIN, ce qui a pour conséquence le relargage de la protéine GSK-3 β et la dissolution du complexe de destruction de la β -caténine. De manière concomitante, la fixation de PGE₂ induit la phosphorylation de AKT qui phosphoryle à son tour GSK-3 β la rendant inactive. Tout ceci concourt au relargage de la β -caténine dans le cytoplasme, qui peut alors transloquer dans le noyau et activer l'expression de gènes cibles tels que *c-myc*, *cycline D1* et *Cox-2*, induisant ainsi une boucle d'amplification. Par ailleurs la surexpression de COX-2 en cellules épithéliales intestinales est impliquée dans la diminution de l'expression du récepteur au TGF- β , ce qui participe à l'insensibilité des cellules aux signaux anti-prolifératifs.

(Modifiée D'après Castellone *et al.*, 2005 ; Wu *et al.*, 2010)

II.3.3.1 COX-2/PGE₂ : mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogenèse colorectale

Le rôle de PGE₂ dans la carcinogenèse colorectale sera illustré ci-après par sa capacité à moduler certains processus clés, dont la dérégulation a des conséquences sur le développement tumoral.

Stimulation de la prolifération cellulaire

Le gradient d'expression du ligand WNT dans les cryptes intestinales permet la mise en place d'une prolifération cellulaire accrue au fond des cryptes, qui diminue lors de la migration des cellules le long des cryptes au profit de la différenciation cellulaire pour donner les différents types cellulaires composant l'épithélium intestinal. L'expression anormale de COX-2, au niveau du microenvironnement tumoral, et donc la production de PGE₂ et l'activation de la voie WNT/β-caténine qui en découle pourrait être à l'origine du blocage de la différenciation au profit d'une prolifération exacerbée et la mise en place d'un phénotype immortalisé (Greenhough *et al.*, 2009). PGE₂ est capable de moduler *in vitro* la prolifération cellulaire de cellules épithéliales intestinales en activant la voie de signalisation WNT/β-caténine en se fixant sur le récepteur EP2 (Castellone *et al.*, 2005) (**Figure 15**). Une boucle d'amplification entre la synthèse de PGE₂ et l'activation de la voie WNT/β-caténine a été mise en évidence (Wu *et al.*, 2010). En effet, l'activation de la voie WNT/β-caténine dépendante de l'activation des récepteurs EP1 et EP4 conduit à l'augmentation de l'expression de COX-2. Au cours de la carcinogenèse, les cellules deviennent insensibles aux signaux antiprolifératifs tels que ceux induit par la voie TGF-β (Tsujii and DuBois, 1995). La diminution de l'expression du récepteur au TGF-β induite par une surexpression de COX-2 pourrait intervenir dans cette insensibilité (**Figure 15**).

Propriétés anti-apoptotiques

Le maintien de l'homéostasie tissulaire nécessite un équilibre entre l'apoptose et la prolifération cellulaire. L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée qui intervient dans le contrôle du nombre de cellules et l'élimination de cellules endommagées ou infectées par des micro-organismes (Adams, 2003). L'implication de PGE₂ dans la résistance

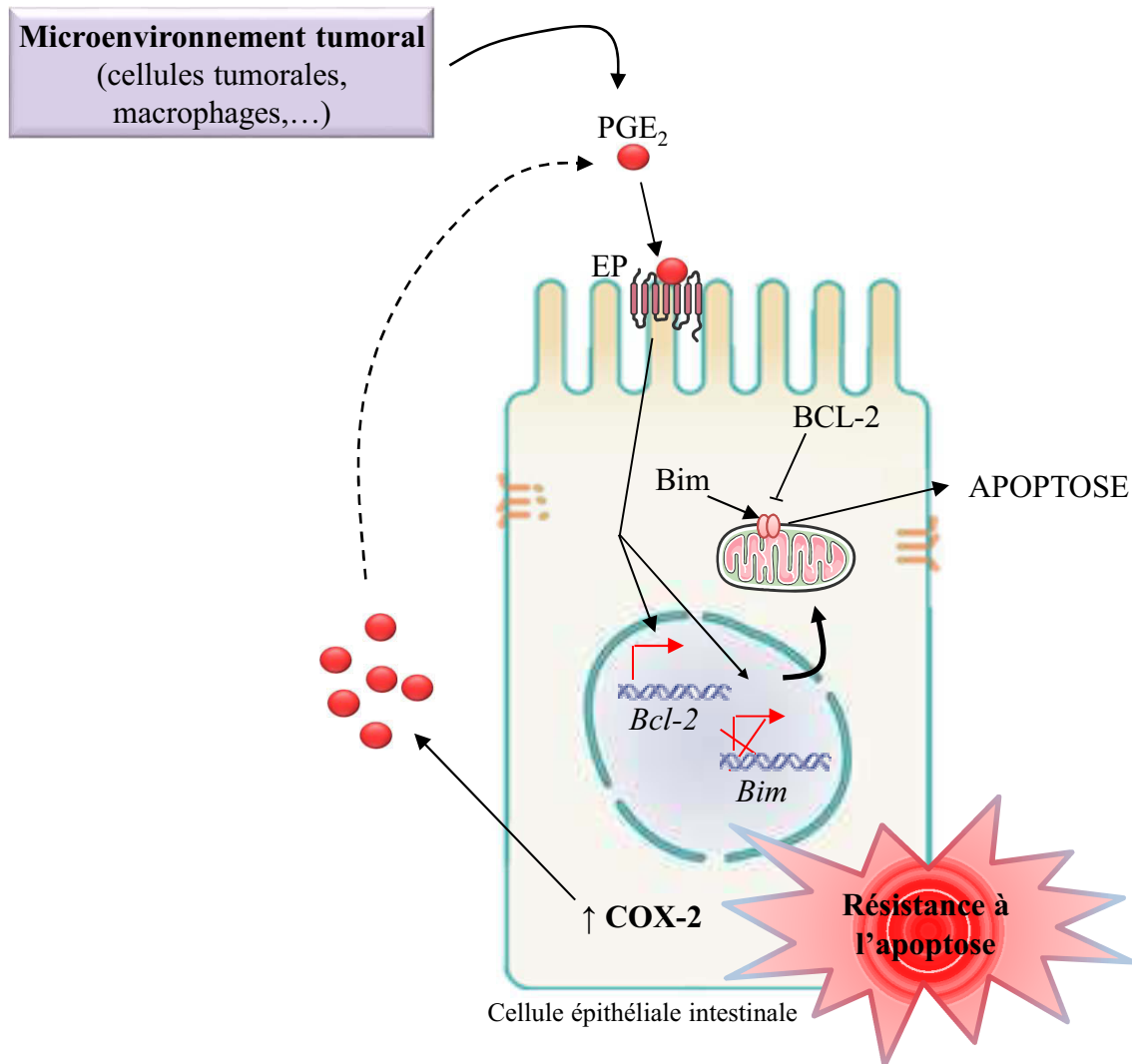


Figure 16 : Rôle de COX-2/PGE₂ dans la résistance à l'apoptose.

Le rôle de PGE₂ dans la résistance à l'apoptose des cellules épithéliales intestinales réside entre autre dans sa capacité à induire l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 et au contraire à inhiber l'expression de la protéines pro-apoptotique BIM. En effet la protéine pro-apoptotique Bim est impliquée dans la formation de pores au niveau de la membrane des mitochondries ayant pour conséquence une fuite du contenu mitochondrial entraînant l'apoptose cellulaire. L'interaction de la protéine anti-apoptotique BCL-2 avec Bim a pour conséquence une inhibition de l'apoptose.

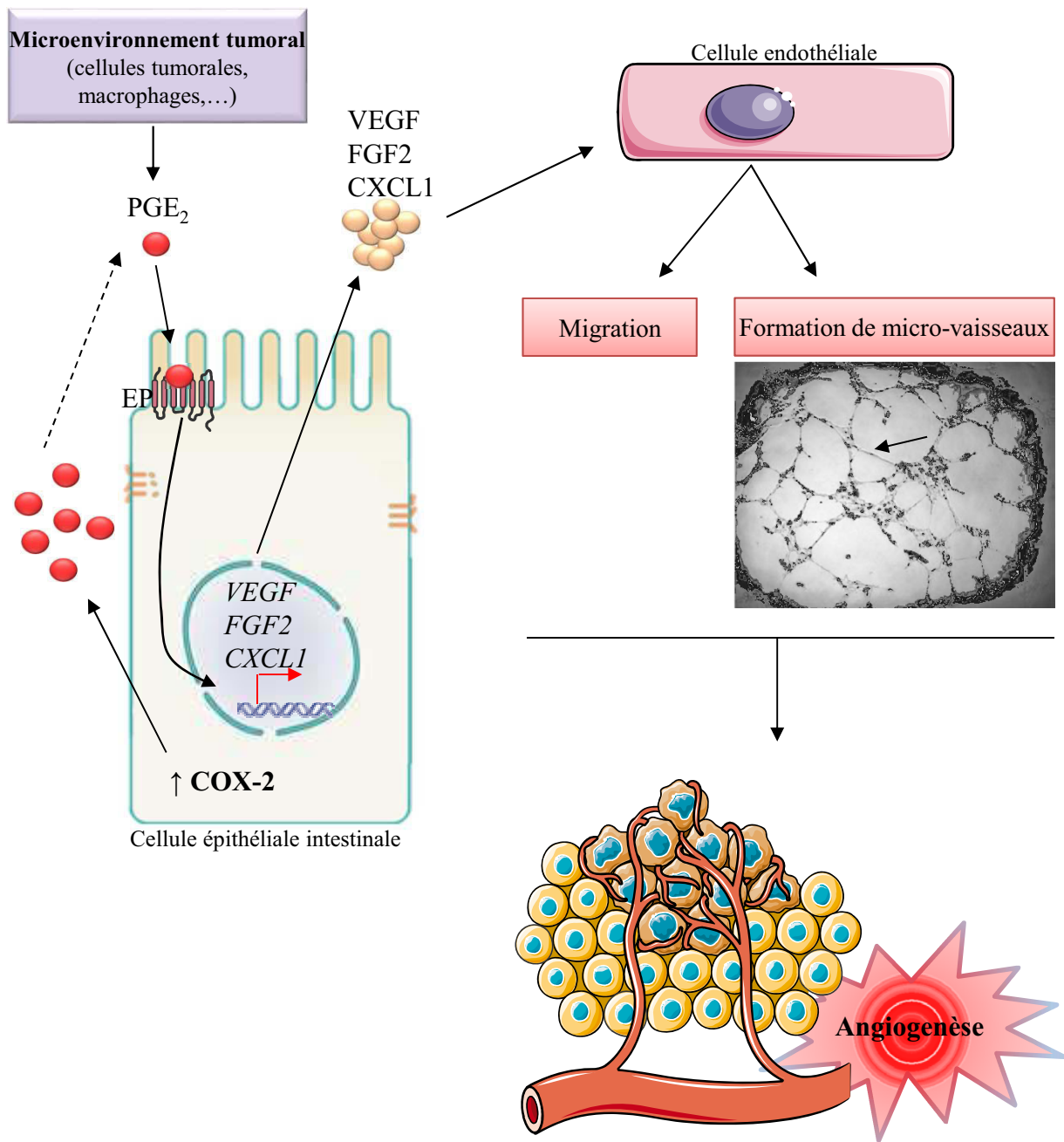


Figure 17 : Rôle de COX-2/PGE₂ dans l'angiogenèse.

La stimulation des cellules épithéliales intestinales par PGE₂ conduit à la synthèse et la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tels que les facteurs de croissance des cellules endothéliales (VEGF) et des fibroblastes (FGF2) et de la chimiokine CXCL1. Ces facteurs pro-angiogéniques vont induire, au niveau des cellules endothéliales, la migration cellulaire ainsi que la formation de micro-vaisseaux, conduisant à la mise place d'une néo-angiogenèse au site tumoral.

cellulaire à l'apoptose est associée à une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique B-cell lymphoma 2 (BCL-2), et une réduction de 60% de l'apoptose des cellules épithéliales intestinales surexprimant EP4 a pu être observée en réponse à une stimulation par PGE₂ (Hawcroft *et al.*, 2007; Sheng *et al.*, 1998) (**Figure 16**). Au contraire, une inhibition de COX-2 en cellules épithéliales intestinales, conduisant à une diminution de la synthèse de PGE₂, induit une augmentation de la protéine pro-apoptotique Bim et par conséquent une induction de l'apoptose cellulaire (Lev-Ari *et al.*, 2006; Doherty *et al.*, 2009b; Greenhough *et al.*, 2010). Cependant une étude indépendante a mis en évidence que la diminution de la synthèse de PGE₂ ne suffisait pas à elle seule pour induire l'apoptose, suggérant que PGE₂ est nécessaire mais pas suffisante pour induire ce processus cellulaire (Lev-Ari *et al.*, 2007). Outre les effets directs sur le développement tumoral, les propriétés anti-apoptotiques de PGE₂ peuvent causer une résistance aux traitements anti-cancéreux, comme cela a été démontré *in vitro* par une diminution de l'apoptose cellulaire induite par des radiations ionisantes (Tessner *et al.*, 2004).

Stimulation de l'angiogenèse et la migration cellulaire

L'augmentation de l'expression de COX-2 observée dans les tumeurs colorectales de patients atteints CCR est corrélée avec l'augmentation de la densité vasculaire, suggérant le rôle majeure de COX-2 et PGE₂ dans les processus angiogéniques (Cianchi *et al.*, 2001, 2010). De nombreuses études indépendantes ont mis en évidence l'implication de PGE₂ dans l'angiogenèse, notamment par sa capacité à induire l'expression des facteurs pro-angiogéniques majeurs VEGF, FGF et la chimiokine pro-angiogénique CXCL1 en cellules épithéliales intestinales (Tsuji *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2006) (**Figure 17**). Ceci induit la migration des cellules endothéliales et la formation de micro-tubes, dans des systèmes de co-culture. Les récepteurs EP2 et EP3 semblent jouer un rôle important dans la mise en place de processus angiogéniques au cours du CCR. En effet, aucune augmentation de la formation de micro-vaisseaux au niveau de polypes de 1-2 mm n'a été observée dans un modèle murin APC^{Δ716} invalidé pour le gène *EP2*, comparativement au souris APC^{Δ716}EP2^{+/+}, dans lequel la formation de micro-vaisseaux augmente avec la taille des polypes (Seno *et al.*, 2002). Par ailleurs, une réduction de la croissance tumorale liée à un défaut de mise en place de l'angiogenèse a été observée dans un modèle de xénogreffe chez les animaux EP3^{-/-}, suggérant l'implication de ce récepteur dans les processus angiogéniques (Amano *et al.*,

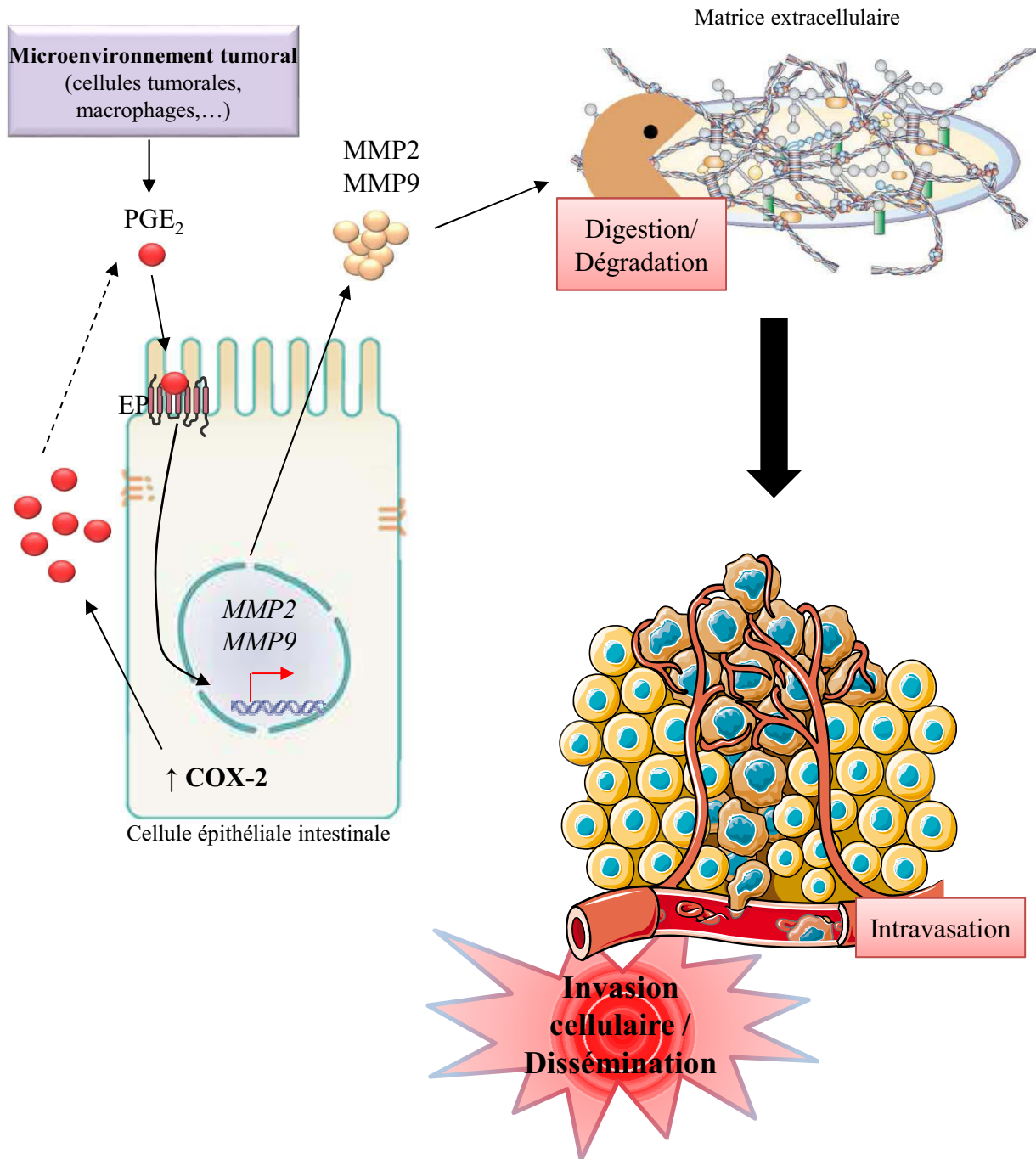


Figure 18 : Rôle de COX-2/PGE₂ dans la migration cellulaire et l'invasion tumorale.

PGE₂ est capable d'induire, en cellules épithéliales intestinales, la synthèse et la sécrétion de métalloprotéases (MMP) telles que MMP2 et MMP9 ayant entre autre pour rôle de digérer la matrice extracellulaire. Les cellules tumorales peuvent ainsi regagner la circulation sanguine par intravasation et disséminer dans l'organisme. La migration des cellules tumorales dans la circulation sanguine est un processus indispensable à la formation de métastases.

2003). Les métastases hépatiques de patients atteints de CCR traités avec un inhibiteur de COX-2 présentent une diminution de 60% de la synthèse de PGE₂ associée à une diminution de 29% de la densité en micro-vaisseaux au sein des métastases, soulignant le rôle important de PGE₂ dans le développement de micro-vaisseaux aux sites métastatiques (Fenwick *et al.*, 2003).

La migration cellulaire est un phénomène requis pour la mise en place de l'intravasation des cellules tumorales dans la circulation sanguine conduisant à la mise en place de métastases. Une diminution de la formation de métastases hépatiques et pulmonaires a été mise en évidence en réponse au traitement par des inhibiteurs de COX-2 dans des modèles de xénogreffes de cellules épithéliales intestinales cancéreuses (Ninomiya *et al.*, 2012; Nishikawa *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2003). De plus, les tumeurs issues de l'implantation de cellules épithéliales intestinales cancéreuses, au niveau de la capsule splénique dans un modèle orthotopique traité avec un inhibiteur spécifique de COX-2, possèdent une diminution de la sécrétion de PGE₂, de l'expression des métalloprotéases MMP2 et MMP9 (impliquées dans la digestion de la matrice extracellulaire et la migration cellulaire) et une diminution de l'incidence des métastases hépatiques (Yao *et al.*, 2003) (**Figure 18**). Des études ont montré que PGE₂ induit une réorganisation du cytosquelette et augmente la migration et l'invasion de cellules cancéreuses coliques en activant le récepteur de l'EGF (EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor), la voie de signalisation PI3K, en augmentant l'expression du récepteur au VEGF (VEGFR1, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1) (Buchanan *et al.*, 2003; Fujino *et al.*, 2011; Sheng *et al.*, 2001).

PGE₂ et macrophages associés aux tumeurs

Les macrophages représentent les principaux producteurs de COX-2 (Bamba *et al.*, 1999; Chapple *et al.*, 2000; Hull *et al.*, 1999). COX-2 et PGE₂ sont impliquées dans l'expression, par les macrophages, de nombreux facteurs pro-tumoraux tels que la métalloprotéase MMP9 et COX-2, générant ainsi une boucle d'amplification (Díaz-Muñoz *et al.*, 2012; Pavlovic *et al.*, 2006; Steenport *et al.*, 2009). Par ailleurs, COX-2 joue un rôle essentiel dans la polarisation des macrophages de type M2 au site tumoral (Nakanishi *et al.*, 2011). En effet les macrophages des souris traitées avec un inhibiteur spécifique de COX-2 présentent une diminution des marqueurs spécifiques des macrophages M2 pro-tumoraux au

profit des macrophages M1 anti-tumoraux, suggérant que l'inhibition de COX-2 induit une repolarisation des macrophages. Cependant, *in vitro*, l'inhibition de COX-2 ne suffit pas à induire la reprogrammation des macrophages M2, suggérant l'implication d'autres facteurs sécrétés dans le microenvironnement. A l'inverse, O'Callaghan et collaborateurs ont montré que le blocage de EP1, *in vivo*, induit une diminution de l'infiltration des macrophages au site tumoral sans repolarisation de ces derniers (O'Callaghan *et al.*, 2013).

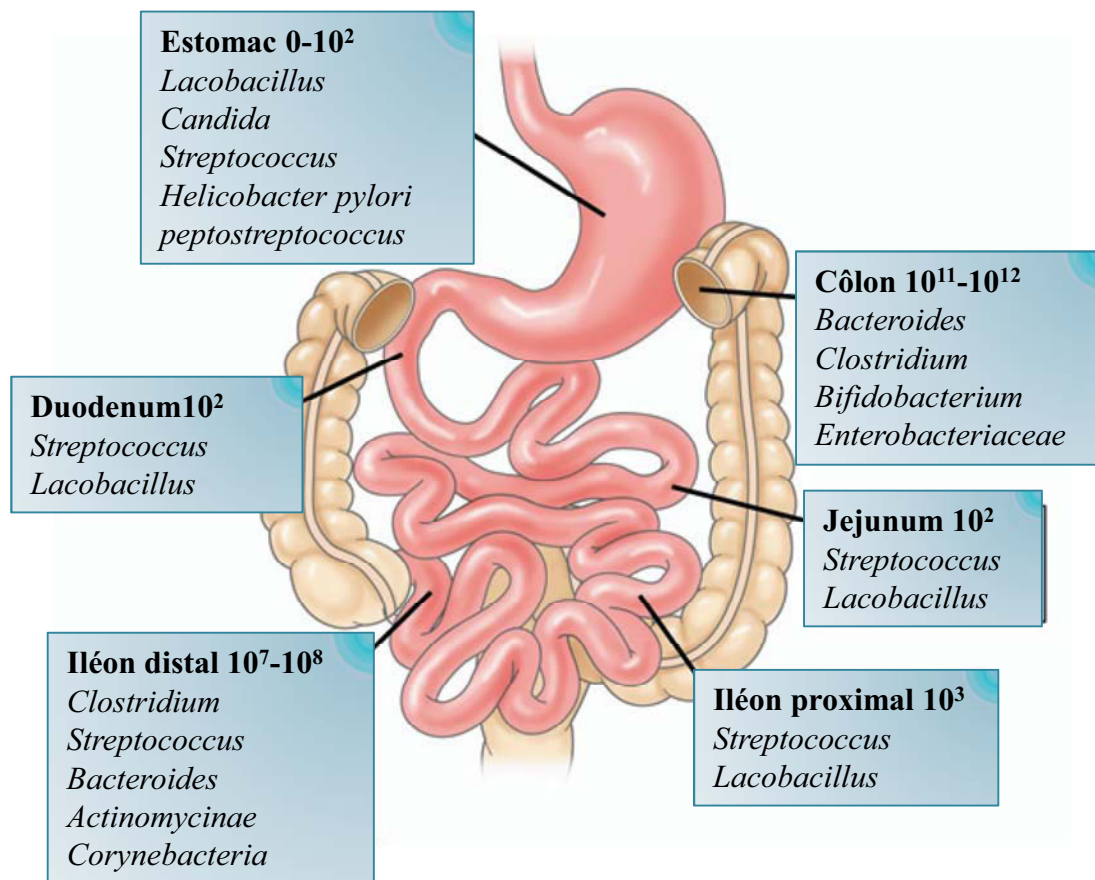


Figure 19 : Composition et concentration des espèces microbiennes dominantes dans les différentes régions du tractus gastro-intestinal humain.

La composition et la densité microbienne augmente de manière croissante le long du tractus digestif, atteignant son maximal dans le côlon avec $10^{11}-10^{12}$ bactéries par gramme de contenu luminal.

(Modifiée d'après Sartor, 2008)

III. *Microbiote intestinal et cancer colorectal*

Dès la naissance, le tube digestif est colonisé par de nombreux micro-organismes qui vont établir une relation mutualiste avec leur hôte (Candela, 2014). Ce microbiote constitue une biomasse très importante, comprenant notamment des centaines d'espèces bactériennes différentes. Ce microbiote intestinal est à l'origine d'une intense activité fonctionnelle qui le rend physiologiquement très important. On parle d'« organe microbien » faisant partie intégrante de l'hôte (O'Hara and Shanahan, 2006). La densité de cette flore varie le long du tractus gastro-intestinal (**Figure 19**). Elle est assez faible, de l'ordre de 10^0 à 10^2 bactéries par gramme de contenu luminal au niveau stomacal, duodénal et jéjunal puis augmente au niveau de l'iléon avec 10^7 à 10^8 bactéries par gramme de fèces (Sartor, 2008). La diversité et la densité de la population bactérienne atteignent leur maximum dans le côlon avec 10^{11} à 10^{12} bactéries par gramme de fèces.

La microflore intestinale exerce de nombreuses fonctions physiologiques, dont les principales sont (i) le développement et la maturation du tractus gastrointestinal, (ii) la digestion d'aliments, la synthèse de vitamines et la bioconversion de métabolites (iii) la maturation et l'éducation du système immunitaire et (iv) une fonction de barrière par laquelle elle s'oppose à la colonisation par des micro-organismes pathogènes (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010; Walter and Ley, 2011). Des dysbioses du microbiote intestinal pourraient également conduire à des modifications fonctionnelles profondes de celui-ci rompant l'homéostasie intestinale et favorisant le développement du CCR.

En dehors des facteurs de risque d'origine génétique/héréditaire, les facteurs de risque significativement associés au cancer colorectal incluent l'alimentation (régimes riches en graisse, sucre et viande rouge), la consommation excessive d'alcool et l'inflammation chronique de l'intestin. Chacun de ces facteurs est associé à des modifications ou altérations du microbiote intestinal, appelées dysbioses. Or le microbiote, au travers du dialogue qu'il établit avec l'épithélium intestinal, joue un rôle essentiel dans l'homéostasie, en particulier il assure le maintien d'un équilibre entre la prolifération, la mort cellulaire, la régulation de la différenciation cellulaire et de la réponse inflammatoire. Ainsi, des modifications de la

composition et des capacités fonctionnelles du microbiote intestinal sont suspectées d'impacter le développement tumoral.

III.1 Dérégulation des mécanismes de défense de l'hôte dans le CCR

Au quotidien, la muqueuse intestinale est au contact d'un grand nombre de molécules microbiennes et de micro-organismes commensaux et/ou pathogènes. Les cellules épithéliales intestinales doivent rapidement détecter la présence des micro-organismes pathogènes afin de mettre en place une réponse immunitaire adaptée, tout en assurant le maintien d'une réponse immunitaire modérée ou «tolérante» face aux micro-organismes commensaux non pathogènes (Cario, 2005). Le dialogue entre la muqueuse intestinale et le microbiote qui permet de maintenir un état homéostatique est assuré notamment par des récepteurs de l'immunité innée (PRR, Pattern Recognition Receptor) ; les récepteurs Toll-like et NOD-like (TLR, Toll-Like Receptor et NLR, NOD-Like Receptor) avec respectivement une localisation membranaire (membrane cytoplasmique ou endosomale) et cytoplasmique.

Le pouvoir discriminant des TLRs et des NLRs face aux éléments du « soi » et du « non soi » microbien est basé sur la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs, Pathogens Associated Molecular Pattern) (Karin and Greten, 2005). La fixation des PAMPs sur les TLRs et NLRs induit notamment le recrutement d'adapteurs cytoplasmiques que sont, respectivement, le facteur de différenciation myéloïde 88 (MyD88, Myeloid Differentiation factor 88) et la protéine RIP-like interagissant avec la kinase CLARP (RICK, RIP-like interacting CLARP Kinase) (**Figure 20**). Ceci conduit à la mise en place d'une cascade de phosphorylations induisant l'activation des voies de signalisation des protéines kinases activées par des agents mitogènes (MAPK, Mitogen Activated Protein Kinase) et PI3K/AKT et de la kinase de l'inhibiteur du facteur de transcription nucléaire κ B (I κ B, Inhibitor of NF- κ B ; IKK, I κ B Kinase ; NF- κ B, Nuclear Factor κ B) provoquant la dégradation d'I κ B par le protéasome. L'activation de ces voies conduit à la translocation nucléaire de facteurs de transcription tels que NF- κ B, c-jun, c-fos et AP-1. Ce qui entraîne l'induction de la transcription de gènes cibles comme ceux codant des cytokines pro-inflammatoires (ex : IL-6, IL-8 et TNF- α), des peptides antimicrobiens, ou encore le gène

codant la protéine COX-2, connue pour son rôle pléiotropique dans la carcinogenèse colorectale (Karin and Greten, 2005; Sakamoto and Maeda, 2010; Wang and Dubois, 2010c).

III.1.1 Les récepteurs de l'immunité innée dans le cancer colorectal

Le dialogue établi entre les bactéries de la flore commensale et l'épithélium intestinal, au travers de l'interaction avec les récepteurs de l'immunité innée TLRs et NLRs, joue un rôle essentiel dans l'homéostasie intestinale. En effet, en réponse à un traitement au DSS, les animaux invalidés pour le gène codant l'adaptateur MyD88, impliqué dans la transmission du signal suite à l'activation de la majorité des TLRs, ou traités avec un cocktail d'antibiotiques (ampicilline, vancomycine, métronidazole, sulfate de néomycine) présentent des dommages épithéliaux dus à une diminution de la production des facteurs cytoprotecteurs IL-6, TNF- α et KC-1 (l'homologue murin de la cytokine IL-8 chez l'Homme) (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004).

III.1.1.1 TLRs et cancer colorectal

L'implication des TLRs dans la carcinogenèse a été démontrée par la création d'animaux knock-out (KO) pour le gène codant l'adaptateur MyD88 dans des modèles murins de carcinogenèse *APC*^{Min/+} et *Il10*^{-/-} traité à l'AOM, dans lesquels une diminution du nombre de tumeurs intestinales a été observée par rapport aux animaux contrôles (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2007; Uronis *et al.*, 2009). La délétion du gène codant l'adaptateur MyD88 est associée à une augmentation de la mort cellulaire au niveau des tumeurs. Ceci s'accompagne d'une diminution de l'expression de la métalloprotéase MMP10, un facteur cytoprotecteur impliqué dans la réparation tissulaire, des facteurs de croissance des kératinocytes KGF2 (Keratinocyte Growth Factor 2) et des fibroblastes FGF10, et de facteurs pro-tumoraux tels que COX-2, MMP7, et des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires IL-8, IL-6 et IL-1 β (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2007). Cependant, ces résultats sont controversés. En effet, une étude récente a montré que la délétion du gène codant MyD88 dans un modèle de carcinogenèse associée à une colite (modèle AOM/DSS) augmente la susceptibilité des souris à développer des tumeurs colorectales, comparativement aux souris sauvages (Salcedo *et al.*, 2010). Ceci suggère que le rôle des TLRs et plus particulièrement le recrutement de l'adaptateur Myd88 dans la carcinogenèse colorectale dépend du type de CCR considéré (Irrazábal *et al.*, 2014).

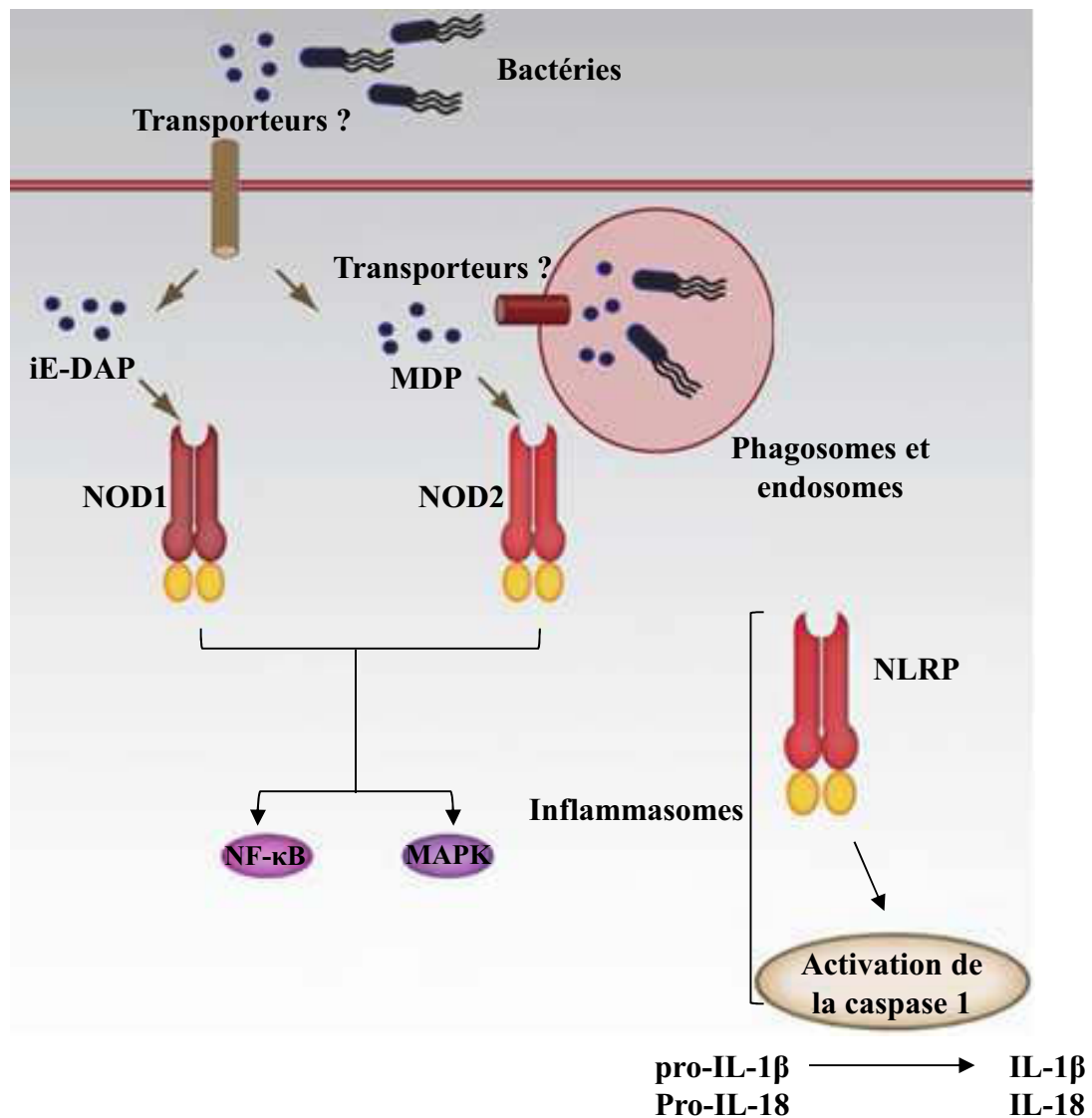


Figure 21 : Activation des NLRs par des composés bactériens.

L'activation des récepteurs NOD1 et NOD2 cytoplasmiques par l'acide γ-D-glutamyl-meso-diaminopimelique (iE-DAP) et du muramyl dipeptide (MDP) conduit à l'activation des voies de signalisation NF-κB et des MAPkinases. Les NLRs entrent également dans la composition des inflammasomes intervenant dans la maturation des cytokines pro-inflammatoire IL-1β et IL-18.

(Modifiée d'après Kanneganti *et al.*, 2007)

Les souris *SIGIRR*^{-/-} dans lesquelles l'expression de ce régulateur négatif a été restaurée spécifiquement dans le côlon, présentent une diminution de l'incidence, du nombre et de la taille des tumeurs colorectales. Par ailleurs, une activation constitutive de la voie NF- κ B a été observée dans le côlon de souris *SIGIRR*^{-/-} comme le montre l'augmentation de la phosphorylation des protéines IKK α/β et de la sous-unité p65 du facteur de transcription NF- κ B. La voie de signalisation NF- κ B, induite notamment en réponse à la stimulation des TLRs, joue un rôle pivot dans la carcinogenèse colorectale comme le souligne la diminution du nombre de tumeurs observée dans un modèle murin traité à l'AOM/DSS et invalidé pour le gène codant la protéine IKK β spécifiquement dans les entérocytes ou les macrophages (Greten *et al.*, 2004).

Parmi les TLRs, le récepteur TLR4 semble jouer un rôle important dans le développement du CCR. Une association entre l'expression élevée de TLR4 et de MyD88 dans les carcinomes de patients atteints de CCR et la présence de métastases hépatiques ainsi qu'un mauvais pronostic a été rapportée, suggérant le rôle important des TLRs en général et de TLR4 en particulier dans la malignité des CCR (Wang *et al.*, 2010). De plus, il a récemment été mis en évidence que les patients atteints de CCR porteurs d'un variant du récepteur TLR4 (TLR4-D299G), développent plus fréquemment des cancers agressifs avec métastases (Eyking *et al.*, 2011). *In vitro*, des cellules épithéliales intestinales Caco-2 exprimant la mutation TLR4-D299G présentent une expression augmentée de gènes associés à l'inflammation et à la carcinogenèse. La signalisation dépendante de TLR4 serait en particulier impliquée dans le recrutement de cellules myéloïdes productrices de COX-2 (Fukata, et al. 2007; Fukata, et al. 2009).

III.1.1.2 NLRs et cancer colorectal

Les NLRs regroupent les récepteurs NOD1 et NOD2 et les récepteurs impliqués dans la formation de complexes protéiques nommés inflammasomes, tels que NLRP3, NLRC4, NLRP6, NLRP12, intervenant dans l'activation de la caspase 1 et dans la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (Kanneganti *et al.*, 2007) (**Figure 21**).

La délétion du gène *Nod1* dans des animaux traités à l'AOM/DSS et *APC*^{Min/+}, induit une augmentation d'au moins 3 fois du nombre de tumeurs coliques, comparativement aux

animaux contrôles (Chen *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que la signalisation dépendante de NOD1 limite le développement tumoral. De manière similaire, les animaux *Nod2*^{-/-} traités à l'AOM/DSS présentent une augmentation de 3 fois du nombre de tumeurs colorectales comparativement aux animaux non transgéniques traités, suggérant que le récepteur NOD-2 joue également un rôle important dans la carcinogenèse colorectale (Couturier-Maillard *et al.*, 2013).

Les NLRs identifiés comme inducteurs d'une activité inflammasome joueraient également un rôle important dans la carcinogenèse colorectale, comme le montrent l'augmentation du nombre de tumeurs et l'agressivité des tumeurs colorectales dans des modèles murins traités à l'AOM/DSS invalidés pour les gènes codant NLRC4, NLRP3, NLRP6 et NLRP12 (Chen *et al.*, 2011a; Hu *et al.*, 2010; Normand *et al.*, 2011; Zaki *et al.*, 2010, 2011). En effet, 66% des souris *NLRC4*^{-/-} traitées à l'AOM/DSS (contre 0% des souris sauvages), présentent un envahissement de la musculature par des tumeurs colorectales, témoignant d'une augmentation du potentiel invasif et de l'agressivité des tumeurs (Hu *et al.*, 2010). Comparativement à des souris sauvages traitées à l'AOM/DSS, l'augmentation de 1,6 fois du nombre de tumeurs colorectales dans les souris invalidées pour le gène codant NLRP3 est accompagnée d'une augmentation de l'infiltration des macrophages dans le côlon et d'une augmentation de 2 fois de l'expression colique du gène codant COX-2 (Zaki *et al.*, 2010). L'invalidation de NLRP6 dans un modèle murin de carcinogenèse induite (AOM/DSS) conduit à une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-6, TNF- α et IL-1- β ainsi qu'une augmentation de l'index prolifératif des cellules épithéliales intestinales de 2 fois (Chen *et al.*, 2011a). Par ailleurs, toutes les souris *NLRP12*^{-/-} traitées à l'AOM/DSS (contre 20% des souris sauvages) développent des tumeurs colorectales caractérisées par une dysplasie de haut grade et des analyses immunohistochimiques ont révélé que 30% de ces lésions étaient des adénocarcinomes (contre 0% chez les souris contrôles) (Zaki *et al.*, 2011). L'augmentation de l'infiltration et de l'activation des cellules myéloïdes observée en absence d'expression de NLRP12 est associée à une augmentation de l'expression colique des gènes codant les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6, TNF- α et IL-17 et de chimiokines telles que KC. Il semblerait donc que l'activité de NLRP12 dans les macrophages contribue à la protection de l'épithélium colique contre l'inflammation et le développement tumoral.

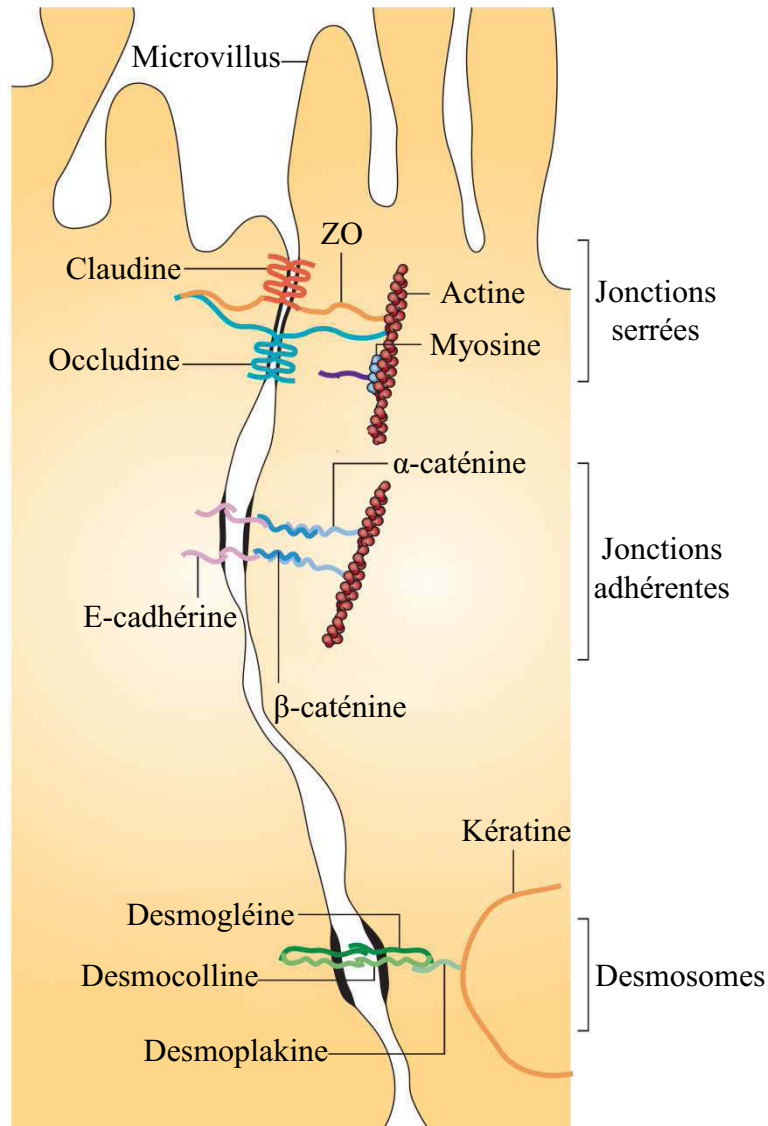


Figure 22 : Jonctions cellulaires de l'épithélium intestinal.

Les jonctions serrées, composées des protéines transmembranaires claudines et occludines, scellent les espaces entre les cellules épithéliales intestinales. Les protéines cytoplasmiques Zonula Occludens (ZO) se lient à ces protéines transmembranaires et au cytosquelette d'actine. Les interactions entre les protéines E-cadhérines transmembranaires et les protéines β -caténines cytoplasmiques forment les jonctions adhérentes. Enfin, les desmosomes sont composés des protéines transmembranaires desmoglénines, desmocollines et desmoplakines qui interagissent avec les protéines de kératines cytoplasmiques.

(Modifiée d'après Turner, 2009)

III.1.2 Fonction de barrière de l'épithélium intestinal et cancer colorectal

III.1.2.1 Barrière physique

L'épithélium intestinal est constitué d'une monocouche de cellules dont la cohésion est assurée par plusieurs types de jonctions intercellulaires (**Figure 22**). Les jonctions serrées se situent au pôle apical des cellules épithéliales et sont composées d'un complexe multiprotéique incluant des protéines transmembranaires de la famille des claudines et des occludines interagissant avec les protéines zonula occludens (ZO) 1 et 2 et l'actine du cytosquelette (Turner, 2009). Ces jonctions serrées jouent un rôle majeur dans la perméabilité membranaire en étant un élément de contrôle des flux paracellulaires. Sous les jonctions serrées se trouvent les jonctions adhérentes, composées de protéines de la famille des cadhérines : E-cadhérine, β -caténine, caténine $\delta 1$ et α -caténine 1. Outre leur fonction dans la cohésion intercellulaire, les protéines des jonctions adhérentes sont également impliquées dans le maintien de la polarisation des cellules, dans la différenciation cellulaire, ainsi que dans la communication intercellulaire. Enfin, les desmosomes sont formés par l'interaction entre la desmoglérine, la desmocolline, la desmoplakine, et les filaments de kératine du cytosquelette et permettent le passage de protéines, du LPS bactérien, mais ne permet pas le passage de bactéries entières.

Une expression augmentée de la claudine-2 a été observée dans les adénocarcinomes de patients atteints de CCR, comparativement à la muqueuse saine, conduisant à suspecter le rôle des protéines de jonctions dans la carcinogenèse colorectale (Dhawan *et al.*, 2011). La surexpression des protéines claudine-2 et claudine-3 induit *in vitro* une augmentation de la malignité des cellules avec notamment une augmentation de la prolifération cellulaire et de leur capacité à former des colonies (Dhawan *et al.*, 2011; de Souza *et al.*, 2013). Dans un modèle orthotopique (injection en sous-cutanée de cellules épithéliales intestinales), la surexpression de la claudine 2 accélère le développement tumoral avec notamment une augmentation du volume tumoral, liés certainement en partie à une désorganisation structurelle de la muqueuse et en conséquence une altération de la barrière physique.

III.1.2.2 Barrière chimique

Le mucus

La sécrétion de mucus et de peptides antimicrobiens par les cellules de l'épithélium intestinal permet la mise en place d'une barrière chimique contre les bactéries de la flore commensale et les pathogènes. Le mucus est produit de façon continue par les cellules caliciformes présentes au sein de l'épithélium intestinal. Il est composé à 98% d'eau et à 2% de mucines, majoritairement MUC2.

Les adénocarcinomes mucineux (MA, Mucinous Adenocarcinoma) représentent 10-20% des cancers colorectaux et sont caractérisés par des cellules néoplasiques sécrétant beaucoup de mucus. Le rôle important du mucus dans le développement tumoral est souligné par des résultats montrant que les MA sont associés à un mauvais pronostic des patients avec notamment un développement de tumeurs chez des patients jeunes, une survie à 5 ans diminuée et une augmentation de métastases, comparativement aux patients présentant des tumeurs non mucineuses (Hyngstrom *et al.*, 2012; Maksimović, 2007; Papadopoulos *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2009). L'incidence des adénocarcinomes est plus élevée dans les pays occidentaux (10-20%) par rapport aux pays d'Asie (4%), suggérant l'implication de la localisation géographique et de l'alimentation comme facteurs étiologiques du MA. Les mucines jouent un rôle important dans le développement des cancers colorectaux, au cours duquel de nouvelles mucines sont synthétisées telles que MUC5AC et MUC6 impliquées dans la progression tumorale (Sylvester *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2013). De plus, un défaut de barrière chimique mimé par un modèle murin *Muc2*^{-/-} induit l'apparition spontanée de tumeurs colorectales chez 65% des animaux (Velcich *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'expression des mucines diffère selon les caractéristiques du CCR considéré. A titre d'exemple, l'expression de MUC2 est augmentée dans les MA et diminuée dans les adénocarcinomes colorectaux non mucineux (Debunne and Ceelen, 2013). Le rôle que pourraient jouer les mucines dans la carcinogenèse colorectale n'est à ce jour pas clairement défini.

Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens, sécrétés par les cellules épithéliales intestinales, les cellules immunitaires et les cellules de Paneth (uniquement dans l'intestin grêle), sont des acteurs de l'immunité innée (Ho *et al.*, 2013). Les défensines et les cathélicidines sont souvent exprimées en réponse à l'infection et en contexte inflammatoire. Elles jouent un rôle important contre les agents pathogènes et dans le maintien d'une tolérance de la flore commensale. Une altération de l'expression des défensines favoriserait la mise en place d'un environnement inflammatoire et des modifications du microbiote. En effet, les défensines jouent un rôle important dans l'établissement et le maintien d'un microbiote normobiotique, comme le suggèrent par exemple les analyses de la flore intestinale réalisées dans des modèles animaux, invalidés pour l' α -defensine 5 produite par les cellules de Paneth, qui montrent une diminution des bactéries appartenant au phylum des Firmicutes au profit des bactéries appartenant au phylum des Bacteroidetes (Salzman *et al.*, 2010).

L'analyse sérique des α -défensines sécrétées par les cellules de Paneth de l'intestin grêle et les neutrophiles circulants HNP1, -2 et -3 (Human Neutrophil Peptide) révèle que leur concentration est plus élevée chez les patients présentant des adénocarcinomes colorectaux par rapport aux patients sains ou aux patients présentant des polypes hyperplasiques (van den Broek *et al.*, 2010; Kemik *et al.*, 2013). Au contraire, une étude a mis en évidence que l'expression de la cathélicidine LL-37, exprimée par les cellules épithéliales intestinales, est diminuée dans les tumeurs colorectales comparativement au tissu non tumoral des patients atteints de CCR (Ren *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'invalidation du gène *Cnlp*^{-/-} codant la cathélicidine LL-37 induit chez les souris traitées à l'AOM/DSS une augmentation du nombre et de la taille des tumeurs comparativement aux souris sauvages traitées, soulignant l'importance de ce peptide antimicrobien dans l'inhibition du développement tumoral. Les souris transgéniques *Cnlp*^{-/-} présentent une apoptose basale des cellules épithéliales intestinales diminuée par rapport aux animaux sauvages et des études *in vitro* ont démontré que LL37 induit l'apoptose et une diminution de la prolifération de cellules épithéliales en culture (Kuroda *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2012, 2013).

III.2 Dysbiose et cancer colorectal

Le microbiote intestinal de chaque individu se compose de 500 à plus de 1000 espèces microbiennes différentes dont seulement une soixantaine est partagée par tous (Eckburg *et al.*, 2005). La composition du microbiote intestinal est stable chez l'individu sain et les espèces bactériennes s'organisent en un ensemble limité de communautés, réparties majoritairement entre 4 phylums : les Firmicutes, les Bacteroidetes, les Actinobacteria et les γ -Proteobacteria.

III.2.1 Implication du microbiote dans la carcinogenèse colorectale

De nombreux arguments mettent en exergue l'implication du microbiote dans la carcinogenèse colorectale. Plusieurs études indépendantes ont démontré que des modèles murins de prédisposition au développement d'un CCR (IL-10^{-/-} traitées à l'AOM et APC^{Min/+}) élevés en condition axénique possèdent un nombre de tumeurs inférieur à celui d'animaux non axéniques de même génotype et ayant subi le même traitement, soulignant l'importance du microbiote intestinal dans le développement tumoral (Arthur *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Uronis *et al.*, 2009). De plus, le traitement par un cocktail d'antibiotiques, ciblant les bactéries à Gram négatif et positif, permet de réduire l'incidence, la sévérité et la taille des tumeurs coliques développées par des souris traitées à AOM/DSS, comparativement à des souris ne recevant pas d'antibiotique (Klimesova *et al.*, 2013; Zackular *et al.*, 2013). Le transfert d'un microbiote dysbiotique provenant de souris développant spontanément des CCR (traitées AOM/DSS), contrairement à celui de souris conventionnelles, favorise l'émergence de tumeurs colorectales chez des souris axéniques (Zackular *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent donc que le microbiote intestinal est capable de favoriser la carcinogenèse colorectale. Bien que les bactéries commensales soient capables d'induire une inflammation chronique et de participer au développement tumoral, le microbiote intestinal peut également jouer un rôle dans la protection contre la carcinogenèse induite par un traitement à l'AOM/DSS (Zhan *et al.*, 2013).

III.2.2 Altération de la composition du microbiote intestinal

Le développement des techniques de séquençage à haut-débit et l'amélioration des techniques de PCR quantitative en temps réel ont permis d'étudier la composition du

Tableau 3 : Synthèse des études sur la composition du microbiote intestinal des patients atteints de CCR.

Les analyses de microbiote ont été réalisées par pyroséquençage et qPCR. L'analyse de l'abondance relative des phyla, familles, genres et espèces bactériennes du microbiote fécal a été réalisée à partir d'échantillons fécaux de patients atteints de CCR comparativement à ceux de patients contrôles. Des biopsies de tumeurs et de muqueuse saine adjacente ont permis d'analyser la composition du microbiote associé aux tumeurs et à la muqueuse de patients atteints de CCR. Une étude (*) s'est intéressée à la composition du microbiote associé aux tumeurs de patients atteints de CCR par rapport à celle du microbiote fécal des même patients. Pour finir des échantillons de muqueuses saines de patients contrôles et ceux pris à distance de tumeurs de patients atteints de CCR ont permis d'étudier le microbiote associé à la muqueuse des patients. (D'après Wu *et al.*, 2013 (1) ; Ahn *et al.*, 2013 (2) ; Wang *et al.*, 2012 (3) ; Sobhani *et al.*, 2011 (4) ; Chen *et al.*, 2012 (5) ; Balamurugan *et al.*, 2008 (6) ; McCoy *et al.*, 2013 (7) ; Marchesi *et al.*, 2011 (8) ; Kostic *et al.*, 2012 (9) ; Shen *et al.*, 2010 (10)).

	Abon- dance	Phyla	Familles	Genres / Espèces	Ref.
Microbiote fécal	↑	Bacteroidetes Fusobacteria	<i>Eubacteriaceae</i> <i>Staphylococcaceae</i> <i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacterium</i> <i>Bacteroides</i> (corrélacion prévalence/statut TNM)	1
		Bacteroidetes		<i>Fusobacterium</i> <i>Atopobium</i> / <i>Porphyromonas</i>	2
		Fimicutes Proteobacteria Actinobacteria		<i>Porphyromonas</i> / <i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> <i>Enterococcus</i> <i>Streptococcus</i> / <i>Peptostreptococcus</i> <i>Bacteroides fragilis</i>	3
				<i>Bacteroides</i> / <i>Prevotella</i>	4
			<i>Erysipelotrichaceae</i> <i>Prevotellaceae</i> <i>Coriobacteriaceae</i> <i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Peptostreptococcus</i> / <i>Mogibacterium</i> <i>Anaerococcus</i> / <i>Slakia</i> / <i>Paraprevotella</i> <i>Anaerotruncus</i> / <i>Collinsella</i> <i>Desulfovibrio</i> / <i>Eubacterium</i>	5
	↓	Firmicutes	<i>Campylobacteriaceae</i> <i>Prophyromonaceae</i>		1
		Fimicutes (<i>Clostridia</i>)		<i>Bacteroides</i> / <i>Roseburia</i> / <i>Parasutterella</i> <i>Alistipes</i> / <i>Eubacterium</i>	2
		Bacteroidetes Fusobacteria		<i>Bacteroides vulgatus</i> / <i>Bacteroides uniformis</i> <i>Clostridium coccoides</i> Bactéries productrices de butyrate	3
				<i>Faecalibacterium prauznitsii</i>	6
Microbiote associé aux tumeurs	↑			<i>Bacteroides</i>	4
				<i>Fusobacterium</i>	7, 9
		Bacteroidetes		<i>Coriobacteriaceae</i> / <i>Roseburia</i> <i>Fusobacterium</i> / <i>Faecalibacterium</i> Bactéries productrices de butyrate	8
		Bacteroidetes Fusobacteria Proteobacteria	<i>Bacteroidaceae</i> <i>Streptococcaceae</i> <i>Fusobacteriaceae</i> <i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Bacteroides</i> / <i>Prevotella</i> <i>Streptococcus</i> <i>Fusobacterium</i> / <i>Peptostreptococcus</i> <i>Morganella</i> / <i>Porphyromonas</i>	5*
	↓	Fimicutes	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Shigella</i> / <i>Citrobacter</i> / <i>Serratia</i> / <i>Salmonella</i>	8
		Bacteroidetes Firmicutes (<i>Clostridiales</i>)			9
		Fimicutes	<i>Ruminococcaceae</i> <i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i> / <i>Roseburia</i> / <i>Pseudobutyrvibrio</i>	5*
Microbiote associé à la muqueuse	↑	Proteobacteria		<i>Faecalibacterium</i> / <i>Dorea</i> / <i>Shigella</i> / <i>Ruminococcus</i> / <i>Clostridium</i> / <i>Eubacterium</i>	10
			<i>Porphyromonadaceae</i> <i>Fusobacteriaceae</i> <i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Fusobacterium</i> / <i>Porphyromonas</i> <i>Peptostreptococcaceae</i> / <i>Gemella</i> <i>Mogibacterium</i> / <i>Klebsiella</i>	5
		Bacteroidetes		<i>Bacteroides</i> / <i>Coprococcus</i> / <i>Fusobacterium</i>	10
	↓		<i>Bifidobacteriaceae</i> <i>Alcaligenaceae</i>	<i>Faecalibacterium</i> / <i>Blautia</i> / <i>Anaerostipes</i> <i>Lachospira</i> / <i>Bifidobacterium</i>	5

microbiote intestinal à grande échelle. Dans un modèle murin de carcinogenèse induite par le traitement avec l'agent carcinogène DHM, des dysbioses du microbiote fécal ont été rapportées, comparativement aux animaux contrôles, avec notamment une augmentation des bactéries appartenant aux phyla des Firmicutes, Proteobacteria et Actinobacteria au détriment des bactéries appartenant au phylum Bacteroidetes (Zhu *et al.*, 2014).

Chez les patients atteints de CCR, différents microbiotes dysbiotiques ont été décrits en fonction des études. Bien qu'il n'est pu être mis en évidence un microbiote dysbiotique commun associé au CCR, certaines altérations du microbiote intestinal sont communes (**Tableau 3**). Une surreprésentation des phyla Bacteroidetes, Proteobacteria et Fusobacteria au détriment des Firmicutes a été mise en évidence dans les tissus tumoraux de patients atteints de CCR comparativement aux tissus sains de patients contrôles, mais également entre les prélèvements tumoraux et luminaux des patients (Ahn *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2012; Marchesi *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013). Par ailleurs, une augmentation du nombre de bactéries appartenant au genre *Bacteroides*, *Prevotella* et *Fusobacterium* et une diminution des genres bactériens *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* ont été observées dans les fèces, au sein du microbiote associé à l'épithélium colique et aux tumeurs (Chen *et al.*, 2012; Kostic *et al.*, 2012; McCoy *et al.*, 2013; Sobhani *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013). En revanche, d'autres études ont révélé une diminution des *Bacteroides* et une augmentation des *Faecalibacterium* au sein du microbiote fécal, adhérent à l'épithélium et aux tumeurs des patients atteints de CCR (Ahn *et al.*, 2013; Marchesi *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2010). Des études poussées jusqu'à l'analyse des espèces bactériennes ont révélé une augmentation des bactéries appartenant aux espèces *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus gallolyticus*, *Enterococcus faecalis* et *Fusobacterium nucleatum* ainsi qu'une diminution des bactéries appartenant aux espèces *Bacteroides vulgatus*, *Clostridium coccoides* et *Faecalibacterium prausnitzii* chez les patients atteints de CCR (Abdulmir *et al.*, 2011; Balamurugan *et al.*, 2008; Maddocks *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2004; Swidsinski *et al.*, 1998; Toprak *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012a; Wu *et al.*, 2013).

III.2.3 Origine inflammatoire du microbiote dysbiotique chez les patients atteints de CCR

Certaines études *in vivo* ont permis d'apporter des éléments sur la compréhension de l'apparition de dysbioses au cours de la carcinogenèse colorectale, et ceci en particulier en condition d'inflammation. Des souris prédisposées au développement de CCR (modèle *Il10^{-/-}* traité à l'AOM) possèdent un microbiote différent de souris sauvages traitées à l'AOM, suggérant un effet de l'inflammation sur la modification de ce microbiote (Arthur *et al.*, 2012). Cependant, dans cette même étude, il a été observé que le microbiote des souris *IL-10^{-/-}* traitées à l'AOM est très similaire à celui observé chez les animaux *IL-10^{-/-}* non traités par cet agent carcinogène, suggérant que les altérations du microbiote intestinal observées au cours de cancers associés à une colite seraient la conséquence de l'inflammation. Un autre argument soutenant le rôle de l'inflammation dans la mise en place d'une dysbiose est apporté par la modification du microbiote intestinal de souris traitées à l'AOM après chaque cycle de traitement au DSS, comparativement à celui relevé juste après l'administration d'AOM (Zackular *et al.*, 2013). Un autre argument fort en faveur du remodelage du microbiote par l'inflammation est la description de microbiotes dysbiotiques chez les patients atteints de MICI, ces derniers présentant un risque augmenté de développer un CCR par rapport à la population générale (Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2011; Cunningham *et al.*, 2010; Manichanh *et al.*, 2012).

L'inflammation semble donc jouer un rôle important dans l'établissement et le maintien de dysbioses chez les patients atteints de CCR. Cependant, d'autres facteurs environnementaux tels que l'alimentation et la consommation régulière de café peuvent être à l'origine de ces altérations (Albenberg and Wu, 2014; Cowan *et al.*, 2014; Patterson *et al.*, 2014).

III.3 Piste infectieuse dans le développement de cancer colorectal

L'hypothèse d'une piste infectieuse dans le développement tumoral a été émise dès la fin du 19^{ème} siècle par Robert Koch et Louis Pasteur, après la découverte de bactéries au sein de tumeurs (Zhu *et al.*, 2013). Depuis, de nombreux arguments épidémiologiques et expérimentaux ont permis d'étayer cette hypothèse et notamment en ce qui concerne la

Lumière
intestinale

Concurrence entre les bactéries « driver » et « passager »

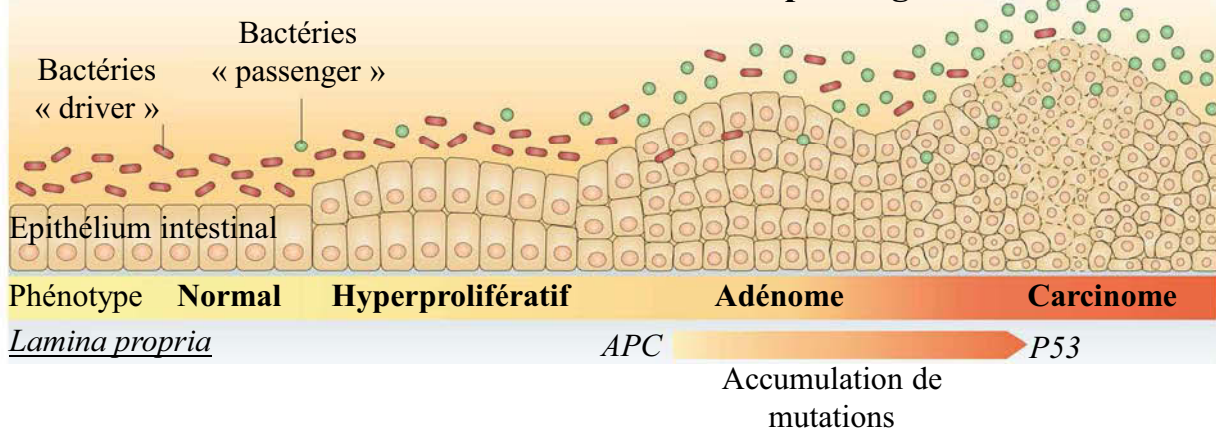


Figure 23 : Modèle « driver-passenger » dans le cancer colorectal.

La muqueuse intestinale des patients à risque de développer un cancer colorectal (CCR) est colonisée par des bactéries dites « driver » telles que *Bacteroides fragilis* entérotoxigènes. Ces bactéries peuvent induire une inflammation colique, augmenter la prolifération cellulaire et/ou produire des composés génotoxiques qui peuvent contribuer à l'accumulation de mutations au cours de la séquence adénome-cancer. Ce processus oncogénique s'accompagne de modifications du microenvironnement et peut exercer une pression de sélection sur la flore microbienne locale. Ces modifications peuvent être à l'origine du remplacement des bactéries « driver » par des bactéries « passager » telles que *Fusobacterium nucleatum* qui possèdent un avantage sélectif au sein du microenvironnement tumoral.

(Modifiée d'après Tjalsma *et al.*, 2012)

carcinogénèse colorectale. Selon le modèle « driver-passenger » proposé par Tjalsma et collaborateurs, la muqueuse colique de patients à risque de développer un CCR pourrait être colonisée par des bactéries dites « driver » pour leur capacité à induire une inflammation chronique, la prolifération cellulaire et/ou ayant des propriétés génotoxiques contribuant à l'accumulation de mutations génétiques, telles que *Bacteroides fragilis* enterotoxinogènes, *Enterococcus fecalis* producteurs de superoxydes et *Escherichia coli* producteurs de génotoxines (Sears and Garrett, 2014; Tjalsma *et al.*, 2012) (**Figure 23**). Les modifications du microenvironnement qui vont s'opérer sur le site de développement tumoral pourraient exercer une pression de sélection locale sur le microbiote intestinal favorisant l'émergence de bactéries dites « passager » telles que *Fusobacterium nucleatum* et *Streptococcus gallolyticus* sous-espèce *gallolyticus*. L'expansion, au site tumoral, de bactéries ayant des propriétés oncogéniques au détriment de bactéries aux propriétés « suppresseurs de tumeurs » pourrait ainsi participer à la promotion tumorale.

III.3.1 Modifications fonctionnelles du microbiote et cancer colorectal

III.3.1.1 Activité β -glucuronidase

Des études ont mis en évidence que les patients à haut risque de développer un CCR et ceux atteints de CCR présentent une augmentation de 1,7 fois de l'activité de β -glucuronidase fécale, une enzyme exprimée par certaines bactéries du microbiote intestinal dont *Escherichia coli*, comparativement aux patients contrôles (Kim and Jin, 2001). La β -glucuronidase pourrait jouer un rôle dans la carcinogénèse colorectale en participant à la synthèse de métabolites carcinogènes. A titre d'exemple, la diméthylhydrazine (DMH), un agent carcinogène présent dans le côlon, est habituellement métabolisé par le foie et de petites quantités de son métabolite pro-carcinogène, le méthylazoxyméthanol (MAM) hautement mutagène, sont excrétées dans la bile et libérées dans le côlon. Par ailleurs, le DMH peut être hydrolysé par l'activité β -glucuronidase des bactéries coliques relarguant ainsi du MAM dans le côlon. Les animaux axéniques traités avec du DMH développent moins de tumeurs coliques que les animaux conventionnels traités avec cette molécule, et l'administration d'un inhibiteur de la β -glucuronidase chez des rats traités avec de l'AOM induit une diminution du nombre de tumeurs. Ceci suggère l'importance de cette activité enzymatique microbienne dans la carcinogénèse colorectale (Gill and Rowland, 2002).

III.3.1.2 Activité 7 α -dehydroxylase

Le microbiote intestinal, et principalement les bactéries anaérobies à Gram positif, joue un rôle important dans le métabolisme des acides biliaires, principalement en exprimant une activité 7 α -dehydroxylase qui est augmentée chez les patients atteints de CCR comparativement aux contrôles (Gill and Rowland, 2002). Les acides biliaires primaires cholique et chénodésoxycholique sont convertis par cette enzyme respectivement en acides biliaires secondaires désoxycholique (DCA) et lithocholique (LCA), les rendant plus hydrophiles (Zhu *et al.*, 2013). Une corrélation positive entre la concentration fécale en acides biliaires et le risque augmenté de développer un CCR a été mise en évidence (de Giorgio and Blandizzi, 2010; Imray *et al.*, 1992; Owen, 1997). En modèle murin, l'administration de DCA à des rats traités à l'AOM, comparativement aux rats seulement traités à l'AOM, induit une augmentation de plus de 2 fois du nombre de foyers de cryptes aberrantes et une augmentation de l'expression du marqueur de prolifération PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), au niveau de la muqueuse (Narahara *et al.*, 2000; Seraj *et al.*, 1997). Le rôle des acides biliaires dans la carcinogenèse colorectale n'est à ce jour pas clairement compris. La capacité du DCA à induire un stress oxydant mitochondrial conduisant à la synthèse d'espèces oxygénées réactives, à activer la voie de signalisation NF- κ B et l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-8, à induire des dommages de l'ADN tels que des cassures double brin, confère à cette molécule des propriétés carcinogènes (Lee *et al.*, 2004; Mühlbauer *et al.*, 2004; Payne *et al.*, 2006; Powolny *et al.*, 2001).

III.3.1.3 Butyrate

Le butyrate est issu de la fermentation de complexes carbohydrates et de fibres alimentaires dont les récepteurs principaux sont GPR41, GPR43, GPR109a et jouerait un rôle protecteur vis-à-vis du développement du CCR (Canani *et al.*, 2011). Une diminution de 0,75 fois du nombre de bactéries fécales productrices de butyrate, sur la base de l'analyse du nombre de copie du gène codant la butyryl-coenzyme A CoA transférase, a été observée chez les patients atteints de CCR comparativement aux sujets contrôles (Wang *et al.*, 2012a). Par ailleurs, des dysbioses du microbiote caractérisées entre autre par une diminution de l'abondance de bactéries appartenant au genre *Faecalibacterium*, bactéries à Gram positif

anérobies strictes productrices de butyrate, ont été mises en évidence dans deux études indépendantes chez les patients atteints de CCR (Balamurugan *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012).

Le rôle protecteur du butyrate dans le développement tumoral est souligné dans une étude récente montrant une augmentation du nombre de tumeurs coliques chez les souris *Niacr1^{-/-}*, invalidées pour le gène codant le récepteur GPR109a traitées à l'AOM/DSS, comparativement aux souris *Niacr1^{-/-}* non traitées, et chez les souris *APC^{Min/+} Niacr1^{-/-}*, par rapport aux souris *APC^{Min/+}* (Singh *et al.*, 2014). *In vitro*, le butyrate est capable d'inhiber la croissance cellulaire et d'induire l'apoptose de cellules épithéliales intestinales coliques en culture (Hague *et al.*, 1995; Ruemmele *et al.*, 2003; Segain *et al.*, 2000).

Des effets anti-inflammatoires des acides gras à courtes chaînes, dont le butyrate, ont été montrés dans un modèle murin invalidé pour le gène codant GPR43, dans lequel est observé une augmentation du score histologique et de l'activité myéloperoxydase (MPO) (témoignant d'une augmentation de l'inflammation intestinale) en réponse à un traitement au DSS ou au TNBS, comparativement aux souris sauvages (Maslowski *et al.*, 2009). Il a également été démontré que les effets anti-inflammatoires de *Faecalibacterium prauznitsii* observés dans un modèle murin de colite induite au TNBS sont en partie dus à la production de butyrate (Sokol *et al.*, 2008b). *In vitro*, les effets protecteurs du butyrate sont associés à une inhibition de la dimérisation du facteur de transcription NF-κB, conduisant à une inhibition de son activité transcriptionnelle (Inan *et al.*, 2000). Cependant, des effets pro-inflammatoires ont également été attribués au butyrate comme le montrent la diminution de l'inflammation et du recrutement des leucocytes au site inflammatoire dans un modèle murin *GPR43^{-/-}* traité au DSS ou au TNBS, comparativement aux souris sauvages (Kim *et al.*, 2013b; Sina *et al.*, 2009).

III.3.2 Bactéries intestinales carcinogènes

Certains pathogènes ou pathogènes opportunistes sont suspectés d'influencer directement le CCR en produisant des toxines et des cyclomodulines, en induisant une inflammation chronique, et/ou en modulant des voies de signalisation régulatrices de processus pro-tumoraux. Dans cette partie, l'intérêt est porté sur l'étude bibliographique des espèces bactériennes pour lesquelles une association avec la carcinogenèse colorectale a été

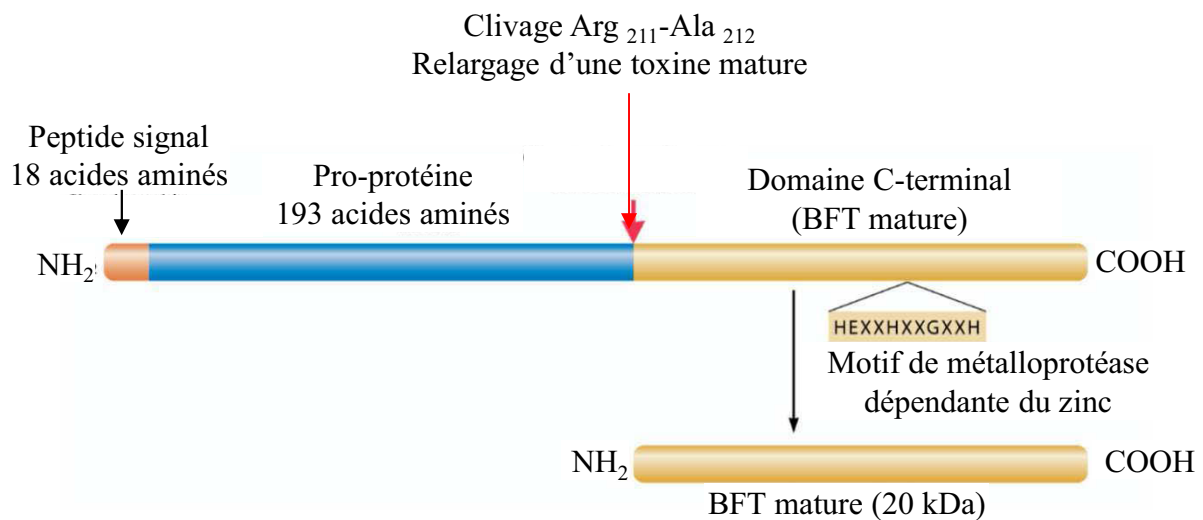


Figure 24 : Structure de la toxine de *Bacteroides fragilis* (BFT).

Il existe 3 isoformes de la toxine BFT (BFT-1, BFT-2 et BFT-3), chacune étant composée de trois domaines : le peptide signal, la pro-protéine et le domaine C-terminal correspondant à la forme mature de la toxine. L'holotoxine est clivée par une protéase de *B. fragilis* encore inconnue entre les acides aminés Arginine et Alanine en position 211 et 212 respectivement. Ceci conduit au relargage de la toxine BFT mature d'une taille de 20 kDa dans le côlon.

(Modifiée d'après Sears 2009)

rapportée par plusieurs études indépendantes et pour lesquelles des éléments permettant de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires influençant le développement tumoral ont été apportés.

III.3.2.1 *Bacteroides fragilis*

Bacteroides fragilis est une bactérie commensale anaérobie stricte à Gram négatif. Cette espèce bactérienne représente environ 0.1% de la flore intestinale normale et est retrouvée chez près de 80% des enfants et des adultes (Moore and Holdeman, 1974; Wu *et al.*, 2003). *B. fragilis* participe à la fermentation des sucres et la biotransformation des acides biliaires (Wexler, 2007). Certaines souches de *B. fragilis* sécrètent une toxine de 20 kDa appelée fragylisine ou *Bacteroides fragilis* toxin (BFT) et ces souches nommées *B. fragilis* entérotoxigènes (ETBF, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*) sont responsables de diarrhées chez l'animal et l'Homme (Sears, 2009; Sears *et al.*, 1995).

La toxine BFT, principal facteur de virulence des souches ETBF est synthétisée sous forme d'une pré-protéine constituée de trois domaines : le peptide signal, le domaine pro-protéique et le domaine C-terminal correspondant à la toxine mature (**Figure 24**). L'activité de la toxine repose sur les deux derniers domaines. La maturation de BFT fait intervenir le clivage du peptide signal (potentiellement impliqué dans l'adressage de la toxine à la membrane) et du domaine pro-protéique (Franco *et al.*, 1997). Trois isoformes de la toxine (BFT-1, BFT-2, BFT-3), codées par trois gènes chromosomiques (*bft-1*, *bft-2* et *bft-3*), présentent des différences au niveau de leur structure primaire, ont été décrites. Les variations touchent principalement le domaine C-terminal qui présente des motifs spécifiques de métalloprotéase dépendante du zinc, ce qui confère à BFT une activité protéolytique, indispensable à son activité biologique, vis-à-vis de différents substrats *in vitro* (actine, gélatine, caséine,...) (Moncrief *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1998). Par ailleurs, la formation, d'une structure amphipathique dans le domaine C-terminal de l'isoforme BFT-2 a été prédite. Il est proposé que BFT-2 pourrait s'oligomériser permettant à la toxine de s'insérer dans la membrane et de former des pores.

Une augmentation de 3 fois de la prévalence de souches de *B. fragilis* productrices de la toxine BFT a été mise en évidence chez les patients atteints de CCR comparativement aux

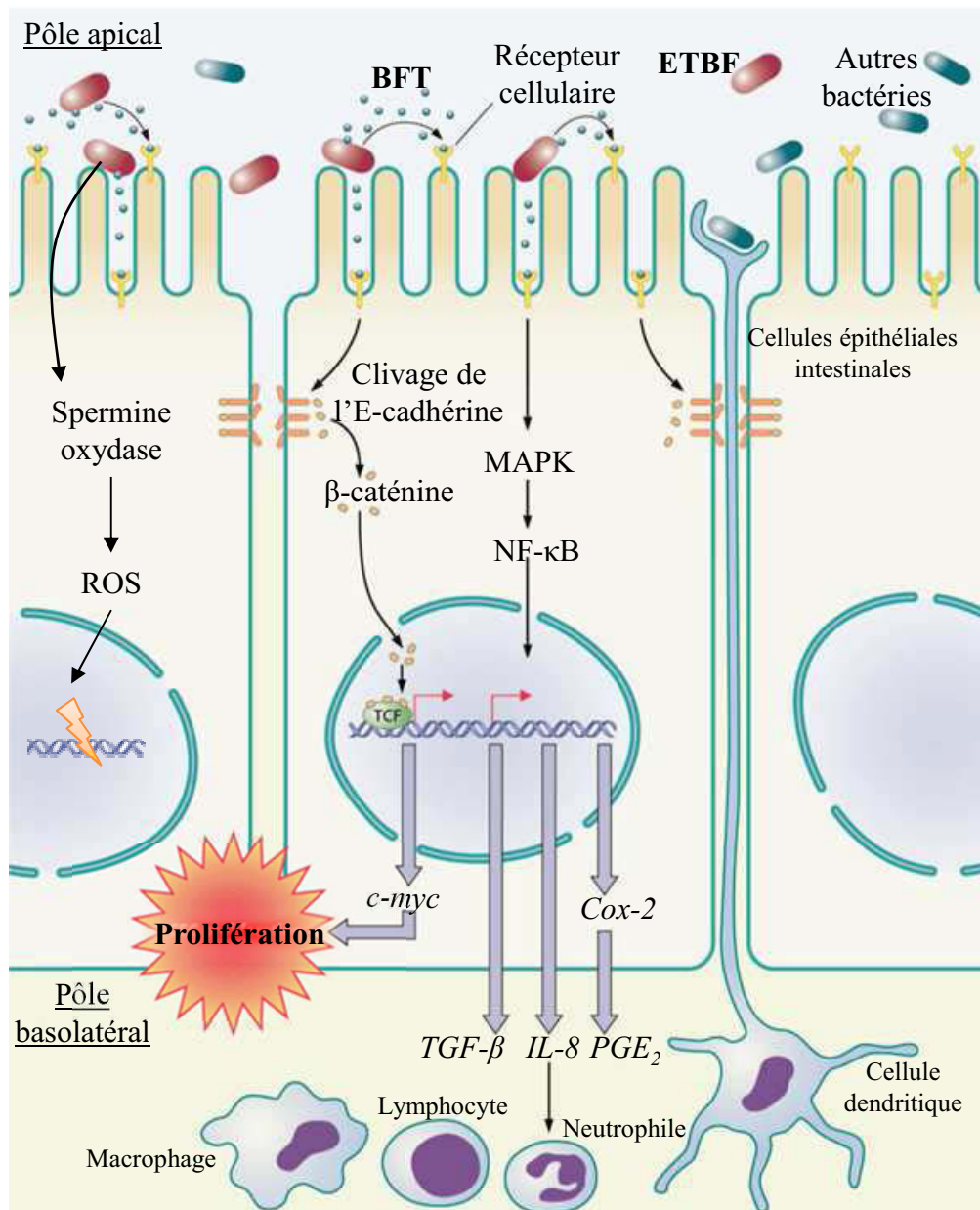


Figure 25 : Rôle pro-inflammatoire et pro-tumoral de *Bacteroides fragilis*.

Les bactéries appartenant à l'espèce *Bacteroides fragilis* entérotoxigènes (ETBF, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*) colonise la muqueuse colique et sécrètent la toxine BFT (*Bacteroides fragilis* toxin). Sa fixation sur un récepteur spécifique présent au niveau des cellules épithéliales intestinales induit l'activation des voies de signalisation MAPKines, NF-κB, et COX-2 et conduit à l'expression et la sécrétion de chimiokines/cytokines telles que TGF-β et l'IL-8, et de PGE₂. Le relargage de ces molécules dans la sous-muqueuse induit l'inflammation. De plus, la fixation de BFT conduit également au clivage de l'E-cadhérine, induisant la libération de la β-caténine dans le cytoplasme, sa translocation nucléaire et l'activation de la transcription de gènes impliqués dans le prolifération cellulaire tels que l'oncogène *c-myc*. Par ailleurs, le clivage de l'E-cadhérine diminue la fonction barrière de la muqueuse colique pouvant participer à une augmentation de l'inflammation colique. ETBF induit également l'expression de la spermine oxydase responsable de la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) à l'origine de cassures double brin de l'ADN. (Modifiée d'après Sears, 2009)

patients contrôles (Toprak *et al.*, 2006). L'administration d'ETBF, mais pas de *B. fragilis* non entérotoxigène, à des souris *APC^{Min/+}*, induit une accélération de l'apparition de tumeurs coliques, suggérant une implication de cette toxine dans la carcinogenèse colorectale (Wu *et al.*, 2009). Des études menées sur le rôle biologique de la toxine BFT ont permis de mieux comprendre son potentiel pro-carcinogène.

Inflammation

Les cellules épithéliales intestinales traitées avec la toxine BFT sécrètent, suite à l'activation des voies NF- κ B, p38, COX-2 et β -caténine, un cocktail de cytokines et chimiokines telles que l'IL-8, MIP-2 (Macrophages Inflammatory Protein 2), CCL2, MCP-1 et CXCL1 conduisant notamment au recrutement de macrophages et leucocytes polynucléaires, suggérant qu'ETBF peut participer à la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire et au développement tumoral (Kim *et al.*, 2002, 2005a; Sears, 2009; Wu *et al.*, 2003, 2004) (**Figure 25**). L'infection chronique de souris C57BL/6J et de souris axéniques par ETBF induit une colite intestinale aigüe puis persistante caractérisée par une infiltration de cellules immunitaires dans la muqueuse intestinale, la présence d'abcès cryptiques ainsi que l'exfoliation des cellules épithéliales intestinales conduisant à la formation de plaques d'érosion et à l'ulcération de l'épithélium intestinal (Rhee *et al.*, 2009). Par ailleurs, dans le modèle *APC^{Min/+}*, la toxine BFT active le facteur de transcription STAT3 qui induit la mise en place d'une réponse immunitaire de type Th17 responsable de l'apparition précoce de tumeurs colorectales (Wu *et al.*, 2009). L'administration d'anticorps dirigés contre l'IL-17 abolit l'effet d'ETBF sur la carcinogenèse colorectale. Ainsi, une colonisation chronique de l'épithélium intestinal par ces bactéries productrices de toxine pourrait entretenir une inflammation chronique pouvant influencer la transformation de l'épithélium intestinal et la progression tumorale.

Par ailleurs, les souches de *B. fragilis* entérotoxigènes induisent *in vitro*, dans des cellules épithéliales intestinales en culture HT29 et T84, la surexpression de la spermine oxydase (SMO) qui est une enzyme productrice de radicaux libres (Goodwin *et al.*, 2011). Les radicaux libres, médiateurs de l'inflammation, sont de puissants inducteurs de cassures de l'ADN. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la SMO (MDL 72527, *N*¹,*N*⁴-bis(2,3-butandienyl)-1,4-butanediamine) induit une réduction de l'inflammation chronique induite par

l'infection par ETBF chez les souris C57BL/6J et une diminution de 69% du nombre de tumeurs coliques chez les animaux *APC*^{Min/+}, suggérant que la SMO est un acteur moléculaire clé intervenant dans la carcinogenèse colorectale induite par ETBF.

Prolifération et résistance à l'apoptose

La toxine BFT est capable, en se fixant sur un récepteur à ce jour inconnu, d'induire le clivage de la protéine E-cadhérine, impliquée à la fois dans les complexes de jonctions et d'adhésion cellulaire et la séquestration cytoplasmique de la β -caténine (Wu *et al.*, 2003). Ceci a pour conséquence le relargage de la β -caténine dans le cytoplasme qui peut alors transloquer dans le noyau et induire l'expression de gènes cibles tels que *c-myc*, oncogène impliqué entre autre dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Hwang *et al.*, 2013) (**Figure 25**). Par ailleurs, en réponse à la stimulation par la toxine BFT, une augmentation dépendante de COX-2 de l'expression de la protéine inhibitrice de l'apoptose cIAP2 (cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2) associée à une résistance à l'apoptose a été rapportée sur des cellules épithéliales intestinales coliques HT-29 (Kim *et al.*, 2008).

III.3.3 Streptococcus gallolyticus sous-espèce gallolyticus

Streptococcus gallolyticus sous-espèce *gallolyticus*, anciennement nommée *Streptococcus bovis* biotype I, est une bactérie commensale du tube digestif anaérobie à Gram positif. Bien que controversée, l'implication de *S. gallolyticus* dans la carcinogenèse colorectale est soupçonnée depuis les années 1950 suite à l'observation de l'apparition de CCR chez 25 à 80% des patients atteints d'endocardites streptococcales (McCOY and MASON, 1951). Cette association a été confirmée par de nombreuses études dont une plus récente montrant que 65% des patients infectés par *S. gallolyticus*, dont la plupart sont atteints d'endocardites, développent un CCR de manière concomitante (Boleij and Tjalsma, 2013). Par ailleurs, le pourcentage de patients présentant des adénomes (78%) et carcinomes (68%) colorectaux séropositifs pour des anticorps dirigés contre *S. gallolyticus* est supérieur à celui des patients contrôles (17%) (Abdulmir *et al.*, 2009). De plus, cette bactérie a été détectée dans 21% des adénomes et 15% des cancers colorectaux des patients (Devis *et al.*, 1989).

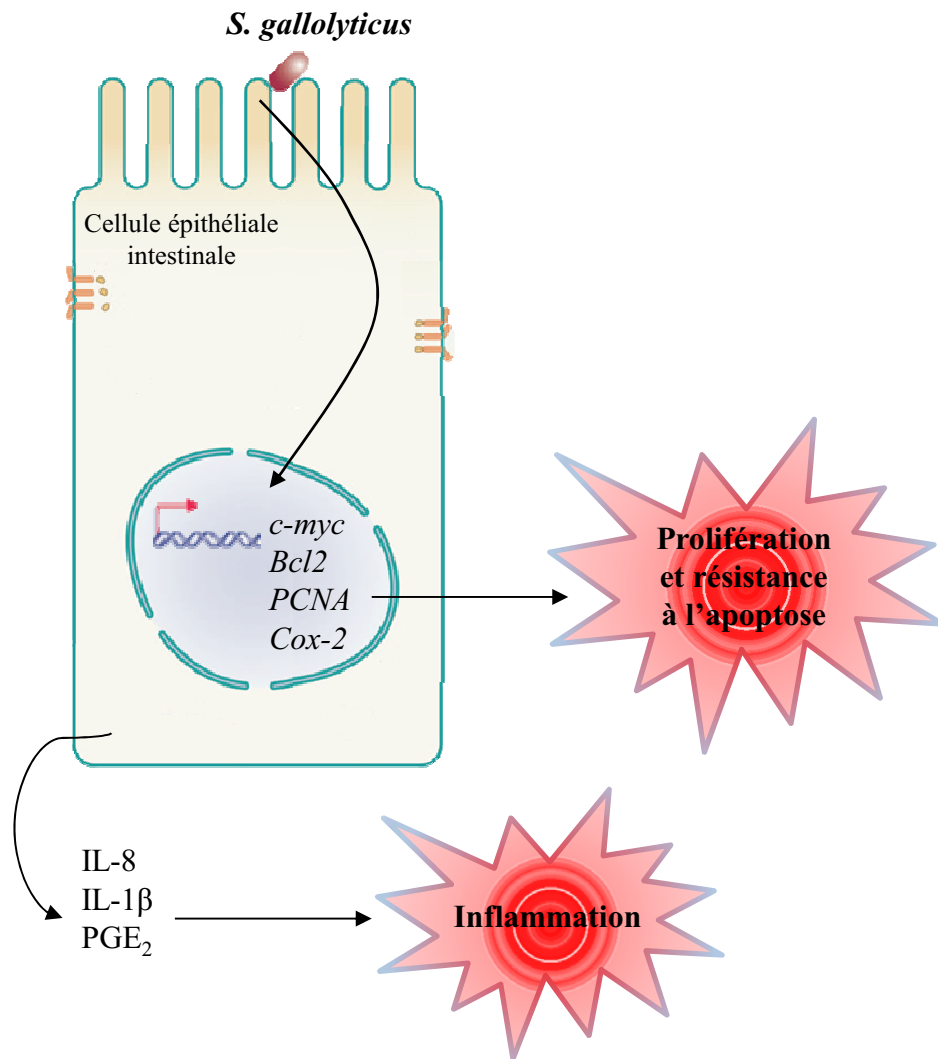


Figure 26 : Rôle pro-inflammatoire et pro-tumoral de *Streptococcus gallolyticus*.

Les bactéries appartenant à l'espèce *Streptococcus gallolyticus* sous espèce *gallolyticus* colonisent la muqueuse des patients atteints de CCR. La participation de *S. gallolyticus* au développement tumoral fait intervenir l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8 et l'IL-1 β , de gènes impliqués dans le prolifération cellulaire tels que *PCNA* et l'oncogène *c-myc*, du gène *Cox-2* et du gène codant la protéine anti-apoptotique BCL-2. L'expression de ces facteurs pro-tumoraux pourrait contribuer à l'établissement d'un épithélium hyper-prolifératif.

Aucun facteur de virulence de *S. gallolyticus* n'a pu être mis en évidence à ce jour. En revanche, une étude a montré que les patients présentant des polypes et des CCR de stades précoces (I et II), mais pas ceux de stades tardifs (III et IV), possèdent des titres d'anti-RpL7/L12, une protéine ribosomale de *S. gallolyticus*, supérieurs à ceux observés pour les patients contrôles, suggérant que cette protéine est associée à un risque élevé de développer un CCR (Boleij *et al.*, 2010).

Inflammation

L'expression du facteur de transcription NF- κ B et de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 est augmentée dans les tissus tumoraux et les tissus adjacents des patients atteints de CCR séropositifs pour *S. gallolyticus* comparativement aux patients séronégatifs, ce qui suggère un lien entre l'expression de ces médiateurs de l'inflammation et le développement tumoral associé à *S. gallolyticus* (Abdulmir *et al.*, 2009). La contribution *S. gallolyticus* au développement tumoral, chez les patients, est associée à l'augmentation de l'expression des gènes codant les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-8, et du gène codant la protéine COX-2 (Abdulmir *et al.*, 2010) (**Figure 26**).

Prolifération cellulaire

Une étude menée *in vivo*, sur des rats traités à l'AOM, a démontré que l'administration de *S. gallolyticus* ou d'extraits totaux de cette bactérie induisent une augmentation de la progression de lésions prénéoplasiques *via* une augmentation de la formation de foyers de cryptes aberrantes hyperprolifératives et une augmentation des marqueurs de prolifération (PCNA et des polyamines mucosales) et de l'IL-8 au sein de la muqueuse intestinale (Ellmerich *et al.*, 2000) (**Figure 26**). Par ailleurs, les tumeurs de patients séropositifs pour *S. gallolyticus* présentent une augmentation de l'expression du gène *c-myc*, impliqué entre autre dans la prolifération cellulaire, et du gène codant la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Abdulmir *et al.*, 2010) Ceci suggère que les antigènes de *S. gallolyticus* pourraient être impliqués dans l'établissement d'un épithélium hyperprolifératif.

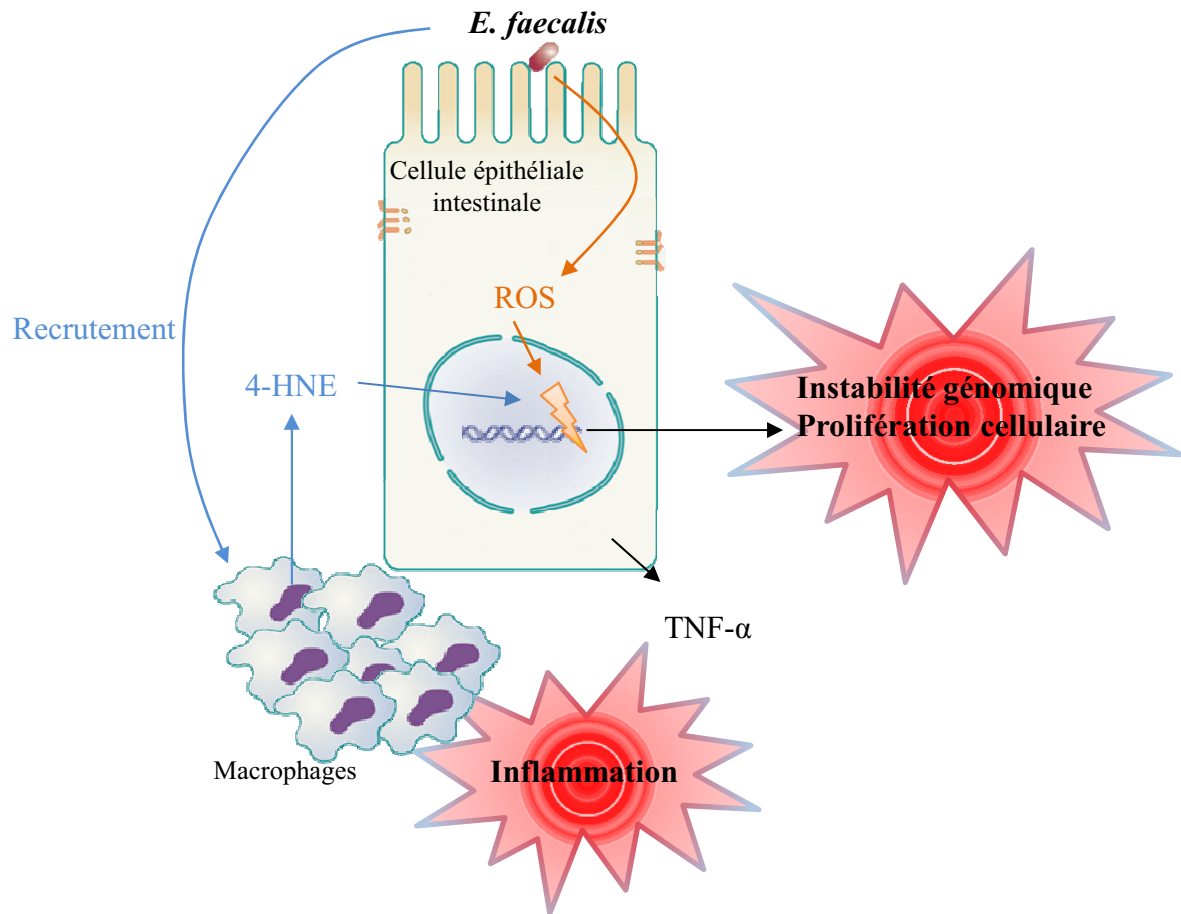


Figure 27 : Rôle pro-inflammatoire et génotoxique d'*Enterococcus faecalis*.

Les bactéries appartenant à l'espèce *Enterococcus faecalis* est capable d'induire des cassures doubles brin de l'ADN en cellules épithéliales intestinales en produisant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que des ions superoxydes $O_2^{\cdot -}$. Par ailleurs, les macrophages infectés par *E. faecalis* produisent une molécule réactive, le 4-Hydroxy-2-Nonenal (4-HNE), capable d'induire des cassures double brin de l'ADN au niveau des cellules épithéliales intestinales par des effets « bystander ». Ceci conduit à une augmentation de l'instabilité chromosomique et une augmentation de la prolifération cellulaire.

III.3.3.1 Enterococcus faecalis

Enterococcus faecalis est une bactérie anaérobie facultative à Gram positif de la flore digestive humaine productrice de butyrate et d'espèces oxygénées réactives. Des analyses par PCR quantitative sur des prélèvements fécaux ont mis en évidence une augmentation d'un facteur 4 d'*E. faecalis* chez les patients atteints de CCR comparativement aux patients contrôles (Balamurugan *et al.*, 2008).

Inflammation et prolifération cellulaire

Des études indépendantes ont mis en évidence que des souris *Il10^{-/-}* infectées avec *E. faecalis* développent des cryptes intestinales hyperplasiques ainsi que des adénocarcinomes colorectaux accompagnés d'une augmentation du nombre de macrophages au niveau de la muqueuse colique, de l'expression de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α et du marqueur de prolifération PCNA (Balish and Warner, 2002; Yang *et al.*, 2012).

Production de composés génotoxiques

E. faecalis présente également des propriétés génotoxiques. En effet, il a été démontré qu'*E. faecalis* est capable de produire, *in vitro* sur les cellules épithéliales intestinales HT29 et HCT116 et *in vivo* chez le rat, des ions superoxydes extracellulaires O₂^{-•}, convertis en peroxyde d'hydrogène qui est une molécule génotoxique pouvant induire entre autre une instabilité chromosomique (Huycke and Moore, 2002; Huycke *et al.*, 2002; Wang and Huycke, 2007; Wang *et al.*, 2008) (**Figure 27**). Ces espèces oxygénées réactives sont également capables d'activer la prolifération cellulaire et d'inhiber l'apoptose en affectant l'expression des facteurs de transcription NF- κ B, MAPK et AP-1 (Huycke *et al.*, 2002).

Une étude récente a mis en évidence *in vitro* que les macrophages infectés avec *E. faecalis* produisent du 4-Hydroxy-2-Nonenal (4-HNE), une molécule réactive issue de la peroxydation lipidique responsable de cassures de l'ADN (Wang *et al.*, 2008, 2012b) (**Figure 27**). Les effets « bystanders » générés par cette molécule causent un arrêt du cycle cellulaire en phase G2, une instabilité chromosomique manifestée par une tétrapolémie des cellules

épithéliales intestinales HCT116, et l'apparition de tumeurs colorectales avec une accumulation de COX-2 dans les macrophages dépendante du 4-HNE chez des souris *Il10*^{-/-}.

III.3.3.2 *Fusobacterium nucleatum*

Fusobacterium nucleatum est une bactérie commensale opportuniste à Gram négatif de la cavité buccale impliquée dans des maladies parodontales. Elle est aussi impliquée dans des infections extra-orales et notamment des infections intra-utérines associées à des complications pendant la grossesse. C'est une bactérie productrice de butyrate, molécule connue pour ses effets anti-inflammatoires sur l'épithélium colique, mais aussi de sulfure d'hydrogène, un composé hautement toxique et pro-inflammatoire issu du métabolisme des cystéines (Allen-Vercoe *et al.*, 2011).

F. nucleatum est capable d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales et endothéliales par l'intermédiaire de l'adhésine FadA exprimée à la surface de la bactérie, ce qui facilite sa dissémination (Han *et al.*, 2000, 2005). FadA existe sous deux formes : une forme non sécrétée de 129 acides aminés (pré-FadA comprenant une séquence signal de 18 acides aminés) associée à la membrane interne des bactéries et une forme de 111 acides aminés (FadA mature ou mFadA) exposée à la surface des bactéries (Xu *et al.*, 2007). Les monomères de mFadA présentent une structure en épingle à cheveux et peuvent s'associer entre eux selon un mode « tête à queue », formant ainsi de longs et fins filaments dépourvus d'activité de liaison (Nithianantham *et al.*, 2009). En revanche, il a été montré qu'un mélange de mFadA et de pré-FadA permet la formation de complexes actifs (FadAc) s'organisant en filaments hétérogènes de longueurs/largeurs variables ou en « nœuds ». L'activité de liaison semble être associée aux filaments de courtes tailles et aux « nœuds » (Témoin *et al.*, 2012). Il a récemment été démontré que la cadhérine CDH5 présente à la surface des cellules endothéliales représente un récepteur pour l'adhésine FadA permettant l'adhésion et l'invasion de *F. nucleatum* (Fardini *et al.*, 2011). En revanche, le récepteur reconnu par FadA au niveau des cellules épithéliales intestinales et permettant l'adhésion et l'invasion de *F. nucleatum* n'a, à ce jour, pas encore été identifié.

Une prévalence augmentée des bactéries appartenant au genre *Fusobacterium* a été observée au niveau de la muqueuse rectale et des fèces de patients avec des adénomes

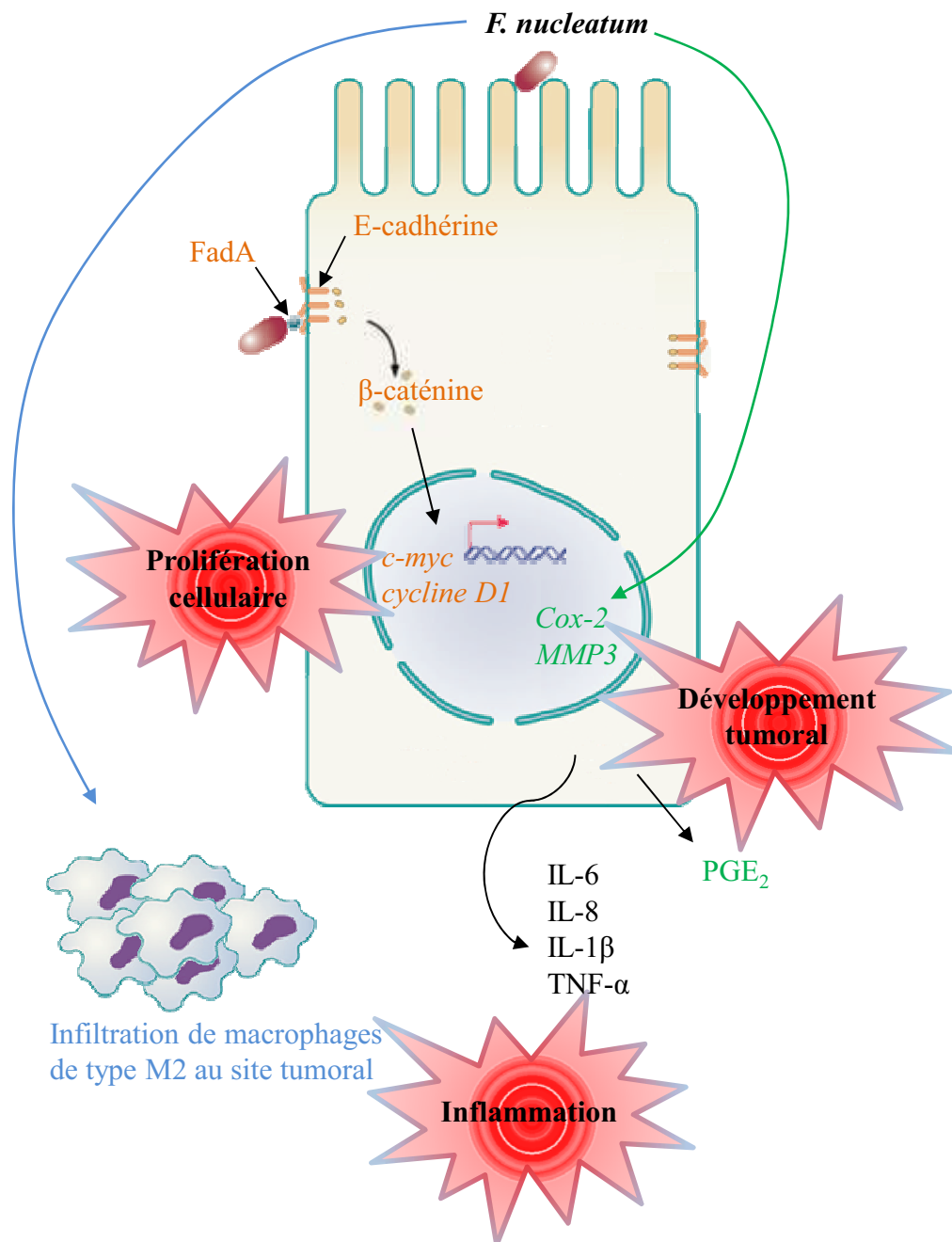


Figure 28 : Implication de *Fusobacterium nucleatum* dans la carcinogenèse colorectale.

L'adhésine FadA des bactéries appartenant à l'espèce *Fusobacterium nucleatum* est capable de se lier à l'E-cadhérine et d'activer la voie de signalisation WNT/β-caténine conduisant à l'expression des gènes *c-myc* et *cycline D1* impliqués notamment dans la prolifération cellulaire. Par ailleurs, *F. nucleatum* induit l'infiltration tumorale par des macrophages de type M2, pro-tumoraux. Il induit également l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF-α, l'IL-8 et l'IL-1β et des gènes codant les protéines COX-2 et MMP3 impliqués dans de nombreux processus pro-tumoraux tels que l'invasion cellulaire.

colorectaux, comparativement à la muqueuse rectale de patients contrôles sans adénome (Ahn *et al.*, 2013; McCoy *et al.*, 2013). De plus, les tumeurs colorectales de patients atteints de CCR possèdent une prévalence augmentée d'au moins 2 fois de bactéries appartenant au genre *Fusobacterium* comparativement à la muqueuse saine adjacente, *F. nucleatum* étant l'espèce majoritaire (Castellarin *et al.*, 2012; Kostic *et al.*, 2012; Marchesi *et al.*, 2011). Des analyses d'immunofluorescence ont permis de localiser *F. nucleatum* dans la couche de mucus qui surplombe l'épithélium intestinal ainsi que dans les cryptes coliques des patients atteints de CCR (McCoy *et al.*, 2013).

L'administration de *F. nucleatum* à des souris *APC^{Min/+}* accélère le développement tumoral en induisant l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , de COX-2 et de MMP3 ainsi qu'en favorisant l'infiltration des tumeurs par des cellules immunitaires telles que des macrophages possédant un phénotype M2 pro-tumoral (Kostic *et al.*, 2013) (**Figure 28**). Il a été montré dans une étude récente que *F. nucleatum* exprime une adhésine, FadA, capable de se lier à l'E-cahérine, induisant ainsi l'activation de la voie de signalisation WNT/ β -caténine, ce qui conduit à une augmentation de l'expression des oncogènes *c-myc* et *cyclin D1* impliqués dans la prolifération cellulaire et de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire tels que les gènes codant les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 (Rubinstein *et al.*, 2013). Ces résultats ont été confirmés dans un modèle de xénogreffe sous-cutanée où les auteurs ont montré que l'adhésine FadA induit une croissance tumorale plus rapide associée à une signature d'expression génique pro-inflammatoire et proliférative. L'inhibition de FadA dans ce modèle permet de bloquer la prolifération de la masse tumorale. Enfin, *F. nucleatum* produit une toxine à activité immunosuppressive, FIP ou FIPA (Fusobacterial Immunosuppressive Protein), capable d'inhiber le cycle cellulaire. Cependant, le rôle de cette toxine dans la carcinogenèse colorectale n'a pas encore été étudié. Les données structurales et moléculaires concernant cette protéine sont peu nombreuses. Elle serait constituée de deux sous-unités (44 et 48 kDa), la sous-unité de 48 kDa étant certainement indispensable à l'activité de cette protéine (Demuth *et al.*, 1996).

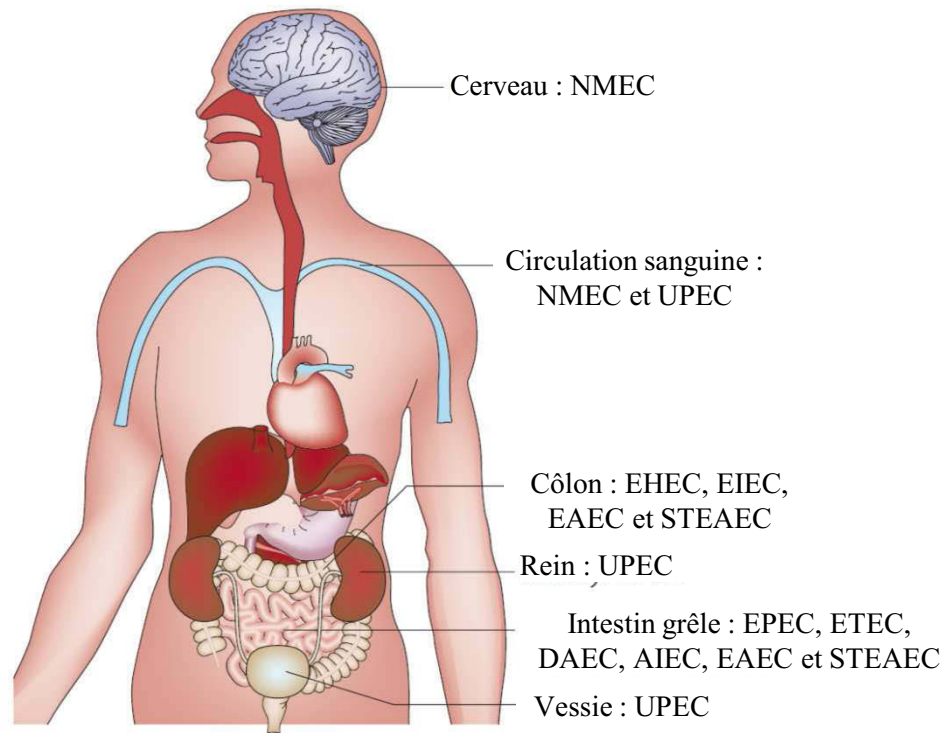


Figure 29 : Tropisme des différents pathovars d'*Escherichia coli*.

Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) et les *E. coli* adhérents et invasifs (AIEC) colonisent l'intestin grêle, alors que les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) colonisent plutôt le côlon. Les *E. coli* entéroaggrégatifs producteurs ou non de Shiga-toxines (EAEC et STEAEC) peuvent coloniser l'intestin grêle et le côlon. Les *E. coli* uropathogènes (UPEC) colonisent la vessie et sont à l'origine de cystites. En fonction des facteurs de virulence hébergés par les souches, les UPEC peuvent remonter jusqu'aux reins et entraîner une pyélonéphrite. De plus, les UPEC comme les *E. coli* à l'origine de méningites néonatales (NMEC) peuvent entraîner une septicémie.

(Modifiée d'après Croxen and Finlay, 2010)

III.3.3.3 *Escherichia coli*

Diversité des souches et pathogénécité

Escherichia coli est une bactérie commensale du tube digestive à Gram négatif colonisant de façon asymptomatique le tractus digestif des nouveaux-nés dans les premières heures qui suivent la naissance. Certaines souches ont acquis des facteurs de virulence et/ou de fitness leur permettant d'accéder à de nouvelles niches écologiques les rendant pathogènes pour l'homme (Clements *et al.*, 2012; Croxen and Finlay, 2010).

Les *E. coli* pathogènes peuvent ainsi être séparés en deux grands groupes en fonction du type d'infection dont ils sont à l'origine. Les souches d'*E. coli* à l'origine d'infections extra-intestinales sont regroupées sous le terme de ExPEC (Extra-intestinal Pathogenic *E. coli* ou *E. coli* extra intestinaux), incluant les *E. coli* uropathogènes (UPEC, UroPathogenic *E. coli*) responsables d'infections du tractus urinaire et les *E. coli* associés à des méningites néonatales (NMEC, Neonatal Meningitis *E. coli*) associés à des méningites ou à des septicémies (**Figure 29**). Le groupe d'*E. coli* pathogènes intestinaux est à l'origine de syndromes diarrhéiques et comprend huit groupes pathogènes ou pathovars (Croxen and Finlay, 2010). Il s'agit des *E. coli* entérotoxigènes (ETEC, Enterotoxigenic *E. coli*), des *E. coli* entéropathogènes (EPEC, Enteropathogenic *E. coli*), des *E. coli* entérohémorragiques (EHEC, Enterohemorrhagic *E. coli*), des *E. coli* entéroinvasifs (EIEC, Enteroinvasive *E. coli*), des *E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC, Enteraggregative *E. coli*), des *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC, Diffusely-Adhering *E. coli*) (Nataro and Kaper, 1998). Récemment, les *E. coli* entéroaggrégatifs producteurs de Shiga-toxine (STEAEC) ont été décrits suite à l'épidémie à *E. coli* en Allemagne en 2011 (Clements *et al.*, 2012). Un autre pathovar d'*E. coli*, les *E. coli* adhérents et invasifs (AIEC, adherent and invasive *E. coli*) associés à la forme iléale de la maladie de Crohn a été mis en évidence il y a 15 ans (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998, 2004).

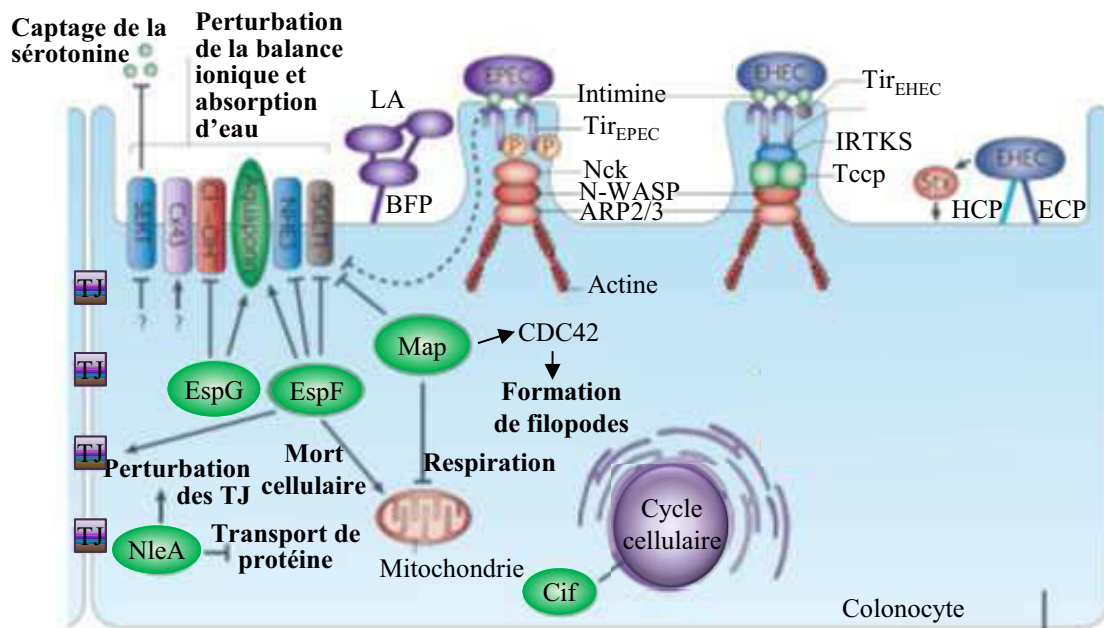


Figure 30 : Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC).

Les **EPEC** adhèrent aux entérocytes *via* les **BFP** (Bundle-Forming Pili) formant des micro-colonies (adhésion localisée (LA)). La liaison entre le récepteur **Tir** (Translocated intimin receptor) transloqué dans le cytoplasme de la cellule hôte et adressé à la membrane plasmique, et l'**intimine** permet une adhésion bactérie/cellule plus intime. Tir est phosphorylé par une thréonine kinase de l'hôte et recrute l'adaptateur Nck, qui active N-WASP (Neural Wiskott–Aldrich Syndrome Protein) et le complexe protéique associé à l'actine 2/3 (ARP2/3, Actin-Related Protein 2/3) afin de réarranger l'actine et former un piédestal. Les **EHEC** adhèrent aux entérocytes *via* les **ECP** (*E. coli* Common Pilus) et les **HCP** (Haemorrhagic *coli* Pilus). Chez les EHEC, **Tir** n'est pas phosphorylé et il n'y a pas recrutement de Nck. Le réarrangement d'actine nécessaire à la formation d'un piédestal fait intervenir la protéine TccP (Tir cytoskeleton-coupled Protein), qui interagit avec Tir par l'intermédiaire d'une protéine de l'hôte (IRTKS: Insulin Receptor Tyrosine Kinase Substrate). Ce complexe se lie avec N-WASP pour activer ARP2/3. L'adhésion intime des EPEC et EHEC et les modifications du cytosquelette d'actine conduisent à l'effacement des microvillosités des entérocytes (lésions d'attachement et d'effacement A/E) et la formation de piédestal. Les effecteurs bactériens **Map** (Mitochondrial-associated protein), **EspG** et **EspF**, sécrétés par le système de sécrétion de type III des EPEC et des EHEC, peuvent perturber l'activité des pompes Cl^-/OH^- et Na^+/H^+ , délocaliser des aquaporines et inhiber le co-transporteur sodium-D-glucose 1 (SGLT1). **Map** est également impliqué dans la formation d'élancements membranaires nommés filopodes (structures qui serviraient de senseurs mais dont le rôle n'est pas encore clairement défini) et perturbe avec **EspF** l'activité mitochondriale. **EspF** est également impliqué avec **NleA** (Non-LEE-encoded effector A) dans la perturbation des jonctions serrées (TJ, Tight Junctions). La cyclomoduline **Cif** (Cycle inhibiting factor) induit un arrêt du cycle cellulaire. De plus, les EHEC produisent des **Shiga-like toxines** (Stx ou vérotoxines) qui interagissent avec le récepteur Gb3 (Glycolipid globotriaosylceramide 3) des cellules endothéliales et des cellules de Paneth.

CDC42 : Cell Division Control Protein 42 ; Cx43 : Connexin 43 ; NHE3 : Na^+/H^+ Exchanger 3 ; SERT : SERotonin Transporter.

(Modifiée d'après Croxen and Finlay, 2010)

Les *E. coli* pathogènes intestinaux

Les *E. coli* entéropathogènes et entérohémorragiques (EPEC et EHEC)

Les **EPEC** sont la cause majeure de diarrhées entraînant la mort chez le nourrisson dans les pays en voie de développement et les **EHEC** sont responsables de symptômes pouvant aller de la diarrhée simple à une diarrhée sanglante et abondante. Dans les formes les plus graves, les infections par des EHEC peuvent conduire un syndrome hémolytique et urémique (SHU) qui se manifeste entre autres par une anémie hémolytique, une thrombopénie et une insuffisance rénale aiguë. Dans un premier temps, les bactéries adhèrent aux entérocytes en utilisant des adhésines fimbriales nommées bundle-forming pili (BFP) ou pili de type IV pour les **EPEC** et de type ECP (*E. coli* Common Pilus) et HCP (Hemorrhagic *Coli* Pilus) pour les **EHEC** (Erdem *et al.*, 2007; Rendón *et al.*, 2007). Cependant, d'autres adhésines cette fois-ci afimbriales ont été décrites comme intervenant dans l'adhésion des **EHEC** aux cellules épithéliales intestinales tels que le facteur d'adhésion des EHEC (Efa-1, EHEC factor for adherence), la protéine de membrane externe A (OmpA, Outer membrane porin A) (Nicholls *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2006). Les flagelles peuvent également participer à cette interaction. Bien qu'ils ne soient pas codés par toutes les souches d'EHEC, les Long Polar Fimbriae (LPF) pourraient également jouer un rôle dans cette adhésion initiale aux cellules hôtes. Un important locus impliqué dans la virulence des EHEC et EPEC est le locus LEE (Locus of Enterocyte Effacement) (Schmidt, 2010). Ce dernier, appartenant au chromosome bactérien, code des effecteurs bactériens de virulence et des protéines impliquées dans la formation d'une seringue moléculaire (SST3, Système de Sécrétion de Type III). Le SST3 est impliqué dans l'injection à l'intérieur des cellules eucaryotes de protéines effectrices bactériennes dont la protéine Tir (Translocated intimin receptor) qui va s'insérer dans la membrane des cellules épithéliales intestinale et servir de récepteurs spécifique à une protéine de surface bactérienne (intimine) également codée par un gène du locus. Des protéines bactériennes également injectées dans le cytoplasme des cellules hôtes vont par phosphorylation et l'activation de différentes cascades intracellulaires interagir avec le cytosquelette d'actine (ex : Map (Mitochondrial-associated protein), EspB, EspF), conduisant à l'effacement des microvillosités des entérocytes (lésions d'Attachement et d'Effacement (A/E)) et la formation de structures en piédestal (**Figure 30**). Bien que les effecteurs bactériens codés par le locus LEE des EHEC et des EPEC soient hautement

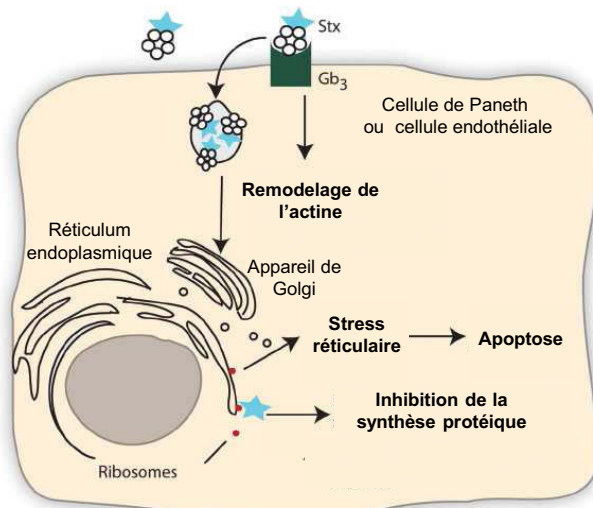


Figure 31 : Mécanisme d'action de la Shiga-toxine.

La Shiga-toxine (Stx) est une toxine de type A₁B₅ composée d'un pentamère de sous-unités B lié de manière non covalente à la sous-unité catalytique A. Le pentamère de sous-unités B interagit avec le récepteur Gb₃ (Glycolipid globotriaosylceramide 3) exprimé à la surface des cellules endothéliales et des cellules de Paneth. La toxine est alors internalisée par endocytose et transite jusqu'à l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique par voie rétrograde. Elle induit alors un stress réticulaire en clivant l'ARN ribosomal 26S induisant une inhibition de la synthèse protéique pouvant conduire à l'apoptose.

(Modifiée d'après Clements et al., 2012)

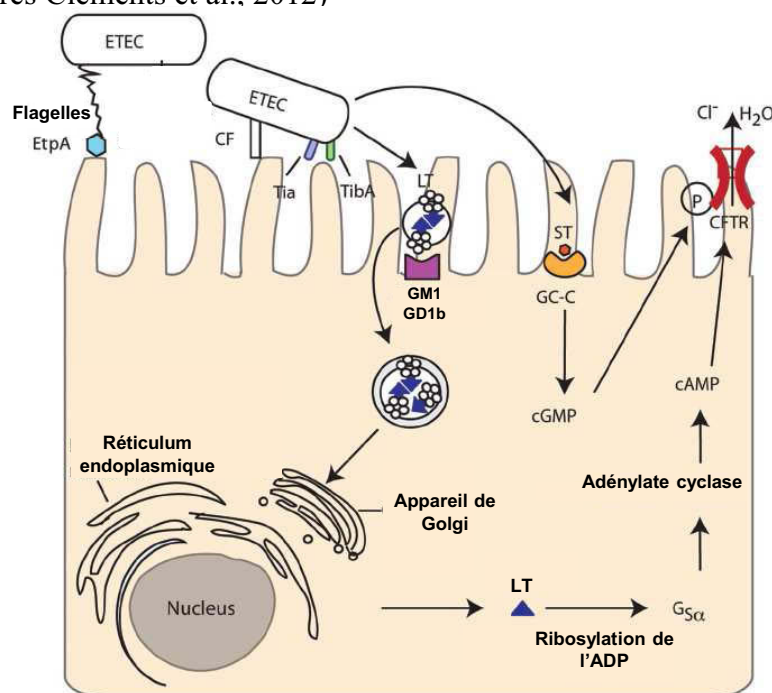


Figure 32 : Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* entérotoxigènes (ETEC).

L'adhésion des EPEC aux entérocytes fait intervenir les facteurs de colonisation (CF) et une adhésine localisée à l'extrémité du flagelle appelée **EtpA** (ETEC autotransporter A). Ensuite, une adhésion plus étroite implique les protéines **Tia** et **TibA**. Deux toxines, une thermolabile (**LT**, thermoLabile Toxin) et l'autre thermostable (**ST**, thermoStable Toxin) se fixant respectivement sur le ganglioside (GM-1) et le récepteur de la guanylate cyclase-C (GC-C), sont sécrétées et entraînent des diarrhées du fait de l'activation du transporteur CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator).

(Modifiée d'après Clements et al., 2012)

conservés, leur répertoire de protéines effectrices non codées par ce locus est différent (Wong *et al.*, 2011).

Les **EPEC** induisent un remodelage de l'actine et la formation de filopodes qui entourent les colonies de bactéries adhérentes *via* la protéine Map, l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose *via* l'effecteur EspF, l'arrêt du cycle cellulaire *via* Cif (Cycle inhibiting factor), ou encore la déstabilisation des jonctions inter-cellulaires en exprimant la protéine NleA (Alto *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2007; Nougayrède and Donnenberg, 2004; Quidard *et al.*, 2006) (**Figure 30**).

Les facteurs de virulence principaux des **EHEC** sont les Shiga-like toxines (Stx ou vérotoxines) Stx1 et Stx2 codés par des gènes portés par un bactériophage. Elles présentent une similarité de séquence en acides aminés avec la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1 (99% pour Stx1 et 56 % pour Stx2) (Strockbine *et al.*, 1986). Ce sont des toxines de type A₁B₅ composées d'un pentamère de sous-unité B lié de manière non covalente à la sous-unité catalytique A (Fraser *et al.*, 2004). Après fixation du pentamère de sous-unités B sur le récepteur Gb3 (Glycolipid globotriaosylceramide 3) présent à la surface des cellules endothéliales (reins, cerveau, intestins) et des cellules de Paneth, les toxines Stx sont internalisées dans une vacuole d'endocytose, puis transportées de manière rétrograde de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique (Römer *et al.*, 2007) (**Figure 31**). Au niveau du réticulum endoplasmique, la sous-unité A des toxines Stx est activée par clivage et induit une inhibition de la synthèse protéique et la mort de la cellule par apoptose (Kurmanova *et al.*, 2007).

Les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC)

Les **ETEC** sont responsables de diarrhées du voyageur et de diarrhées infantiles aqueuses pouvant être fatales. Les ETEC adhèrent aux cellules épithéliales intestinales grâce aux facteurs CFs (Colonization Factors) dont les plus communs sont CFA/I, CFA/II et CFA/IV, à l'adhésine sécrétée EtpA qui se lie de façon transitoire à l'extrémité des flagelles (Roy *et al.*, 2009) et aux protéines de membrane externe Tia et TibA (**Figure 32**). De plus, les ETEC sécrètent deux entérotoxines : les entérotoxines thermolabiles (LT, thermoLabile Toxin) et thermostables (ST, thermoStable toxin). La toxine LT est très similaire en termes de

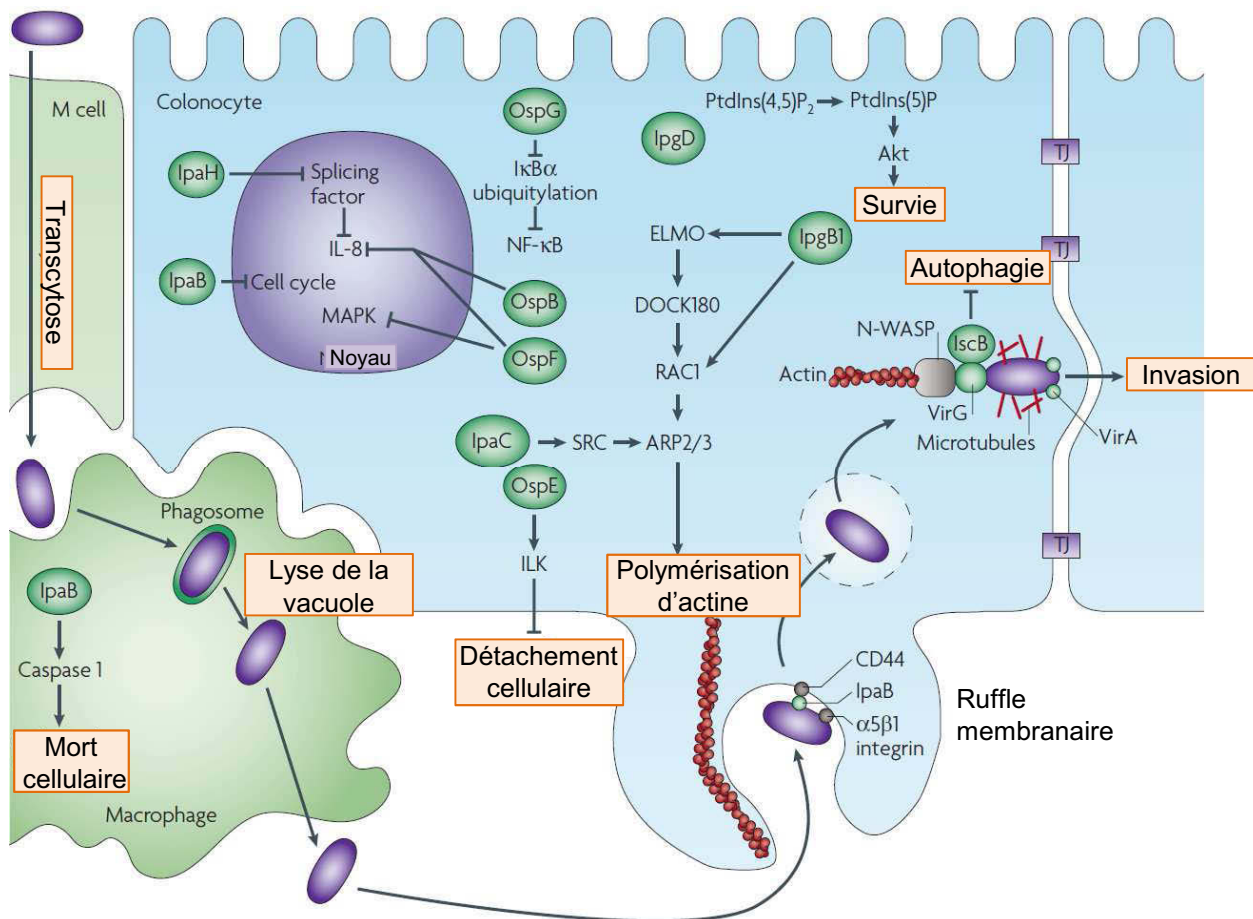


Figure 33 : Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* entéroinvasifs (EIEC).

Les EIEC accèdent à la sous-muqueuse en transitant par les cellules Microfold (M) et une fois internalisés dans les macrophages sous-jacents, les EIEC sont capables de lyser leur vacuole de phagocytose, de se multiplier dans le cytoplasme de la cellule hôte et induisent ensuite leur mort cellulaire à l'aide d'effecteurs bactériens sécrétés par le système de sécrétion de type III (SST3) tel qu'**IpaB**. Ceci leur permet d'aller ensuite envahir les cellules épithéliales par le pôle basolatéral. Au contact des cellules épithéliales intestinales, les bactéries sont capables de promouvoir leur endocytose en injectant dans le cytoplasme de la cellule hôte *via* leur SST3 des effecteurs bactériens tels qu'**IpaC** et **IpgB1**, qui sont impliqués dans la polymérisation d'actine et la formation de « ruffles » nécessaires à l'entrée des bactéries dans les cellules hôtes. Après lyse de leur vacuole, les EIEC sont capables de disséminer de cellule à cellule en induisant le recrutement de la machinerie nécessaire à une polymérisation d'actine à un des pôles de la bactérie, ceci mettant en jeu l'effecteur bactérien **VirG**. Ceci permet la formation d'une comète d'actine, qui en association avec une déstabilisation des microtubules (implication de l'effecteur bactérien **VirA**) permet de propulser les bactéries dans les cellules adjacentes. Afin de prévenir le renouvellement et donc le détachement des cellules épithéliales intestinales, les EIEC sécrètent **IpaB**, qui induit un arrêt du cycle cellulaire, **OspE** qui interagit avec ILK (Integrin-Linked Kinase) et **IpgD** qui prévient l'apoptose pour empêcher l'exfoliation cellulaire. Les effecteurs **OspG**, **OspB**, **OspF** et **IpaH** agissent de concert pour moduler notamment les voies de signalisation NF-κB (Nuclear Factor-κB) et MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) diminuant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires permettant d'échapper au système immunitaire. La survie intracellulaire des EIEC est assurée notamment par **IscB** qui permet d'échapper à une prise en charge des bactéries par l'autophagie, un mécanisme de dégradation intracellulaire. DOCK180 : dedicator of cytokinesis protein 1 ; ELMO: engulfment and cell motility; IκBα: Inhibitor of NF-κB subunit-α; IL-8: interleukin-8 ; N-WASP: Neural Wiskott–Aldrich Syndrome Protein; PtdIns(5)P: Phosphatidylinositol-5-phosphate; PtdIns(4,5)P₂: phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate ; TJ :Tigh Junctions.

(Modifiée d'après Croxen and Finlay et al. 2010)

fonction et de structure à la toxine cholérique (Qadri *et al.*, 2005). Il existe différents variants : LT-I associée à des maladies humaines et LT-II à des maladies animales. La toxine LT, composée d'une sous-unité A toxique et de cinq sous unités B (A_1B_5), permet l'adhésion des bactéries aux entérocytes *via* les gangliosides de surface GM1 et GD1b (Johnson *et al.*, 2009). La sous unité A active l'adénylate cyclase et induit l'augmentation de la sécrétion d'ions chlorure (Nataro and Kaper, 1998). La toxine ST correspond à un peptide de petite taille, dont la forme active n'excède par 18-19 acides aminés, avec deux variants : STa (humaine) et STb (animale). La liaison de STa sur un récepteur à activité guanylate cyclase stimule l'activité de ce dernier et augmente ainsi la sécrétion d'électrolytes au niveau intestinal (Turner *et al.*, 2006). D'autres facteurs de virulence ont été décrits pour les ETEC, tels que la cytotoxine formant des pores membranaires (ClyA, pore-forming cytotoxin A), l'autotransporteur sérine protéase EatA (ETEC autotransporteur A) et le facteur EAST1 (EnteroAggregative thermoStable enteroToxin 1) qui présente des similitudes avec la toxine STa (Croxen and Finlay, 2010).

Les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC)

Les EIEC ne sont différenciables des souches de *Shigella* que par des caractéristiques biochimiques car la physiopathologie associée aux infections à EIEC est très similaire. Ces souches sont responsables de syndromes dysentériques (forte fièvre, crampes abdominales, nausées et diarrhée aqueuse) qui évoluent rapidement en une dysentérie (selles contenant du sang et du mucus). La virulence de ces bactéries repose essentiellement sur la présence d'un SST3, codé par le plasmide pINV, qui permet l'injection dans les cellules hôtes de nombreux effecteurs bactériens (**Figure 33**) (Croxen and Finlay, 2010). La porte d'entrée des EIEC au niveau de la muqueuse intestinale se situe au niveau des plaques de Peyer puisque ces bactéries ciblent les cellules M. Les EIEC sont capables d'échapper à la bactéricidie des macrophages sous-jacents en échappant de leur vacuole de phagocytose et en induisant la mort des cellules infectées, ceci implique entre autre l'effecteur bactérien IpaB. En sécrétant les effecteurs bactériens IpaC et IpgB1, les bactéries envahissent les cellules épithéliales intestinales par le pôle basolatéral en induisant la formation de « ruffles » membranaires, des élongations membranaires qui permettent l'englobement des bactéries en vue de leur internalisation (Mounier *et al.*, 2009). A l'intérieur des cellules, les EIEC lysent la membrane de leur endosome et sont capables de se mouvoir dans le cytoplasme des cellules hôtes et de

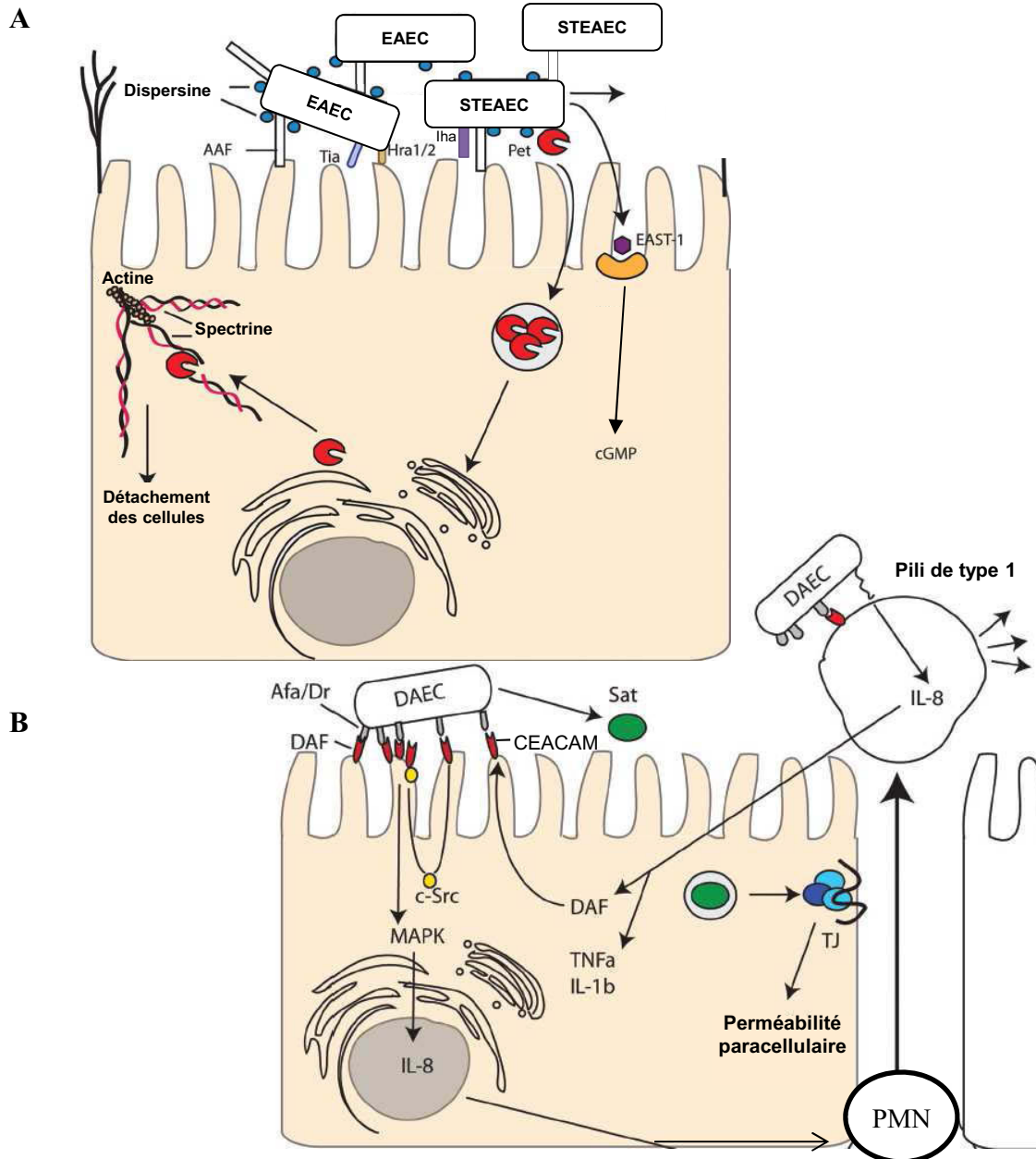


Figure 34 : Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* entéroaggrégatifs producteurs ou non de Shiga-toxine (EAEC et STEAEC) et à adhésion diffuse (DAEC).

A. Les EAEC et les STEAEC s'agrègent et adhèrent aux entérocytes *via* les pili AAF (Aggregative Adherence Fimbriae), la dispersine, **Tia** (EAEC) et **Iha** (STEAEC). Les bactéries hébergent un plasmide qui code la toxine **Pet**, un autotransporteur sérine protéase, ciblant et clivant la spectrine, ce qui induit une perturbation du cytosquelette d'actine conduisant au détachement des cellules. L'effecteur bactérien **EAST-1** est à l'origine de l'augmentation du GMP cyclique intracellulaire, cependant sa fonction n'est pas encore clairement définie. **B.** Les DAEC adhèrent de façon diffuse aux entérocytes *via* les adhésines de type **Afa/Dr**. Une majorité des adhésines Afa/Dr se lie au récepteur DAF (Decay-Accelerating Factor) et une minorité aux récepteurs de type CEACAM (CarcinoEmbryonicAntigen Cell Adhesion Molecule). La toxine **Sat** (Secreted autotransporter toxin) est impliquée dans la déstabilisation des jonctions serrées (TJ, Tight Junction) augmentant ainsi la perméabilité de la barrière intestinale. L'infiltration de PMN (PolyMorphoNuclear leukocyte) augmente la localisation des DAF à la surface cellulaire. (Modifiée d'après Clements et al., 2012)

disséminer aux cellules adjacentes en recrutant la machinerie nécessaire à la polymérisation d'actine et en destabilisant le réseau de microtubules (Schroeder and Hilbi, 2008). Parmi les effecteurs mis en jeu, VirG recrute et active N-WASP (Neural Wiskott–Aldrich Syndrome Protein) et le complexe ARP2/3 impliqué dans la polymérisation d'actine et VirA stimule la déstabilisation des microtubules (Egile *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2006). Pour assurer leur survie intracellulaire et leur dissémination, les EIEC favorisent la survie des cellules épithéliales intestinales, inhibent leur renouvellement cellulaire et échappent à la reconnaissance par la machinerie de l'autophagie, qui est processus notamment impliqué dans l'élimination des bactéries intracellulaires (Ogawa *et al.*, 2005).

Les *E. coli* entéoaagrégatifs producteurs ou non de Shiga-toxines (EAEC et STEAEC)

Les EAEC sont responsables de diarrhées persistantes dans les pays industrialisés ou en voie de développement et de certaines diarrhées du voyageur. Ces souches sont définies comme ne sécrétant pas les entérotoxines LT ou ST et adhérant aux cellules intestinales en formant des structures « en amas de briques », on parle alors d'adhésion agrégative. L'adhésion bactérie-cellule et bactérie-bactérie est due à des fimbriae appelés AAF (Aggregative Adherence Fimbriae) responsables de la formation d'un biofilm et codés par un plasmide de 100 kb nommé pAA (Croxen and Finlay, 2010). Cependant, les souches EAEC ne présentent pas toutes ce type de fimbriae et ce sont alors d'autres structures qui favorisent leur adhésion telles que la dispersine et la flagelline. Il faut noter que certaines souches d'EAEC produisent des entérotoxines (EAST1, EAEC heat-Stable enteroToxin 1) et/ou des cytotoxines (Pet, plasmide-encoded toxin) ainsi que d'autres facteurs de virulence dont la fonction reste inconnue (Kaper *et al.*, 2004) (**Figure 34 A**).

Des souches productrices de Shiga-toxines présentant des facteurs de virulence communs au pathovar EAEC et présents chez les exPEC ont été identifiées comme responsables de l'épidémie foudroyante survenue en Allemagne en 2011 (Mora *et al.*, 2011). Les analyses du génome des ces souches bactériennes suggèrent un transfert horizontal de gènes ayant favorisé l'émergence d'un nouveau pathovar d'*E. coli* hautement pathogène : les *E. coli* entéroaggrégatifs producteurs de Shiga-toxines (STEAEC, Shiga-Toxin producing EnteroAggregative *E. coli*).

Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC)

Les **DAEC** sont associés à des diarrhées aiguës et persistantes chez les enfants et à des infections du tractus urinaire (UTI). Ce groupe est très hétérogène et comprend des souches des quatre groupes phylogénétiques majeurs : A, B1, B2 et D (Escobar-Páramo *et al.*, 2004). Les DAEC adhèrent aux cellules épithéliales HEp-2 et HeLa de façon uniforme (adhésion diffuse). Cette capacité est due à l'expression d'adhésines codées par les opérons *afa/dra/daa*. Ces adhésines peuvent être fimbriales (Dr et F1845) ou afimbriales (Afa) et sont toutes de la famille Afa/Dr (Pour revue (Servin, 2005)) (**Figure 34 B**). Une petite partie des DAEC exprime le facteur de colonisation CS20 présent chez les EPEC (Ochoa *et al.*, 2010). Toutes les adhésines Afa/Dr interagissent avec les cellules épithéliales intestinales ou urinaires *via* le récepteur DAF (decay-accelerating factor) qui s'accumule sous les bactéries adhérentes. De plus, il y a une modulation de la voie de signalisation dépendante du Ca^{2+} qui induit l'élongation ainsi que l'altération des microvillosités de la bordure en brosse. Il faut noter que les DAEC possédant ou non des adhésines Afa/Dr stimulent la production d'IL-8 de façon dépendante de la présence des flagelles (Arikawa *et al.*, 2005; Meraz *et al.*, 2006). Cette augmentation d'IL-8 entraîne la transmigration des leucocytes polynucléaires (PMN, PolyMorphoNuclear leucocytes) qui permet une surexpression des récepteurs DAF, améliorant ainsi l'adhérence bactérienne (Bétis *et al.*, 2003). Une sous-classe d'adhésine Afa/Dr interagit avec les récepteurs de type CEACAM (CarcinoEmbryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule) qui s'accumulent alors sous les bactéries adhérentes, induisant l'effacement des microvillosités. Une telle déstabilisation de la barrière en brosse peut accroître le phénomène de diarrhées chez les patients. Le pouvoir pathogène des DAEC ne peut pas être exclusivement expliqué par le rôle des adhésines Afa/Dr. D'autres facteurs de virulence ont été recherchés, et outre les flagelles, l'autotransporteur Sat a été identifié. En effet, cette toxine peut détruire les jonctions serrées et augmenter la perméabilité au niveau épithélial (Le Bouguénec and Servin, 2006; Guignot *et al.*, 2007).

Les *E. coli* adhérents et invasifs (AIEC)

Les **AIEC** sont associés à la forme iléale de la maladie de Crohn (MC) (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). Ils sont caractérisés phénotypiquement par (i) la capacité à adhérer et envahir les cellules épithéliales intestinales selon un processus dépendant du recrutement des

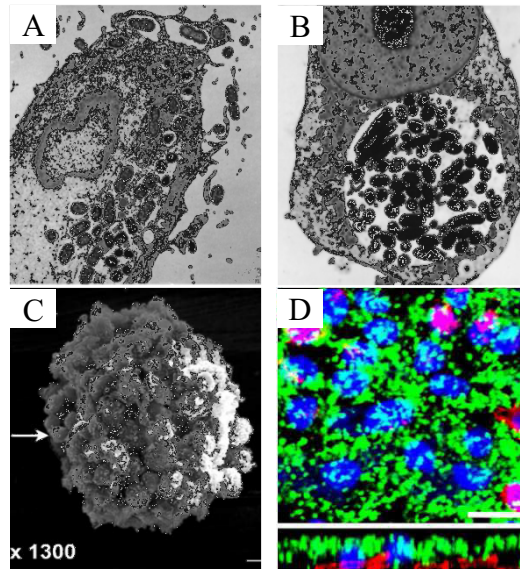


Figure 35 : Caractéristiques phénotypiques des *E. coli* adhérents et invasifs associés à la maladie de Crohn.

A. Cliché de microscopie électronique à transmission (MET) de cellules épithéliales HEp-2 infectées par la souche de AIEC LF82 ($\times 6\,200$). Les bactéries sont capables d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales. **B.** Cliché de MET de macrophages murins J774-A1, 24 h après infection par la souche AIEC LF82 ($\times 7\,200$). La souche AIEC LF82 survie et se multiplie en macrophages murins dans une large vacuole. **C.** Cliché de microscopie électronique à balayage d'une structure granulomateuse induite *in vitro* par la souche AIEC LF82. Les agrégats contiennent à la fois des lymphocytes (indiqués par la flèche) et des macrophages ($\times 1\,300$). **D.** Formation d'un biofilm par la souche AIEC LF82 sur des cellules intestinales I-407 fixées à la paraformaldéhyde. Les bactéries AIEC LF82 expriment la GFP et apparaissent en vert, l'actine est colorée en rouge et les noyaux des cellules en bleu ($\times 630$).

(D'après Boudeau *et al.*, 1999 ; Glasser *et al.*, 2001 ; Meconi *et al.*, 2007 ; Chassaing *et al.*, 2012)

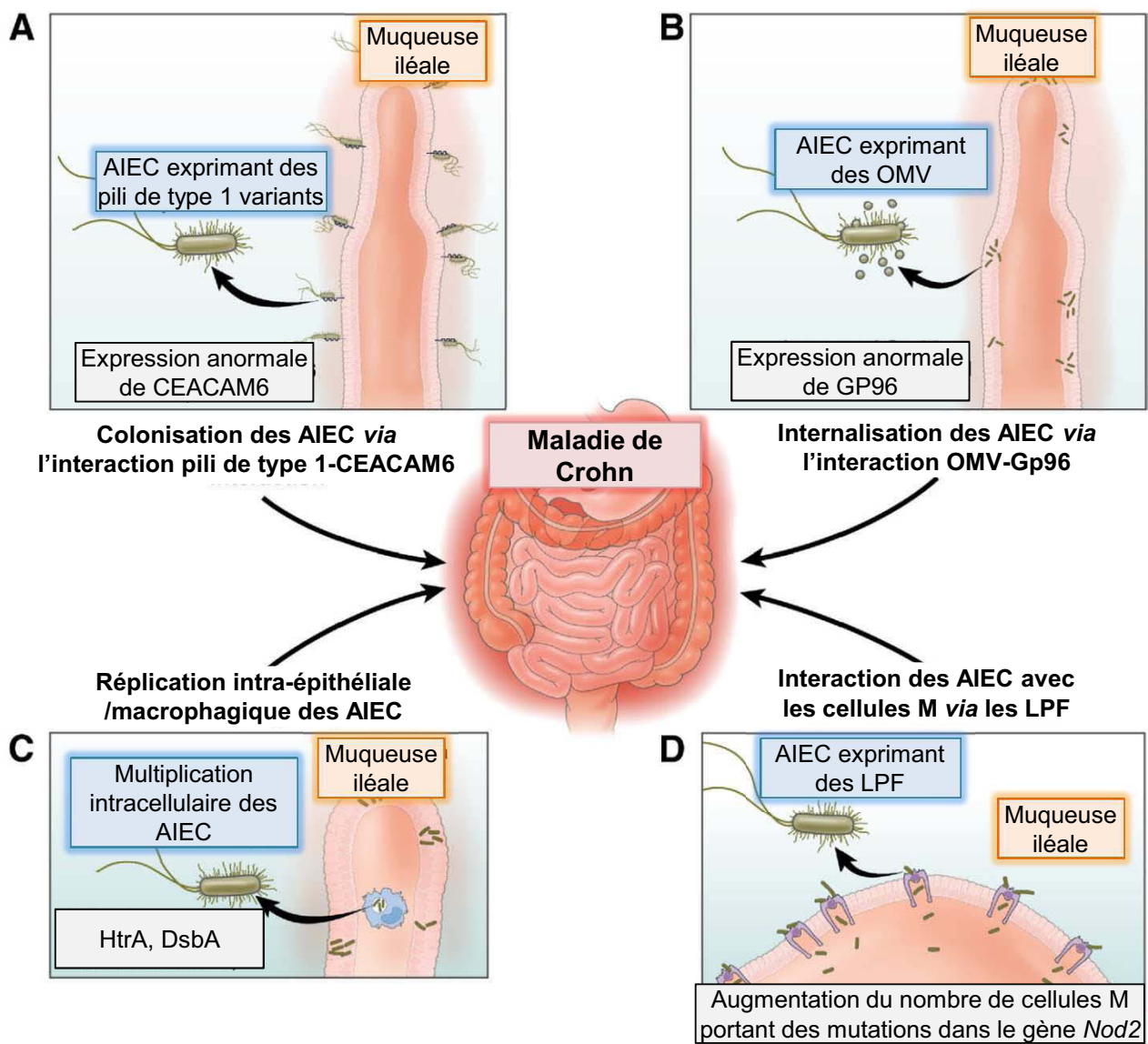


Figure 36 : Facteurs de virulence identifiés chez les bactéries AIEC associées à la maladie de Crohn permettant leur adhésion à l'épithélium iléal.

A. Les AIEC colonisent l'épithélium iléal en utilisant les **pili de type 1 variants** exprimés à leur surface. Les pili de type 1 se lient au récepteur mannosylé CEACAM6 anormalement exprimé chez les patients atteints de maladie de Crohn. **B.** La protéine du stress du réticulum endoplasmique Gp96 est anormalement exprimée à la surface de l'épithélium intestinal. Gp96 sert de récepteur aux vésicules de membranes externes (**OMV**) sécrétées par les AIEC, permettant leur internalisation dans la cellule hôte. **C.** Les AIEC se multiplient dans les cellules épithéliales et dans les macrophages (implication de la protéine de réponse au stress **HtrA** et de l'oxydoréductase **DsbA**). **D.** Les bactéries AIEC interagissent avec les cellules M *via* l'expression des Long Polar Fimbriae (**LPF**), leur permettant de transloquer à travers l'épithélium au niveau des plaques de Peyer. (Modifiée d'après Chassaing and Dareuille-Michaud., 2011)

microtubules et des microfilaments, (ii) la capacité à survivre et se multiplier fortement au sein de larges vacuoles dans les macrophages et (iii) la capacité à induire la libération de taux élevés de TNF- α par les macrophages infectés (Boudeau *et al.*, 1999; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Glasser *et al.*, 2001) (**Figure 35**). De plus, les souches AIEC ont pour caractéristiques communes de former des biofilms, de pouvoir déstabiliser l'épithélium intestinal et d'induire la formation de granulomes (tumeur bénigne de nature inflammatoire) *in vitro* (Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2013; Martinez-Medina *et al.*, 2009; Meconi *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2007).

Les AIEC possèdent des caractéristiques génétiques proches de celles des *E. coli* extra-intestinaux (Miquel *et al.*, 2010). Aucun facteur de virulence particulier des AIEC n'a pu être identifié. Cependant, il a été mis en évidence que les souches AIEC expriment des variants de l'adhésine FimH des pili de type 1, leur conférant un haut pouvoir de liaison au récepteur CEACAM6 anormalement exprimé au niveau de l'épithélium iléal des patients atteints de MC (Barnich *et al.*, 2007; Dreux *et al.*, 2013) (**Figure 36**). L'adhésion et l'invasion des AIEC fait également intervenir les pili de type 1, flagelles et les vésicules de membranes externes (Barnich *et al.*, 2003; Boudeau *et al.*, 2001; Rolhion *et al.*, 2005). Par ailleurs, il a été mis en évidence que 49,6% des souches AIEC hébergent l'opéron codant les LPF (Chassaing *et al.*, 2011). Les bactéries AIEC qui expriment les LPF sont capables d'interagir avec les plaques de Peyer et de transloquer à travers les cellules M. L'implication de deux gènes bactériens (*htrA* et *dsbA*) dans l'adaptation des AIEC vis-à-vis des stress rencontrés dans le phagosome des macrophages a également été démontrée (Bringer *et al.*, 2005, 2007). L'expression de ces gènes est fortement augmentée lorsque les bactéries sont dans les macrophages. HtrA est impliquée dans la capacité des AIEC à résister au stress oxydant. L'oxydoréductase DsbA est nécessaire aux AIEC pour résister au stress acide et à la carence en nutriments auxquels elles sont confrontées dans les phagolysosomes. La délétion des gènes *htrA* et *dsbA* a pour conséquence une incapacité des bactéries AIEC à se multiplier et à survivre, respectivement, dans les macrophages.

Les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC)

Les UPEC sont responsables de la majorité (90 %) des infections survenant au niveau du tractus urinaire (cystites, pyélonéphrites). Leur pouvoir pathogène est caractérisé par de

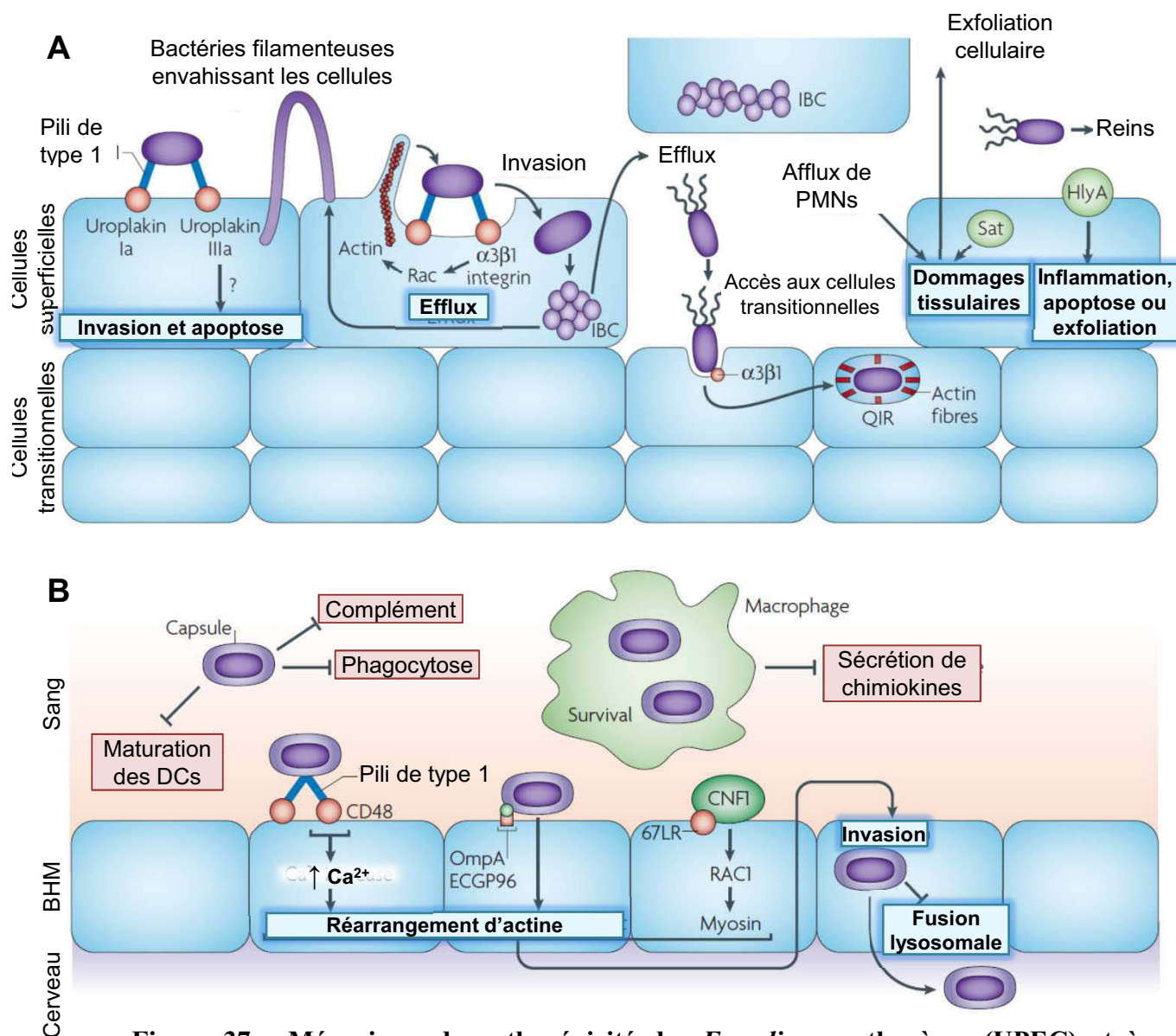


Figure 37 : Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* uropathogènes (UPEC) et à l'origine de méningites néonatales (NMEC).

A. Les UPEC adhèrent aux cellules uroépithéliales *via* les **pili de type 1** reconnaissant les uroplakines Ia et IIIa. Cette liaison active une voie de signalisation inconnue qui permet l'invasion et l'apoptose. La liaison des pili de type 1 aux intégrines $\alpha\beta 1$ permet l'invasion des cellules urothéliales et la formation de communautés bactériennes intracellulaires (IBC, Intracellular Bacterial Community). L'hémolysine A (**HlyA**) est une toxine qui peut inhiber l'activation de la protéine Akt et entraîne l'apoptose et l'exfoliation des cellules ouvrant une nouvelle porte d'entrée aux UPEC. L'effecteur bactérien **Sat** (Secreted autotransporter toxin) est impliqué dans l'induction de dommages tissulaires. **B.** Les NMEC sont protégés du système immunitaire de l'hôte par une capsule de type K1. Ces bactéries utilisent les macrophages comme niche de réplication et sont ensuite capables de traverser la barrière hémato-méningée (BHM) afin d'atteindre le système nerveux central. Les mécanismes d'adhésion et d'invasion des NMEC font intervenir les **pili de type 1** et la protéine **OmpA** (Outer membrane protein A) qui reconnaissent respectivement les récepteurs CD48 et Gp96. L'invasion met également en jeu **CNF1** (Cytotoxic Necrotizing Factor 1) qui se fixe à la molécule 67LR (67kDa Laminin Receptor). DCs : cellules dendritiques ; PMN: polymorphonuclear leukocyte. (Modifiée d'après Croxen and Finlay, 2010)

nombreux facteurs de virulence principalement codés par des gènes se trouvant dans des îlots de pathogénécité. Ces facteurs de virulence codent des systèmes de captation du fer, des adhésines (FimH), des antigènes de capsules et des toxines sécrétées (Sat, Secreted autotransporter toxin). La colonisation du tractus urinaire fait intervenir l'adhésion des bactéries aux cellules urothéliales grâce à l'interaction des pili de type 1 portant l'adhésine FimH avec différents récepteurs comme les uroplakines I et IIIa ou les intégrines $\alpha 3$ et $\beta 1$ (Thumbikat *et al.*, 2009; Wiles *et al.*, 2008a) (**Figure 37 A**). Cette interaction conduit à l'internalisation des bactéries dans les cellules hôtes où elles forment une communauté bactérienne intracellulaire (IBC, intracellular bacterial community). L'ascension des bactéries aux reins se fait grâce à une régulation fine entre l'expression des flagelles et des pili de type 1 (Lane *et al.*, 2007). La grande majorité des UPEC associés à des pyélonéphrites expriment des fimbriae de type P capables d'interagir avec des motifs glycolipidiques présents à la surface des cellules épithéliales rénales (Kaper *et al.*, 2004). Plusieurs génomes UPEC ont été séquencés et on y retrouve les gènes codant plus de dix types de fimbriae différents. Cette analyse a permis d'introduire la notion : « Home is where your pili stick » (Wiles *et al.*, 2008a). Les UPEC codent également une hémolysine A formant des pores (HlyA) et de CNF-1 (cytotoxic necrotizing factor) impliqués dans l'apoptose et l'exfoliation des cellules (Wiles *et al.*, 2008b).

Les NMEC sont responsables de 80 % des cas de méningites néonatales. Le processus infectieux se fait en plusieurs étapes qui vont de la colonisation et l'invasion des muqueuses jusqu'à la traversée de la barrière hémato-méningée (**Figure 37 B**). Les bactéries utilisent les pili de type 1 et les fimbriae S pour reconnaître le récepteur CD48 à la surface luminale de l'endothélium cérébral (Khan *et al.*, 2007). Par la suite, la protéine OmpA se lie à la glycoprotéine Gp96 pour induire l'internalisation des bactéries (Prasadara, 2002). L'invasion des bactéries fait intervenir la toxine CNF1 *via* la mise en place d'un réarrangement de la myosine (Essler *et al.*, 2003). La capsule K1, présente chez 80% des NMEC, joue également un rôle dans l'invasion des cellules en bloquant la fusion lysosomale et permettant ainsi le relargage de bactéries vivantes au travers la barrière hémato-méningée (Kim *et al.*, 2003). Il a été mis en évidence chez ces souches la présence d'un phage lambdaïde codant une acétyltransférase O qui acétyle l'antigène O permettant de conférer une grande diversité à la capsule, ce qui pourrait ainsi participer à sa dissimulation vis-à-vis du système immunitaire (Deszo *et al.*, 2005)

***E. coli* et carcinogenèse colorectale**

Plusieurs études indépendantes ont montré que les carcinomes et la muqueuse colique des patients atteints de CCR sont anormalement colonisés par un nombre élevé d'*E. coli* comparativement à des sujets contrôles (Arthur *et al.*, 2012; Buc *et al.*, 2013; Maddocks *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2004; Swidsinski *et al.*, 1998). Une augmentation du nombre d'*E. coli* associés et internalisés a été mise en évidence dans les tumeurs de patients atteints de CCR comparativement à la muqueuse non tumorale des mêmes patients et à la muqueuse de patients contrôles (Bonnet *et al.*, 2014). Par ailleurs, une augmentation de la colonisation des tumeurs par des *E. coli* en fonction de l'avancement du stade tumoral a été observée, suggérant le développement d'une niche écologique favorable aux *E. coli* chez les patients atteints à des stades plus tardifs.

Inflammation

Certains de ces *E. coli* pathogènes sont capables à travers leur interaction avec les cellules épithéliales intestinales et les macrophages d'induire une réponse inflammatoire aiguë. C'est le cas par exemple des EHEC dont l'interaction avec les cellules épithéliales intestinales et les macrophages conduit à l'activation de la voie de signalisation NF- κ B et celle des MAPK (ERK, JNK, p38) ainsi qu'à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-1 β , IL-8 et TNF- α (Berin *et al.*, 2002; Ledesma *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012).

Les AIEC associés à la maladie de Crohn sont quant à eux suspectés de jouer un rôle dans l'entretien de l'inflammation chronique observée chez ces patients. Les AIEC sont en effet capables d'induire une colite en modèle murin transgénique pour la molécule humaine CEACAM6, ainsi que d'aggraver une colite induite par du DSS (Carvalho *et al.*, 2008, 2009). Cet effet pro-inflammatoire est caractérisé par une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-17 et IL-1 β , une diminution des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et par une augmentation du score histologique et des dommages épithéliaux. Par ailleurs, le rôle pro-inflammatoire des AIEC est souligné par leur capacité à survivre et se répliquer au sein de macrophages, leur faisant sécréter de grandes quantités de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α (Glasser *et al.*, 2001).

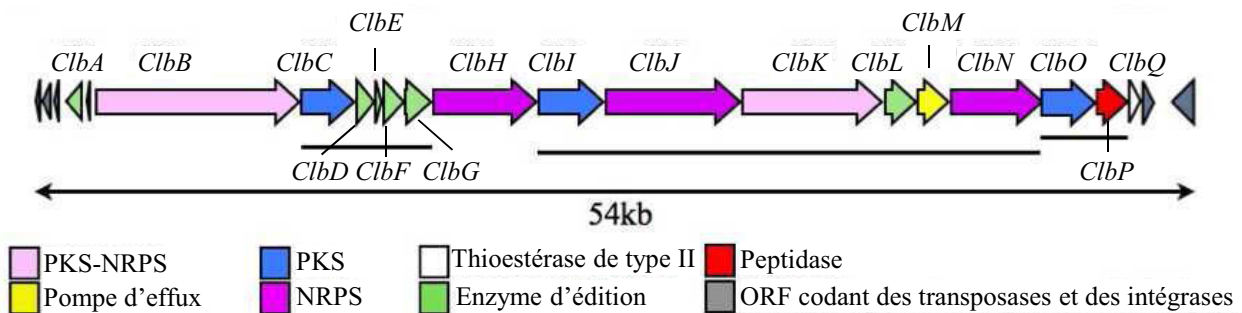


Figure 38 : Organisation de l'îlot génomique *pks*.

L'îlot génomique *pks* est composé de 19 gènes (*clbA* à *clbR*) répartis sur 54 Kb. Les traits noirs représentent les transcrits polycistroniques. La synthèse de la colibactine correspond à une chaîne d'assemblage faisant intervenir plusieurs enzymes telles que des NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthase), des PKS (PolyKetide Synthase), des hybrides PKS-NRPS (PolyKetide Synthase-Non Ribosomal Peptide Synthase..

(Modifiée d'après Nougayrède *et al.*, 2006)

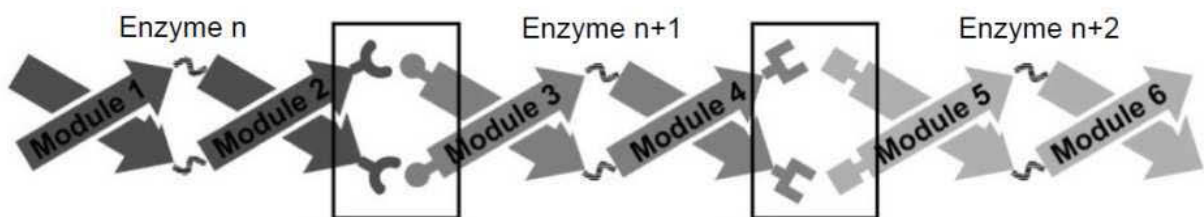


Figure 39 : Organisation des mégasynthèses d'une chaîne d'assemblage.

Les enzymes impliquées dans la synthèse des composés NRP (Non Ribosomal Peptide), PK (PolyKetide) ou PK-NRP (PolyKetide-Non Ribosomal Peptide) s'organisent en mégacomplexes grâce à des domaines d'interactions protéine-protéine, présents à l'extrémité de chaque enzyme, permettant d'associer l'enzyme *n* avec l'enzyme *n+1* et d'ordonner les enzymes en une chaîne d'assemblage. Le composé synthétisé est transféré d'un module enzymatique au suivant. En fin de chaîne d'assemblage, le composé est libéré à partir de l'enzyme terminale par une thioestérase, qui le plus souvent génère un composé linéaire ou cyclisé. Par ailleurs, les composés sont modifiés en cours ou en fin de synthèse par des enzymes d'édition. Ces dernières catalysent une grande diversité de réactions comme des méthylations, des réductions. Ainsi, la famille des composés NRP, PK ou PK-NRP contient une grande diversité de molécules portant des activités très différentes.

(Modifiée d'après Nougayrède *et al.*, 2006 ; <http://www.nii.res.in/nrps-pks.html>)

Potentiel génotoxique

Implication de la colibactine

Les données épidémiologiques obtenues au sein de notre unité et par le groupe du Professeur Christian Jobin au sein du département de Médecine, Pharmacologie et Immunologie-Microbiologie de l'Université de Caroline du Nord montrent que les *E. coli* producteurs d'une génotoxine, la colibactine, sont plus fréquemment trouvés dans les biopsies de tumeurs de patients atteints de CCR (50-65%) que dans les biopsies de patients atteints de la MC (40%) ou ne souffrant pas de maladie inflammatoire chronique de l'intestin ou de cancer (20,8%) (Arthur *et al.*, 2012; Buc *et al.*, 2013). Malgré de multiples essais, la colibactine n'a pas été isolée à ce jour et sa structure précise reste inconnue. La colibactine est un composé hybride PK (Polyketide)-NRP (Non Ribosomal Peptide) dont la synthèse est assurée par une chaîne d'assemblage enzymatique codée par un cluster de 19 gènes (*clbA* à *clbR*) de 54 kb nommé *pks* (Polyketide Synthase) (Nougayrède *et al.*, 2006) (**Figure 38 et 39**). Cet îlot génomique est inséré dans le gène codant un ARN de transfert de l'asparagine, un site courant d'intégration des îlots de pathogénicité. L'activité transcriptionnelle des gènes de l'îlot a révélé un découpage en sept ARN messagers polycistroniques de tailles variables (Homburg *et al.*, 2007). Un premier polycistron de 23,3 kb comporte les gènes de *clbI* à *clbN*. Le deuxième recouvre les gènes *clbC* à *clbG* et mesure 6,2 kb. Deux autres transcrits codent 2 protéines, un premier de 3,9 kb code *clbO* et *clbP*, le suivant de 0,9 kb code *clbR* et *clbA*. Les autres transcrits forment des monocistrons. La présence de l'îlot génomique *pks* est associée à celle de la cyclomoduline CNF et à d'autres îlots de pathogénicité tels que celui de la yersiniabactine et certains facteurs de virulence tels que les gènes codant les adhésines des fimbriae P (PapC) et des fimbriae de type 1 (FimH), et l'hémolysine HlyA (Dubois *et al.*, 2010; Nowrouzian and Oswald, 2012; Putze *et al.*, 2009).

L'infection de souris *III0^{-/-}* axéniques traitées à l'AOM/DSS et *APC^{Min/+}* par des *E. coli* producteurs de colibactine induit une accélération du développement tumoral avec une augmentation d'au moins 2 fois du nombre de tumeurs et du volume tumoral, comparativement aux animaux contrôles de même génotype non infectés et les animaux infectés avec un mutant de ces souches ne produisant pas de colibactine (Arthur *et al.*, 2012; Bonnet *et al.*, 2014). Ces résultats ont été confirmés, avec une augmentation du nombre de

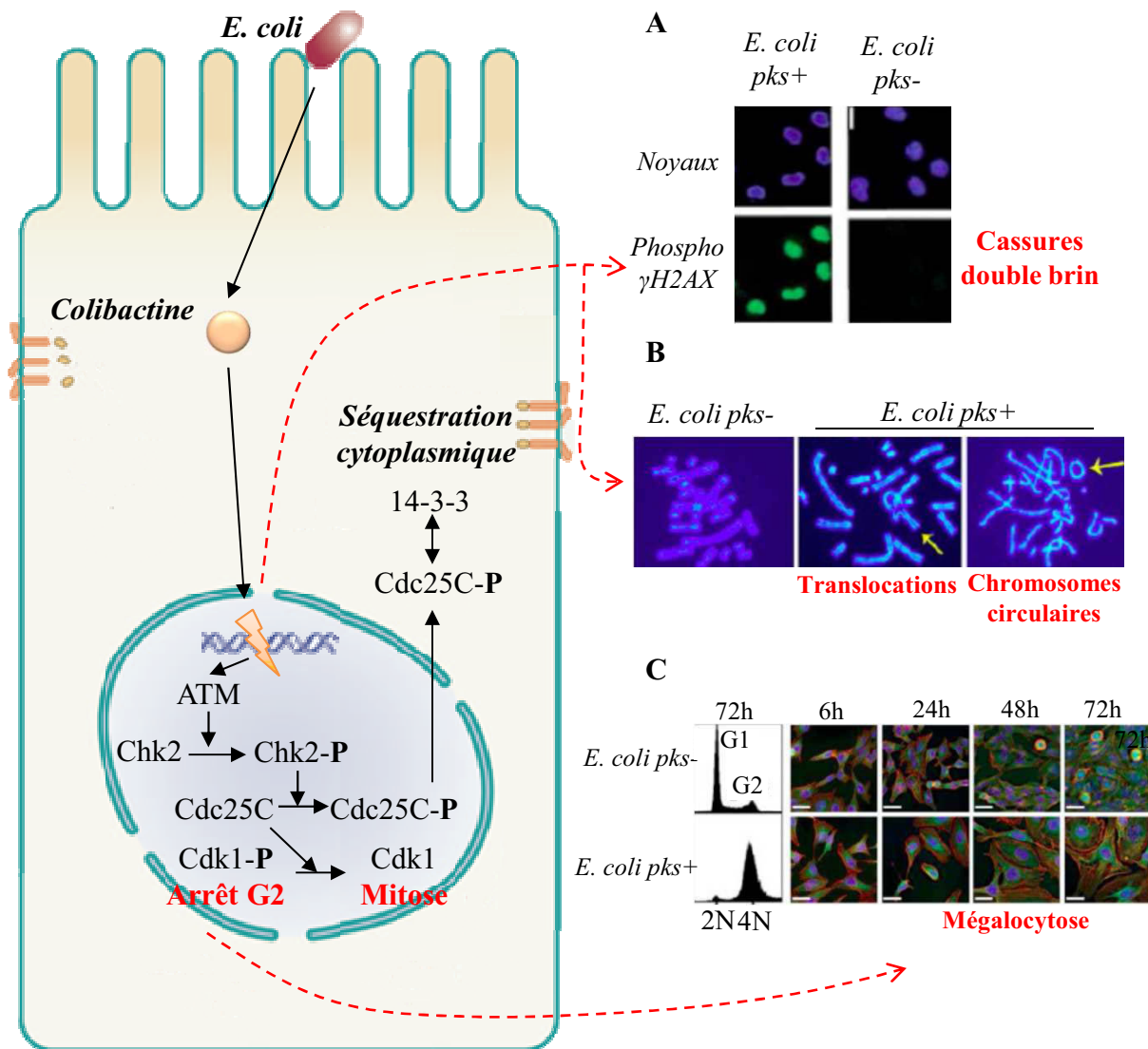


Figure 40 : Mécanisme d'action de la colibactine.

La colibactine est un composé hybride PK/NRP génotoxique. **A.** Elle induit des cassures double brin de l'ADN en cellules Hela infectées par des *E. coli* producteurs de colibactine, qui peuvent être visualisées par microscopie suite un immunomarquage de l'histone γ H2AX phosphorylée en position 139 (vert). Les noyaux des cellules sont marqués à l'Hoescht (bleu). **B.** Les dommages de l'ADN induits par la colibactine génèrent d'importants remaniements chromosomiques, dans les cellules CHO infectées avec des *E. coli* producteurs de colibactine, tels que des translocations et la formation de chromosomes circulaires visualisables après marquage des chromosomes au DAPI (bleu). **C.** Toutes ces lésions activent la cascade ATM/Chk2 (schématisée dans la partie gauche de cette figure) qui conduit à la phosphorylation de la protéine Cdc25c qui est alors séquestrée dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3. La protéine Cdc25c ne peut plus phosphoryler la protéine Cdk1, ce qui conduit à un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M pouvant aboutir à une mégakaryocytose (augmentation du volume cellulaire). L'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (cellules 4N) est visualisé par cytométrie en flux. La mégakaryocytose est observée en réponse à l'infection par des *E. coli* producteurs de colibactine, suite à un marquage des noyaux au DAPI (bleu), du cytosquelette d'actine (rouge) et d' α -tubuline (vert).

(Modifiée d'après Nougayrède *et al.*, 2005 ; Nougayrède *et al.* 2006 ; Cuevas-Ramos *et al.*, 2010)

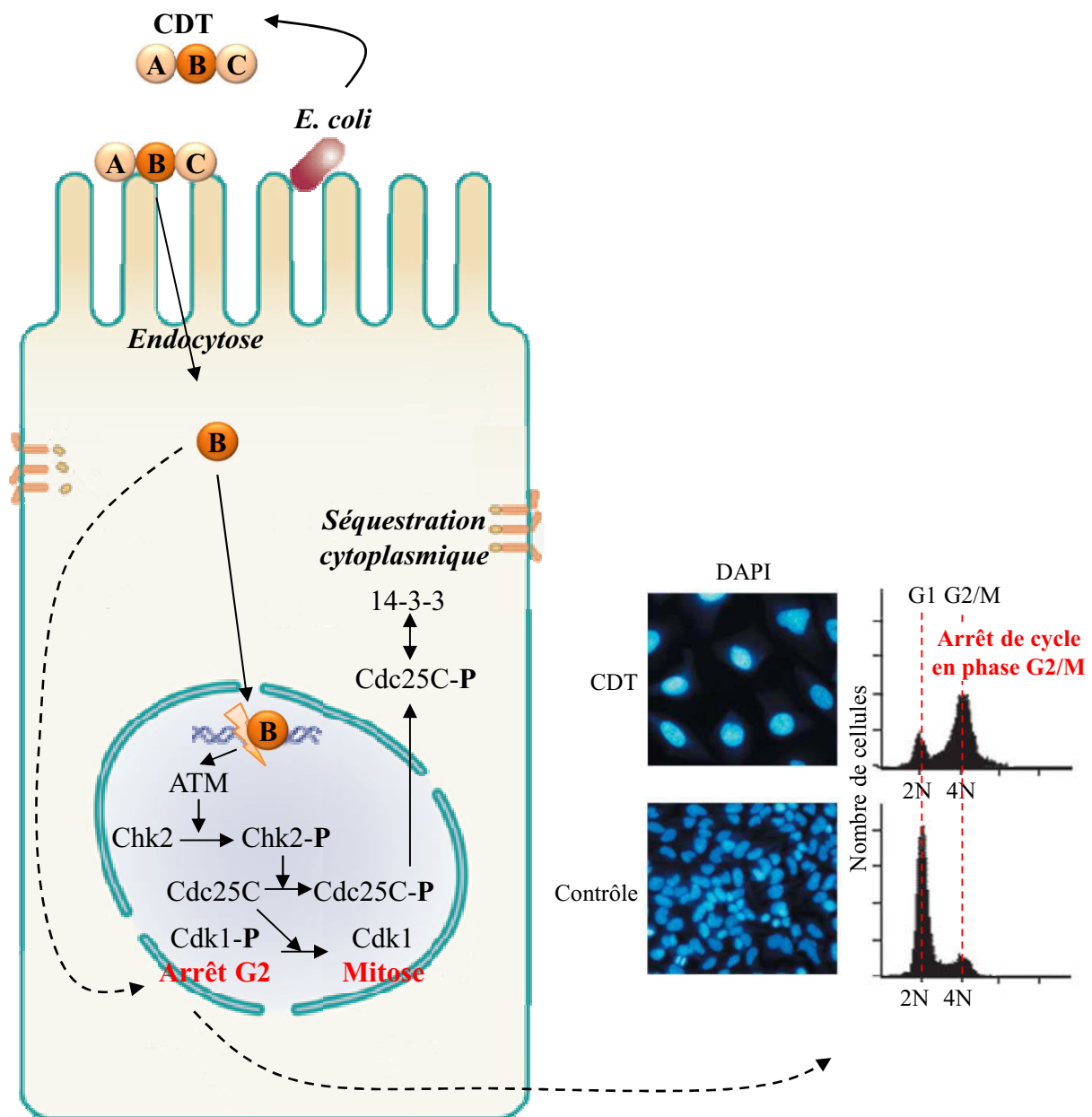


Figure 41 : Contrôle du cycle cellulaire par CDT.

La toxine CDT (Cytolethal Distending Toxin) est composée de 3 sous-unités (A, B et C). La sous-unité B est internalisée par endocytose et transite jusqu'au noyau où elle induit des cassures double brin de l'ADN. Ceci a pour conséquence d'activer une cascade de phosphorylations initiée par la protéine ATM et conduisant à la déphosphorylation de la protéine Cdc25C induisant sa séquestration cytoplasmique par la protéine chaperonne 14-3-3. Cdc25C ne peut alors plus déphosphoryler la protéine Cdk1, ce qui conduit à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (cellules 4N) pouvant aboutir à une mégaloctose. Le blocage du cycle cellulaire et le phénotype de mégaloctose sont visualisés respectivement par cytométrie en flux et une augmentation de la taille des noyaux par marquage au DAPI (bleu).

(Modifiée d'après Nougayrède *et al.*, 2005)

tumeurs et du volume tumoral, dans un modèle murin de carcinogenèse induite traité à l'AOM/DSS infecté avec une souche d'*E. coli* hébergeant un plasmide porteur de l'îlot génomique pks (Cougnoux *et al.*, 2014). La colibactine induit, *in vitro* et *in vivo*, des cassures double brin de l'ADN conduisant à un arrêt du cycle cellulaire, et éventuellement à la mort cellulaire par apoptose (Arthur *et al.*, 2012; Marcq *et al.*, 2014; Nougayrède *et al.*, 2006) (**Figure 40**). Cette activité génotoxique nécessite des bactéries vivantes et un contact entre les bactéries et les cellules. Les dommages de l'ADN causés par des infections à faibles doses avec des *E. coli* producteurs de colibactine ne sont souvent pas correctement réparés ce qui peut avoir pour conséquences l'accumulation d'aberrations chromosomiques et une augmentation de la fréquence des mutations génétiques (Cuevas-Ramos *et al.*, 2010). De plus, les cellules infectées par les *E. coli* producteurs de colibactine peuvent entrer en sénescence, ce qui s'accompagne notamment de la production d'espèces oxygénées réactives, connues pour leurs effets génotoxiques (Cougnoux *et al.*, 2014; Secher *et al.*, 2013).

Implication de CDT

Des *E. coli* producteurs de la toxine CDT (Cytolethal Distending Toxin) ont été isolés chez 12,5% de patients atteints de CCR et 0% de patients contrôles (Raisch *et al.* 2014). La toxine CDT, produite par de nombreuses bactéries pathogènes à Gram négatif, est une protéine hétérodimérique constituée de 3 sous-unités, A, B et C dont la masse moléculaire varie selon l'espèce bactérienne considérée (23-30 kDa, 28-29 kDa et 19-21 kDa respectivement) (Jinadasa *et al.*, 2011). Les sous-unités A et C, impliquées dans la liaison de la toxine à la membrane plasmique des cellules cibles, permettent de délivrer dans la cellule hôte la sous-unité B qui porte une activité enzymatique DNase (Haghjoo and Galán, 2004). La sous-unité CdtB est internalisée par endocytose, transportée par voie rétrograde vers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique puis transloquée dans le noyau, où elle induit des cassures double brin de l'ADN et *in fine* un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M (Comayras *et al.*, 1997; Fedor *et al.*, 2013; Frisan *et al.*, 2003) (**Figure 41**). Il a également été montré que l'exposition chronique des cellules épithéliales intestinales à la toxine CDT induit des aberrations chromosomiques et une augmentation de la fréquence des mutations, soulignant le potentiel génotoxique de cette cyclomoduline (Guidi *et al.*, 2013). D'autres génotoxines d'*E. coli* pourraient affecter le développement du CCR. Cependant, peu

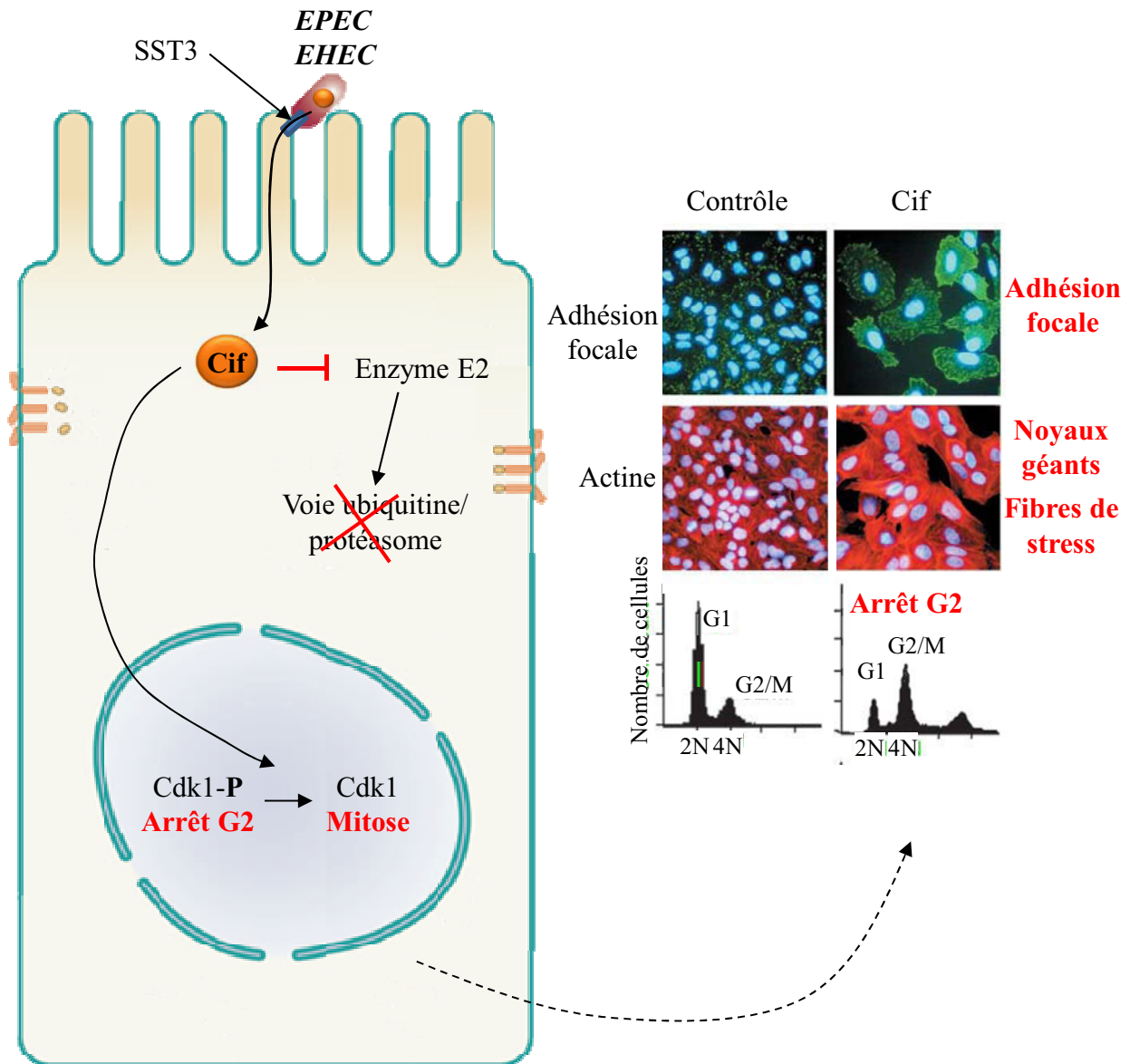


Figure 42 : Mécanisme d'action de Cif.

La cyclomoduline Cif (Cycle inhibiting factor) est produite par les *E. coli* appartenant aux pathovars entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC) qui possèdent le locus d'attachement et d'effacement des entérocytes (LEE) qui code notamment pour un système de sécrétion de type III (SST3). Après son injection dans la cellule hôte par l'intermédiaire du SST3, Cif bloque l'activation de la kinase Cdk1 conduisant à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M visualisable par cytométrie en flux. L'injection de Cif dans la cellule hôte entraîne également une inhibition de l'enzyme E2 du système d'ubiquitination qui conduit à une inhibition de la voie ubiquitine/protéasome. L'action de Cif, au niveau de cellules Hela infectées par des *E. coli* producteurs de cette toxine, conduit à l'apparition des effets cytopathiques tels que les fibres de stress d'actine (marquage à la rhodamine-phalloïdine en rouge) et de plaques d'adhésion focales (marquage de la taline en vert) ainsi que des noyaux géants (marquage au DAPI en bleu). (Modifiée d'après Nougayrède *et al.*, 2005)

d'études spécifiques ont été menées à ce jour quant au rôle de cette toxine dans le développement du CCR et sa prévalence semble faible dans le contexte du CCR.

Implication de Cif

La toxine inhibitrice du cycle cellulaire (Cif, Cycle inhibiting factor) est produite par différentes bactéries intestinales dont l'espèce *E. coli*, au sein de laquelle sa distribution est limitée aux pathovars EPEC et EHEC. Le gène codant la toxine Cif est porté par un prophage lambdoïde (Jubelin *et al.*, 2009). La toxine Cif est organisée en deux régions : la séquence N-terminale porte un peptide d'adressage au SST3 et le domaine C-terminal porte l'activité enzymatique de la toxine. Sa structure est apparentée à celle des peptidases à cystéine active, des acétyltransférases et des transglutaminases.

Après injection de Cif dans la cellule hôte *via* le SST3, elle inactive l'enzyme E2 du système d'ubiquitination, en désaminant la glutamine en position 40, ce qui entraîne une inhibition de la voie ubiquitine/protéasome (Pour revue (Nougayrède *et al.*, 2005). Cette activité suggère un effet pléiotropique qui peut affecter des protéines clés impliquées dans la carcinogenèse colorectale. Les conséquences cellulaires sont le blocage de l'apoptose et du cycle cellulaire (**Figure 42**). Les cellules peuvent cependant continuer à synthétiser de l'ADN et la teneur en ADN des cellules augmente par endoduplication pour atteindre 16n, ce qui pourrait engendrer des anomalies génétiques susceptibles de favoriser le développement tumoral.

Implication d'EspF

La présence d'*E. coli* induisant des lésions d'attachement et d'effacement (AEEC, Attaching and Effacing *E. coli*), dont les pathovars EHEC et EPEC, a été observée dans 25% des adénocarcinomes de patients atteints de CCR contre 0% au niveau de la muqueuse saine adjacente (Maddocks *et al.*, 2009). Le rôle des AAEC dans le développement du CCR est appuyé par les résultats montrant que *Citrobacter rodentium*, une bactérie induisant des lésions d'attachement et d'effacement chez les rongeurs, augmente le nombre d'adénomes coliques dans des modèles de susceptibilité au CCR (*APC*^{Min/+} et traité avec l'agent

carcinogène DMH) (Barthold and Jonas, 1977; Newman *et al.*, 2001). La capacité des souches d'*E. coli* appartenant au pathovar EPEC de diminuer l'expression des protéines de réparation des dommages de l'ADN MLH1 et MLH2 est en partie dépendante de l'expression de l'effecteur bactérien EspF, injecté dans la cellule hôte *via* le SST3, comme le montrent les résultats obtenus avec un *E. coli* invalidé pour le gène codant EspF. Ceci conduit à une augmentation de la fréquence de mutations aux sites d'instabilité micro-satellitaire, montrant le potentiel mutagène de ces bactéries (Maddocks *et al.*, 2009, 2013).

Prolifération cellulaire

L'infection de cellules épithéliales intestinales HCT116 par des *E. coli* producteurs de colibactine induit l'entrée en sénescence des cellules, ce qui est associé à un phénotype sécrétoire riche en facteurs de croissance tels que HGF, FGF, GM-CSF et VEGF, capables d'augmenter de 50% la prolifération cellulaire (Cougnoux *et al.*, 2014; Cuevas-Ramos *et al.*, 2010).

Par ailleurs, il a été mis en évidence une prévalence augmentée des *E. coli* producteurs de la cyclomoduline CNF, qui stimule l'avancée du cycle cellulaire, dans les tumeurs coliques de patients atteints de CCR (39,5%), comparativement à la muqueuse de patients contrôles (12,9%) (Bronowski *et al.*, 2008; Buc *et al.*, 2013). La cyclomoduline CNF a été décrite initialement par Caprioli et collaborateurs en 1983 (Caprioli *et al.*, 1983). Il en existe 3 variants chez *E. coli*, CNF1 à CNF3 qui partagent 65 à 90% d'homologie. CNF1 et CNF3 sont codés par des gènes chromosomiques alors que CNF2 est codé par un gène plasmidique (Knust and Schmidt, 2010). Le gène *cnf1* est situé sur l'îlot de pathogénicité nommé PAI-II situé en aval de l'opéron *hlyCABD*, qui code l'hémolysine alpha. La toxine CNF3 est présente chez les souches responsables d'infections chez les ovins et les caprins. Les toxines de la famille CNF sont des protéines d'environ 115 kDa organisées en trois domaines fonctionnels (Lax, 2007; Nougayrède *et al.*, 2005). L'extrémité N-terminal contient un domaine de liaison qui permet une interaction de haute affinité avec le récepteur cellulaire laminine, le domaine central assure la translocation du domaine C-terminal dans le cytoplasme et enfin l'extrémité C-terminal contient le domaine enzymatique responsable de l'activité toxique (Kim *et al.*, 2005b).

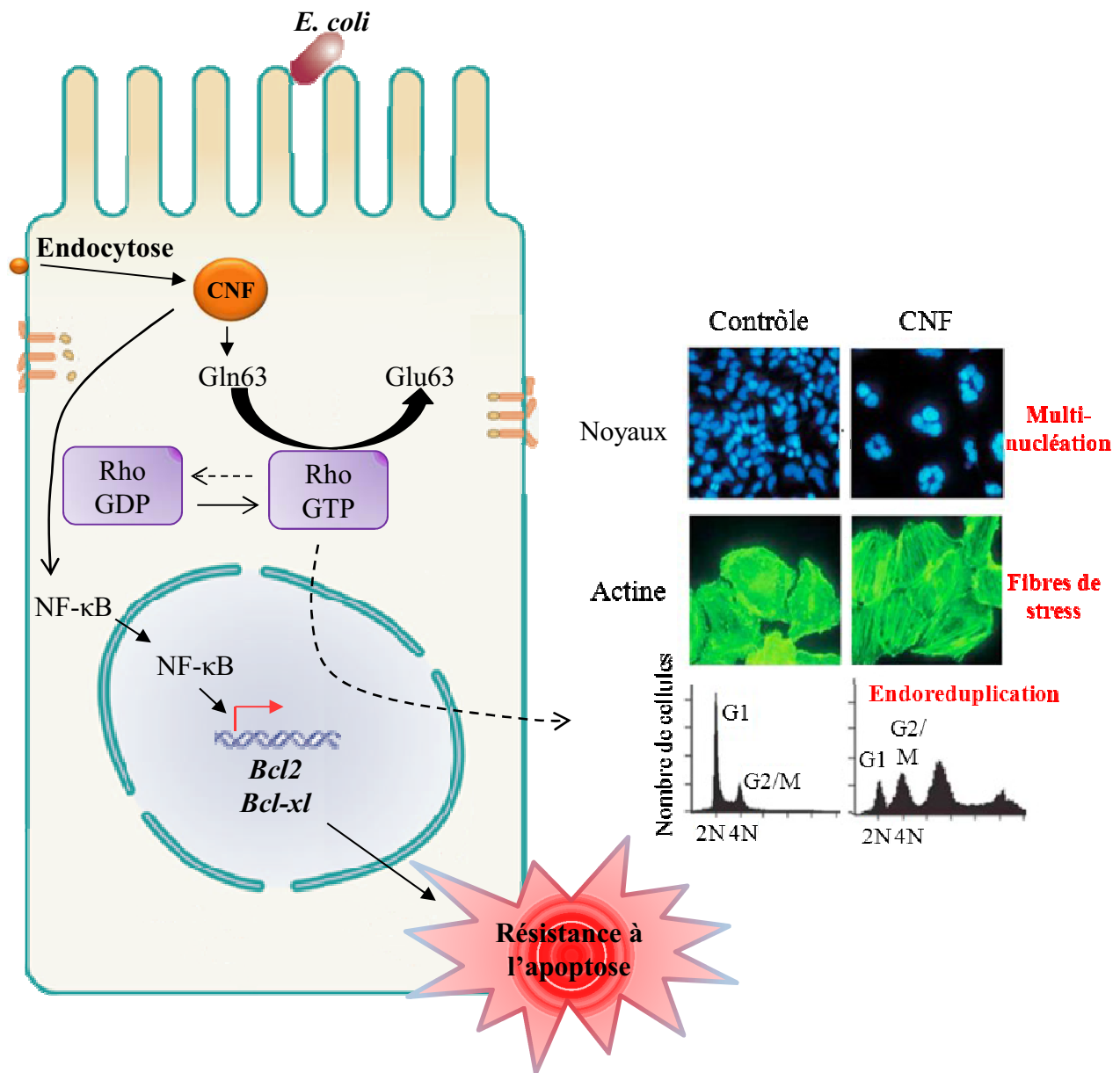


Figure 43 : Mécanisme d'action de CNF.

La toxine CNF (Cytotoxic Necrotizing Factor) se lie au niveau des jonctions serrées des cellules hôtes qui l'internalisent par endocytose. Dans le cytoplasme, CNF induit la désamination du résidu glutamine des Rho GTPases (Gln 63 de Rho, Gln 61 de Rac et Cdc42). La conversion en glutamate de ces résidus entraîne l'activation des RhoGTPases. Ce qui conduit, en cellules Hela traitées avec la toxine, à l'apparition de fibres de stress d'actine (marquage à la fluorescéine-phalloïdine en vert) ainsi qu'une inhibition de la cytokinèse induisant une multi-nucléation (marquage des noyaux au DAPI en bleu), visibles sur la partie droite de cette figure. L'analyse en cytométrie en flux du cycle cellulaire révèle un endoreduplication des cellules traitées. (Modifiée d'après Nougayrède *et al.*, 2005)

CNF possède une activité transglutaminase et catalyse la désamination ou la polyamination des protéines de la famille Rho GTPase (Rho, Rac et Cdc42) sur la glutamine en position 63 (Boquet, 2001; Nougayrède *et al.*, 2005). L'activation de ces GTPases contribue à la progression du cycle cellulaire en interagissant avec des effecteurs protéiques spécifiques (Nougayrède *et al.*, 2005; Oswald *et al.*, 2005). Ainsi, CNF favorise l'entrée dans le cycle cellulaire et la transition G1/S en affectant la production de la cycline D1, et des inhibiteurs des cyclines (CDKi, Cyclin-Dependent Kinase inhibitor) p21^{cip} et p27^{kip}, impliquées dans les points de contrôle du cycle cellulaire (Oswald *et al.*, 2005). CNF entraîne un contournement du point de contrôle en phase G1, induit des altérations du fuseau mitotique, de la cytokinèse, de la ségrégation des chromosomes et peut ainsi occasionner des aneuploïdies ou des endoréplifications de l'ADN (**Figure 43**).

Résistance à l'apoptose

Le rôle cytoprotecteur de la cyclomoduline CNF est appuyé par les résultats montrant une protection des cellules épithéliales HEP-2 contre l'apoptose induite par des UV-B (Fiorentini *et al.*, 1998; Miraglia *et al.*, 2007). Cet effet anti-apoptotique de CNF est attribué à sa capacité d'empêcher le décollement des cellules de la matrice, et d'activer la voie NF-κB conduisant à l'augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-XL (Fiorentini *et al.*, 1998; May *et al.*, 2012; Miraglia *et al.*, 2007).

*Travail
expérimental*



Présentation des résultats

Chez l'Homme, le côlon est le site anatomique exposé à la plus grande quantité de microorganismes. Le microbiote intestinal influence de nombreuses fonctions physiologiques et est de plus en plus considéré comme un organe à part entière. Avec la mise en évidence de dysbioses du microbiote intestinal chez les patients atteints de CCR, l'étude du rôle du microbiote intestinal dans la carcinogenèse colorectale fait l'objet depuis ces 15 dernières années de nombreuses investigations. Plusieurs études indépendantes, dont une menée au sein de l'unité M2iSH, ont mis en évidence une colonisation anormale des tumeurs coliques et de la muqueuse intestinale adjacente par l'espèce *Escherichia coli*. Si le potentiel carcinogène de souches d'*E. coli* productrices d'une génotoxine, la colibactine, a été bien démontré *in vitro* et en modèle murin, peu de données existent concernant l'interaction des *E. coli* associés au cancer colorectal avec l'épithélium intestinal et les populations cellulaires prépondérantes présentes au niveau de la tumeur.

Mes travaux de thèse se sont inscrits dans la caractérisation de souches d'*E. coli* isolées de tumeurs coliques et dans l'étude de leur interaction avec l'épithélium intestinal et les macrophages dans le but de mieux comprendre leur influence potentielle sur la carcinogenèse colorectale. Ce travail a donné lieu à deux publications qui sont présentées et commentées dans cette partie.

Dans une première étude, acceptée pour publication dans le journal « World Journal of Gastroenterology », la capacité de souches d'*E. coli* isolées de patients atteints de cancer du côlon à adhérer et à envahir *in vitro* des cellules épithéliales intestinales et à coloniser *in vivo* la muqueuse intestinale de souris et à promouvoir la prolifération cellulaire a été analysée.

Avec pour hypothèse que les bactéries colonisant les tumeurs, en tant qu'entité du microenvironnement tumoral, pourraient activer les fonctions pro-tumorales des macrophages, une seconde étude soumise dans le journal « Cellular Microbiology » s'est focalisée sur l'interaction entre des *E. coli* associés au CCR et les macrophages. En particulier, nous avons analysé la capacité de ces bactéries à induire l'expression du facteur pro-tumoral COX-2.

Partie 1 :

Capacité de souches d'*Escherichia coli* isolées de patients atteints de cancer du côlon et appartenant au phylogroupe B2 à coloniser la muqueuse intestinale et à promouvoir la prolifération cellulaire.

Publication n°1

Colon cancer-associated B2 *Escherichia coli* colonize gut mucosa and promote cell proliferation.

Jennifer Raisch*, Emmanuel Buc*, Mathilde Bonnet, Pierre Sauvanet, Emilie Vazeille, Amélie De Vallée, Pierre Dechelotte, Claude Darcha, Denis Pezet, Richard Bonnet, Marie-Agnès Bringer*, Arlette Darfeuille-Michaud*. (* Contribution équivalente des auteurs).

World Journal of Gastroenterology, Février 2014, article sous-presse.

Introduction de la publication n°1

Même si l'étiologie des cancers colorectaux (CCR) sporadiques reste à ce jour mal définie, de nombreux arguments sont en faveur de l'implication du microbiote intestinal dans le développement tumoral. Un modèle proposé pour expliquer le rôle des bactéries dans le développement du CCR est celui du « driver-passenger » (Tjalsma *et al.*, 2012). Selon ce modèle, sous l'influence de facteurs environnementaux et/ou génétiques, la muqueuse colique de patients à risque de développer un CCR serait colonisée par des bactéries dites « driver », c'est-à-dire capables d'initier la carcinogenèse colorectale de par leurs propriétés génotoxiques et/ou pro-inflammatoires. Les altérations cellulaires et tissulaires qui vont s'opérer au niveau de la muqueuse colique entraîneraient alors des modifications des conditions environnementales locales, favorisant l'émergence de bactéries opportunistes dites « passenger ». L'expansion au site tumoral de bactéries ayant des propriétés oncogéniques, au détriment de bactéries aux propriétés « suppresseurs de tumeurs » pourrait ainsi participer à la promotion tumorale.

Des altérations de la composition du microbiote intestinal ou dysbioses ont été mises en évidence chez les patients atteints de CCR, avec en particulier une augmentation de l'abondance de certaines bactéries telles que celles appartenant au genre *Bacteroides* et *Fusobacterium* (Balamurugan *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012; Kostic *et al.*, 2013; McCoy *et al.*, 2013; Sobhani *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013). Des études indépendantes ont mis en évidence que la muqueuse, les adénomes et les carcinomes de patients atteints de CCR sont colonisés par un nombre élevé d'*E. coli* comparativement aux patients contrôles (Arthur *et al.*, 2012; Bonnet *et al.*, 2014; Buc *et al.*, 2013; Maddocks *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2004; Swidsinski *et al.*, 1998). Ces bactéries pourraient participer activement à l'accumulation de mutations de l'ADN, directement *via* l'expression de génotoxines ou indirectement en diminuant l'expression de protéines de réparation de l'ADN. D'ailleurs 33% des *E. coli* associés au CCR codent des génotoxines. De plus, ces souches d'*E. coli* pourraient participer activement au développement tumoral en mettant en place et/ou en entretenant une inflammation chronique.

L'objectif de ce travail était de caractériser les *E. coli* isolés de la muqueuse de patients atteints de CCR. Nous avons déterminé leur capacité à adhérer et envahir des cellules

épithéliales intestinales, à former des biofilms et à induire l'expression du récepteur CEACAM6. Enfin, en utilisant des souris transgéniques CEABAC10, exprimant le récepteur CEACAM6 humain et un protocole d'infection chronique, nous avons étudié la capacité de la souche d'*E. coli* 11G5 isolée d'un patient atteint de CCR à induire l'inflammation et la prolifération cellulaire.

Colon cancer-associated B2 *Escherichia coli* colonize gut mucosa and promote cell proliferation

Jennifer Raisch, Emmanuel Buc, Mathilde Bonnet, Pierre Sauvanet, Emilie Vazeille, Amélie de Vallée, Pierre Déchelotte, Claude Darcha, Denis Pezet, Richard Bonnet, Marie-Agnès Bringer, Arlette Darfeuille-Michaud

Jennifer Raisch, Emmanuel Buc, Mathilde Bonnet, Pierre Sauvanet, Emilie Vazeille, Amélie de Vallée, Denis Pezet, Richard Bonnet, Marie-Agnès Bringer, Arlette Darfeuille-Michaud, Clermont Université, UMR1071 Inserm/Université d'Auvergne and INRA USC2018, 63000 Clermont-Ferrand, France
Emmanuel Buc, Pierre Sauvanet, Emilie Vazeille, Pierre Déchelotte, Claude Darcha, Denis Pezet, Richard Bonnet, Centre Hospitalier Universitaire, 63000 Clermont-Ferrand, France
Author contributions: Raisch J, Buc E, Bringer MA and Darfeuille-Michaud A conceived and designed the study, analysed data and drafted the manuscript; Bringer MA and Darfeuille-Michaud A contributed equally to the design and data analyses of this study; Raisch J, Buc E, Bonnet M, Vazeille E and Bringer MA performed experiments; Raisch J and Buc E contributed equally to this study; Buc E, Sauvanet P, de Vallée A, Pezet D and Bonnet R carried out the sample collection and the sample processing; Déchelotte P and Darcha C performed immunohistology analyses.

Supported by Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche, Inserm and Université d'Auvergne (UMR1071), INRA (USC-2018); and Grants from the Association F. Aupetit (AFA) and Ligue contre le cancer

Correspondence to: Marie-Agnès Bringer, PhD, Clermont Université, UMR1071 Inserm/Université d'Auvergne and INRA USC2018, 63000 Clermont-Ferrand, France. m-agnes.bringer@udamail.fr

Telephone: +33-4-7317 8371 Fax: +33-4-7317 8371

Received: October 25, 2013 Revised: February 10, 2014

Accepted: March 8, 2014

Published online: June 7, 2014

determined by PCR. Adhesion and invasion experiments were performed with I-407 intestinal epithelial cells using gentamicin protection assay. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) expression in T84 intestinal epithelial cells was measured by enzyme-linked immunosorbent assay and by Western Blot. Gut colonization, inflammation and pro-carcinogenic potential were assessed in a chronic infection model using CEABAC10 transgenic mice. Cell proliferation was analyzed by real-time mRNA quantification of *PCNA* and immunohistochemistry staining of Ki67.

RESULTS: Analysis of mucosa-associated *E. coli* from colon cancer and diverticulosis specimens showed that whatever the origin of the *E. coli* strains, 86% of cyclomodulin-positive *E. coli* belonged to B2 phylogroup and most harbored polyketide synthase (*pks*) island, which encodes colibactin, and/or cytotoxic necrotizing factor (*cnf*) genes. *In vitro* assays using I-407 intestinal epithelial cells revealed that mucosa-associated B2 *E. coli* strains were poorly adherent and invasive. However, mucosa-associated B2 *E. coli* similarly to Crohn's disease-associated *E. coli* are able to induce CEACAM6 expression in T84 intestinal epithelial cells. In addition, *in vivo* experiments using a chronic infection model of CEACAM6 expressing mice showed that B2 *E. coli* strain 11G5 isolated from colon cancer is able to highly persist in the gut, and to induce colon inflammation, epithelial damages and cell proliferation.

CONCLUSION: In conclusion, these data bring new insights into the ability of *E. coli* isolated from patients with colon cancer to establish persistent colonization, exacerbate inflammation and trigger carcinogenesis.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key words: B2 *Escherichia coli*; Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6; Cell proliferation;

Abstract

AIM: To provide further insight into the characterization of mucosa-associated *Escherichia coli* (*E. coli*) isolated from the colonic mucosa of cancer patients.

METHODS: Phylogroups and the presence of cyclomodulin-encoding genes of mucosa-associated *E. coli* from colon cancer and diverticulosis specimens were

Colon cancer; Polyketide synthase genomic island

Core tip: Tumors and mucosa of patients with colon cancer are abnormally colonized by *Escherichia coli* (*E. coli*) belonging to B2 phylogroup. The aim of the present study was to provide further insight into the characterization of colon cancer-associated *E. coli*. Despite their poor ability to adhere to and to invade intestinal epithelial cells *in vitro*, we showed that colon cancer-associated *E. coli* induce carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) expression, a receptor involved in adhesion of pathogenic *E. coli*. These bacteria were also able to persist and promote low grade inflammation and cell proliferation, in a chronic infection model of CEACAM6 expressing mice, highlighting their oncogenic potential.

Raisch J, Buc E, Bonnet M, Sauvanet P, Vazeille E, de Vallée A, Déchelotte P, Darcha C, Pezet D, Bonnet R, Bringer MA, Darfeuille-Michaud A. Colon cancer-associated B2 *Escherichia coli* colonize gut mucosa and promote cell proliferation. *World J Gastroenterol* 2014; 20(21): 6560-6572 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i21/6560.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i21.6560>

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the fourth leading cause of cancer death and is responsible for about 610000 deaths per year worldwide^[1]. Although many etiologic genetic changes are associated with progression from adenomatous lesions to invasive carcinoma^[2], the specific causative factors in the development of sporadic CRC remain unclear. Accumulating evidence supports that inflammation and gut microbial communities influence the development of colorectal carcinoma^[3-5]. Two theories have emerged to explain the contribution of bacteria in CRC: (1) the “alpha bug” concept, wherein select members of a microbial community with virulence and pro-carcinogenic features are capable of remodeling the microbiome as a whole to drive pro-inflammatory immune responses and colonic epithelial cell transformation leading to cancer^[6]; and (2) the “driver-passenger” concept, wherein certain indigenous intestinal bacteria, termed “bacteria drivers”, initiate CRC by inducing epithelial DNA damages: the resulting tumorigenesis induces intestinal niche alterations that promote the proliferation of passenger opportunistic bacteria with a growth advantage in the tumour microenvironment^[7].

Dysbiosis of the intestinal microbiota has been observed in CRC patients. Recent pyrosequencing data of CRC-associated bacterial microbiota have revealed, in particular, over-representation of some bacteria such as *Bacteroides/Prevotella*, *Faecalibacterium* and *Fusobacterium*^[8,9]. In addition, independent studies show that colonic adenomas, carcinomas and the mucosa of CRC patients are abnormally colonized by high numbers of adherent *Es-*

cherichia coli (*E. coli*) compared to controls^[10-12]. It has been suggested that the role of *E. coli* in CRC promotion and development is related to chronic inflammation. Inflammation can result from bacterial infection, *via* its effects on both the host and the microbiota, in particular by promoting the expansion of *E. coli*, which actively contribute to the accumulation of mutations resulting from DNA damages induced by genotoxins, or by downregulating host DNA mismatch repair proteins^[3,11,13]. In particular, *E. coli* strains harboring the polyketide synthase (*pks*) genotoxic island, which are found in a significantly high percentage of inflammatory bowel disease (IBD) and CRC patients, can promote invasive carcinoma in mono-colonized azoxymethane (AOM)-treated *IH0^{-/-}* mice^[3]. In addition, certain pathogenic bacteria can also be involved in cancer development, like, for example enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF), a common human commensal bacterium that is associated with colon cancer^[14]. ETBF-induced chronic inflammation and tumorigenesis in *Ap^{c^{Min/+}}* mice (a mouse model of familial adenomatous polyposis) involve the induction of the polyamine catabolic enzyme spermine oxidase, which causes DNA damages and uncontrolled cell proliferation in intestinal epithelial cells^[15].

Patients with IBD have an increased risk of colon cancer and small bowel adenocarcinoma^[16,17]. As in colon cancer patients, dysbiosis toward selected micro-organisms and decreased complexity of commensal bacteria have been observed in patients with Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), but it is not clear whether dysbiosis contributes to the development of IBD or is instead a consequence of the disease. Patients with IBD, compared to healthy controls, have fewer bacteria with anti-inflammatory properties and/or more bacteria with pro-inflammatory properties. Several metagenomic-based studies reported that members of the phyla Bacteroidetes and Firmicutes were reduced in patients with CD or UC^[18-20]. Among the Firmicutes, *Faecalibacterium prausnitzii* has anti-inflammatory properties; its numbers are reduced in patients with CD and associated with a risk of post-resection recurrence of ileal CD^[20]. In contrast, a greater relative abundance of *Enterobacteriaceae*, mostly *E. coli* belonging to the B2 phylogenetic group, has been reported in CD patients more notably on mucosa-associated microbiota than in fecal samples^[10,18,21-24]. Intestinal colonization by *E. coli* correlates with bacterial adhesion of CD-associated *E. coli* strains to intestinal epithelial cells^[10,25]. CD-associated *E. coli* share abilities to adhere to and to invade intestinal epithelial cells and to survive within macrophages^[26,27] and they are termed accordingly adherent-invasive *E. coli* (AIEC). The abnormal colonization of CD mucosa by AIEC involves abnormal expression of a host receptor, the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6)^[28]. Interestingly, CEACAM6 is not only abnormally expressed in the ileum of patients with CD^[28] but expression of this molecule is also up-regulated in proliferating cells in adenomas and colorectal tumors^[29,30]. However, the origin

of CEACAM6 surexpression in colon cancer is not yet clearly understood.

The aim of the present study was to provide further insight into the characterization of mucosa-associated *E. coli* isolated from the colonic mucosa of cancer patients. We determined their ability to interact with intestinal epithelial cells, with a particular focus on biofilm formation and the presence of cyclomodulin-encoding genes, and to induce CEACAM6 expression in intestinal epithelial cells. Finally, using CEABAC10 transgenic mice expressing human CEACAMs, we assessed the effects of long-term chronic infection by the colon cancer-associated *E. coli* strain 11G5 for its ability to colonize the gut, to potentiate inflammation and to induce cell proliferation.

MATERIALS AND METHODS

Ethical considerations

Ethical approval for the study was granted by the Clermont-Ferrand research ethics committee. This IRB allowed for the waiver of written consent and approved the process of obtaining verbal consent from potential subjects, because the research involved no procedures for which written consent is normally required outside of the research context and presents no risk of harm to subjects. The biological samples were collected from colon resections, which were required for the treatment of patients. The investigators explained the study to the potential subject verbally, providing all pertinent information such as purpose, procedures and putative risks. Following this verbal explanation, the potential subject was provided with a study information sheet. After allowing the potential subject time to read the study information sheet, the investigators answered any additional questions the subject may have. A verbal agreement to participate in the research was obtained for all patients included in the study. The dates of verbal consent were tracked in a non-identifiable manner.

Patients

Eighty-one patients were studied between March 2007 and July 2010 at the University hospital of Clermont-Ferrand, France, 48 with colon cancer (adenocarcinoma), and 33 with diverticulosis. For ethical considerations no surgical specimens from healthy patients were included and diverticulosis specimens were used as non-neoplastic controls. Among patients with diverticulosis, we excluded those with acute or chronic inflammation at the time of surgery, and those with stenosis to avoid potential consequences of inflammation on gut microbiota. Sex ratio (M/F) was 1.22 and 0.74 for CRC and diverticulosis patients respectively. The age range was 35-95 years for cancer patients (median age, 70 years and average age, 67 years) and 34-81 years for controls (median age, 58 years and average age, 60 years). Biopsies were taken on non-involved mucosa near the site of malignant tumors in resected colon. Pathologic analysis confirmed the neoplastic features of the samples. Bowel preparation was

by oral sodium picosulfate or oral polyethylene glycol the evening before surgery. All resection patients had received cefoxitin (2 g intravenously) at the time of incision and none had received antibiotics in the 4 wk before sampling. Ethical approval for the study was granted by the Clermont-Ferrand Research Ethics Committee.

Biopsy treatment for determination of associated *E. coli* numbers

The mucosal biopsy specimens were transported on ice to the laboratory. The samples were weighed (50 to 100 mg each) and washed thoroughly three times in 10 mL PBS to remove most of the fecal bacteria. To determine the number of associated bacteria, samples were crushed (Ultra-Turrax, IKA) and incubated for 15 minutes in the presence of 0.1% Triton X-100. Ten-fold dilutions of the lysates were then plated on Drigalski agar and chromogenic agar chromID CPS3® (bioMérieux), which allow the identification of *E. coli* isolates. Colony forming units (CFUs) of *E. coli* isolates were collected after 24 h of incubation at 37 °C and the identification of bacteria was confirmed with the automated Vitek II® (bioMérieux) system. When possible a maximum of 96 *E. coli* isolates per sample were collected for molecular typing. The bacteria were subcultured for 24 h at 37 °C in 96-well plates in Luria Bertani medium, supplemented with 15% glycerol and then stored at -80 °C.

Molecular phylogenetic grouping and PCR assay for cyclomodulin and adhesin-encoding genes

Ten isolates per sample were typed with molecular methods to identify the *E. coli* isolates (*E. coli* genotypes) colonizing the samples. Two genotyping methods were used: an “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus” sequence (ERIC)-PCR using primer ERIC2 (5’ AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3’) and a “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD)-PCR using primer 1283 (5’ GCGATCCCCA 3’)^[31,32]. For each isolate, one representative isolate was subsequently analysed and stored at -80 °C in Luria-Bertani medium supplemented with 15% glycerol. *E. coli* isolates were then classified according to the *E. coli* Reference Collection system into phylogenetic groups A, B1, B2, and D using a multiplex PCR technique^[33]. Strain RS218, which harbors all the genes targeted by the multiplex PCR, was used as positive control. To investigate the presence of cyclomodulin (*pks* genomic island, *cdt*, *cnf*, and *ajf*), adhesin (*afa*, *afa/dr* and *aaf*), or intimin (*eae*)-encoding genes, PCR assays were performed using primers listed in Table 1.

Cell culture

The intestinal epithelial cell lines T84 (ATCC, CCL-248) and Intestine-407 (I-407; ATCC, CCL-6) were maintained in an atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C in the culture medium recommended by ATCC. For infection assays, cells were seeded in 24-well plates at a density of 2×10^5 /cm².

Table 1 List of primers used for PCR assays

Primer name	Sequence (5'-3')	Region specific for	Ref.
afa-f	CGGCTTTTCTGCTGAACTGGCAGGC	<i>afaC</i>	[49]
afa-r	CCGTCAGCCCCACGGCAGACC		
afa1	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC	<i>afaBC</i>	
afa2	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG		
afaE-f ¹	TTAGACCGTACTGTTGTGTACCCC		
	C		
afaE1-r	CATCGCCCGTCGCAGAGCCCAT	<i>afaE1</i>	
afaE2-r	GTTTCCCACTAGACTGGAATGAAG	<i>afaE2</i>	
	C		
afaE3-r	CCCTATTGTTGTCGCTGATCAGGAA	<i>afaE3</i>	
	G		
daaE-r	CGGCTAGTCATATATAGATTGTCC	<i>daaE</i>	
	C		
afaE5-f	TCAACTCACCCAGTAGCCCCAG	<i>afaE5</i>	
afaE5-r	AGGAAGTGGTAGCACCGGTACG		
afaE7-f	GCTAAATCAACTGTGTATGTT	<i>afaE7</i>	
afaE7-r	GGACAATCCAAATGGCGAATTA		
afaE8-f	CTAACTTGCCATGCTGTGACAGTA	<i>afaE8</i>	
afaE8-r	TTATCCCCTGCGTAGTTGTGAATC		
aggR1	CTAATTGTACAATCGATGTA	<i>aggR</i>	
aggR2	CTGAAGTAATCTTGAA		[50]
pksORF9-10.1KJ	ATTCGATAGCGTCACCCAAC	<i>clbK-clbJ</i>	
pksORF9-10.2KJ	TAAGCGTCTGGAATGCAGTG		[51]
CNF-1s	GGGGGAAGTACAGAAGAATTA	<i>cnf1</i>	
CNF-1as	TTGCCGTCCACTCTCACCAGT		
CNF-2s	TATCATACGGCAGGAGGAAGCACC	<i>cnf2</i>	
CNF-2as	GTCACAATAGACAATAATTTTCCG		
CNF3-3D	TAACGTAATTAGCAAAGA	<i>cnf3</i>	
CNF-3as	GTCTTCATTACTACAGT		
CDT-s1	GAAAGTAAATGGAATATAAAATGTC	<i>cdtB- I ,</i>	[51]
	CG	<i>cdtB- III ,</i>	
CDT-as1	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA	<i>cdtB- V</i>	
CDT- II as ²	TTTGTGTGCGCCGCTGGTGAAA	<i>cdtB- II</i>	
CDT- III as ²	TTTGTGTGCGTGACGAGGGAAAA		
CDT-s2	GAAAATAAATGGAACACACATGTC	<i>cdtB- I ,</i>	
	CG	<i>cdtB- IV</i>	
CDT-as2	AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA		
CDT- I s	CAATAGTCGCCACAGGA	<i>cdtB- I</i>	
CDT- I as	ATAATCAAGAACACCACCAC		
CDT- IV s	CCTGATGGTTCAGGAGGCTGGTTC	<i>cdtB- IV</i>	
CDT- IV as	TTGCTCCAGAATCTATACCT		
P105	GTCAACGAACATTAGATTAT	<i>cdtC- V</i>	
c2767r	ATGGTCATGCTTTGTTATAT		
cif-int-s	AACAGATGGCAACAGACTGG	<i>cif</i>	
cif-int-as	AGTCAATGCTTTATGCGTCAT		[51]
clbQ-F	TTGTATAGTTACACAACATTTTC		
clbQ-R	CCTGTTAGCTTTCGTTTC		This study
MiclbQaa-dA7-F	CATTAAATCATCAAATTAAC-GAATTCTATTACACAACAAGGAGT-GGGACGCACTGGCATTTAATAAC-GCGTC		
MiclbQaa-dA7-R	GATGATGGAACAGCCATATCTATT-GCTCCTTGATAGTTACACAAC-TATTTTAACTACTTTTATC		

¹The afa-f and afa-r primers detect all *afa*-positive strains, irrespective of the *afaE* subtype and the binding properties of the adhesins (Afa/Dr+ and Afa/Dr-). Specific detection of strains encoding Afa/Dr+ adhesins was performed using afa-1 and afa-2 primers; ²Primers used with CDT-s1 primer.

Adhesion and invasion assays

I -407 cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10 bacteria per cell. Adhesion and invasion assays were performed as previously described^[27]. For adhesion assays, monolayers were washed five times in PBS after 3 h of incubation at 37 °C. To determine the numbers of intracellular bacteria (invasion assay), cell culture medium containing gentamicin at a concentration of 200 µg/mL was added for 1 h to kill extracellular bacteria. The epithelial cells were then lysed with 1% Triton X-100 in deionized water. This concentration of Triton X-100 had no effect on bacterial viability for at least 30 min. Samples were diluted and plated onto LB agar plates to determine the number of CFU.

Biofilm formation assays

Biofilm formation assays on abiotic surface were performed using a previously described method^[34]. Biofilm measurements were calculated using the formula SBF = (AB-CW)/G, in which SBF is the specific biofilm formation, AB the OD_{570nm} of the attached and stained bacteria, CW the OD_{570nm} of the stained control wells containing only bacteria-free medium (to eliminate unspecific or abiotic OD values), and G is the OD_{630nm} of cell growth in broth. Assays were performed in triplicate.

Biofilm formation assays were also performed using PFA-fixed I -407 cells^[34]. Briefly, confluent I -407 monolayers were fixed for 15 min in 3.7% PFA-PBS. The fixed cells were washed and infected with bacteria in M63 minimal medium and incubated overnight at 30 °C without shaking. For visualization, infected epithelial cells were fixed for 15 min in 3.7% PFA-PBS and permeabilized in PBS-0.1% Triton X-100. Coverslips were incubated with goat anti-*E. coli* polyclonal antibodies (dilution 1/100, AbD serotec) and Alexa 488-labeled anti-goat antibodies (dilution 1/300, Invitrogen). Actin cytoskeleton was stained using TRITC-labelled-phalloidin (Sigma). The slides were examined with a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope (ICCF platform, Clermont-Ferrand, France).

Mouse model infection

CEABAC10 transgenic mice (heterozygote^[35]) were housed in specific pathogen-free conditions in the animal care facility at Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France). Mice from the same generation were used for experimentation. Animal protocols were approved by the Committee for Research and Ethical Issues of the International Association for the Study of Pain.

A total of 22 female 10 wk-old CEABAC10 mice were divided into three groups: non-infected control group (*n* = 6), 11G5-infected group (*n* = 7) and AIEC LF82-infected group (*n* = 9). The animals were pretreated once before the first infection cycle by oral administration of the broad-spectrum antibiotic streptomycin (20 mg intragastric per mouse) to disrupt normal resident bacterial flora in the intestinal tract and received a dose of 0.25%

Table 2 Histological grading of intestinal inflammation

Symptoms	Characteristics
Infiltration of inflammatory cells	
0	Rare inflammatory cells in the lamina propria
1	Increased numbers of inflammatory cells, including neutrophils in the lamina propria
2	Confluence of inflammatory cells extending into the submucosa
3	Transmural extension of the inflammatory cell infiltrate
Infiltration of epithelium by polynuclear cells	
0	No infiltration
1	Surface
2	Inside the crypt
3	Cryptic abscess
Severity of epithelial damage	
0	Absence of mucosal damage
1	Lymphoepithelial lesions
2	Mucosal erosion/ulceration
3	Extensive mucosal damage and extension through deeper structures of the bowel wall
Surface of epithelial damage	
0	Normal
1	Focal
2	Wide

Table 3 List of primers used for RT qPCR assays

Primer name	Sequence (5'-3')	Region specific for	Ref.
mmu-26s-FW	TGTCATTTCGGAACATTGTAG	S26	This study
mmu-26s-RV	GGCTTTGGTGGAGGTC		
mmu-PCNA-FW	CCACATTGGAGATGCTGTTG	PCNA	
mmu-PCNA-RV	CAGTGGAGTGGCTTTTGTGA		

(wt/vol) of dextran sulfate sodium (DSS; molecular mass = 36000-50000 daltons; MP Biomedicals) in drinking water 3 d before infection to increase the accessibility of bacteria to the surface of the epithelial layer. The administration of 0.25% DSS did not affect the body weight of mice and did not induce clinical symptoms of colitis^[36]. The mice were subjected to 8 consecutive cycles of infection. For each infection cycle, they were orally challenged twice a week by intra-gastric gavage with 2×10^8 bacteria for a 3-wk period. This infection period was followed by a 1-wk recovery period without infection. For each cycle, 5 d after the last oral bacterial infection, fresh fecal pellets (100-200 mg) were collected and suspended in PBS to evaluate colonization. After serial dilution, bacteria were enumerated by plating on LB agar medium containing 50 µg/mL of kanamycin and 50 µg/mL of ampicillin isolate 11G5 bacteria or 100 µg/mL of ampicillin and 20 µg/mL of erythromycin to isolate LF82 bacteria, and incubated at 37 °C overnight.

Histological grading of intestinal inflammation and epithelial damages

After mouse sacrifice, the entire colon was excised and rolls of the proximal colon were fixed in buffered 4% formalin, paraffin-embedded, cut into 5-µm slices, and stained with hematoxylin/eosin/safranin. The histological severity of colitis was graded in a blinded fashion by a GI pathologist. The tissue samples were assessed for

the extent and depth of inflammation and the extent of epithelial damages, as presented in Table 2. The histology score corresponds to the sum of each item.

Immunohistochemistry

For immunohistochemical staining of mouse Ki-67, heat-induced epitope retrieval was performed using sodium citrate buffer (pH 6.0). Ki-67 antigen was detected using anti-mouse Ki-67 polyclonal antibodies (Leica) and revealed with Vectastain ABC kit (Vector) and DAB detection kit (Invitrogen). The sections were counterstained using Gill's hematoxylin (Vector).

Real-time mRNA quantification

Total RNAs were extracted from tissue using a Nucleospin® RNA/Protein extraction kit (Macherey-Nagel GmbH & Co). RNA samples were subjected to reverse transcription using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit and non-specific random hexamer primers (Applied Biosystems) and quantification was performed using FastStart SYBR® Green Master kit (Roche Applied Science). The primer sequences used are given in Table 3. Gene expression values were calculated based on the $\Delta\Delta C_t$ method.

Enzyme-linked immunosorbent assay

T84 colon epithelial cells were infected with bacteria for 6h at a MOI of 100 bacteria per cell. The amount of CEACAM6 on whole cell protein extracts was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to manufacturer's instructions (R and D systems).

Western immunoblotting

T84 colon epithelial cells were infected for 6h at a MOI of 100 bacteria per cell. Whole-cell protein extracts were prepared by adding NP-40 lysis buffer. Protein concen-

Table 4 Distribution of *Escherichia coli* strains producing various cyclomodulins according to phylogroups and specimen origins *n* (%)

Phylogroups		<i>E. coli</i> strains exhibiting cyclomodulin-encoding genes			
		<i>pks</i>	<i>cnf</i>	<i>cdt</i>	<i>cif</i>
Colon cancer-associated <i>E. coli</i> strains (<i>n</i> = 88) ¹	A (<i>n</i> = 20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
	B1 (<i>n</i> = 14)	0 (0)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
	B2 (<i>n</i> = 38)	23 (26)	16 (18)	4 (11)	0 (0)
	D (<i>n</i> = 16)	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
Diverticulosis-associated <i>E. coli</i> strains (<i>n</i> = 46) ²	A (<i>n</i> = 17)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	B1 (<i>n</i> = 3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	B2 (<i>n</i> = 15)	6 (13)	4 (9)	0 (0)	0 (0)
	D (<i>n</i> = 11)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

¹Isolated from 48 colon cancer patients; ²Isolated from 33 patients with diverticulosis. *E. coli*: *Escherichia coli*.

Table 5 Phylogroup distribution of cyclomodulin-positive *Escherichia coli* strains according to specimen origins *n* (%)

	Phylogroups			
	A	B1	B2	D
Cyclomodulin-positive <i>E. coli</i> strains isolated from colon cancer patients	2 (6)	2 (6)	26 (84)	1 (3)
Cyclomodulin-positive <i>E. coli</i> strains isolated from patients with diverticulosis	0 (0)	0 (0)	6 (100)	0 (0)
Cyclomodulin-positive <i>E. coli</i> strains	2 (5)	2 (5)	32 (86)	1 (3)

E. coli: *Escherichia coli*.

trations were determined by Bradford assay. Total proteins were subjected to SDS-PAGE on 12% gels.

Proteins were electroblotted onto nitrocellulose membranes (Amersham International), and the membranes were immunoblotted for CEACAM6 (mouse anti-CEACAM6, dilution 1/1.000, Genovac) and GAPDH (rabbit anti-GAPDH; dilution 1/1.000, Cell Signaling). Immunoreactants were detected using horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulin G antibodies, ECL reagents (Amersham Biosciences) and autoradiography.

Statistical analysis

Where appropriate, nonparametric data were expressed by median value (range). Normally distributed data were expressed as means. Error bars represent SEM. Statistical analysis was done using ANOVA (Histopathological score and RT-qPCR), Mann Whitney (adhesion, invasion and biofilm assays) using GraphPad prism5 software. A *P* value of 0.05 was considered significant.

RESULTS

Most cyclomodulin-producing *E. coli* strains associated with colon cancer and diverticulosis belong to B2 phylogroup

The analysis of the presence of cyclomodulin-encoding genes, *pks* island coding for colibactin, and/or *cnf* and/or *cdt* and/or *cif* genes coding for cytotoxic necrotizing factor (CNF), cytolethal distending toxin (CDT), and cycle-inhibiting factor (Cif) indicated that, whatever the origin of the *E. coli* strains, either from colon cancer or diverticulosis samples, 86% of cyclomodulin-positive *E. coli* belonged to B2 phylogroup (Tables 4 and 5). Among *E. coli* strains isolated from colon cancer specimens, B2 *E. coli*

strains harboring *pks*, *cnf* and *cdt* genes represented 26%, 18% and 11% of the total strains isolated, respectively (Tables 4 and 6). Among *E. coli* strains isolated from patients with diverticulosis, *pks*-positive B2 *E. coli* strains represented 13%, and *cnf*-positive B2 *E. coli* strains 9% of the total strains isolated. Although a higher prevalence of B2 *E. coli* strains harboring *pks* or *cnf* genes was observed in colon cancer patients than in patients with diverticulosis, this was not significant (*P* = 0.06 for both *pks* and *cnf* genes). Of interest, all but two *cnf* positive strains also harbored *pks* and all *cnf*- and *pks*-positive *E. coli* strains belonged to the B2 phylogroup.

Low level of adhesion and invasion but high ability to form biofilm of B2 *E. coli* strains isolated from colon cancer or diverticulosis patients

The analysis of the ability of *E. coli* strains to adhere to and to invade intestinal epithelial cells was restricted to B2 *E. coli*, which were the main cyclomodulin producers in our study. Of note, due to cytolytic activity of hemolysin on cultured cells, hemolysin-positive *E. coli* strains were not tested. Results showed that B2 phylogroup *E. coli* strains isolated from colon cancer and from diverticulosis displayed low levels of adhesion to I-407 intestinal epithelial cells (Figure 1A). Compared to the adhesion level of the AIEC reference strain LF82, for which a mean adhesion index of 53.23 ± 6.63 was observed, the adhesion levels of all *E. coli* strains isolated from colon cancer (except *E. coli* strain 14H4, which had a mean adhesion level of 25.76 ± 5.06) or from diverticulosis ranged from 0.15 ± 0.02 to 4.04 ± 1.24 or from 0.10 ± 0.04 to 9.17 ± 3.40 , respectively. Microscopy examination after Giemsa staining showed a diffuse adhesion pattern (data not shown), and we therefore searched for adhesive factor-encoding genes associated with diffusely adhering

Table 6 Hemolysin expression and presence of cyclomodulin- and adhesin-encoding genes in B2 phylogroup *Escherichia coli* strains

<i>E. coli</i> strains	Haemolytic phenotype ¹	Cyclomodulin-encoding genes				Adhesin-encoding genes		
		<i>pks</i>	<i>cnf</i>	<i>cdtB</i>	<i>cif</i>	<i>afa</i>	<i>dra</i>	<i>aagR</i>
Colon cancer								
1C12	+	+	<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-
1D2	-	+	-	-	-	-	-	-
1F8	-	-	-	-	-	-	-	-
2D5	-	-	-	-	-	-	-	-
2F8	+	+	<i>cnf1</i>	<i>cdtB-IV</i>	-	-	-	-
2G2	+	-	-	-	-	-	-	-
4A9	-	-	-	-	-	-	-	-
6A8	+	+	<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-
6G8	+	+	<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-
6G10	-	-	-	<i>cdtB-IV</i>	-	-	-	-
6G11	-	-	-	-	-	-	-	-
7G1	-	-	-	-	-	-	-	-
7G2	+	+	<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-
8A9	+	+	-	-	-	-	-	-
8A10	-	-	-	-	-	-	-	-
8F1	+	-	<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-
8G8	-	-	-	-	-	-	-	-
9G5	+	+	<i>cnf1</i>	-	-	+	-	-
10D12	-	+	-	-	-	-	-	-
10E9	+	+	<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-
11F1	-	-	-	-	-	-	-	-
11G5	-	+	-	-	-	-	-	-
12B1	+	+	<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-
13H2	+	+	<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-
14H4	-	+	-	-	-	+	+ (<i>afaE5</i>)	-
15D1	+	-	-	-	-	-	-	-
15D3	+	+	<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-
16C1	-	+	-	-	-	-	-	-
17G3	+	-	<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-
18C3	+	+	<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-
18C5	-	-	-	-	-	-	-	-
18H5	-	+	-	-	-	-	-	-
19D12	+	+	<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-
19G1	-	+	-	-	-	-	-	-
19H2	+	+	<i>cnf1</i>	<i>cdtB-IV</i>	-	-	-	-
20B6	+	+	<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-
20C3	-	+	-	<i>cdtB- I</i>	-	-	-	-
20D5	-	-	-	-	-	-	-	-
Diverticulosis								
1D5	-	-	-	-	-	-	-	-
4D5	+	+	<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-
9D7	-	-	-	-	-	-	-	-
9F1	-	-	-	-	-	-	-	-
9F4	-	-	-	-	-	-	-	-
11D9	+	+	<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-
12H1	-	+	-	-	-	-	-	-
13D1	+	+	<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-
15C1	-	-	-	-	-	-	-	-
16A4	-	+	-	-	-	-	-	-
16A8	-	-	-	-	-	-	-	-
17C1	-	-	-	-	-	-	-	-
17F2	-	-	-	-	-	-	-	-
17E1	-	-	-	-	-	-	-	-
18E6	+	+	<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-

¹Alpha-hemolysin expression was analysed after over-night growth of bacteria on agar plates containing sheep blood. *cnf*: Cytotoxic necrotizing factor; *cdt*: Cytolethal distending toxins; *cif*: Cycle-inhibiting factor; *afa*: Afimbrial adhesion. *E. coli*: *Escherichia coli*.

E. coli (DAEC) strains (*i.e.*, Afa and Afa/Dr adhesin-encoding genes). None of the B2 *E. coli* strains tested was positive for *afa* or *afa/dr* genes except the highly adherent *E. coli* strain 14H4 isolated from colon cancer (Table 6). Of note, none of the B2 *E. coli* strains tested was positive

for *eae* gene coding for intimin of enteropathogenic *E. coli* or for *aaf* gene coding for the adhesive factor AAF of enteroaggregative *E. coli*, indicating that B2 *E. coli* strains studied do not belong to these *E. coli* pathovars. Analysis of the ability of bacteria to invade I-407 cells showed

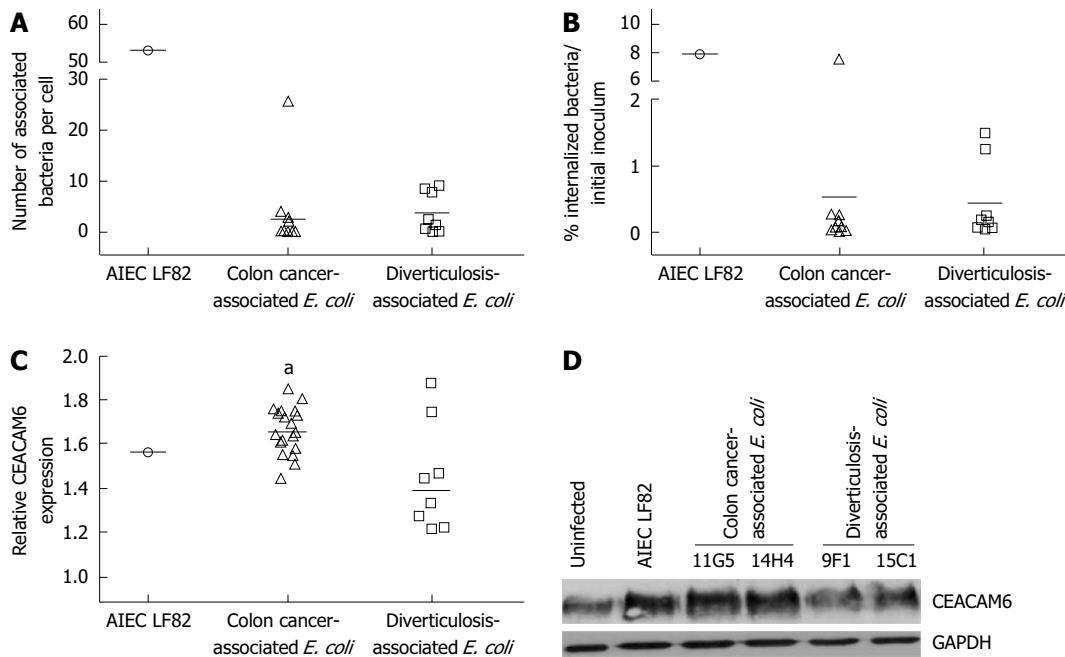


Figure 1 Adhesion, invasion and ability to induce carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 expression of B2 *Escherichia coli* strains. A and B: Ability of colon cancer- and diverticulosis-associated B2 *Escherichia coli* (*E. coli*) strains and AIEC strain LF82 to adhere to and to invade I-407 intestinal epithelial cells. A: Adhesion. Results are expressed as number of associated bacteria per cell after 3 h of infection; B: Invasion. Results are expressed as percentage of inoculum surviving after 3 h of infection and 1 h of gentamicin treatment; C and D: Induction of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) expression in colon epithelial T84 cells infected for 6 h with colon cancer- and diverticulosis-associated B2 *E. coli* strains and AIEC strain LF82. C: Quantitative dosage of CEACAM6 by ELISA. Results are expressed as amounts of CEACAM6 in stimulated or infected cells relative to untreated cells. ^a $P \leq 0.05$ vs diverticulosis associated *E. coli*. D: CEACAM6 expression analysis by Western Blot. *E. coli* strains 11G5 and 14H4 were isolated from colon cancer patients and *E. coli* strains 9F1 and 15C1 from patients with diverticulosis.

that whatever the origin of the B2 *E. coli* strains their invasion levels were very low, ranging from 0.02% to 1.49%, except strain 14H4, for which invasion level was similar to that of the AIEC strain LF82 (Figure 1B).

We also investigated the ability of B2 *E. coli* isolated from colon cancer to induce CEACAM6 expression as abnormal CEACAM6 expression was shown to promote gut colonization by AIEC^[36] and AIEC bacteria were reported to be able to induce increased CEACAM6 expression in intestinal epithelial cells^[28]. A quantitative analysis of the level of CEACAM6 expression by T84 intestinal epithelial cells in response to B2 *E. coli* infection was determined by ELISA (Figure 1C) and Western blot (Figure 1D). Interestingly, we observed that most of B2 *E. coli* strains isolated from colon cancer induced increased expression of CEACAM6 to a level similar to that of AIEC strain LF82. Of note, B2 *E. coli* strains isolated from diverticulosis induced no or very low expression of CEACAM6 in T84 cells.

Another important bacterial trait involved in the colonization of the intestinal mucosa by gut resident bacteria is their ability to form biofilm. This property was investigated both on abiotic and on fixed intestinal epithelial cells. The level of biofilm formation on abiotic surface was evaluated by calculating the specific biofilm formation index (SBF). An SBF index of 3.13 ± 0.23 was obtained for AIEC strain LF82 compared to 0.99 ± 0.22 for the non-pathogenic K-12 *E. coli* strain C600 (Figure 2A). We observed that 7/19 (37%) B2 *E. coli* strains isolated

from colon cancer and 2/8 (25%) B2 *E. coli* strains isolated from diverticulosis harbored SBF index similar to that of the biofilm producer AIEC strain LF82 ($P \geq 0.05$). Biofilm formation on fixed I-407 intestinal epithelial cells was evaluated by confocal microscopy (Figure 2B), which confirmed that 6/9 B2 *E. coli* strains having a high SBF index on abiotic surface were able to form a strong biofilm on fixed I-407 cultured cells. Combining the two methods of biofilm formation assessment, 16/27 B2 *E. coli* strains tested were able to form biofilm. This shows that even B2 *E. coli* strains have a low ability to adhere to intestinal epithelial cells, at least half of them were able to form biofilm to a level similar to that of CD-associated *E. coli* strain LF82 known to form a strong biofilm and no difference was observed between B2 *E. coli* strains isolated from colon cancer patients or from patients with diverticulosis.

Colonization of colon mucosa in CEACAM-expressing mice by colon cancer-associated B2 *E. coli* strain 11G5: induction of inflammation and enhanced epithelial intestinal cell proliferation

CEABAC10 mice harboring a bacterial artificial chromosome that contains part of the human CEA family gene cluster including the *CEACAM6* gene were infected with AIEC reference strain LF82 or B2 *E. coli* strain 11G5 isolated from colon cancer patient. To assess bacterial colonization, the levels of bacteria in the stools were determined 5 d after the last infection of each cycle, over the

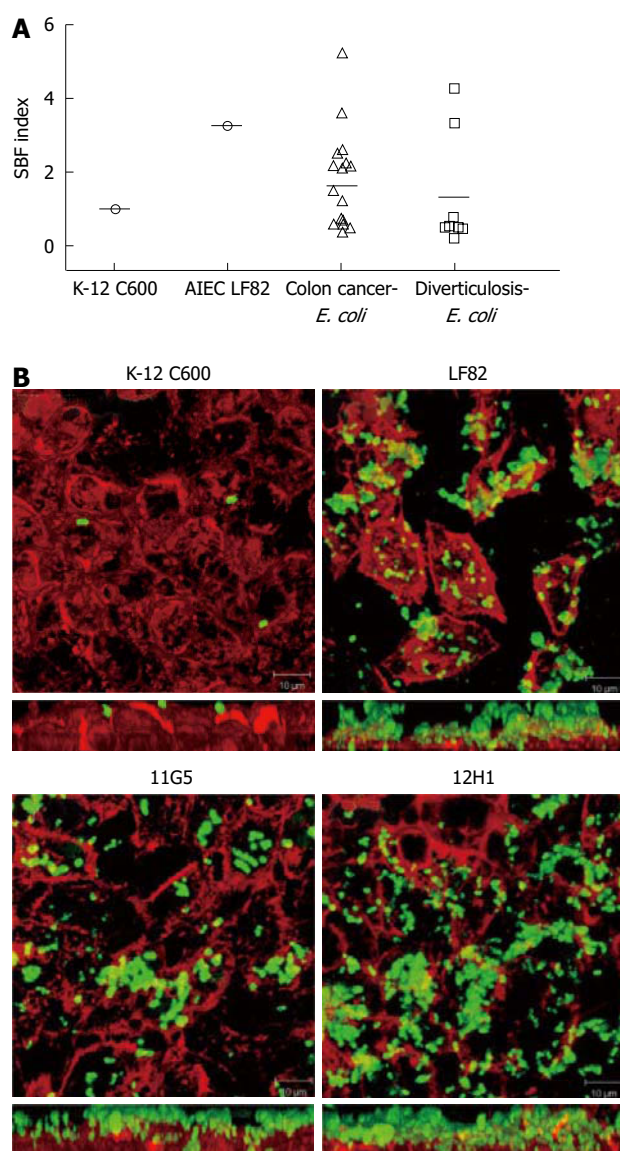


Figure 2 Ability of B2 *Escherichia coli* strains to form biofilm. Biofilm formation of colon cancer-associated and diverticulosis-associated B2 *Escherichia coli* (*E. coli*) were compared to that of the non-pathogenic K-12 *E. coli* strain C600 and the biofilm producer AIEC strain LF82. A: Biofilm formation on abiotic surface. Results are expressed as specific biofilm formation (SBF) index; B: Biofilm formation on human I-407 intestinal epithelial cells. *E. coli* strain 11G5 was isolated from a patient with colon cancer and *E. coli* strain 12H1 from a patient with diverticulosis. Bacteria were stained using goat anti-*E. coli* polyclonal antibodies (green) and I-407 cells were labeled for actin cytoskeleton using TRITC-labeled phalloidin (red). Y- and Z-stack projections are presented.

8 consecutive cycles of infection. Analysis of the number of bacteria recovered in the stools at cycle 4 and cycle 8 revealed similar ($P = 0.78$) colonization levels for mice infected with AIEC LF82 and colon cancer-associated 11G5 bacteria (Figure 3A).

On macroscopic examination, no sign of tumor development such as neoplasia or polyp was observed in the colon of mice infected with AIEC strain LF82 or colon cancer-associated 11G5 *E. coli* strain. Histological analysis showed a similar colonic histological score for inflammation and epithelial damages for mice infected with AIEC strain LF82 and *E. coli* strain 11G5 ($P \geq 0.05$)

(Figure 3B). Mice infected with *E. coli* strains LF82 and 11G5 exhibited infiltration of polynuclear cells in crypts, larger numbers of crypt abscesses and large and multifocal erosion plates (Figure 3C).

The level of *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) mRNA was measured in the colonic mucosa of infected mice to determine the proliferative index (Figure 3D). Significant ($P \leq 0.05$) 2.5-fold and 2.9-fold increases in PCNA mRNA levels were observed in the colonic mucosa of mice infected with the *E. coli* strain 11G5 compared to those of control mice or mice infected with AIEC strain LF82, respectively. This finding was confirmed by Ki67 immunostaining on colonic mucosa tissue. 11G5-infected mice had higher numbers of proliferative epithelial cells in crypts than control mice and mice infected with AIEC strain LF82 (Figure 3E). This indicates that colonic mucosa cells undergo accelerated proliferation in response to infection by B2 *E. coli* strain 11G5 associated with colon cancer.

DISCUSSION

Accumulating evidence supports the involvement of infectious agents in the development of cancer, especially in organs that are continuously exposed to microorganisms such as the colon. Remodeling of the colonic microbiota due to environmental changes is thought to contribute to the pathogenesis of colon cancer by suppressing the growth of cancer-protective bacterial species and allowing the emergence or expansion of bacterial species with oncogenic potential. It has been suggested that the role of *E. coli* in CRC promotion and development is linked to chronic inflammation, which can result from bacterial infection *via* its effects on both the host and the microbiota, in particular that of promoting the expansion of certain bacteria, such as pro-inflammatory *E. coli*^[37] or ETBF^[38,39]. In parallel, two different studies have reported that between 71% and 82% of patients with colonic adenoma or carcinoma^[10,12] are highly colonized by mucosa-associated *E. coli* compared to controls. The aim of the present study was to provide further insight into the characterization of the *E. coli* colonizing the mucosa of colon cancer patients.

It is well documented that B2 *E. coli* harbors genes coding for cyclomodulins such as colibactin, which is encoded by the *pks* genomic island, CDT, CNF or Cif, which can act as genotoxic agents and/or can modulate cellular differentiation, apoptosis, and proliferation^[13,40,41]. In the present study, we observed that 86% of cyclomodulin-positive *E. coli* isolated from colon cancer and diverticulosis specimens belonged to B2 phylogroup. Of interest, all but two *cnf* positive strains also harbored *pks* and all *cnf*- and *pks*-positive *E. coli* strains belonged to the B2 phylogroup. Our results are in good agreement with those reported by Arthur *et al.*^[3], who observed that 66.7% of patients with CRC and 20.8% of controls harbored *pks*-positive *E. coli*.

E. coli strains belonging to B2 phylogroup have a

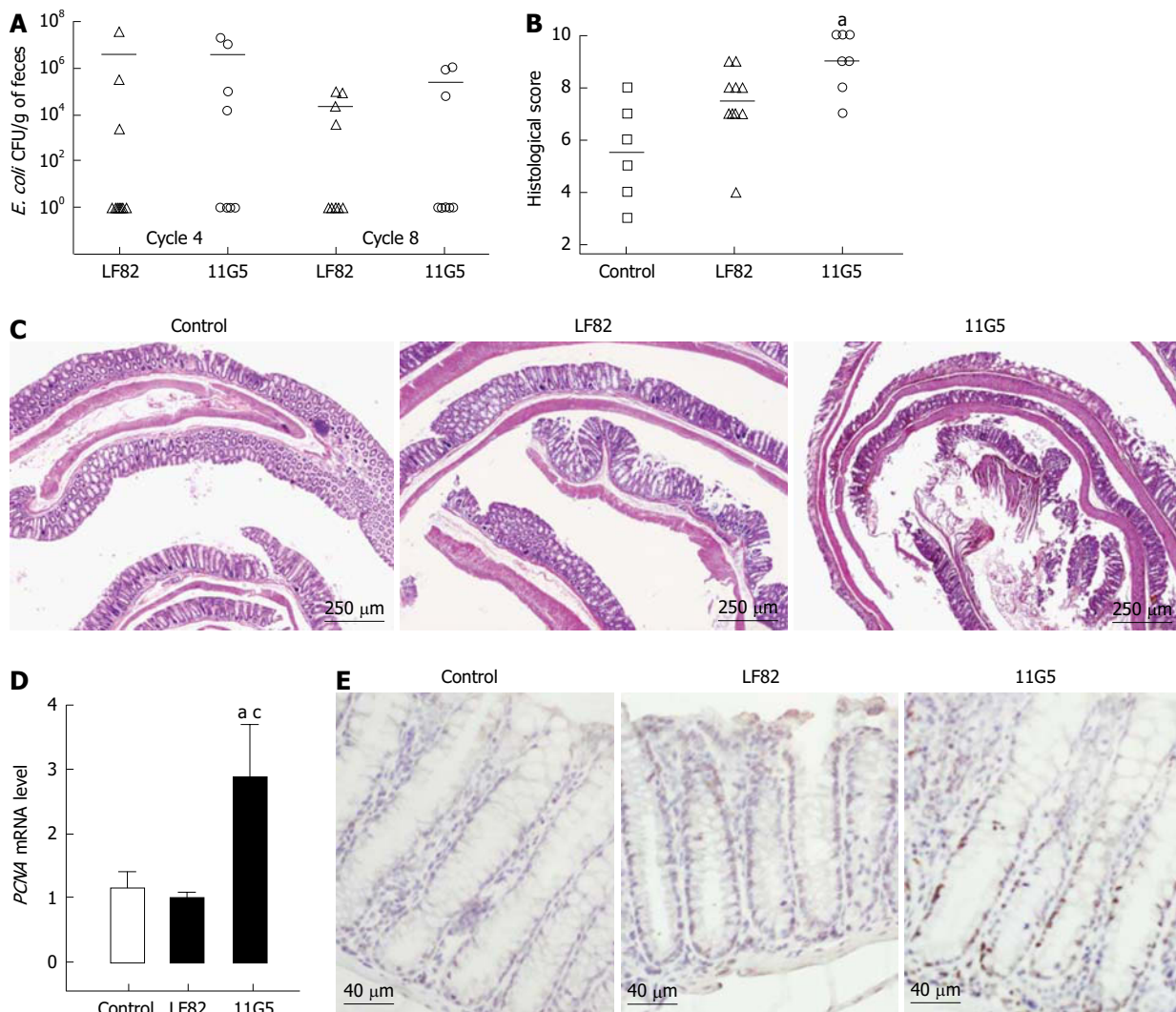


Figure 3 Impact of CEABAC10 mice colonization by B2 *Escherichia coli* strain on inflammation and cell proliferation. CEABAC10 mice transgenic for human CEACAMs, including CEACAM6, were subjected to 8 consecutive cycles of infection with AIEC LF82 or B2 phylogroup *Escherichia coli* (*E. coli*) strain 11G5. Control mice received PBS. A: Quantification of the number of bacteria in the feces of mice at cycle 4 and cycle 8; B: Histopathological scoring for several parameters of inflammation and epithelial damages (see Table 2) was performed at the end of the 8th cycle. ^a $P \leq 0.05$ vs control; $P = \text{NS}$ vs LF82; C: Hematoxylin/eosin/safran (HES) staining of colonic tissue sections; D: Total RNAs from colons were extracted at the end of the 8th cycle. PCNA and S26 mRNA levels were measured by RT-qPCR. PCNA amount relative to S26 is presented. ^a $P \leq 0.05$ vs control; ^b $P \leq 0.05$ vs LF82; E: Immunohistochemistry examination of Ki67 on colonic tissue sections. NS: Not significant.

greater ability to colonize the human gut, due, at least in part, to accumulation of genes encoding fitness factors such as pili and adhesins^[42,43]. In addition, an increased proportion of mucosa-associated *E. coli* expressing hemagglutinins was observed in CD patients (39%) and colon cancer patients (38%) compared to controls (4%), in correlation with the ability of bacteria to adhere to I-407 and HT-29 intestinal epithelial cells^[10]. However in our study, analysis of the adhesive abilities of B2 *E. coli* isolated from colon cancer or diverticulosis revealed that the strains were poorly adherent to I-407, even if the majority of them were able to form biofilm. However some B2 *E. coli* strains isolated from colon cancer induced increased expression of CEACAM6 to a level similar to that of AIEC strain LF82 associated with CD, indicating that colon cancer-associated *E. coli* could influence carcinogenesis, since CEACAM6 has been implicated in cel-

lular adhesiveness, invasiveness, and metastatic behavior of tumor cells^[30,44]. In addition, this result indicates that, in agreement with what we previously reported for AIEC strains isolated from CD patients^[28], colon cancer-associated *E. coli* strains could have the ability to promote their own colonisation since CEACAM6 serves as a receptor for mediating adherence and/or cell entry of pathogenic bacteria such as *Neisseria* bacteria^[45], diffusely-adhering *E. coli* (DAEC)^[46] or AIEC^[28].

Experiments of long-term colonization of CEABAC10 mice revealed that an *E. coli* strain isolated from colon cancer (strain 11G5) was able to persist in the gut of CEABAC10 transgenic mice expressing human CEACAMs, including CEACAM6 and to exacerbate colonic inflammation. Whether colonisation of the intestinal mucosa of colon cancer patients by B2 *E. coli* is a cause or a consequence of malignant transformation is a ques-

tion that has yet to be addressed. We show here that B2 phylogroup *E. coli* isolated from colon cancer increased the proliferative index of epithelial cells in crypts in the chronic infection model of CEABAC10 mice. This indicates that colonic mucosa cells undergo accelerated proliferation in response to infection by B2 *E. coli*. The ability to induce cell proliferation is a common trait of various pathogens involved in carcinogenesis. Indeed, *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces *c-myc* transcription and translation and persistent cellular proliferation ensues, mediated in part by β -catenin/T-cell factor-dependent transcriptional activation^[47]. Another example is *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), which increases the proliferation of gastric cancer cells. This process is dependent on the LPS-TLR4 pathway since *H. pylori* LPS induces the proliferation of gastric cancer cells and the use of neutralizing antibody against TLR4 almost completely abrogates the proliferative activities of cancer cells^[48]. Some cyclomodulins, such as CNF, which are mostly produced by B2 *E. coli*, induce epithelial cell proliferation^[49]. In our study the B2 *E. coli* strain 11G5 did not harbor the *cnf* genes and was able to promote cell proliferation as observed in infected CEABAC10 mice. This effect could be related to *E. coli*-derived LPS, which was previously reported to have a more remarkable cancer proliferative activity than *H. pylori*-derived LPS^[48]. Because *E. coli* inhabits the host colon as normal intestinal flora, owing to host tolerance toward *E. coli*, it is likely that *E. coli* LPS stimulates the host cellular immune response to prevent cancer progression. However, we can hypothesize that when too great a load of *E. coli* colonize the colonic mucosa, as observed in 11G5-infected CEABAC10 mice, potent tumor proliferative activity is no longer effectively repressed. The cell proliferation observed in 11G5-infected CEABAC10 mice could also result from the presence of colibactin. Colibactin with its genotoxic activity promotes DNA damages, which leads to carcinogenesis and cell proliferation.

In conclusion, B2 *E. coli* abnormally colonized the mucosa of colon cancer patients, indicating that microbiota remodeling had occurred promoting their expansion. Together with previous findings reported by Arthur *et al.*^[3], this study on a larger cohort of patients confirms the high prevalence of B2 *pks*-positive or *pks-cnf*-positive *E. coli* in colon cancer patients. The study also indicates that, these bacteria can promote low grade inflammation and cell proliferation, as shown in the CEABAC10 infected mouse model. Analyses to determine whether these bacteria take advantage of the tumor microenvironment to colonize the gut or promote their own colonization may be an important step in understanding their role in carcinogenesis and in the development of therapeutic strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Emmanuel Bourgeois for his help in immunohistochemical staining and Cécile Charpy for her help in their interpretation. We thank ICCF platforms from Université d'Auvergne for confocal microscopy.

COMMENTS

Background

Colorectal cancer (CRC) is one of the most prevalent cancers worldwide, and is the fourth leading cause of cancer death worldwide. Inflammation and changes in composition and function of gut microbial communities are suspected to be causative factors in the development of sporadic CRC.

Research frontiers

The authors and other researchers have reported abnormal colonization of tumors and mucosa of colon cancer patients by *Escherichia coli* (*E. coli*) belonging to B2 phylogroup.

Innovations and breakthroughs

To date, there has been a limited number of studies analyzing interaction of colon cancer-associated *E. coli* to intestinal epithelial cells. The authors showed that colon cancer-associated *E. coli* induce expression of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) receptor in intestinal epithelial cells, and that these bacteria were able to persist in a chronic infection model of CEACAM6 expressing mice and had oncogenic potential.

Applications

The authors have analyzed the ability of colon cancer-associated *E. coli* to colonize gut mucosa and influence carcinogenesis. Analyses to determine whether these bacteria take advantage of the tumor microenvironment to colonize the gut or promote their own colonization may be an important step in understanding their role in carcinogenesis and in the development of therapeutic strategies.

Terminology

CEACAM6 molecule serves as a receptor for mediating mucosa colonization by pathogenic bacteria.

Peer review

This study provides evidence supporting the hypothesis that colon cancer-associated *E. coli* are able to colonize gut mucosa and to induce cell proliferation in a mouse model with overexpression of human CEACAM6.

REFERENCES

- 1 **World Health Organization World.** WHO Global Malaria Programme. Switzerland: World Health Organization, 2011. Available from: URL: http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/9789241564403_eng.pdf
- 2 **Vogelstein B,** Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; **319**: 525-532 [PMID: 2841597 DOI: 10.1056/NEJM198809013190901]
- 3 **Arthur JC,** Perez-Chanona E, Mühlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, Fan TJ, Campbell BJ, Abujamel T, Dogan B, Rogers AB, Rhodes JM, Stintzi A, Simpson KW, Hansen JJ, Keku TO, Fodor AA, Jobin C. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 2012; **338**: 120-123 [PMID: 22903521 DOI: 10.1126/science.1224820]
- 4 **Mantovani A,** Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; **454**: 436-444 [PMID: 18650914 DOI: 10.1038/nature07205]
- 5 **Uronis JM,** Jobin C. Microbes and colorectal cancer: is there a relationship? *Curr Oncol* 2009; **16**: 22-24 [PMID: 19672421]
- 6 **Sears CL,** Pardoll DM. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. *J Infect Dis* 2011; **203**: 306-311 [PMID: 21208921 DOI: 10.1093/jinfdis/jiq061]
- 7 **Tjalsma H,** Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol* 2012; **10**: 575-582 [PMID: 22728587 DOI: 10.1038/nrmicro2819]
- 8 **Sobhani I,** Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, Corthier G, Tran Van Nhieu J, Furet JP. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One* 2011; **6**: e16393 [PMID: 21297998 DOI: 10.1371/journal.pone.0016393]
- 9 **Kostic AD,** Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F,

- Earl AM, Ojesina AI, Jung J, Bass AJ, Tabernero J, Baselga J, Liu C, Shivdasani RA, Ogino S, Birren BW, Huttenhower C, Garrett WS, Meyerson M. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012; **22**: 292-298 [PMID: 22009990 DOI: 10.1101/gr.126573.111]
- 10 **Martin HM**, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, Englyst H, Williams HF, Rhodes JM. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 2004; **127**: 80-93 [PMID: 15236175]
 - 11 **Maddocks OD**, Short AJ, Donnenberg MS, Bader S, Harrison DJ. Attaching and effacing *Escherichia coli* down-regulate DNA mismatch repair protein in vitro and are associated with colorectal adenocarcinomas in humans. *PLoS One* 2009; **4**: e5517 [PMID: 19436735 DOI: 10.1371/journal.pone.0005517]
 - 12 **Swidsinski A**, Khilkin M, Kerjaschki D, Schreiber S, Ortner M, Weber J, Lochs H. Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998; **115**: 281-286 [PMID: 9679033]
 - 13 **Nougayrède JP**, 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 [PMID: 16902142 DOI: 10.1126/science.1127059]
 - 14 **Wu S**, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, Huso DL, Brancati FL, Wick E, McAllister F, Housseau F, Pardoll DM, Sears CL. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med* 2009; **15**: 1016-1022 [PMID: 19701202 DOI: 10.1038/nm.2015]
 - 15 **Goodwin AC**, Destefano Shields CE, Wu S, Huso DL, Wu X, Murray-Stewart TR, Hacker-Prietz A, Rabizadeh S, Woster PM, Sears CL, Casero RA. Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced colon tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 15354-15359 [PMID: 21876161 DOI: 10.1073/pnas.1010203108]
 - 16 **Bernstein CN**, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* 2001; **91**: 854-862 [PMID: 11241255]
 - 17 **Ullman TA**, Itzkowitz SH. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* 2011; **140**: 1807-1816 [PMID: 21530747 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.01.057]
 - 18 **Martinez-Medina M**, Aldegue X, Gonzalez-Huix F, Acero D, Garcia-Gil LJ. Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Inflamm Bowel Dis* 2006; **12**: 1136-1145 [PMID: 17119388 DOI: 10.1097/01.mib.0000235828.09305.0c]
 - 19 **Frank DN**, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 13780-13785 [PMID: 17699621 DOI: 10.1073/pnas.0706625104]
 - 20 **Sokol H**, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottière HM, Doré J, Marteau P, Seksik P, Langella P. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 16731-16736 [PMID: 18936492 DOI: 10.1073/pnas.0804812105]
 - 21 **Swidsinski A**, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loeining-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; **122**: 44-54 [PMID: 11781279]
 - 22 **Mylonaki M**, Rayment NB, Rampton DS, Hudspith BN, Brostoff J. Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; **11**: 481-487 [PMID: 15867588]
 - 23 **Baumgart M**, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, Orsi RH, Wiedmann M, McDonough P, Kim SG, Berg D, Schukken Y, Scherl E, Simpson KW. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J* 2007; **1**: 403-418 [PMID: 18043660 DOI: 10.1038/ismej.2007.52]
 - 24 **Kotlowski R**, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* 2007; **56**: 669-675 [PMID: 17028128 DOI: 10.1136/gut.2006.099796]
 - 25 **Darfeuille-Michaud A**, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel JF. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998; **115**: 1405-1413 [PMID: 9834268]
 - 26 **Boudeau J**, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* 1999; **67**: 4499-4509 [PMID: 10456892]
 - 27 **Darfeuille-Michaud A**, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; **127**: 412-421 [PMID: 15300573]
 - 28 **Barnich N**, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantschke P, Allez M, Peeters H, Bommelaer G, Desreumaux P, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* 2007; **117**: 1566-1574 [PMID: 17525800 DOI: 10.1172/JCI30504]
 - 29 **Schölzel S**, Zimmermann W, Schwarzkopf G, Grunert F, Rogaczewski B, Thompson J. Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *Am J Pathol* 2000; **156**: 595-605 [PMID: 10666389 DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64764-5]
 - 30 **Kim KS**, Kim JT, Lee SJ, Kang MA, Choe IS, Kang YH, Kim SY, Yeom YI, Lee YH, Kim JH, Kim KH, Kim CN, Kim JW, Nam MS, Lee HG. Overexpression and clinical significance of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 in colorectal cancer. *Clin Chim Acta* 2013; **415**: 12-19 [PMID: 22975528 DOI: 10.1016/j.cca.2012.09.003]
 - 31 **Versalovic J**, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 6823-6831 [PMID: 1762913]
 - 32 **Wang G**, Whittam TS, Berg CM, Berg DE. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**: 5930-5933 [PMID: 8290354]
 - 33 **Bidet P**, Metais A, Mahjoub-Messai F, Durand L, Dehem M, Aujard Y, Bingen E, Nassif X, Bonacorsi S. Detection and identification by PCR of a highly virulent phylogenetic subgroup among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* B2 strains. *Appl Environ Microbiol* 2007; **73**: 2373-2377 [PMID: 17293507 DOI: 10.1128/AEM.02341-06]
 - 34 **Chassaing B**, Darfeuille-Michaud A. The oE pathway is involved in biofilm formation by Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2013; **195**: 76-84 [PMID: 23104802 DOI: 10.1128/JB.01079-12]
 - 35 **Chan CH**, Stanners CP. Novel mouse model for carcinoembryonic antigen-based therapy. *Mol Ther* 2004; **9**: 775-785 [PMID: 15194045 DOI: 10.1016/j.ymthe.2004.03.009]
 - 36 **Carvalho FA**, Barnich N, Sivignon A, Darcha C, Chan CH, Stanners CP, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease ad-

- herent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med* 2009; **206**: 2179-2189 [PMID: 19737864 DOI: 10.1084/jem.20090741]
- 37 **Mukhopadhyay I**, Hansen R, El-Omar EM, Hold GL. IBD-what role do Proteobacteria play? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; **9**: 219-230 [PMID: 22349170 DOI: 10.1038/nrgastro.2012.14]
- 38 **Sears CL**. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes. *Clin Microbiol Rev* 2009; **22**: 349-369, Table of Contents [PMID: 19366918 DOI: 10.1128/CMR.00053-08]
- 39 **Toprak NU**, Yagci A, Gulluoglu BM, Akin ML, Demirkalem P, Celenk T, Soyletir G. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin Microbiol Infect* 2006; **12**: 782-786 [PMID: 16842574 DOI: 10.1111/j.1469-0691.2006.01494.x]
- 40 **Nougayrède JP**, Taieb F, De Rycke J, Oswald E. Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends Microbiol* 2005; **13**: 103-110 [PMID: 15737728 DOI: 10.1016/j.tim.2005.01.002]
- 41 **Collins D**, Hogan AM, Winter DC. Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2011; **12**: 504-512 [PMID: 21067973 DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70186-8]
- 42 **Picard B**, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, Elion J, Denamur E. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* 1999; **67**: 546-553 [PMID: 9916057]
- 43 **Nowrouzian FL**, Adlerberth I, Wold AE. Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells. *Microbes Infect* 2006; **8**: 834-840 [PMID: 16483819 DOI: 10.1016/j.micinf.2005.10.011]
- 44 **Ilantzis C**, DeMarte L, Sreaton RA, Stanners CP. Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia* 2002; **4**: 151-163 [PMID: 11896570 DOI: 10.1038/sj.neo/7900201]
- 45 **Bos MP**, Grunert F, Belland RJ. Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Opa variants of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 1997; **65**: 2353-2361 [PMID: 9169774]
- 46 **Guignot J**, Hudault S, Kansau I, Chau I, Servin AL. Human decay-accelerating factor and CEACAM receptor-mediated internalization and intracellular lifestyle of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* in epithelial cells. *Infect Immun* 2009; **77**: 517-531 [PMID: 19015254 DOI: 10.1128/IAI.00695-08]
- 47 **Wu S**, Morin PJ, Maouyo D, Sears CL. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology* 2003; **124**: 392-400 [PMID: 12557145 DOI: 10.1053/gast.2003.50047]
- 48 **Chochi K**, Ichikura T, Kinoshita M, Majima T, Shinomiya N, Tsujimoto H, Kawabata T, Sugawara H, Ono S, Seki S, Mochizuki H. *Helicobacter pylori* augments growth of gastric cancers via the lipopolysaccharide-toll-like receptor 4 pathway whereas its lipopolysaccharide attenuates antitumor activities of human mononuclear cells. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 2909-2917 [PMID: 18483357 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4467]
- 49 **Le Bouguéneq C**, Lalioui L, du Merle L, Jouve M, Courcoux P, Bouzari S, Selvarangan R, Nowicki BJ, Germani Y, Andremonet A, Gounon P, Garcia MI. Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 1738-1745 [PMID: 11325983 DOI: 10.1128/JCM.39.5.1738-1745.2001]
- 50 **Bernier C**, Gounon P, Le Bouguéneq C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infect Immun* 2002; **70**: 4302-4311 [PMID: 12117939]
- 51 **Dubois D**, Delmas J, Cady A, Robin F, Sivignon A, Oswald E, Bonnet R. Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 2122-2129 [PMID: 20375237 DOI: 10.1128/JCM.02365-09]

P- Reviewers: Bommireddy R, De Nardi P, Kurniali PC, Lee KY
S- Editor: Ma YJ **L- Editor:** A **E- Editor:** Wang CH



Commentaires de la publication n°1**Capacité d'interaction des *E. coli* associés au CCR avec les cellules épithéliales intestinales.**

Nous avons montré que des souches d'*E. coli* appartenant au phylogroupe B2 productrices de génotoxines/cyclomodulines (et plus particulièrement les souches hébergeant l'îlot génomique *pks* et les gènes *cnf*) sont présentes chez 89,5% des patients atteints de CCR, contre 30,3% de patients atteints de diverticulose. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus par l'équipe du Professeur Christian Jobin (Arthur *et al.*, 2012).

Il est décrit que la plupart des souches d'*E. coli* appartenant au phylogroupe B2 exprime des facteurs d'adhésion (fimbriae, adhésines) leur conférant un pouvoir de colonisation de l'épithélium intestinal. L'analyse de l'interaction des *E. coli* B2, isolés de patients atteints de CCR et de patients diverticulose, avec les cellules épithéliales intestinales I-407 a révélé que ces souches présentent de faibles capacités d'adhésion et d'invasion comparativement à la souche d'*E. coli* adhérente et invasive (AIEC) de référence LF82 associée à la maladie de Crohn (MC). De plus, ces souches d'*E. coli* associées au CCR, sauf une, ne possèdent aucune des adhésines (AFA, AFA/DR, intimine, et AAF) décrites chez les autres pathovars d'*E. coli* DAEC et EPEC. Cependant, nous avons observé que la plupart des *E. coli* B2 associées au CCR sont capables de former des biofilms sur cellules épithéliales intestinales et sur surface abiotique, ce qui pourrait leur conférer un pouvoir de colonisation de l'épithélium intestinal.

Les souches d'*E. coli* B2 isolés de patients atteints de CCR induisent l'expression du récepteur CEACAM6 à un niveau similaire à celui observé pour la souche AIEC LF82 associée à la MC. Le récepteur CEACAM6 est impliqué dans l'adhésion de bactéries pathogènes telles que les bactéries appartenant au genre *Neisseria*, les DAEC et les AIEC (Barnich *et al.*, 2007; Bos *et al.*, 1997; Guignot *et al.*, 2009). Ces résultats indiqueraient donc que les souches d'*E. coli* associées au CCR pourraient favoriser leur propre colonisation via l'induction de l'expression de CEACAM6. Par ailleurs, CEACAM6 étant décrit pour être impliqué dans l'adhésion cellulaire, l'invasion et la formation de métastases (Ilantzis *et al.*,

2002; Kim *et al.*, 2013a), ceci suggère que la capacité des *E. coli* associés au CCR à induire l'expression de CEACAM6 pourrait influencer la carcinogenèse colorectale.

Etude du potentiel pro-inflammatoire et pro-tumoral de souches d'*E. coli* associées au CCR en modèle murin transgénique pour le récepteur CEACAM6 humain.

Nous avons analysé la capacité de la souche d'*E. coli* 11G5 isolée d'un patient atteint de CCR à coloniser la muqueuse intestinale de souris CEABAC10, transgéniques pour des molécules CEACAMs humaines dont le récepteur CEACAM6. Le dénombrement des bactéries dans les fèces a permis de démontrer que la souche 11G5 est capable de coloniser rapidement la muqueuse intestinale des souris CEABAC10 et de persister, contrairement à un *E. coli* K-12 non pathogène. A l'issue de l'expérience, aucun polype n'a pu être détecté dans les côlons des souris infectées par la souche d'*E. coli* 11G5. En revanche, comme le montrent les scores histologiques d'inflammation et de dommages épithéliaux ainsi que l'analyse des transcrits de cytokines pro-inflammatoires, la souche 11G5 exerce une activité pro-inflammatoire similaire à celle observée pour la souche d'*E. coli* LF82 associée à la MC.

La souche 11G5 associée au CCR est également capable d'augmenter l'indice de prolifération de l'épithélium des souris infectées comme en témoignent l'augmentation de l'expression des marqueurs de prolifération PCNA, par RT-qPCR, et Ki-67, par immunohistochimie, au niveau de la muqueuse intestinale des animaux infectés par la souche d'*E. coli* 11G5, comparativement aux animaux non infectés ou infectés avec la souche AIEC LF82.

Ces résultats suggèrent que les souches d'*E. coli* associées au CCR pourraient participer à la mise en place d'un environnement inflammatoire et l'établissement d'un épithélium hyperprolifératif. D'autres pathogènes associés à des cancers gastro-intestinaux induisent également la prolifération cellulaire. En effet, les *Bacteroides fragilis* entérotoxigènes induisent l'expression de l'oncogène *c-myc*, celle-ci étant associée à une augmentation de la prolifération cellulaire dépendante notamment de l'activation du facteur de transcription β -caténine (Wu *et al.*, 2003). Un autre exemple est celui d'*Helicobacter pylori*. Ce pathogène est impliqué dans la prolifération des cellules gastriques cancéreuses suite à l'activation du récepteur TLR4 par le LPS (Chochi *et al.*, 2008). Par ailleurs, plusieurs

cyclomodulines telles que CNF, produites principalement par les *E. coli* B2 sont capables d'induire la prolifération cellulaire (Nougayrède *et al.*, 2005). La souche d'*E. coli* B2 11G5 utilisée dans notre étude ne possède pas le gène codant la cyclomoduline CNF et est capable d'induire la prolifération cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal de souris CEABAC10. Cet effet pourrait être imputé au LPS dérivé d'*E. coli*, qui a précédemment été décrit comme ayant une activité proliférative supérieure à celle observée pour le LPS d'*H. pylori* (Chochi *et al.*, 2008). La prolifération cellulaire colique observée en modèle murin CEABAC10 suite à l'infection par la souche 11G5 pourraient également indirectement résulter de l'expression de la colibactine (Cougnoux *et al.*, 2014; Cuevas-Ramos *et al.*, 2010; Nougayrède *et al.*, 2006; Secher *et al.*, 2013).

Ce travail a permis de confirmer, sur une nouvelle cohorte de patients, la colonisation de la muqueuse et des tumeurs coliques de patients par des souches d'*E. coli* appartenant au phylogroupe B2 et produisant des génotoxines/cyclomodulines, précédemment observée par l'équipe du Pr. Jobin. Nous avons également montré que les *E. coli* associés au CCR ont des propriétés pro-inflammatoires et sont capables d'induire la prolifération cellulaire en modèle murin CEABAC10, suggérant que ces bactéries pourraient participer à l'établissement d'un épithélium hyperprolifératif. L'identification des mécanismes moléculaires mis en jeu dans la colonisation des tissus (muqueuses et tumeurs) coliques par *E. coli* devrait permettre de mieux comprendre l'implication de ces bactéries dans la carcinogenèse colorectale et d'ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques.

Partie 2 :

Réplication intramacrophagique de souches d'*Escherichia coli* associées au cancer du côlon et expression de la cyclo-oxygénase pro-tumorale COX-2.

Publication n°2

Intracellular persistence of colon cancer-associated *Escherichia coli* promotes pro-tumor activities of human macrophages by inducing sustained COX-2 expression.

Jennifer Raisch, Nathalie Rolhion, Anaëlle Dubois, Arlette Darfeuille-Michaud*, and Marie-Agnès Bringer*. (* Contribution équivalente des auteurs). Article en préparation.

Introduction à la publication n°2

Les macrophages représentent la population majoritaire de l'infiltrat inflammatoire tumoral. Sous l'influence de signaux présents au sein du microenvironnement tumoral, les macrophages peuvent faire l'objet de reprogrammations transcriptionnelles pouvant conduire à la sécrétion de molécules aux propriétés oncogéniques (Erreni *et al.*, 2011). Parmi ces molécules, PGE₂ joue un rôle majeur dans l'orchestration de l'activité pro-tumorale des macrophages. Le niveau de sécrétion de PGE₂ au site tumoral est corrélé à celui de son enzyme de synthèse, COX-2. Le rôle de COX-2 dans le CCR est supporté par de nombreux arguments épidémiologiques et expérimentaux. En effet, son expression est élevée dans 50% des adénomes colorectaux et 85% des adénocarcinomes de patients (Eberhart *et al.*, 1994). Un autre argument est l'efficacité des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et d'inhibiteurs spécifiques de COX-2 (COXIB) à réduire la taille et le nombre de tumeurs chez les patients atteints de polypose adénomateuse familiale (PAF) et dans des modèles animaux de carcinogénèse intestinale (Oshima *et al.*, 1996; Steinbach *et al.*, 2000).

Les tumeurs et la muqueuse colique de patients atteints de CCR sont anormalement colonisées par des souches d'*E. coli* de phylogroupe B2 produisant des génotoxines/cyclomodulines (Arthur *et al.*, 2012; Buc *et al.*, 2013). Notre hypothèse est que ces bactéries, en tant qu'entité du microenvironnement tumoral, pourraient participer à une reprogrammation des macrophages pour exprimer des fonctions pro-tumorales. L'objectif de cette étude était d'analyser la capacité des *E. coli* B2 isolés de CCR à résister à l'activité bactéricide des macrophages et à induire l'expression du facteur pro-tumoral COX-2 par les macrophages



Intracellular colon cancer-associated *Escherichia coli* promote pro-tumoral activities of human macrophages by inducing sustained COX-2 expression

Journal:	<i>Cellular Microbiology</i>
Manuscript ID:	CMI-14-0138
Manuscript Type:	Research article
Date Submitted by the Author:	13-May-2014
Complete List of Authors:	Raisch, Jennifer; UMR1071 Inserm-Université Auvergne; INRA USC2018, M2iSH Rolhion, Nathalie; MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection, Imperial College of London, Section of Microbiology Dubois, Anaëlle; UMR1071 Inserm-Université Auvergne; INRA USC2018, M2iSH Darfeuille-Michaud, Arlette; UMR1071 Inserm-Université Auvergne; INRA USC2018, M2iSH Bringer, Marie-Agnès; UMR1071 Inserm-Université Auvergne; INRA USC2018, M2iSH
Key Words:	Diseases, Enterobacteria, Infection, Microbial-cell interaction

Intracellular colon cancer-associated *Escherichia coli* promote pro-tumoral activities of human macrophages by inducing sustained COX-2 expression

Jennifer Raisch¹, Nathalie Rolhion², Anaëlle Dubois¹, Arlette Darfeuille-Michaud^{1*} and Marie-Agnès Bringer^{1*}

¹ M2iSH, UMR 1071 Inserm/University of Auvergne, Clermont-Ferrand, France; INRA USC 2018, Clermont-Ferrand, France; Centre Hospitalier Universitaire, Clermont-Ferrand, France.

² Section of Microbiology, MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection, Imperial College London, London, United Kingdom.

Running title: Colon cancer associated-*E. coli* induce COX-2

* Correspondence footnote :
e-mail: m-agnes.bringer@udamail.fr; arlette.darfeuille-michaud@udamail.fr
Tel: (+33) 4 73 17 83 72; Fax: (+33) 4 73 17 83 71.

Summary

Macrophages are one of the predominant tumor-infiltrating immune cells supporting key processes in tumor progression by producing pro-tumoral factors such as COX-2. Here, we analysed the interaction of B2 phylogroup *E. coli* strains isolated from colon cancer patients with macrophages and the subsequent COX-2 expression. Colon cancer-associated *E. coli* were able to resist killing by human THP-1 macrophages and induced COX-2 expression and PGE2 secretion to levels significantly higher than those induced by the B2 commensal *E. coli* ED1a strain. Induced-COX-2 expression by colon cancer-associated *E. coli* was not due to colibactin production, since we observed similar COX-2 levels in macrophages infected with the wild-type 11G5 strain or a *clbQ* mutant unable to produce colibactin. Treatment of macrophages with ofloxacin, an antibiotic with intracellular tropism, efficiently decreased the number of intracellular bacteria and suppressed bacteria-induced COX-2 expression. In addition, the p38 MAPK signalling pathway was involved in the control of the number of intracellular bacteria and in COX-2 expression. In conclusion, intramacrophagic colon cancer-associated *E. coli* induce COX-2 expression. Thus, manipulation of microbes associated to tumors could have a deep influence on the secretion of pro-tumoral molecules by infiltrated macrophages.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is one of the most commonly diagnosed malignancies worldwide, making it the fourth most common cause of cancer deaths throughout the world (Ferlay *et al.*, 2012). CRC is a heterogeneous disease, including at least three major forms: hereditary, sporadic and colitis-associated CRC. A large body of evidence indicates that genetic mutations, epigenetic changes, chronic inflammation, diet and lifestyle deeply impact on CRC onset (Rasool *et al.*, 2013; Huxley *et al.*, 2009). In addition to these factors, gut microbiota dysbiosis has been reported in CRC patients (Irrazabal *et al.*, 2014; Sears and Garrett, 2014; Dejea *et al.*, 2013; Zackular *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013; Sobhani *et al.*, 2011). Recent pyrosequencing analysis of CRC-associated bacterial microbiota have revealed dysbiosis with, in particular, over-representation of *Fusobacterium* and *Bacteroides* (Kostic *et al.*, 2013; Castellarin *et al.*, 2012; Kostic *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2009; Toprak *et al.*, 2006). In addition, our group and others have shown that colonic adenomas, carcinomas and the mucosa of CRC patients are abnormally colonized by *Escherichia coli* belonging to the B2 phylogroup, with a high prevalence of *E. coli* producing a genotoxin, termed colibactin, encoded by the *pks* genomic island (Buc *et al.*, 2013; Arthur *et al.*, 2012; Maddocks *et al.*, 2009; Nougayrede *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2004; Swidsinski *et al.*, 1998). It has been recently demonstrated that cells that survive infection with colibactin-producing *E. coli* display hallmarks of cellular senescence accompanied with production of reactive oxygen species and secretion of pro-inflammatory cytokines, chemokines and proteases, inducing bystander genotoxic and oncogenic effects (Cognoux *et al.*, 2014 ; Secher *et al.*, 2013).

Macrophages are one of the predominant components of murine and human tumor-infiltrating cells. By integrating signals present in the tumor microenvironment, macrophages acquire a new transcriptional program leading to secretion of the molecules displaying pro-

1
2
3 tumoral activities and hence supporting the key processes in tumor progression, including
4
5 proliferation and survival of cancer cells, angiogenesis, immunosuppression, invasion, and
6
7 metastasis (Qian and Pollard, 2010; Sica *et al.*, 2008). Among these molecules, prostaglandin
8
9 E2 (PGE2) is one of the major actors that orchestrate the pro-tumoral response of
10
11 macrophages (Wu *et al.*, 2010; Wang and DuBois, 2008). Elevated PGE2 biosynthesis in
12
13 tumor results from up-regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2). Role of COX-2 in CRC is
14
15 particularly supported by its elevated expression found in approximately 50% of adenomas
16
17 and 85% of adenocarcinomas (Eberhart *et al.*, 1994), its association with worse survival
18
19 among CRC patients (Ogino *et al.*, 2008), and the efficiency of non-steroidal anti-
20
21 inflammatory drugs (NSAIDs) and selective COX-2 inhibitors (COXIBs) to reduce the
22
23 occurrence of sporadic CRC, and the number and size of adenomas in familial adenomatous
24
25 polyposis patients and in *APC* knockout mice (Wang and Dubois, 2010). COX-2 expression is
26
27 regulated at both transcriptional and post-transcriptional levels and mitogen-activated proteins
28
29 kinases (MAPKs) regulation have been reported to play a key role in regulation of COX-2
30
31 expression (Dixon *et al.*, 2013; Young and Dixon, 2010; Chun and Surh, 2004).
32
33
34
35

36 In the present study, we hypothesized that B2 *E. coli* colonizing colon cancer tumors
37
38 could influence pro-tumoral activities of macrophages. We showed that colon cancer-
39
40 associated *E. coli* survive and replicate within human macrophages and that intracellular
41
42 bacteria induce COX-2 expression. We identified the p38 MAPK signalling pathway as a
43
44 target to control the number of intracellular bacteria within macrophages and to limit
45
46 expression of the pro-tumoral factor COX-2.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Results

Colon cancer-associated *E. coli* strains survive and replicate within human macrophages.

The ability of 19 strains of colon cancer-associated *E. coli* belonging to B2 phylogroup to resist killing by macrophage was assessed in human monocyte-derived THP-1 macrophages and compared to that of the non-pathogenic intestinal B2 *E. coli* ED1a strain. The numbers of intracellular bacteria were determined at 1h and 24h post-infection (**Figure 1A** and **1B**). No statistically significant difference was observed in the numbers of intracellular B2 *E. coli* at 1h post-infection indicating similar internalization rates of bacteria within macrophages ($p=0.97$; **Figure 1A**). In contrast to the non-pathogenic *E. coli* ED1a strain, which was efficiently killed by macrophages, 16/19 (84%) colon cancer-associated *E. coli* strains were able to survive and/or replicate within macrophages with percentages of intracellular bacteria at 24h compared to 1h post-infection, considered as 100%, ranging from $137.30\% \pm 7.67\%$ to $746.90\% \pm 334.70\%$ (**Figure 1B**). This result was confirmed by confocal microscopic examination of infected macrophages. At 24h post-infection, high numbers of intracellular bacteria were observed within macrophages infected with the *E. coli* 11G5, 10D12 and 16C1 strains, whereas only few bacteria were observed within *E. coli* ED1a strain-infected cells (**Figure 1C**). Analysis of *E. coli* 11G5, 10D12 and 16C1 strains-infected macrophages by transmission electron microscopy revealed the existence of two types of bacteria-containing compartments, one containing only a few bacteria and another containing numerous bacteria (**Figure 2**). Survival of colon cancer-associated *E. coli* within THP-1 macrophages did not induce apoptosis as revealed by absence of cleaved Caspase-3 and PARP-1 in infected macrophages at 24h post-infection (**Figure 1D**). Cleaved Caspase-3 and PARP-1 were detected in macrophages incubated with staurosporin, an inducer of apoptosis (**Figure 1D**).

Colon cancer-associated *E. coli* bacteria induce COX-2 expression in human macrophages.

We examined whether colon cancer-associated *E. coli* strains are able to modulate COX-2 expression and, as a consequence, PGE2 secretion. For this, we focused on three colon cancer-associated *E. coli* strains displaying strong ability to survive within macrophages: 11G5, 10D12 and 16C1. As shown in **Figure 3A** and **3B**, these strains induced COX-2 expression and PGE2 secretion in THP-1 macrophages to levels significantly higher than those induced by the non-pathogenic *E. coli* ED1a strain (COX-2, 11G5: $p=0.031$, 10D12: $p=0.015$ and 16C1: $p=0.015$; PGE2, 11G5: $p=0.008$, 10D12: $p=0.008$ and 16C1: $p=0.039$). In addition, we showed that macrophages treated with gentamicin- and heat-killed colon cancer-associated *E. coli* 11G5, 10D12 and 16C1 strains produced significantly less amount of COX-2 than macrophages infected with live bacteria ($p<0.05$; **Figure 3C**), indicating that live bacteria are required to induce COX-2 expression.

The TLR4-dependent signalling pathways have been involved in induction of COX-2 expression by the uropathogenic *E. coli* J96 strain (Chen *et al.*, 2011). We investigated whether induced COX-2 expression by colon cancer-associated *E. coli* results from extracellular activation of TLR4 signalling and/or from stimulation by intracellular bacteria. Macrophages prepared from wild type mice and TLR4 knock-out mice and infected with the colon cancer-associated *E. coli* 11G5 strain expressed similar levels of COX-2 ($p=0.33$; **Figure 3D**). In addition, no significant modification of COX-2 expression was observed in 11G5-infected THP-1 macrophages treated with TLR4-neutralizing antibodies compared to those treated with isotype control antibodies (**Figure 3E**), indicating that the *E. coli* 11G5 strain induces COX-2 expression in a TLR4-independent manner.

By infecting cells with the colon cancer-associated *E. coli* 11G5, 10D12 and 16C1 strains at different MOI, we showed that the level of COX-2 expression was highly correlated with the load of intracellular bacteria in THP-1 macrophages at 24h post-infection (11G5, $r=0.9333$; 10D12, $r=0.9167$; 16C1, $r=0.9833$) (**Figure 4A, 4B and 4C**). We analysed whether the induction of COX-2 expression by these strains could be suppressed by pharmacologically reducing the intracellular bacterial load in infected macrophages. Human THP-1 macrophages were treated at 6h post-infection with ofloxacin, a fluoroquinolone antibiotic able to penetrate eukaryotic cells and thus to target intracellular bacteria. Decrease in intracellular bacterial load by ofloxacin treatment were associated with significant reduction of COX-2 expression ($p=0.05$; **Figures 4D and 4E**). Ofloxacin treatment did not modify COX-2 expression induced by LPS stimulation in THP-1 cells (**Figure S1**). Altogether, these results demonstrated that COX-2 expression in infected THP-1 macrophages is related to the presence of alive intracellular colon cancer-associated *E. coli* and that antibiotic treatment could efficiently suppress COX-2 expression by reducing intracellular bacterial load.

Colibactin is not involved in the induction of COX-2 expression by colon cancer-associated *E. coli*.

As the *E. coli* 11G5, 10D12 and 16C1 strains harbor the *pks* genomic island encoding colibactin and as colibactin-producing *E. coli* have been shown to induce inflammation and oxidative stress as a consequence of senescence promotion (Raisch *et al.*, in press; Cougnoux *et al.*, 2014; Secher *et al.*, 2013), we generated an *E. coli* 11G5 mutant strain unable to produce colibactin, by deleting *clbQ*, and analysed its ability to survive within macrophages and to induce COX-2 expression. Similar levels of intracellular wild-type 11G5 and 11G5 $\Delta clbQ$ bacteria were observed in THP-1 macrophages at 1h and 24h post-infection ($p=0.75$; **Figure 5A**). In addition, deletion of *clbQ* did not significantly modify the level of

COX-2 expression induced by 11G5 bacteria ($p=0.50$; **Figure 5B**). These results indicate that the ability of the *E. coli* 11G5 strain to resist killing by macrophage and to promote COX-2 expression is independent of colibactin production.

Intracellular number of colon cancer-associated *E. coli* and bacteria-induced COX-2 expression are controlled by p38 MAPK

MAPK signalling pathways have been involved in transcriptional regulation of COX-2 expression (Brown and DuBois, 2005). The colon cancer-associated *E. coli* 11G5, 10D12 and 16C1 strains induced phosphorylation of JNK and p38 MAPKs, indicating activation of these signalling pathways (**Figure 6A**). No activation of ERK signalling pathway was observed (**Figure 6A**). To determine the contribution of JNK and p38 MAPK signalling pathway in the bacteria-induced COX-2 expression and in the intracellular persistence of colon cancer-associated *E. coli*, THP-1 macrophages were incubated with specific inhibitors of JNK (SP600125) and p38 (SB203580) after the infection period. These treatments had no effect on cell viability (**Figure S2**). COX-2 expression was decreased in macrophages treated with specific inhibitors of p38 and JNK signalling pathways and infected with the 11G5, 10D12 and 16C1 strains (**Figure 6B**). Interestingly, significant decrease in the number of intracellular colon cancer-associated bacteria was observed at 24h post-infection only when p38, but not JNK, signalling pathway was inhibited (**Figure 6C**). Altogether, these results indicate that the p38 MAPK signalling pathway controls both numbers of intracellular bacteria and expression of the pro-tumoral factor COX-2 in THP-1 macrophages infected with colon cancer-associated *E. coli*.

Discussion

Macrophages are one of the most predominant tumor-infiltrating cell types and their role in cancer progression has been firmly established. By secreting a variety of factors including COX-2/PGE2, macrophages promote key steps of carcinogenesis. Acquisition of pro-tumoral function by macrophages is directly influenced by tumor micro-environment. As several independent studies have reported high colonization by *E. coli* of adenomas and carcinomas in colon cancer patients (Buc *et al.*, 2013; Arthur *et al.*, 2012; Maddocks *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2004; Swidsinski *et al.*, 1998), we have analysed the effect of such a microbial environmental factor on COX-2 expression in human macrophages.

Phagocytic uptake of pathogens by macrophages results in the formation of vacuoles that rapidly evolve into bactericidal organelles termed phagolysosomes through interactions with vesicles of the endosomal system. Pathogens often use phagocytic cells, in particular macrophages, to gain access to an intracellular niche where they can survive and replicate (Stein *et al.*, 2012; Thi *et al.*, 2012; Kumar and Valdivia, 2009). Shortly after internalization, many intracellular pathogens hijack the intracellular defense mechanisms to either subvert or delay the maturation process (e.g., *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica* Typhimurium, *Brucella abortus* and *Legionella pneumophila*), or to escape from their vacuoles (e.g., *Shigella flexneri* and *Listeria monocytogenes*), and induce macrophage apoptosis (Friedrich *et al.*, 2012; Kumar and Valdivia, 2009). In the present study, we showed that the great majority of B2 *E. coli* strains isolated from colon cancer patients are able to survive and to replicate within human macrophages and do not induce apoptosis. Interestingly, we demonstrated that the p38 MAPK signalling pathway is involved in the control of intracellular bacteria. Indeed, specific inhibition of p38 signalling pathway, but not that of JNK induced a decrease in the number of intracellular colon cancer-associated *E. coli*.

1
2
3 It could be speculated that colon cancer-associated *E. coli* hijack the p38 MAPK signalling
4 pathway to create an intracellular niche where they can survive and replicate. MAPKs are
5 involved in membrane trafficking, and thus control key steps of phagolysosome biogenesis
6 (Marjuki *et al.*, 2011; Fratti *et al.*, 2003; Cavalli *et al.*, 2001) and regulate autophagy pathway
7 (Webber and Tooze, 2010; Corcelle *et al.*, 2007). Some intracellular pathogens hijack MAPK
8 signalling pathways in favor of their survival. For example, intracellular replication of
9 *Mycobacterium avium* is enhanced by p38 activation, whereas ERK activation has the
10 opposite effect (Klug *et al.*, 2011). Activation of p38 plays a role in EEA1 exclusion, an early
11 endosomal protein, from *Mycobacterium tuberculosis* phagosomes and in inhibiting the
12 maturation of mycobacterial phagosomes (Fratti *et al.*, 2003). Dependence of the survival of
13 *Brucella melitensis* on p38 and JNK activation has also been reported (Dimitrakopoulos *et al.*,
14 2013).

15
16 In macrophages infected with colon cancer-associated *E. coli*, two kinds of vacuoles
17 were observed, one containing a few bacteria and another containing numerous bacteria.
18 Heterogeneity of intracellular bacterial population has already been reported for *Salmonella*
19 (Helaine *et al.*, 2014; Helaine *et al.*, 2010). Indeed, upon entry into macrophages, some
20 *Salmonella* do not replicate and enter a dormant-like state. It is speculated that these living
21 non-replicating bacteria could represent a reservoir of persistent bacteria. Besides, some
22 intracellular pathogens have adapted to resist the harsh conditions in the phagolysosomes
23 (e.g., Crohn's disease-associated *E. coli*) (Bringer *et al.*, 2006), and may require lysosomal or
24 autophagosomal interactions to facilitate the delivery of nutrients ensuring their intracellular
25 survival and growth (e.g., *Brucella abortus* and *Yersinia*) (Starr *et al.*, 2012; Moreau *et al.*,
26 2010).

27
28 COX-2 expression is low and undetectable in normal cells and is induced in response
29 to various stimuli (Brown and DuBois, 2005). Elevated COX-2 expression is found in most
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

colon cancer tissues and is associated with worse survival among CRC patients (Wang and Dubois, 2010). We reported here that infection of human macrophages with colon cancer-associated *E. coli* strains induces COX-2 expression to a level significantly higher than that observed in macrophages infected with the commensal *E. coli* ED1a strain. Bacteria need to be alive to induce COX-2 expression, and the induced COX-2 expression level was correlated with the intracellular bacterial number. Induction of COX-2 expression by other pathogens associated with gastrointestinal cancer has been reported. For example, *Helicobacter pylori*, a persistent colonizer of the human stomach classified as carcinogen class I, and *Bacteroides fragilis*, a human anaerobic enterotoxinogen bacteria with oncogenic capabilities, induce COX-2 expression through production of toxins (Hisatsune *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006). In addition, tumors of *Apc*^{Min/+} mice infected with *Fusobacterium nucleatum* and human fusobacteria-positive colorectal carcinomas highly expressed COX-2 (Kostic *et al.*, 2013). Induction of COX-2 expression by pathogenic *E. coli* has also been reported. Uropathogenic *E. coli* stimulate COX-2 expression through activation of the pathogen recognition receptor TLR4 by type 1 pili expressed by bacteria (Chen *et al.*, 2011). We reported here that induction of COX-2 expression by colon cancer-associated *E. coli* does not require TLR4 since similar COX-2 levels were observed in TLR4^{-/-} and wild-type infected macrophages. Cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF), a toxin produced by some isolates of *E. coli* that cause extra-intestinal infections, stimulates COX-2 expression *via* a RhoA-dependent signalling pathway (Thomas *et al.*, 2001). PCR analysis of the colon cancer-associated *E. coli* 11G5, 10D12 and 16C1 strains revealed that they do not possess genes encoding CNF. However, these strains harbor the *pks* genomic island encoding colibactin, a genotoxin that has been associated with pro-tumoral properties of *E. coli* strains isolated from patients with colon cancer (Arthur *et al.*, 2012). Colibactin triggers senescence in host cells, and this is notably accompanied by production of reactive oxygen species and secretion of pro-inflammatory cytokines and

chemokines (Cougnoux *et al.*, 2014; Secher *et al.*, 2013). Deletion of *clbQ* gene, which impaired colibactin synthesis, had no effect on induction of COX-2 expression by the colon cancer-associated *E. coli* 11G5, 10D12 and 16C1 strains in macrophages, indicating that B2 *E. coli* strains associated with colon cancer can promote pro-tumoral response independently of colibactin production.

Increased levels of COX-2 in macrophages have been reported in human CRC and mouse models of CRC (Hull *et al.*, 2006; Brown and DuBois, 2005; Hardwick *et al.*, 2001; Bamba *et al.*, 1999; Hull *et al.*, 1999). COX-2 expression is regulated both at the transcriptional and post-transcriptional levels, and the signalling pathways involved in COX-2 transcriptional regulation include NF- κ B, PI3K/AKT, GSK/ β -catenin and MAPKs (Wang and Dubois, 2010). High expression of active MAPKs has been observed in the stroma of human colonic adenomatous polyps (Hardwick *et al.*, 2001). Involvement of MAPK signalling pathways in induction of COX-2 expression by colon cancer-associated *E. coli* was revealed by decrease in COX-2 level upon selective inhibition of these signalling pathways. Involvement of pro-inflammatory signalling pathways in COX-2 transcriptional induction by pathogens has been previously reported. Stimulation of COX-2 expression by *Helicobacter pylori* involves activation of p38 MAPK and PKC/c-Src/NF- κ B signalling pathways in human gastric cancer cells (Hisatsune *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2004). *Bacteroides fragilis* enterotoxin increases COX-2 expression in a NF- κ B-dependent manner in human intestinal epithelial cells (Kim *et al.*, 2006). In addition, ERK, JNK and p38 MAPKs are critical for uropathogenic *E. coli*-induced COX-2 expression in bladder epithelial cells (Chen *et al.*, 2011).

In conclusion, colon cancer-associated *E. coli* strains belonging to B2 phylogroup are able to resist killing by macrophages, and the presence of intracellular bacteria stimulates COX-2 expression. We identified the p38 MAPK signalling pathway as a target to control the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

number of intracellular colon cancer-associated *E. coli* within macrophages and to limit expression of COX-2 induced by these bacteria. Antibiotic treatment, allowing intracellular bacterial clearance, suppressed COX2 expression, suggesting that manipulation of microbes associated to tumors could have a deep influence on the secretion of pro-tumoral molecules by infiltrated macrophages.

For Peer Review

Experimental procedures

Bacterial strains. B2 *E. coli* strains used in this study was isolated from the tumors of colon cancer patients as previously described (Raisch *et al.*, in press; Buc *et al.*, 2013). Bacteria were grown routinely in Luria Bertani (LB) broth or on LB agar plates overnight at 37°C.

Gentamicin treatment and heat-killing of bacteria. Bacteria were suspended at DO=0.1 in PBS and were incubated for 30 min with gentamicin (Gm) at 5 mg/ml or incubated for 30 min at 65°C before infection. Killing of bacteria was checked by plating on LB agar.

Construction of isogenic mutants and transcomplementation assays. The 11G5 Δ *clbQ* isogenic mutant was generated with a PCR product by using the method modified by Chaverroche *et al.* (Cougoux *et al.*, 2014; Chaverroche *et al.*, 2000). The basic strategy was to replace a chromosomal sequence with a selectable antibiotic resistance gene, spectinomycin, generated by PCR.

Cell culture. The human monocytic THP-1 cell line was maintained in an atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C in the culture medium recommended by ATCC. THP-1 monocytes were differentiated into macrophages by a treatment with 20 ng/mL phorbol myristate acetate (PMA) for 18h. Primary bone marrow-derived macrophages (BMDM) were obtained from wild-type and TLR-4 knock-out BALB/c mice, extracted from tibia and femur and grown as previously described (Helaine *et al.*, 2010).

Antibodies and reagents. For Western blot analysis, rabbit anti-GAPDH monoclonal antibody, rabbit anti-ERK1/2 polyclonal antibody, rabbit anti-phospho ERK1/2 monoclonal

antibody, rabbit anti-p38 polyclonal antibody, rabbit anti-phospho p38 monoclonal antibody, rabbit anti-SAPK/JNK monoclonal antibody, rabbit anti-phospho SPAK/JNK monoclonal antibody, rabbit anti-caspase-3 monoclonal antibody and rabbit anti-PARP1 monoclonal antibody were purchased from Cell Signalling. Goat anti-COX-2 polyclonal antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology. Inhibitor for SAPK/JNK (SP600125) signalling pathway was purchased from Cell Signalling, and inhibitor for p38 signaling pathway (SB203580) was purchased from Calbiochem. For macrophage survival assay, ofloxacin and gentamicin were purchased from Euromedex and PMA was purchased from Sigma. For immunofluorescence analysis, bacteria were labelled with goat anti-*E. coli* polyclonal antibody (AbD serotec) and Alexa 488-labeled anti-goat antibody (Invitrogen). For TLR-4 neutralization, macrophages were treated with goat anti-TLR-4 antibody (R&D systems). Actin cytoskeleton was stained using TRITC-labelled-phalloidin (Sigma). Hoechst 33342 was purchased from Sigma.

Macrophage survival assay. The numbers of intracellular bacteria within macrophages were determined by the gentamicin protection assay (Bringer *et al.*, 2005). Briefly, THP-1 macrophages and BMDM were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 100 for 20 min. Infected cells were then washed and incubated with culture medium containing gentamicin at 50 µg/mL for 40 min (1h post-infection) or 24h (24h post-infection). When indicated, macrophages were treated for 1h before infection with anti-TLR-4 antibody or an isotype antibody at 7.5 µg/ml, and infection was performed in the presence of the antibodies. When indicated, cells were treated with ofloxacin at 4 µg/mL in the gentamicin-containing medium at 6h post-infection. When indicated, the inhibitors of JNK (SP600125, 50µM) and p38 (SB203580, 10µM) signalling pathways were added in the gentamicin-containing medium at 1h post-infection.

Enzyme-linked immunosorbent assays for PGE2 quantification. The amount of PGE2 released in the culture supernatant was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (Cayman Chemical). PGE2 concentration was assessed according to the manufacturer's instructions.

Immunoblot analysis. Whole-cell protein extracts were prepared by using lysis buffer (25 mM Tris pH 7,5 ; 1mM EDTA ; 5 mM MgCl₂ ; 1% NP-40 ; 10% glycerol ; 15 mM NaCl ; 10μL/mL sodium orthovanadate ; 1 mM PMSF). Proteins were separated on SDS/PAGE gels, transferred to nitrocellulose membrane, blocked 2h in Tris-buffered saline (TBS) solution containing 2% BSA, probed overnight with primary antibodies and for 2h with secondary HRP-coupled antibodies. GAPDH levels were used to normalize protein quantity. After membrane revelation using the ECL detection kit (Amersham), quantification was performed with ImageJ software.

Confocal microscopy. Briefly, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and immunostained overnight at 4°C with the indicated specific primary antibodies. Cells were then incubated for 1h with secondary antibodies. The slides were examined with a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope. Each confocal microscopy image is representative of at least three independent experiments.

Statistical analysis.

Data were expressed as means. Error bars represent SEM. Where appropriate, statistical analysis were done using ANOVA or Mann Whitney using GraphPad prism5 software. A p-value of 0.05 was considered significant.

Figure legends

Figure 1. Ability of colon cancer-associated *E. coli* to survive within macrophages.

Human THP-1 macrophages were infected with *E. coli* strains isolated from tumors of CRC patients or the non-pathogenic B2 *E. coli* ED1a strain. **A.** The number of bacteria internalized within macrophages was determined at 1h post-infection. Results were expressed as numbers of colony forming unit (CFU) per well. **B.** The number of intracellular bacteria within macrophages was determined at 24h post-infection. Results were expressed as the number of intracellular bacteria at 24h post-infection relative to that obtained at 1h post-infection, taken as 100%. For all experiments, data are means $\pm$ SEM of three independent experiments. **C.** Confocal microscopic examination of cells infected with the non-pathogenic *E. coli* ED1a strain or the colon cancer-associated *E. coli* 11G5, 10D12 and 16C1 strains at 24h post-infection. The actin cytoskeleton and nucleus of cells were stained using TRITC-labelled phalloidin and Hoescht, respectively. **D.** Cells were infected with the colon cancer-associated *E. coli* 11G5, 10D12 and 16C1 strains and the non-pathogenic *E. coli* ED1a strain. Caspase-3 and PARP-1 cleavage were analysed by western blot at 24h post-infection. As a positive control for apoptosis, cells were treated for 6h with staurosporin at 200nM.

Figure 2. Transmission electronic microscopic examination of colon cancer-associated *E.*

***coli*-containing vacuoles.** THP-1 macrophages were infected with the colon cancer-associated *E. coli* 11G5 (**A**), 10D12 (**B**) and 16C1 (**C**) strains, and infected macrophages were analysed by TEM at 24h post-infection. TEM examination revealed two kinds of vacuoles, one containing a few bacteria (left panels) and another containing numerous bacteria (right panels). Bars = 2 microns.

Figure 3. COX-2 expression and PGE2 secretion by colon cancer-associated *E. coli* infected macrophages. THP-1 macrophages were infected with the colon cancer-associated *E. coli* 11G5, 10D12 and 16C1 strains or with the non-pathogenic *E. coli* ED1a strain. **A.** COX-2 expression was analysed by western blot at 24h post-infection. Quantification of COX-2 expression relative to GAPDH was displayed below the representative immunoblot. **B.** Levels of PGE2 secreted in cell supernatants were quantified by ELISA. **C.** COX-2 expression was analysed at 24h post-infection in macrophages infected with living or dead (gentamicin (Gm)- or heat-killed) bacteria by western blot. Quantification of COX-2 expression relative to GAPDH was displayed below the representative immunoblot. **D.** Bone marrow-derived macrophages were prepared from wild-type and TLR-4 knock-out mice and infected with the colon cancer-associated *E. coli* 11G5 strain. COX-2 expression was analysed by western blot at 24h post-infection. Quantification of COX-2 expression relative to GAPDH was displayed below the representative immunoblot. **E.** Human THP-1 macrophages were treated before infection with anti-TLR4 antibody or with an isotype control antibody. Infection with the *E. coli* 11G5 strain was performed in the presence of the antibodies. COX-2 expression was analysed by western blot at 24h post-infection. Quantification of COX-2 expression relative to GAPDH was displayed below the representative immunoblot. For all experiments, data are means $\pm$ SEM of three independent experiments.

Figure 4. COX-2 expression in infected macrophages is correlated with the presence of intracellular bacteria. THP-1 macrophages were infected with the colon cancer-associated *E. coli* 11G5, 10D12 or 16C1 strains. **A and B.** THP-1 macrophages were infected at MOI 10, 25 or 100. **A.** The number of intracellular bacteria within macrophages was determined at 24h post-infection. **B.** COX-2 expression was analysed at 24h post-infection, and quantification of COX-2 expression relative to GAPDH was displayed below the

representative immunoblot. **C.** Correlation between the number of intracellular bacteria and the ratio of COX2/GAPDH levels determined by Spearman test. **D** and **E.** Infected macrophages were treated with ofloxacin at 6h post-infection and until 24h post-infection. **D.** The numbers of intracellular bacteria were determined at 1h, 6h and 24h post-infection. Results were expressed as CFU per well. **E.** COX-2 expression was analysed at 24h post-infection, and quantification of COX-2 expression relative to GAPDH was displayed below the representative immunoblot. For all experiments, data are means $\pm$ SEM of three independent experiments.

Figure 5. Colibactin is not involved in colon cancer-associated *E. coli*-induced COX-2 expression. THP-1 macrophages were infected with the *E. coli* 11G5 and 11G5 Δ clbQ strains. **A.** The numbers of bacteria internalized within macrophages were determined at 1h and 24h post-infection. Results were expressed as CFU per well. **B.** COX-2 expression was analysed at 24h post-infection, and quantification of COX-2 expression relative to GAPDH was displayed below the representative immunoblot. For all experiments, data are means $\pm$ SEM of three independent experiments.

Figure 6. Role of MAPKs in the control of number of intracellular colon cancer-associated *E. coli* and in COX-2 induction in infected macrophages. THP-1 macrophages were infected with the colon cancer-associated *E. coli* 11G5, 10D12 or 16C1 strains. **A.** Activation of JNK and p38 MAPK signalling pathways was analysed by western blot using specific antibodies directed against phosphorylated and total proteins. **B** and **C.** Infected macrophages were treated with specific inhibitors of JNK (SP600125) and p38 (SB203580) signalling pathways at 1h post-infection. **B.** COX-2 expression was analysed at 24h post-infection, and quantification of COX-2 expression relative to GAPDH was displayed below

the representative immunoblot. C. The numbers of intracellular bacteria were determined at 24h post-infection. Results are expressed as CFU per well. For all experiments, data are means $\pm$ SEM of three independent experiments.

Figure S1. Effect of ofloxacin on COX-2 expression. THP-1 macrophages were stimulated with lipopolysaccharide (LPS) at 500 μ g/mL for 6h. Where indicated, cells were treated with ofloxacin at 4 μ g/mL concomitantly with LPS stimulation. A representative immunoblot of COX-2 expression is presented.

Figure S2. Effect of specific inhibitors of JNK and p38 signalling pathways on cell viability. Cells were treated with inhibitors of JNK (SP600125) and p38 (SB203580) signalling pathways for 24h. XTT was added to each well and the incubation was continued for further 5h. Plates were read at 450 nm relative to 690 nm, using an automatic microtiter plate reader and data were expressed as the absorbance of the treated cells/control cells $\times$ 100.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgements

This study was supported by the Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche, Inserm and Université d'Auvergne (UMR1071), INRA (USC-2018) and by a grant from Ligue contre le cancer. Jennifer Raisch was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale and Anaëlle Dubois by the Conseil régional d'Auvergne. We thank Prof. Maria Belvisi and Dr. Mark Birrell (Respiratory Pharmacology, National Heart and Lung Institute, Imperial College, London) for kindly giving TLR4 knock-out mice. We thank the ICCF platform for confocal microscopy and the CICS platform for transmission electronic microscopy.

References

- Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Muhlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.J., *et al* (2012) Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*. **338**: 120-123.
- Bamba, H., Ota, S., Kato, A., Adachi, A., Itoyama, S. and Matsuzaki, F. (1999) High expression of cyclooxygenase-2 in macrophages of human colonic adenoma. *Int J Cancer*. **83**: 470-475.
- Bringer, M.A., Barnich, N., Glasser, A.L., Bardot, O. and Darfeuille-Michaud, A. (2005) HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Infect Immun*. **73**: 712-721.
- Bringer, M.A., Glasser, A.L., Tung, C.H., Meresse, S. and Darfeuille-Michaud, A. (2006) The Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. *Cell Microbiol*. **8**: 471-484.
- Brown, J.R. and DuBois, R.N. (2005) COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention. *J Clin Oncol*. **23**: 2840-2855.
- Buc, E., Dubois, D., Sauvanet, P., Raisch, J., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., *et al* (2013) High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. *PLoS One*. **8**: e56964.
- Castellarin, M., Warren, R.L., Freeman, J.D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., *et al* (2012) *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res*. **22**: 299-306.
- Cavalli, V., Vilbois, F., Corti, M., Marcote, M.J., Tamura, K., Karin, M., *et al* (2001) The stress-induced MAP kinase p38 regulates endocytic trafficking via the GDI:Rab5 complex. *Mol Cell*. **7**: 421-432.
- Chang, Y.J., Wu, M.S., Lin, J.T., Sheu, B.S., Muta, T., Inoue, H. and Chen, C.C. (2004) Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor-kappaB activation. *Mol Pharmacol*. **66**: 1465-1477.
- Chaverroche, M.K., Ghigo, J.M. and d'Enfert, C. (2000) A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res*. **28**: E97.
- Chen, T.C., Tsai, J.P., Huang, H.J., Teng, C.C., Chien, S.J., Kuo, H.C., *et al* (2011) Regulation of cyclooxygenase-2 expression in human bladder epithelial cells infected with type I fimbriated uropathogenic *E. coli*. *Cell Microbiol*. **13**: 1703-1713.

- 1
- 2
- 3 Chun, K.S. and Surh, Y.J. (2004) Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2
- 4 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol.* **68**:
- 5 1089-1100.
- 6
- 7 Corcelle, E., Djerbi, N., Mari, M., Nebout, M., Fiorini, C., Fenichel, P., *et al* (2007) Control
- 8 of the autophagy maturation step by the MAPK ERK and p38: lessons from
- 9 environmental carcinogens. *Autophagy.* **3**: 57-59.
- 10
- 11 Cougnoux, A., Dalmasso, G., Martinez, R., Buc, E., Delmas, J., Gibold, L., *et al* (2014)
- 12 Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a
- 13 senescence-associated secretory phenotype. *Gut.*
- 14
- 15
- 16 Dejea, C., Wick, E. and Sears, C.L. (2013) Bacterial oncogenesis in the colon. *Future*
- 17 *Microbiol.* **8**: 445-460.
- 18
- 19 Dimitrakopoulos, O., Liopeta, K., Dimitracopoulos, G. and Paliogianni, F. (2013) Replication
- 20 of *Brucella melitensis* inside primary human monocytes depends on mitogen activated
- 21 protein kinase signaling. *Microbes Infect.* **15**: 450-460.
- 22
- 23
- 24 Dixon, D.A., Blanco, F.F., Bruno, A. and Patrignani, P. (2013) Mechanistic aspects of COX-2
- 25 expression in colorectal neoplasia. *Recent Results Cancer Res.* **191**: 7-37.
- 26
- 27 Eberhart, C.E., Coffey, R.J., Radhika, A., Giardiello, F.M., Ferrenbach, S. and DuBois, R.N.
- 28 (1994) Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal
- 29 adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology.* **107**: 1183-1188.
- 30
- 31
- 32 Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D.M. (2012) Estimates of
- 33 worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* **127**: 2893-
- 34 2917.
- 35
- 36 Fratti, R.A., Chua, J. and Deretic, V. (2003) Induction of p38 mitogen-activated protein
- 37 kinase reduces early endosome autoantigen 1 (EEA1) recruitment to phagosomal
- 38 membranes. *J Biol Chem.* **278**: 46961-46967.
- 39
- 40
- 41 Friedrich, N., Hagedorn, M., Soldati-Favre, D. and Soldati, T. (2012) Prison break: pathogens'
- 42 strategies to egress from host cells. *Microbiol Mol Biol Rev.* **76**: 707-720.
- 43
- 44 Hardwick, J.C., van den Brink, G.R., Offerhaus, G.J., van Deventer, S.J. and Peppelenbosch,
- 45 M.P. (2001) NF-kappaB, p38 MAPK and JNK are highly expressed and active in the
- 46 stroma of human colonic adenomatous polyps. *Oncogene.* **20**: 819-827.
- 47
- 48 Helaine, S., Thompson, J.A., Watson, K.G., Liu, M., Boyle, C. and Holden, D.W. (2010)
- 49 Dynamics of intracellular bacterial replication at the single cell level. *Proc Natl Acad*
- 50 *Sci U S A.* **107**: 3746-3751.
- 51
- 52
- 53 Helaine, S., Cheverton, A.M., Watson, K.G., Faure, L.M., Matthews, S.A. and Holden, D.W.
- 54 (2014) Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of
- 55 nonreplicating persisters. *Science.* **343**: 204-208.
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- Hisatsune, J., Yamasaki, E., Nakayama, M., Shirasaka, D., Kurazono, H., Katagata, Y., *et al* (2007) *Helicobacter pylori* VacA enhances prostaglandin E2 production through induction of cyclooxygenase 2 expression via a p38 mitogen-activated protein kinase/activating transcription factor 2 cascade in AZ-521 cells. *Infect Immun.* **75**: 4472-4481.
- Hull, M.A., Booth, J.K., Tisbury, A., Scott, N., Bonifer, C., Markham, A.F. and Coletta, P.L. (1999) Cyclooxygenase 2 is up-regulated and localized to macrophages in the intestine of Min mice. *Br J Cancer.* **79**: 1399-1405.
- Hull, M.A., Faluyi, O.O., Ko, C.W., Holwell, S., Scott, D.J., Cuthbert, R.J., *et al* (2006) Regulation of stromal cell cyclooxygenase-2 in the ApcMin/+ mouse model of intestinal tumorigenesis. *Carcinogenesis.* **27**: 382-391.
- Huxley, R.R., Ansary-Moghaddam, A., Clifton, P., Czernichow, S., Parr, C.L. and Woodward, M. (2009) The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer.* **125**: 171-180.
- Irrazabal, T., Belcheva, A., Girardin, S.E., Martin, A. and Philpott, D.J. (2014) The Multifaceted Role of the Intestinal Microbiota in Colon Cancer. *Mol Cell.* **54**: 309-320.
- Kim, J.M., Lee, J.Y., Yoon, Y.M., Oh, Y.K., Kang, J.S., Kim, Y.J. and Kim, K.H. (2006) *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces cyclooxygenase-2 and fluid secretion in intestinal epithelial cells through NF-kappaB activation. *Eur J Immunol.* **36**: 2446-2456.
- Klug, K., Ehlers, S., Uhlig, S. and Reiling, N. (2011) Mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 regulated control of *Mycobacterium avium* replication in primary murine macrophages is independent of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10. *Innate Immun.* **17**: 470-485.
- Kostic, A.D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J.N., Gallini, C.A., Michaud, M., *et al* (2013) *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe.* **14**: 207-215.
- Kostic, A.D., Gevers, D., Pedamallu, C.S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A.M., *et al* (2012) Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* **22**: 292-298.
- Kumar, Y. and Valdivia, R.H. (2009) Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments. *Cell Host Microbe.* **5**: 593-601.
- Maddocks, O.D., Short, A.J., Sonnenberg, M.S., Bader, S. and Harrison, D.J. (2009) Attaching and effacing *Escherichia coli* downregulate DNA mismatch repair protein in vitro and are associated with colorectal adenocarcinomas in humans. *PLoS One.* **4**: e5517.

- 1
- 2
- 3 Marjuki, H., Gornitzky, A., Marathe, B.M., Ilyushina, N.A., Aldridge, J.R., Desai, G., *et al*
- 4 (2011) Influenza A virus-induced early activation of ERK and PI3K mediates V-
- 5 ATPase-dependent intracellular pH change required for fusion. *Cell Microbiol.* **13**:
- 6 587-601.
- 7
- 8 Martin, H.M., Campbell, B.J., Hart, C.A., Mpofu, C., Nayar, M., Singh, R., *et al* (2004)
- 9 Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon
- 10 cancer. *Gastroenterology.* **127**: 80-93.
- 11
- 12 Moreau, K., Lacas-Gervais, S., Fujita, N., Sebbane, F., Yoshimori, T., Simonet, M. and
- 13 Lafont, F. (2010) Autophagosomes can support *Yersinia pseudotuberculosis*
- 14 replication in macrophages. *Cell Microbiol.* **12**: 1108-1123.
- 15
- 16 Nougayrede, J.P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., *et al*
- 17 (2006) *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells.
- 18 *Science.* **313**: 848-851.
- 19
- 20 Ogino, S., Kirkner, G.J., Nosho, K., Irahara, N., Kure, S., Shima, K., *et al* (2008)
- 21 Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon
- 22 cancer. *Clin Cancer Res.* **14**: 8221-8227.
- 23
- 24 Qian, B.Z. and Pollard, J.W. (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and
- 25 metastasis. *Cell.* **141**: 39-51.
- 26
- 27 Raisch, J., Buc, E., Bonnet, M., Sauvanet, P., Vazeille, E., de Vallée, A., *et al* (in press) Colon
- 28 cancer-associated B2 *Escherichia coli* colonize gut mucosa and promote cell
- 29 proliferation. *World Journal of Gastroenterology.*
- 30
- 31 Rasool, S., Kadla, S.A., Rasool, V. and Ganai, B.A. (2013) A comparative overview of
- 32 general risk factors associated with the incidence of colorectal cancer. *Tumour Biol.*
- 33 **34**: 2469-2476.
- 34
- 35 Sears, C.L. and Garrett, W.S. (2014) Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host*
- 36 *Microbe.* **15**: 317-328.
- 37
- 38 Secher, T., Samba-Louaka, A., Oswald, E. and Nougayrede, J.P. (2013) *Escherichia coli*
- 39 producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian
- 40 cells. *PLoS One.* **8**: e77157.
- 41
- 42 Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M.G., *et al* (2008)
- 43 Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol.* **18**: 349-355.
- 44
- 45 Sobhani, I., Tap, J., Roudot-Thoraval, F., Roperch, J.P., Letulle, S., Langella, P., *et al* (2011)
- 46 Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One.* **6**: e16393.
- 47
- 48 Starr, T., Child, R., Wehrly, T.D., Hansen, B., Hwang, S., Lopez-Otin, C., *et al* (2012)
- 49 Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella*
- 50 intracellular cycle. *Cell Host Microbe.* **11**: 33-45.
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- Stein, M.P., Muller, M.P. and Wandinger-Ness, A. (2012) Bacterial pathogens commandeer Rab GTPases to establish intracellular niches. *Traffic*. **13**: 1565-1588.
- Swidsinski, A., Khilkin, M., Kerjaschki, D., Schreiber, S., Ortner, M., Weber, J. and Lochs, H. (1998) Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology*. **115**: 281-286.
- Thi, E.P., Lambertz, U. and Reiner, N.E. (2012) Sleeping with the enemy: how intracellular pathogens cope with a macrophage lifestyle. *PLoS Pathog*. **8**: e1002551.
- Thomas, W., Ascott, Z.K., Harmey, D., Slice, L.W., Rozengurt, E. and Lax, A.J. (2001) Cytotoxic necrotizing factor from *Escherichia coli* induces RhoA-dependent expression of the cyclooxygenase-2 Gene. *Infect Immun*. **69**: 6839-6845.
- Toprak, N.U., Yagci, A., Gulluoglu, B.M., Akin, M.L., Demirkalem, P., Celenk, T. and Soyletir, G. (2006) A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin Microbiol Infect*. **12**: 782-786.
- Wang, D. and DuBois, R.N. (2008) Pro-inflammatory prostaglandins and progression of colorectal cancer. *Cancer Lett*. **267**: 197-203.
- Wang, D. and Dubois, R.N. (2010) The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene*. **29**: 781-788.
- Webber, J.L. and Tooze, S.A. (2010) Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *Embo J*. **29**: 27-40.
- Wu, S., Rhee, K.J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H.R., *et al* (2009) A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med*. **15**: 1016-1022.
- Wu, W.K., Sung, J.J., Lee, C.W., Yu, J. and Cho, C.H. (2010) Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: an update on the molecular mechanisms. *Cancer Lett*. **295**: 7-16.
- Young, L.E. and Dixon, D.A. (2010) Posttranscriptional Regulation of Cyclooxygenase 2 Expression in Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*. **6**: 60-67.
- Zackular, J.P., Baxter, N.T., Iverson, K.D., Sadler, W.D., Petrosino, J.F., Chen, G.Y. and Schloss, P.D. (2013) The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *MBio*. **4**: e00692-00613.
- Zhu, Q., Gao, R., Wu, W. and Qin, H. (2013) The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. *Tumour Biol*. **34**: 1285-1300.

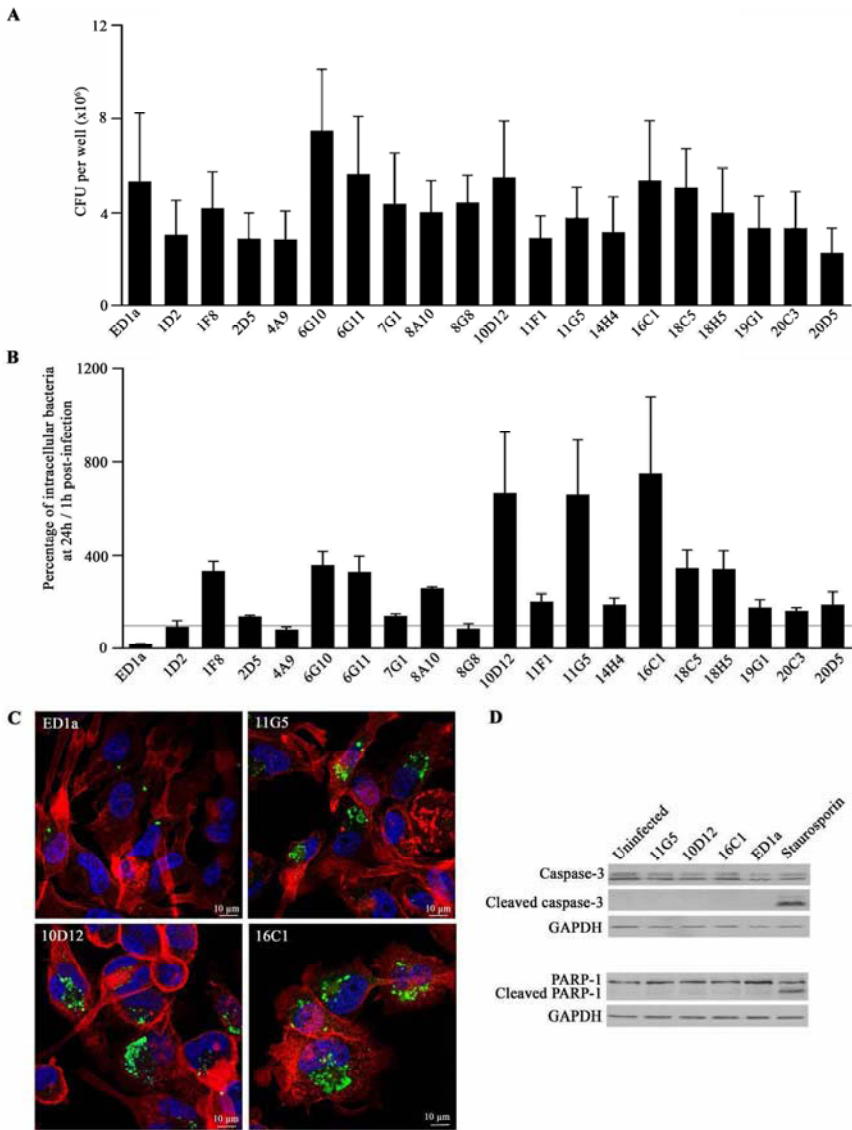


Figure 1

219x288mm (300 x 300 DPI)

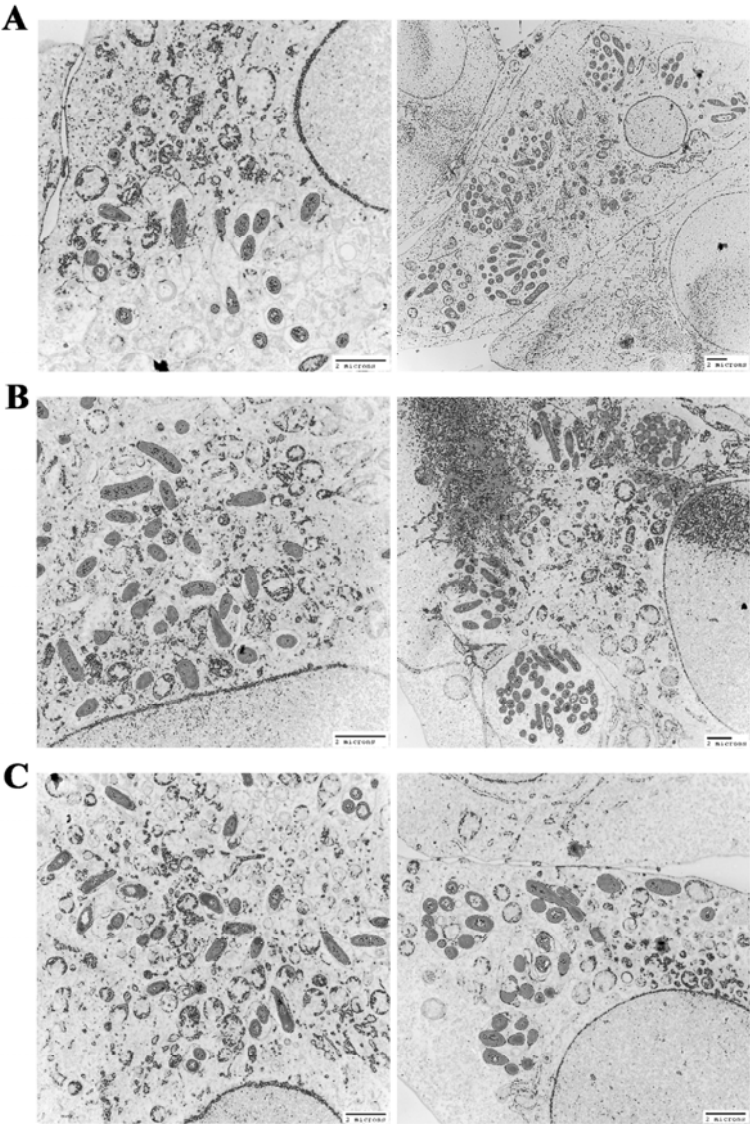


Figure 2

114x165mm (300 x 300 DPI)

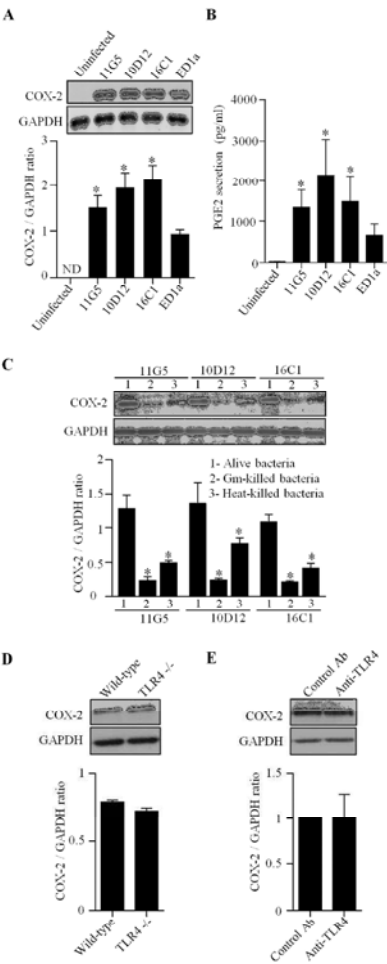


Figure 3

190x254mm (300 x 300 DPI)

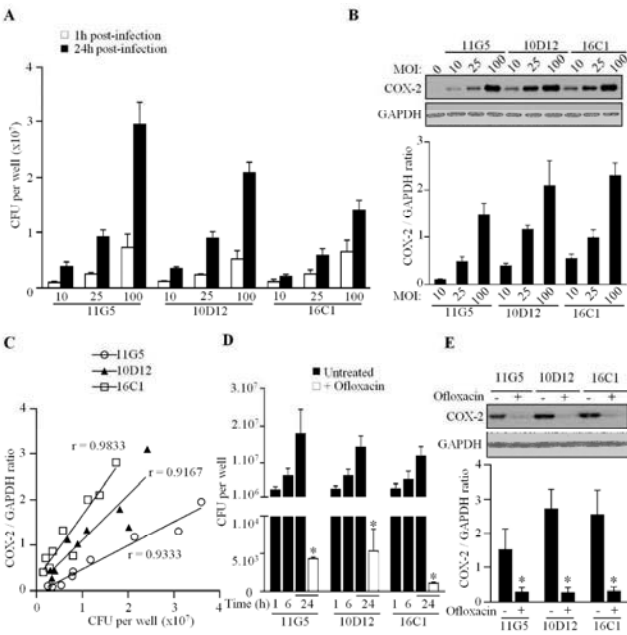


Figure 4

190x254mm (300 x 300 DPI)

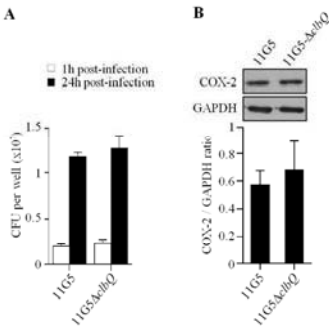


Figure 5

190x254mm (300 x 300 DPI)

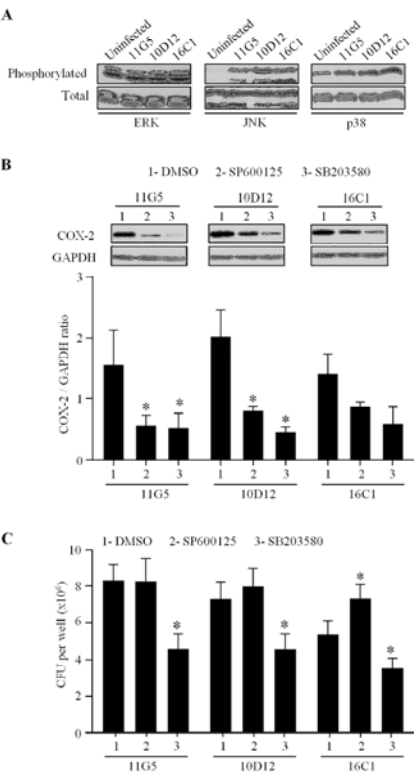


Figure 6

190x254mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

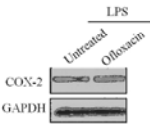


Figure S1

190x254mm (300 x 300 DPI)

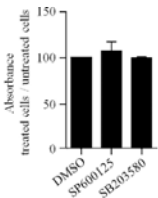


Figure S2

190x254mm (300 x 300 DPI)

Commentaires de la publication n°2

Capacité de survie et de multiplication intracellulaire en macrophages humains THP-1 de souches d'*E. coli* B2 isolées de CCR.

Suite à l'infection de macrophages dérivés de monocytes humains THP-1 par des souches d'*E. coli* de phylogroupe B2 isolées de CCR, nous avons déterminé le nombre de bactéries intracellulaires à 1h post-infection (détermination du nombre de bactéries internalisées dans les macrophages) et à 24h post-infection (détermination du nombre de bactéries ayant survécu à l'activité bactéricide des macrophages). Les résultats obtenus montrent que les 19 souches d'*E. coli* B2 testées sont internalisées à des niveaux similaires en macrophages THP-1. Contrairement à la souche d'*E. coli* B2 non pathogène ED1a qui est dégradée par les macrophages, 84% (16/19 souches) des *E. coli* B2 associées au CCR sont capables de résister à l'activité bactéricide des macrophages voir même de se multiplier. Ce résultat a été confirmé par microscopie confocale et microscopie électronique à transmission. Les images obtenues à 24h post-infection montrent la présence, à l'intérieur des macrophages infectés, de deux types de vacuoles. Certaines contiennent un faible nombre de bactéries et d'autres contiennent de nombreuses bactéries. Ce résultat suggère que les macrophages pourraient représenter une niche de réplication et/ou de persistance pour les *E. coli* associés au CCR. Il serait à présent intéressant de caractériser le compartiment vacuolaire au sein duquel les bactéries survivent. En effet, de manière similaire aux *E. coli* B2 associés au CCR, de nombreux pathogènes tels que *Salmonella* Typhimurium ou *Mycobacterium tuberculosis* sont capables de résister à l'activité bactéricide des macrophages (Stein *et al.*, 2012; Thi *et al.*, 2012). Ceux-ci ont développés des stratégies leur permettant d'échapper aux mécanismes de défenses intracellulaires en bloquant ou détournant la maturation de leur vacuole. D'autres pathogènes, tels que les *E. coli* associés à la maladie de Crohn ou *Coxiella burnetii* possèdent eux la capacité à résister à l'environnement hostile du phagolysosome.

Induction de l'expression de COX-2 par les souches d'*E. coli* B2 associées au CCR.

La capacité des souches d'*E. coli* B2 associées au CCR à induire l'expression de COX-2, et par conséquent la sécrétion de PGE₂ a été analysée en macrophages humains THP-1. Nous avons montré que les *E. coli* associés au CCR induisent une expression de COX-2 et

une sécrétion de PGE₂ significativement augmentée comparativement à celles induites par la souche d'*E. coli* non pathogène ED1a.

Nous avons recherché si l'expression de COX-2 induite par les *E. coli* associés au CCR était la conséquence de la stimulation extracellulaire des macrophages par les bactéries et/ou impliquait les bactéries intracellulaires. En effet, il a été précédemment mis en évidence que la souche d'*E. coli* uropathogène J96 est capable d'induire l'expression de COX-2 en activant les voies de signalisation dépendante du récepteur TLR4, exprimé au niveau de la membrane plasmique des cellules (Chen *et al.*, 2011b). Des niveaux similaires de COX-2 ont été observés suite à l'infection de macrophages dérivés de moelle osseuse de souris invalidées pour TLR-4 ou de souris sauvages. De la même manière, le traitement de macrophages THP-1 avant l'infection avec des anticorps neutralisants dirigés contre TLR4 ne modifie pas le niveau d'expression de COX-2, montrant que la stimulation extracellulaire du récepteur TLR4 par les *E. coli* associés au CCR n'est pas impliquée dans l'induction de COX-2.

En revanche, l'infection de macrophages THP-1 avec des multiplicités d'infection croissantes de bactéries a révélé que l'expression de COX-2 et la sécrétion de PGE₂ sont corrélées positivement avec le nombre d'*E. coli* intracellulaires. Le traitement des macrophages infectés avec un antibiotique à tropisme intracellulaire, l'ofloxacine, permet de réduire de manière significative le nombre de bactéries intracellulaires et est associé à une diminution significative du niveau d'expression de COX-2. Par ailleurs, une diminution significative de l'expression de COX-2 est observée lorsque les macrophages THP-1 sont infectés avec des bactéries tuées à la chaleur ou par un traitement antibiotique (gentamicine), montrant qu'il est nécessaire que les bactéries soient vivantes pour induire l'expression de COX-2. L'ensemble de ces résultats montrent que les *E. coli* intracellulaires sont impliqués dans l'induction de l'expression de COX-2 par les macrophages.

La colibactine n'est pas impliquée dans l'induction de COX-2.

La majorité (60,5%) des *E. coli* B2 associés au CCR héberge l'ilôt génomique *pks*, impliqué dans la synthèse d'un composé hybride PK (*polyketide*)-NRP (*non ribosomal peptide*) génotoxique, la colibactine. Il a été montré précédemment que la colibactine peut promouvoir la sénescence, avec pour conséquence l'induction d'inflammation et de stress

oxydant (Cougnoux *et al.*, 2014). Afin d'analyser l'implication de la colibactine dans l'induction de COX-2, nous avons créé un mutant isogénique incapable de produire une colibactine fonctionnelle dans une souche d'*E. coli* B2 associée au CCR (souche 11G5) en invalidant un des gènes de l'îlot génomique *pks* (gène *clbQ*). Le mutant isogénique 11G5 Δ *clbQ* est capable de survivre et de se multiplier de manière similaire à la souche sauvage dans les macrophages THP-1. Par ailleurs, nous avons montré que la délétion de *clbQ* ne modifie pas le niveau d'expression de COX-2 induit par la souche d'*E. coli* 11G5. Ces résultats indiquent que la capacité des *E. coli* B2 associés au CCR à survivre en macrophages THP-1 et à induire l'expression de COX-2 est indépendante de la production de colibactine.

Implication de la voie de signalisation p38 dans le contrôle du nombre d'*E. coli* B2 associés au CCR intracellulaires et dans l'induction de l'expression de COX-2.

La régulation transcriptionnelle de COX-2 est sous le contrôle de plusieurs voies de signalisation incluant les voies des MAPK (ERK, JNK et p38) (Dixon *et al.*, 2013). Nous avons montré que les souches d'*E. coli* B2 associées au CCR activent en macrophages THP-1 les voies p38 et JNK, comme en témoigne l'augmentation de la phosphorylation des protéines p38 et JNK, mais pas la voie ERK. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des voies de signalisation p38 et JNK a révélé que l'expression de COX-2 induite par les souches d'*E. coli* associées au CCR est dépendante de l'activation de ces deux voies.

De manière intéressante, nous avons également montré que la voie de signalisation p38 est impliquée dans le contrôle du nombre d'*E. coli* intracellulaires. En effet, le nombre de bactéries intracellulaires diminue significativement lorsque les macrophages sont traités avec un inhibiteur spécifique de p38. Il est décrit que les MAPK sont impliquées dans la formation des vacuoles de phagocytose et régulent les voies de dégradation intracellulaires endosomale et autophagique (Cavalli *et al.*, 2001; Corcelle *et al.*, 2007; Fratti *et al.*, 2003; Webber and Tooze, 2010). Afin d'échapper à la bactéricidie du phagolysosome, certains pathogènes modulent l'activation des voies de signalisation des MAPK. A titre d'exemple, l'activation de la voie de signalisation p38 favorise la réplication intracellulaire de *Mycobacterium avium* alors que l'activation de la voie ERK la diminue (Klug *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'activation des voies de signalisation p38 et JNK a été rapporté comme nécessaire à la survie du pathogène *Brucella melitensis* (Dimitrakopoulos *et al.*, 2013). Il est donc possible que les *E.*

coli associés au CCR activent la voie p38 dans le but de détourner leur compartiment vacuolaire du trafic endocytaire classique afin de se créer une niche de réplication/persistance dans les macrophages.

En conclusion, nous avons montré que les *E. coli* de phylogroupe B2 associés au CCR sont capables de résister à l'activité bactéricide des macrophages et que les bactéries intracellulaires stimulent l'expression du facteur pro-tumoral COX-2. Nous avons identifié la voie de signalisation p38 comme une cible impliquée dans le contrôle du nombre d'*E. coli* associés au CCR intracellulaires et dans l'induction de l'expression de COX-2 par ces bactéries. Un traitement antibiotique dirigé contre les bactéries intracellulaires permet de diminuer l'expression de COX-2, suggérant que l'élimination des bactéries associées aux tumeurs pourrait avoir des conséquences sur la sécrétion de facteurs pro-tumoraux par les macrophages.

Discussion – Perspectives



Des dysbioses du microbiote intestinal ont été mises en évidence chez les patients atteints de cancer colorectal (CCR) à partir de cohortes indépendantes. Même si aucun microbiote dysbiotique consensus, en terme de composition bactérienne, associé au CCR n'a pu être défini, les analyses de flore bactérienne ont révélé une prédominance anormale, chez les patients atteints de CCR, de bactéries à potentiel pro-inflammatoire et/ou oncogénique pouvant appartenir aux espèces *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum* ou *Escherichia coli* au détriment de bactéries dites « protectrices » telles que *Faecalibacterium prauznitsii* (Balamurugan *et al.*, 2008; Kostic *et al.*, 2012; Swidsinski *et al.*, 1998; Toprak *et al.*, 2006). Il est à ce jour impossible de savoir si la colonisation anormale des tumeurs par ces espèces bactériennes précède le développement tumoral, ou bien, si elle est la conséquence d'un bouleversement de l'environnement extracellulaire et cellulaire qui s'opère sur le site de développement tumoral, offrant un avantage sélectif à certaines espèces bactériennes en créant une nouvelle niche écologique.

La majorité des *Escherichia coli* associés aux tumeurs coliques de patients code des génotoxines et/ou cyclomodulines, ces bactéries pourraient donc jouer un rôle promoteur dans la carcinogenèse colorectale (Arthur *et al.*, 2012; Buc *et al.*, 2013). Par ailleurs, le fait que ces bactéries soient retrouvées associées aux tissus coliques aux différents stades de développement tumoral (adénomes, adénocarcinomes de différents statuts TNM) laisse penser que ces bactéries pourraient supporter la progression tumorale au travers de leur interaction avec les populations cellulaires « moteurs » du développement tumoral telles que les macrophages (Bonnet *et al.*, 2014).

La caractérisation moléculaire des *Escherichia coli* associés au CCR et l'étude des interactions entre ces bactéries et les différentes populations cellulaires retrouvées sur le site tumoral aideront à la compréhension du rôle que peuvent jouer ces bactéries dans la dynamique du développement tumoral.

1) Caractérisation des souches d'*E. coli* colonisant les tumeurs colorectales

D'un point de vue moléculaire, peu de choses sont connues concernant les souches d'*E. coli* colonisant les tumeurs des patients atteints de CCR. L'intérêt de la communauté scientifique s'est pour l'instant principalement porté sur l'étude du rôle joué par la colibactine dans la carcinogenèse colorectale, une forte prévalence de souches hébergeant l'ilôt génomique *pks* impliqué dans la synthèse de cette génotoxine étant associée au CCR. Les souches d'*E. coli* isolées de CCR ne semblent pas appartenir à un pathovar d'*E. coli* déjà décrit. En effet, si une étude unique a montré que 25% des *E. coli* isolés d'adénocarcinomes de patients hébergent le gène *eae* qui code l'intimine, impliquée dans l'établissement des lésions d'attachement et d'effacement causées par les souches appartenant aux pathovars EHEC et EPEC, ce résultat n'a pas été retrouvé dans d'autres études. De la même manière le groupe du Pr. J. Rhodes a rapporté une prévalence augmentée (66%) de souches positives pour le gène *afaC* associé aux DAEC chez les patients atteints de CCR (Prorok-Hamon *et al.*, 2014). Cependant, sur les 105 souches d'*E. coli* isolées de patients atteints de CCR de notre collection, tous phylogroupes confondus, aucune souche n'hébergeait le gène *eae* et seulement 8,6% possédaient le gène *afa* (données du laboratoire). Par ailleurs, nous avons montré que ces souches adhèrent et envahissent faiblement *in vitro* les cellules épithéliales intestinales en culture les excluant ainsi des pathovars AIEC associé à la maladie de Crohn et EIEC. Il apparaît donc nécessaire à présent de séquencer et comparer les génomes de souches d'*E. coli* associés au CCR afin de rechercher si ces souches possèdent des facteurs de virulence ou de fitness communs et/ou des mutations pathoadaptatrices pouvant expliquer leur tropisme pour les tumeurs colorectales et/ou ouvrir de nouvelles pistes sur la compréhension de leur rôle dans le CCR.

Le CCR peut avoir différentes origines : génétique, associé à une colite (MICI) ou sporadique. Les analyses de microbiote qui ont été réalisées à ce jour ont été menées uniquement sur des cohortes de patients atteints de CCR sporadiques. Il serait intéressant de pouvoir comparer les microbiotes dysbiotiques des patients atteints de CCR sporadiques aux microbiotes de patients atteints de CCR génétiques ou associés à une MICI. De telles analyses pourraient permettre de définir s'il existe un ou des pathobiontes associés au CCR en fonction de leur origine. Par ailleurs, afin d'apporter des éléments de réponse à la question de la relation réciproque entre l'établissement d'un microbiote dysbiotique et le développement tumoral, il serait intéressant de pouvoir suivre la composition du microbiote intestinal chez

des patients génétiquement prédisposés à développer un CCR (patients atteints de PAF et de HNPCC), et ce dès leur plus jeune âge et de concert avec l'appartition et l'évolution de la maladie.

2) Rôle du récepteur CEACAM6 dans la colonisation et le pouvoir oncogénique des *E. coli* associés au CCR

La molécule CEACAM6 est surexprimée dans les adénocarcinomes colorectaux de patients atteints de CCR comparativement aux tissus sains pris en marge des tumeurs (Kim *et al.*, 2013a; Schölzel *et al.*, 2000) et le niveau d'expression est corrélé positivement avec le stade de développement tumoral des patients. Il est connu que CEACAM6 sert de récepteur pour des bactéries pathogènes telles que les bactéries appartenant au genre *Neisseria*, les DAEC et les AIEC (Barnich *et al.*, 2007; Berger *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1998). Les AIEC sont capables d'induire l'expression du récepteur CEACAM6 *in vitro* en cellules épithéliales intestinales, et la liaison entre l'adhésine FimH des pili de type 1 de ces bactéries et le récepteur CEACAM6 est impliquée dans la colonisation de la muqueuse intestinale et dans l'induction d'une colite sévère en modèle murin CEABAC10 (Carvalho *et al.*, 2008, 2009).

Nous avons montré que des souches d'*E. coli* associées au CCR sont capables d'induire *in vitro* l'expression de CEACAM6 et des résultats non publiés montrent une augmentation du nombre d'*E. coli* associés aux tumeurs des patients atteints de CCR en fonction du niveau d'expression de CEACAM6 (**Figure 44**). Il est donc possible que la colonisation des tumeurs par *E. coli* puisse être favorisée par l'expression de CEACAM6. Cette hypothèse serait donc intéressante de tester *in vitro* en analysant le niveau d'adhésion des souches d'*E. coli* associées au CCR sur des cellules exprimant des niveaux croissants de CEACAM6 (lignées cellulaires exprimant différents niveaux de CEACAM6 ou transfectées avec des vecteurs permettant une surexpression de cette molécule), mais également *in vivo* en comparant les niveaux de colonisation par ces souches de souris transgéniques pour le récepteur CEACAM6 humain (modèle CEABAC2 et CEABAC10) et de souris sauvages.

Par ailleurs, il serait intéressant d'analyser l'impact de l'expression de CEACAM6 sur le pouvoir oncogénique des *E. coli* associés au CCR, en analysant la capacité de ces *E. coli* à promouvoir la carcinogenèse dans le modèle murin CEABAC10 traité à l'AOM/DSS

comparativement à des souris non transgéniques subissant le même traitement. Seraient alors notamment comparés le nombre et la taille des tumeurs coliques développées par les animaux, l'expression de marqueurs de la prolifération cellulaire tels que PCNA et Ki-67 et la microvascularisation développée au site tumoral.

3) Influence des *E. coli* associés au CCR sur la mise en place d'un épithélium hyperprolifératif

Le développement de CCR sporadique est initié par la transformation d'un épithélium normal en épithélium hyperprolifératif suite à l'acquisition de mutations dans le gène codant la protéine APC, qui est impliquée dans l'activation de la voie de signalisation WNT/ β -caténine. En effet, pour rappel, la protéine APC appartient au complexe de dégradation de la β -caténine (qui est liée à l'E-cadhérine dans le cytoplasme) (Half *et al.*, 2009). En réponse à la stimulation par un ligand spécifique, le complexe de dégradation de la β -caténine est inactivé, la rendant libre dans le cytoplasme. De même, le clivage de l'E-cadhérine induit un relargage cytoplasmique de la β -caténine, qui peut alors transloquer dans le noyau et activer la transcription de gènes cibles impliqués notamment dans la prolifération cellulaire. La capacité à activer la voie de signalisation WNT/ β -caténine semble être un phénotype commun partagé par deux espèces bactériennes anormalement abondantes au niveau des tumeurs de patients atteints de CCR, *Bacteroides fragilis* et *Fusobacterium nucleatum* (Rubinstein *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2003). La fixation de toxine BFT, sécrétée par *B. fragilis* entérotoxigène, sur un récepteur spécifique restant à identifier induit le clivage de l'E-cadhérine transmembranaire ayant pour conséquence un relargage de la β -caténine dans le cytoplasme, sa translocation nucléaire et l'activation de la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire tels que les gènes *c-myc* et *cycline D1* (Wu *et al.*, 2003). De manière similaire, l'adhésine FadA de *F. nucleatum* est capable de se fixer sur l'E-cadhérine induisant ainsi l'activation de la voie WNT/ β -caténine et l'expression des oncogènes *c-myc* et *cyclin D1* (Rubinstein *et al.*, 2013).

En modèle murin CEABAC10, nous avons montré que la souche d'*E. coli* 11G5 associée au CCR est capable d'induire une prolifération accrue de l'épithélium intestinal. Cependant, nous n'avons pas à l'heure actuelle décrit les mécanismes mis en jeu. Il serait donc intéressant de rechercher si les souches d'*E. coli* associées au CCR sont capables

d'activer la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. L'état de phosphorylation du facteur de transcription β -caténine, sa translocation nucléaire, l'expression des gènes cibles tels que *c-myc* et *cycline D1* et l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine par des systèmes de reporteurs luciférase inducibles (système TOP/FOP) pourraient être analysés dans différentes lignées de cellules épithéliales intestinales, en réponse à l'infection par des souches d'*E. coli* associées au CCR. De plus, la prolifération des cellules en réponse à l'infection pourrait être déterminée par des marquages bromodeoxyuridine (BrdU) ou à l'aide de kits spécifiques d'analyse de la prolifération cellulaire. L'activation constitutive de la voie Wnt/ β -caténine dans les modèles de carcinogenèse spontanée ($APC^{Min/+}$) et induite (AOM/DSS) rend difficile l'analyse de l'activation de cette voie dans le côlon des animaux en réponse à l'infection par des souches d'*E. coli*. Il serait possible d'analyser si les souches d'*E. coli* associées au CCR sont capables d'induire l'activation de cette voie de signalisation dans les modèles de xénogreffes en analysant la localisation cellulaire de la β -caténine (cytoplasmique ou nucléaire), l'expression de marqueurs de prolifération (PCNA, Ki-67) et l'expression de gènes cibles (*c-myc* et *cycline D1*).

Au sein de notre cohorte, 18% des souches d'*E. coli* isolées de patients de CCR codent la cyclomoduline CNF1. Elle est capable d'influencer directement la prolifération en favorisant l'entrée dans le cycle cellulaire et la transition G1/S. Le rôle de CNF dans la capacité des souches d'*E. coli* associées au CCR à promouvoir la carcinogenèse n'a pas encore été exploré. L'impact de la production de CNF1 sur le développement tumoral pourrait être analysé suite à l'infection de souris $APC^{Min/+}$ ou traitées à l'AOM/DSS par des mutants isogéniques invalidés pour le gène *cnf1* comparativement à une infection avec les souches sauvages correspondantes. Par ailleurs, 52,2% de souches d'*E. coli* associées au CCR hébergeant l'îlot génomique *pks* hébergent également le gène codant CNF1. Il serait intéressant d'analyser s'il existe un effet synergique de ces deux cyclomodulines sur la carcinogenèse colorectale. Des expériences pourraient être menées *in vitro* et *in vivo* en comparant les propriétés de simples (*pks* ou *cnf*) et doubles (*pks* et *cnf*) mutants. Par ailleurs, il serait intéressant d'analyser la cinétique d'expression de ces génotoxines/cyclomodulines lors de l'infection de cellules épithéliales intestinales. Ceci pourrait être réalisé en utilisant des plasmides exprimant des gènes codant des protéines fluorescentes (GFP et Cherry par exemple) sous contrôle de promoteurs de gènes impliqués dans la synthèse de la colibactine (gène de l'îlot *pks*) et du promoteur du gène *cnf1*.

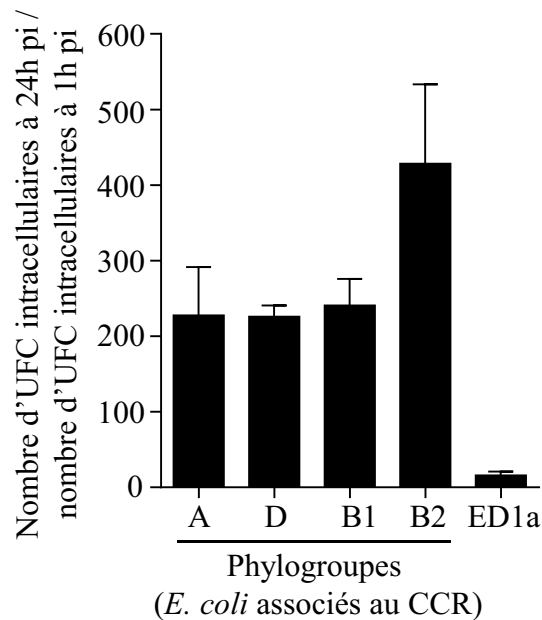


Figure 45 : Capacité de survie et de réplication en macrophages des *E. coli* associés au CCR appartenant aux phylogroupes A, D, B1 et B2.

Les THP-1 ont été infectés avec des souches appartenant aux phylogroupes A, B1, B2 et D, isolées de patients atteints de CCR, et la souche d'*E. coli* commensale non pathogène ED1a, à une multiplicité d'infection de 100 bactéries par cellules pendant 20 min, puis le milieu d'infection a été remplacé par un milieu contenant de la gentamicine. Les résultats sont exprimés en nombre d'unités formant des colonies (UFC) intracellulaires à 24h post-infection par rapport aux UFC intracellulaires dénombrées à 1h post-infection, défini comme 100%. Contrairement à une souche d'*E. coli* non pathogène rapidement éliminée par les macrophages, les souches d'*E. coli* associées au CCR sont capables de survivre et de se répliquer en macrophages quelque soit leur phylogroupe. pi : post-infection.

4) **Les macrophages associés aux tumeurs sont-ils des niches de persistance/réplication pour les *E. coli* associés au CCR ?**

Au niveau des tumeurs, les macrophages représentent la population majoritaire de l'infiltrat inflammatoire. Les macrophages sont des cellules spécialisées dans la détection et l'élimination de bactéries intracellulaires. Suite à leur phagocytose, les bactéries sont internalisées dans des vacuoles qui vont interagir séquentiellement avec des vésicules endosomales ou autophagosomales puis lysosomales, délivrant à l'intérieur des vacuoles contenant les bactéries des molécules bactéricides et un contenu acide en vue de l'élimination du micro-organisme ingéré. Cependant, certaines bactéries pathogènes se sont adaptées pour survivre aux conditions hostiles du phagolysosome, c'est le cas par exemple des AIEC associés à la maladie de Crohn et de *Coxiella burnetii* (Glasser *et al.*, 2001; Macdonald *et al.*, 2014). D'autres bactéries ont élaboré des stratégies leur permettant par exemple d'échapper à une dégradation dans les phagolysosomes en détournant le trafic intracellulaire de leur vacuole afin de se créer une niche de persistance et/ou de réplication intracellulaire, c'est le cas de *Mycobacterium tuberculosis* et de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Thi *et al.*, 2012; Vergne *et al.*, 2005).

Nos travaux ont montré que la grande majorité des souches d'*E. coli* de phylogroupe B2 isolées de patients atteints de CCR sont capables de survivre et de se multiplier en macrophages humains contrairement à une souche d'*E. coli* commensale non pathogène. De manière intéressante, la capacité de survie et de réplication intramacrophagique des *E. coli* associés au CCR ne semble pas être restreinte aux bactéries appartenant au phylogroupe B2 puisque ce phénotype est également observé pour les *E. coli* isolés de tumeurs appartenant aux phylogroupes A, B1 et D (**Figure 45**). Ces résultats suggèrent que les macrophages représenteraient une niche de persistance/réplication pour les *E. coli* associés au CCR. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de rechercher la présence d'*E. coli* intramacrophagiques sur des coupes de biopsies de patients atteints de CCR, ainsi que dans les tumeurs de modèles murins de carcinogenèse (souris *APC^{Min/+}* ou traitées à l'AOM/DSS) infectés par des *E. coli* associés au CCR. La détection des *E. coli* serait réalisée par fluorescence *in situ* (FISH, *Fluorescent in situ hybridization*) à l'aide d'une sonde permettant de détecter l'ARNr 16S d'*E. coli*, ou d'un marquage à l'aide d'anticorps anti-*E. coli* et les macrophages seraient marqués à l'aide d'anticorps spécifiques.

Des études *in vitro* pourraient être également réalisées afin de déterminer si les *E. coli* associés au CCR sont capables de survivre à l'activité bactéricide des auto-/ phagolysosomes ou bien si ces bactéries sont capables de modifier/altérer le trafic intracellulaire de leur vacuole. Pour ce faire, suite à l'infection des macrophages, les interactions des vacuoles contenant les *E. coli* associés au CCR avec les différents organelles du trafic endocyttaire classique et de l'autophagie pourraient être suivies au cours du temps par microscopie confocale.

En fonction de leur localisation au niveau de la tumeur, les macrophages sont activés par des stimuli environnementaux différents qui peuvent moduler leur fonction bactéricide. Schématiquement, en périphérie de la tumeur, les macrophages sont polarisés en M1 (pro-inflammatoires et bactéricides). Au contraire, au sein de la tumeur les macrophages sont polarisés en M2 (peu bactéricides). Il serait donc intéressant d'analyser le comportement des *E. coli* isolés de CCR vis-à-vis de macrophages exprimant ces deux états de polarisation. Ces tests pourraient être réalisés *in vitro* puisqu'il est possible à partir de cocktails de cytokines décrits dans la littérature de polariser des macrophages primaires (dérivés de monocytes de sang humain) ou de lignée continue (macrophages dérivés de monocytes humains THP-1) pour exprimer un phénotype M1 ou M2. Par ailleurs, la capacité de survie et de multiplication des souches d'*E. coli* associées au CCR pourrait être analysée dans des macrophages isolés de tumeurs de souris traitées à l'AOM/DSS, comparativement à des macrophages dérivés de la moelle osseuse.

En réponse à l'infection par diverses bactéries à Gram négatif et positif, les macrophages s'engagent dans une reprogrammation transcriptionnelle responsable de l'expression d'un phénotype M1 qui favorise l'élimination des bactéries (Benoit *et al.*, 2008a). Cependant, certaines bactéries pathogènes telles que *Salmonella typhimurium* et *Mycobacterium tuberculosis* sont capables d'interférer avec la polarisation M1 des macrophages et d'autres pathogènes tels que *Coxiella burnetii* ou *Yersinia* sont capables de stimuler une polarisation M2 des macrophages, dans le but de favoriser leur survie intracellulaire (Benoit *et al.*, 2008b; Labonte *et al.*, 2014). La capacité des *E. coli* associés au CCR à polariser les macrophages pour un phénotype donné pourrait être analysée par spectrométrie de masse (Ouedraogo *et al.*, 2012). En effet, chacun des états de polarisation se

traduit par des profils protéiques spécifiques. Brièvement, *in vitro* des macrophages seraient infectés par des souches d'*E. coli* associées au CCR. A différents temps post-infection, une analyse en spectrométrie de masse des protéines extraites des cellules infectées serait réalisée, et les spectres obtenus seraient comparés à ceux obtenus pour des macrophages polarisés pour un phénotype M1 ou M2 par des cocktails cytokiniques spécifiques, servant de référentiels et à ceux de macrophages infectés par une souche d'*E. coli* commensale ou stimulés par du LPS. De manière similaire, le profil de sécrétion de cytokines/chimiokines et le niveau d'expression de gènes décrits comme étant des marqueurs associés à une polarisation M1 ou M2, pourraient être analysés à partir de macrophages infectés par des *E. coli* associés au CCR. En parallèle, le profil d'expression de gènes marqueurs de polarisation M1 ou M2 pourrait être analysé sur des macrophages péritonéaux issus de souris infectées en intra-péritonéales comparativement aux souris ayant reçues du PBS tel que cela a déjà été décrit pour le pathogène *Francisella tularensis* (Shirey *et al.*, 2008).

5) Potentiel pro-tumoral des *E. coli* associés au CCR au travers de leur interaction avec les macrophages

En fonction des stimuli environnementaux auxquels ils sont confrontés, les macrophages subissent des reprogrammations transcriptionnelles activant des fonctions pro-inflammatoire/anti-tumorale (phénotype M1) ou pro-tumorale (phénotype M2), ces deux phénotypes représentant les extrémités d'un continuum d'états d'activation. Les macrophages retrouvés dans les tumeurs associées à une polarisation de type M2 jouent un rôle substantiel dans la carcinogenèse, en sécrétant un arsenal de cytokines/chimiokines, médiateurs de l'inflammation, facteurs de croissance et facteurs pro-angiogéniques. Ainsi, des stimuli activant une reprogrammation des macrophages pour exprimer un phénotype M2 peuvent profondément influencer le développement tumoral. Les tumeurs coliques des patients étant colonisées par *E. coli* et ces bactéries étant capables de persister dans les macrophages, il est possible que les *E. coli* associés au CCR puissent influencer l'état d'activation des macrophages. Nos travaux ont montré que les *E. coli* associés au CCR induisent l'expression de COX-2 par les macrophages. De plus, des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent que l'infection de macrophages humains THP-1 par des souches d'*E. coli* B2 isolées de patients atteints de CCR induit une augmentation de l'expression de gènes codant des facteurs de croissance impliqués dans la mise en place d'une néoangiogenèse VEGF et FGF2,

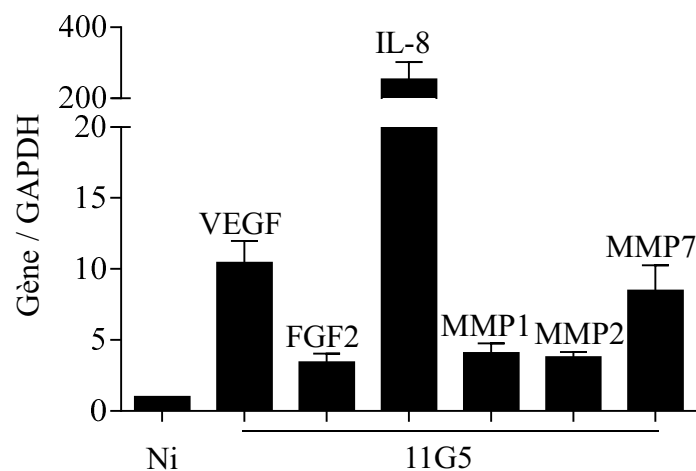


Figure 46 : Expression de facteurs pro-tumoraux par les macrophages infectés par la souche d'*E. coli* 11G5 associée au CCR.

Les THP-1 ont été infectés avec la souche d' *E. coli* 11G5 isolée d'un patient atteint de CCR à une multiplicité d'infection de 100 bactéries par cellules pendant 20 min, puis le milieu d'infection a été remplacé par un milieu contenant de gentamicine. Les ARNm messagers totaux ont été extraits à 8h post-infection. L'infection par la souche 11G5 induit en macrophages une augmentation des ARNm des gènes codant les facteurs pro-angiogéniques VEGF, FGF2, IL-8, et les protéines impliquées dans l'invasion et la migration cellulaire MMP1, MMP2, MMP7.

de la chimiokine associée à l'angiogenèse IL-8, ainsi que l'expression des métalloprotéases MMP2, MMP7 et MMP9 impliquées dans les processus d'invasion cellulaire (**Figure 46**). La capacité des souches d'*E. coli* associées au CCR à activer des fonctions pro-tumorales des macrophages pourrait être analysée par RNAseq afin de rechercher l'apparition de profils d'expression spécifiques des macrophages associés aux tumeurs.

Comme évoqué ci-dessus, l'infection de macrophages par des *E. coli* associés au CCR induit l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse. L'angiogenèse est une étape clé et limitante du développement tumoral. Au cours de l'angiogenèse se met en place une néo-vascularisation qui permet d'augmenter les apports en oxygène et nutriments au site tumoral, indispensable à la croissance tumorale. Il serait intéressant de déterminer si les *E. coli* associés au CCR sont capables de promouvoir l'angiogenèse au travers de leur interaction avec les macrophages. L'expression par les cellules de facteurs impliqués dans l'angiogenèse est soumise à une régulation par des microARN appelés angiomiRs. Les angiomiRs interviennent dans la régulation de l'angiogenèse de manière cellule autonome (dans les cellules endothéliales) ou cellule non autonome (en modulant l'expression de facteurs pro-angiogéniques dans d'autres type cellulaire que les cellules endothéliales) (pour revue (Wang and Olson, 2009)). Il serait ainsi intéressant de rechercher si l'infection de macrophages avec des *E. coli* associés au CCR module l'expression d'angiomiRs, par des approches de qPCR. Par ailleurs, afin de définir le potentiel pro-angiogénique des macrophages infectés par des *E. coli* associés au CCR, des surnageants conditionnés de macrophages infectés pourraient être mis au contact de cellules endothéliales en culture (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*). La prolifération, le développement de micro-vaisseaux et l'activation du récepteur au VEGF (VEGFR2) sur les cellules endothéliales seraient analysés. Le pouvoir pro-angiogénique des souches d'*E. coli* associées au CCR pourrait être également évalué à l'aide d'un modèle *ex-vivo* d'anse aortique murine et en utilisant les modèles murins de CCR AOM/DSS et *APC*^{Min/+}, dans lequel la densité vasculaire au site tumoral serait analysée (Baker *et al.*, 2012). Ces études permettraient de supporter le rôle d'*E. coli* dans le CCR au travers de la modulation du processus angiogénique.

6) Ciblage des macrophages par les *E. coli* associés au CCR à des fins thérapeutiques

Face à la résistance des patients à des stades avancés vis-à-vis des traitements anti-cancéreux conventionnels, des stratégies thérapeutiques alternatives sont explorées. L'utilisation de bactéries comme outils thérapeutiques pour traiter le cancer suscite depuis plusieurs dizaines d'années un intérêt grandissant (Bolhassani and Zahedifard, 2012). Les genres bactériens ayant été exploités comme agents anti-cancer incluent *Salmonella*, *Escherichia*, *Listeria*, *Clostridium*, *Mycobacterium* et *Bifidobacterium*. Ces bactéries peuvent être délivrées à la tumeur par différentes voies (injection intratumorale, injection intraveineuse ou voie orale) et le contrôle de ces souches peut être assuré par des traitements antibiotiques adaptés. Des études précliniques ont montré la capacité de différentes souches bactériennes à délivrer ou produire des molécules thérapeutiques et/ou à induire une réponse anti-tumorale. Selon leurs propriétés, les bactéries peuvent être utilisées comme vecteur de thérapie génique ou pour délivrer/sécréter des molécules thérapeutiques ou oncolytiques dans l'environnement tumoral, à l'intérieur des cellules. A titre d'exemple, un essai clinique a déjà vu le jour en 2009 avec l'utilisation de *Listeria monocytogenes* dans le cadre du cancer du col de l'utérus. Dans cet essai des patientes présentant des stades tardifs de développement tumoral avec métastases ont reçu en intraveineuse une solution contenant *L. monocytogenes* qui exprime l'antigène HPV-16 E7 (exprimé dans plus de 70% des carcinomes cervicaux invasifs) fusionné à la listeriolyse O (LLO, *listeriolysin O*) non hémolytique. La LLO est un facteur de virulence de *L. monocytogenes* impliqué dans la formation de pores membranaires (Maciag *et al.*, 2009). Il a été démontré que la fusion d'antigènes associés aux tumeurs à la LLO augmente l'immunogénicité de cet antigène induisant une meilleure efficacité thérapeutique contre les tumeurs (Gunn *et al.*, 2001; Sewell *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2005). Les résultats encourageants montrent une réduction tumorale chez 30% des patientes atteintes de cancer du col de l'utérus, dont 2 avec disparition des lésions tumorales (Maciag *et al.*, 2009). Par ailleurs, la médiane de survie et la survie à 1 an des patientes traitées sont respectivement de 347 jours et 53% contre 180 jours et 5% décrits dans la littérature pour les patients recevant un traitement classique. Un autre exemple est l'utilisation de souches de *Salmonella typhimurium* atténuées. L'administration de *Salmonella typhimurium* hébergeant un gène codant la protéine de surface TEM8, majoritairement exprimée par les cellules endothéliales au site tumoral, est capable d'inhiber, en modèle murin, l'angiogenèse et la croissance tumorale (Bolhassani and Zahedifard, 2012; Ruan *et al.*, 2009). Des études

récentes ont démontré que plusieurs espèces bactériennes possèdent un tropisme particulier pour les macrophages. A titre d'exemple, la souche *Shigella flexneri* possède un tropisme pour les macrophages associés aux tumeurs, suite à l'infection en intra-veineuse de souris porteuses de xénogreffes de cellules cancéreuses du sein ou d'un modèle développant spontanément des cancers du sein (Galmbacher *et al.*, 2010). De plus, l'infection avec une souche invasive avirulente induit une augmentation de l'apoptose des macrophages associés aux tumeurs avec une diminution de moitié de leur nombre. Ceci s'accompagne d'une réduction de 74% de la taille des tumeurs. Ces résultats suggèrent que le ciblage spécifique des macrophages associés aux tumeurs par des bactéries représente une perspective thérapeutique d'intérêt. Le caractère aéro-anaérobie d'*E. coli* lui conférant la capacité de survivre à la fois dans des milieux oxygéné et hypoxique, une condition environnementale rencontrée au sein des tumeurs solides, et le tropisme des souches d'*E. coli* associées au CCR pour les macrophages, une population cellulaire d'intérêt, pourraient en faire des candidats pour l'élaboration de nouveaux vecteurs thérapeutiques.

Conclusion



En conclusion, ces deux dernières décennies ont été marquées par la découverte de microbiotes intestinaux dysbiotiques associés aux maladies inflammatoires chroniques intestinales et au cancer colorectal. Si un certain nombre d'études prônent un rôle direct d'espèces bactériennes particulières dans le développement du cancer colorectal, d'autres soulèvent l'hypothèse d'un rôle du microbiote dans sa globalité. Ces deux hypothèses ne sont d'ailleurs pas exclusives si l'on considère que les propriétés oncogéniques d'une espèce bactérienne particulière peuvent conduire au remodelage du microbiote intestinal favorisant l'émergence de communautés bactériennes. Nos travaux ont permis de mieux caractériser les *Escherichia coli* associés au cancer colorectal et ont ouvert de nouvelles pistes quant au rôle que pourraient jouer ces bactéries dans la carcinogenèse colorectale au travers de leur interaction avec les cellules de l'hôte. Si des données sont actuellement disponibles concernant la composition du microbiote intestinal associé au cancer colorectal, la difficulté réside maintenant dans la compréhension des interactions complexes qui s'opèrent entre le microbiote intestinal et l'hôte. En effet, le microbiote intestinal, au travers des communautés bactériennes qui le constitue et des activités métaboliques exprimées, peut profondément influencer les réponses de l'hôte, et inversement les modifications environnementales qui vont s'opérer sur le site de développement tumoral doivent affecter le microbiote intestinal. Une meilleure compréhension des interactions entre les bactéries composant le microbiote dysbiotique associé au cancer colorectal et les acteurs cellulaires de la carcinogenèse permettrait de donner des clés pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. Par ailleurs, le développement du cancer colorectal s'étendant sur une longue période (10-15 ans) et des études prospectives permettant de suivre au cours du temps l'évolution du microbiote intestinal en fonction de l'avancement de la maladie permettraient de mieux comprendre l'influence réciproque du microbiote et de la carcinogenèse colorectale.

*Références
Bibliographiques*



- Abdulmir, A.S., Hafidh, R.R., Mahdi, L.K., Al-jeboori Tarik, and Abubaker, F. (2009). Investigation into the controversial association of *Streptococcus gallolyticus* with colorectal cancer and adenoma. *BMC Cancer* 9, 403.
- Abdulmir, A.S., Hafidh, R.R., and Bakar, F.A. (2010). Molecular detection, quantification, and isolation of *Streptococcus gallolyticus* bacteria colonizing colorectal tumors: inflammation-driven potential of carcinogenesis via IL-1, COX-2, and IL-8. *Mol. Cancer* 9, 249.
- Abdulmir, A.S., Hafidh, R.R., and Abu Bakar, F. (2011). The association of *Streptococcus bovis/gallolyticus* with colorectal tumors: the nature and the underlying mechanisms of its etiological role. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 30, 11.
- Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 131–144.
- Adams, J.M. (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 17, 2481–2495.
- Adams, T.D., Gress, R.E., Smith, S.C., Halverson, R.C., Simper, S.C., Rosamond, W.D., Lamonte, M.J., Stroup, A.M., and Hunt, S.C. (2007). Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N. Engl. J. Med.* 357, 753–761.
- Adegboyega, P.A., and Ololade, O. (2004). Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in normal kidneys. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM Off. Publ. Soc. Appl. Immunohistochem.* 12, 71–74.
- Adloff, M., Arnaud, J.P., Ollier, J.C., and Schloegel, M. (1989). [Can the prognosis of patients treated surgically in cancer of the rectum or colon be improved by follow-up? Prospective study of 909 patients]. *Chir. Mém. Académie Chir.* 115, 228–236; discussion 236–237.
- Ahn, J., Sinha, R., Pei, Z., Dominianni, C., Wu, J., Shi, J., Goedert, J.J., Hayes, R.B., and Yang, L. (2013). Human Gut Microbiome and Risk for Colorectal Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 105, 1907–1911.
- Albenberg, L.G., and Wu, G.D. (2014). Diet and the Intestinal Microbiome: Associations, Functions, and Implications for Health and Disease. *Gastroenterology*.
- Algars, A., Irjala, H., Vaitinen, S., Huhtinen, H., Sundström, J., Salmi, M., Ristamäki, R., and Jalkanen, S. (2012). Type and location of tumor-infiltrating macrophages and lymphatic vessels predict survival of colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 131, 864–873.
- Allaj, V., Guo, C., and Nie, D. (2013). Non-steroid anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and cancer. *Cell Biosci.* 3, 8.
- Allen-Vercoe, E., Strauss, J., and Chadee, K. (2011). *Fusobacterium nucleatum*: an emerging gut pathogen? *Gut Microbes* 2, 294–298.
- Alto, N.M., Shao, F., Lazar, C.S., Brost, R.L., Chua, G., Mattoo, S., McMahon, S.A., Ghosh, P., Hughes, T.R., Boone, C., et al. (2006). Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell* 124, 133–145.
- Amano, H., Hayashi, I., Endo, H., Kitasato, H., Yamashina, S., Maruyama, T., Kobayashi, M., Satoh, K., Narita, M., Sugimoto, Y., et al. (2003). Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J. Exp. Med.* 197, 221–232.
- Andersen, N.N., and Jess, T. (2013). Has the risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease decreased? *World J. Gastroenterol. WJG* 19, 7561–7568.

André, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., et al. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* 350, 2343–2351.

André, T., Tournigand, C., Achille, E., Tubiana-Mathieu, N., Lledo, G., Raoul, Y., Carola, E., Flesch, M., Muron, T., Boutan-Laroze, A., et al. (2006). [Adjuvant treatment of colon cancer MOSAIC study's main results]. *Bull. Cancer (Paris)* 93 Suppl 1, S5–9.

Lev-Ari, S., Maimon, Y., Strier, L., Kazanov, D., and Arber, N. (2006). Down-regulation of prostaglandin E2 by curcumin is correlated with inhibition of cell growth and induction of apoptosis in human colon carcinoma cell lines. *J. Soc. Integr. Oncol.* 4, 21–26.

Lev-Ari, S., Kazanov, D., Liberman, E., Ben-Yosef, R., and Arber, N. (2007). Down-regulation of PGE2 by physiologic levels of celecoxib is not sufficient to induce apoptosis or inhibit cell proliferation in human colon carcinoma cell lines. *Dig. Dis. Sci.* 52, 1128–1133.

Arikawa, K., Meraz, I.M., Nishikawa, Y., Ogasawara, J., and Hase, A. (2005). Interleukin-8 secretion by epithelial cells infected with diffusely adherent *Escherichia coli* possessing Afa adhesin-coding genes. *Microbiol. Immunol.* 49, 493–503.

Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.-J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., et al. (2012). Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 338, 120–123.

Aune, D., Chan, D.S.M., Lau, R., Vieira, R., Greenwood, D.C., Kampman, E., and Norat, T. (2011). Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 343, d6617.

Averboukh, F., Ziv, Y., Kariv, Y., Zmora, O., Dotan, I., Klausner, J.M., Rabau, M., and Tulchinsky, H. (2011). Colorectal carcinoma in inflammatory bowel disease: a comparison between Crohn's and ulcerative colitis. *Colorectal Dis. Off. J. Assoc. Coloproctology G. B. Irel.* 13, 1230–1235.

Backlund, M.G., Mann, J.R., Holla, V.R., Buchanan, F.G., Tai, H.-H., Musiek, E.S., Milne, G.L., Katkuri, S., and DuBois, R.N. (2005). 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase Is Down-regulated in Colorectal Cancer. *J. Biol. Chem.* 280, 3217–3223.

Bailey, C., Negus, R., Morris, A., Ziprin, P., Goldin, R., Allavena, P., Peck, D., and Darzi, A. (2007). Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer. *Clin. Exp. Metastasis* 24, 121–130.

Baker, M., Robinson, S.D., Lechertier, T., Barber, P.R., Tavora, B., D'Amico, G., Jones, D.T., Vojnovic, B., and Hodivala-Dilke, K. (2012). Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nat. Protoc.* 7, 89–104.

Balamurugan, R., Rajendiran, E., George, S., Samuel, G.V., and Ramakrishna, B.S. (2008). Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, *Desulfovibrio* and *Enterococcus faecalis* in the feces of patients with colorectal cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23, 1298–1303.

Balish, E., and Warner, T. (2002). *Enterococcus faecalis* induces inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice. *Am. J. Pathol.* 160, 2253–2257.

Bamba, H., Ota, S., Kato, A., Adachi, A., Itoyama, S., and Matsuzaki, F. (1999). High expression of cyclooxygenase-2 in macrophages of human colonic adenoma. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 83, 470–475.

- Barbera-Guillem, E., Nyhus, J.K., Wolford, C.C., Friece, C.R., and Sampsel, J.W. (2002). Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Res.* 62, 7042–7049.
- Bardou, M., Barkun, A.N., and Martel, M. (2013). Obesity and colorectal cancer. *Gut* 62, 933–947.
- Barker, N., Wetering, M. van de, and Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes Dev.* 22, 1856–1864.
- Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Clevers, H. (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457, 608–611.
- Barnich, N., Boudeau, J., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2003). Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol. Microbiol.* 48, 781–794.
- Barnich, N., Carvalho, F.A., Glasser, A.-L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., Peeters, H., Bommelaer, G., Desreumaux, P., Colombel, J.-F., et al. (2007). CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J. Clin. Invest.* 117, 1566–1574.
- Barthold, S.W., and Jonas, A.M. (1977). Morphogenesis of Early 1,2-Dimethylhydrazine-induced Lesions and Latent Period Reduction of Colon Carcinogenesis in Mice by a Variant of *Citrobacter freundii*. *Cancer Res.* 37, 4352–4360.
- Beaugerie, L., Svrcek, M., Seksik, P., Bouvier, A., Simon, T., Allez, M., Brixi, H., Gornet, J., Altwegg, R., Beau, P., et al. (2013). Risk of Colorectal High-Grade Dysplasia and Cancer in a Prospective Observational Cohort of Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 145, 166–175.e8.
- Benatti, P., Gafà, R., Barana, D., Marino, M., Scarselli, A., Pedroni, M., Maestri, I., Guerzoni, L., Roncucci, L., Menigatti, M., et al. (2005). Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 8332–8340.
- Benoit, M., Desnues, B., and Mege, J.-L. (2008a). Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *J. Immunol.* 181, 3733–3739.
- Benoit, M., Barbarat, B., Bernard, A., Olive, D., and Mege, J.-L. (2008b). *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, stimulates an atypical M2 activation program in human macrophages. *Eur. J. Immunol.* 38, 1065–1070.
- Berger, C.N., Billker, O., Meyer, T.F., Servin, A.L., and Kansau, I. (2004). Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* (Afa/Dr DAEC). *Mol. Microbiol.* 52, 963–983.
- Berin, M.C., Darfeuille-Michaud, A., Egan, L.J., Miyamoto, Y., and Kagnoff, M.F. (2002). Role of EHEC O157:H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF-kappaB and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8. *Cell. Microbiol.* 4, 635–648.
- Bertagnolli, M.M., Eagle, C.J., Zauber, A.G., Redston, M., Solomon, S.D., Kim, K., Tang, J., Rosenstein, R.B., Wittes, J., Corle, D., et al. (2006). Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. *N. Engl. J. Med.* 355, 873–884.
- Bétis, F., Brest, P., Hofman, V., Guignot, J., Kansau, I., Rossi, B., Servin, A., and Hofman, P. (2003). Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* infection in T84 cell monolayers induces increased neutrophil transepithelial

migration, which in turn promotes cytokine-dependent upregulation of decay-accelerating factor (CD55), the receptor for Afa/Dr adhesins. *Infect. Immun.* *71*, 1774–1783.

Bingle, L., Brown, N.J., and Lewis, C.E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* *196*, 254–265.

Biswas, S.K., Gangi, L., Paul, S., Schioppa, T., Sacconi, A., Sironi, M., Bottazzi, B., Doni, A., Vincenzo, B., Pasqualini, F., et al. (2006). A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* *107*, 2112–2122.

Blumenthal, R.D., Leon, E., Hansen, H.J., and Goldenberg, D.M. (2007). Expression patterns of CEACAM5 and CEACAM6 in primary and metastatic cancers. *BMC Cancer* *7*, 2.

Boland, C.R., and Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* *138*, 2073–2087.e3.

Boleij, A., and Tjalsma, H. (2012). Gut bacteria in health and disease: a survey on the interface between intestinal microbiology and colorectal cancer. *Biol. Rev.* *87*, 701–730.

Boleij, A., and Tjalsma, H. (2013). The itinerary of *Streptococcus gallolyticus* infection in patients with colonic malignant disease. *Lancet Infect. Dis.* *13*, 719–724.

Boleij, A., Roelofs, R., Schaeps, R.M.J., Schölin, T., Glaser, P., Swinkels, D.W., Kato, I., and Tjalsma, H. (2010). Increased exposure to bacterial antigen Rpl7/L12 in early stage colorectal cancer patients. *Cancer* *116*, 4014–4022.

Bolhassani, A., and Zahedifard, F. (2012). Therapeutic live vaccines as a potential anticancer strategy. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *131*, 1733–1743.

Bond, C.E., Umapathy, A., Ramsnes, I., Greco, S.A., Zhen Zhao, Z., Mallitt, K.-A., Buttenshaw, R.L., Montgomery, G.W., Leggett, B.A., and Whitehall, V.L.J. (2012). p53 mutation is common in microsatellite stable, BRAF mutant colorectal cancers. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *130*, 1567–1576.

Bonnet, M., Buc, E., Sauvanet, P., Darcha, C., Dubois, D., Pereira, B., Déchelotte, P., Bonnet, R., Pezet, D., and Darfeuille-Michaud, A. (2014). Colonization of the Human Gut by *E. coli* and Colorectal Cancer Risk. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *20*, 859–867.

Boquet, P. (2001). The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* *39*, 1673–1680.

Bos, M.P., Grunert, F., and Belland, R.J. (1997). Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Opa variants of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* *65*, 2353–2361.

Boudeau, J., Glasser, A.L., Masseret, E., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. (1999). Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect. Immun.* *67*, 4499–4509.

Boudeau, J., Barnich, N., and Darfeuille-Michaud, A. (2001). Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol. Microbiol.* *39*, 1272–1284.

Le Bougu  nec, C., and Servin, A.L. (2006). Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. FEMS Microbiol. Lett. 256, 185–194.

Bringer, M.-A., Barnich, N., Glasser, A.-L., Bardot, O., and Darfeuille-Michaud, A. (2005). HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn’s disease. Infect. Immun. 73, 712–721.

Bringer, M.-A., Rolhion, N., Glasser, A.-L., and Darfeuille-Michaud, A. (2007). The oxidoreductase DsbA plays a key role in the ability of the Crohn’s disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 to resist macrophage killing. J. Bacteriol. 189, 4860–4871.

Van den Broek, I., Sparidans, R.W., Engwegen, J.Y.M., Cats, A., Depla, A.C.T.M., Schellens, J.H.M., and Beijnen, J.H. (2010). Evaluation of human neutrophil peptide-1, -2 and -3 as serum markers for colorectal cancer. Cancer Biomark. 7, 109–115.

Bronowski, C., Smith, S.L., Yokota, K., Corkill, J.E., Martin, H.M., Campbell, B.J., Rhodes, J.M., Hart, C.A., and Winstanley, C. (2008). A subset of mucosa-associated *Escherichia coli* isolates from patients with colon cancer, but not Crohn’s disease, share pathogenicity islands with urinary pathogenic *E. coli*. Microbiol. Read. Engl. 154, 571–583.

Buc, E., Dubois, D., Sauvanet, P., Raisch, J., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., Pezet, D., and Bonnet, R. (2013). High Prevalence of Mucosa-Associated *E. coli* Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer. PLoS ONE 8, e56964.

Buchanan, F.G., Wang, D., Bargiacchi, F., and DuBois, R.N. (2003). Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. J. Biol. Chem. 278, 35451–35457.

Burkitt, D.P. (1969). Related disease--related cause? Lancet 2, 1229–1231.

Canani, R.B., Costanzo, M.D., Leone, L., Pedata, M., Meli, R., and Calignano, A. (2011). Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. World J. Gastroenterol. WJG 17, 1519–1528.

Canavan, C., Abrams, K.R., and Mayberry, J. (2006). Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn’s disease. Aliment. Pharmacol. Ther. 23, 1097–1104.

Candela, M. (2014). Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. World J. Gastroenterol. 20, 908.

Caprioli, A., Falbo, V., Roda, L.G., Ruggeri, F.M., and Zona, C. (1983). Partial purification and characterization of an *escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. Infect. Immun. 39, 1300–1306.

Carethers, J.M., Smith, E.J., Behling, C.A., Nguyen, L., Tajima, A., Doctolero, R.T., Cabrera, B.L., Goel, A., Arnold, C.A., Miyai, K., et al. (2004). Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. Gastroenterology 126, 394–401.

Cario, E. (2005). Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. Gut 54, 1182–1193.

Carvalho, F.A., Barnich, N., Sauvanet, P., Darcha, C., Gelot, A., and Darfeuille-Michaud, A. (2008). Crohn’s disease-associated *Escherichia coli* LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin. Inflamm. Bowel Dis. 14, 1051–1060.

Carvalho, F.A., Barnich, N., Sivignon, A., Darcha, C., Chan, C.H.F., Stanners, C.P., and Darfeuille-Michaud, A. (2009). Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J. Exp. Med.* 206, 2179–2189.

Castellarin, M., Warren, R.L., Freeman, J.D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., Barnes, R., Watson, P., Allen-Vercoe, E., Moore, R.A., et al. (2012). *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* 22, 299–306.

Castellone, M.D., Teramoto, H., Williams, B.O., Druey, K.M., and Gutkind, J.S. (2005). Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* 310, 1504–1510.

Cavalli, V., Vilbois, F., Corti, M., Marcote, M.J., Tamura, K., Karin, M., Arkinstall, S., and Gruenberg, J. (2001). The stress-induced MAP kinase p38 regulates endocytic trafficking via the GDI:Rab5 complex. *Mol. Cell* 7, 421–432.

Cerf-Bensussan, N., and Gaboriau-Routhiau, V. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 735–744.

Chan, A.T., Ogino, S., and Fuchs, C.S. (2007). Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N. Engl. J. Med.* 356, 2131–2142.

Chan, D.S.M., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D.C., Kampman, E., and Norat, T. (2011). Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PloS One* 6, e20456.

Chandrasekharan, N.V., and Simmons, D.L. (2004). The cyclooxygenases. *Genome Biol.* 5, 241.

Chapman, M.A., Buckley, D., Henson, D.B., and Armitage, N.C. (1998). Preoperative carcinoembryonic antigen is related to tumour stage and long-term survival in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 78, 1346–1349.

Chapple, K.S., Cartwright, E.J., Hawcroft, G., Tisbury, A., Bonifer, C., Scott, N., Windsor, A.C., Guillou, P.J., Markham, A.F., Coletta, P.L., et al. (2000). Localization of cyclooxygenase-2 in human sporadic colorectal adenomas. *Am. J. Pathol.* 156, 545–553.

Chassaing, B., and Darfeuille-Michaud, A. (2011). The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140, 1720–1728.

Chassaing, B., and Darfeuille-Michaud, A. (2013). The σE pathway is involved in biofilm formation by Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 195, 76–84.

Chassaing, B., Rolhion, N., de Vallée, A., Salim, S.Y., Prorok-Hamon, M., Neut, C., Campbell, B.J., Söderholm, J.D., Hugot, J.-P., Colombel, J.-F., et al. (2011). Crohn disease--associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J. Clin. Invest.* 121, 966–975.

Chell, S.D., Witherden, I.R., Dobson, R.R., Moorghen, M., Herman, A.A., Qualtrough, D., Williams, A.C., and Paraskeva, C. (2006). Increased EP4 receptor expression in colorectal cancer progression promotes cell growth and anchorage independence. *Cancer Res.* 66, 3106–3113.

Chen, J., and Iverson, D. (2012). Estrogen in obesity-associated colon cancer: friend or foe? Protecting postmenopausal women but promoting late-stage colon cancer. *Cancer Causes Control CCC* 23, 1767–1773.

Chen, G.Y., Shaw, M.H., Redondo, G., and Núñez, G. (2008). The innate immune receptor Nod1 protects the intestine from inflammation-induced tumorigenesis. *Cancer Res.* 68, 10060–10067.

- Chen, G.Y., Liu, M., Wang, F., Bertin, J., and Núñez, G. (2011a). A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 7187–7194.
- Chen, T.-C., Tsai, J.-P., Huang, H.-J., Teng, C.-C., Chien, S.-J., Kuo, H.-C., Huang, W.-S., and Chen, C.-N. (2011b). Regulation of cyclooxygenase-2 expression in human bladder epithelial cells infected with type I fimbriated uropathogenic *E. coli*. *Cell. Microbiol.* *13*, 1703–1713.
- Chen, W., Liu, F., Ling, Z., Tong, X., and Xiang, C. (2012). Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PloS One* *7*, e39743.
- Cheng, H., and Leblond, C.P. (1974a). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am. J. Anat.* *141*, 461–479.
- Cheng, H., and Leblond, C.P. (1974b). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am. J. Anat.* *141*, 537–561.
- Cho, E., Smith-Warner, S.A., Ritz, J., van den Brandt, P.A., Colditz, G.A., Folsom, A.R., Freudenheim, J.L., Giovannucci, E., Goldbohm, R.A., Graham, S., et al. (2004). Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann. Intern. Med.* *140*, 603–613.
- Chochi, K., Ichikura, T., Kinoshita, M., Majima, T., Shinomiya, N., Tsujimoto, H., Kawabata, T., Sugawara, H., Ono, S., Seki, S., et al. (2008). *Helicobacter pylori* augments growth of gastric cancers via the lipopolysaccharide-toll-like receptor 4 pathway whereas its lipopolysaccharide attenuates antitumor activities of human mononuclear cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 2909–2917.
- Choi, S.W., Stickel, F., Baik, H.W., Kim, Y.I., Seitz, H.K., and Mason, J.B. (1999). Chronic alcohol consumption induces genomic but not p53-specific DNA hypomethylation in rat colon. *J. Nutr.* *129*, 1945–1950.
- Chulada, P.C., Thompson, M.B., Mahler, J.F., Doyle, C.M., Gaul, B.W., Lee, C., Tiano, H.F., Morham, S.G., Smithies, O., and Langenbach, R. (2000). Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Res.* *60*, 4705–4708.
- Chun, K.-S., and Surh, Y.-J. (2004). Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem. Pharmacol.* *68*, 1089–1100.
- Cianchi, F., Cortesini, C., Bechi, P., Fantappiè, O., Messerini, L., Vannacilli, A., Sardi, I., Baroni, G., Boddi, V., Mazzanti, R., et al. (2001). Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology* *121*, 1339–1347.
- Cianchi, F., Cuzzocrea, S., Vinci, M.C., Messerini, L., Comin, C.E., Navarra, G., Perigli, G., Centorrino, T., Marzocco, S., Lenzi, E., et al. (2010). Heterogeneous expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase within colorectal tumors: correlation with tumor angiogenesis. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* *42*, 20–27.
- Clements, A., Young, J.C., Constantinou, N., and Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* *3*, 71–87.
- Clevers, H. (2013). The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment. *Cell* *154*, 274–284.
- Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* *149*, 1192–1205.

- Comayras, C., Tasca, C., Pérès, S.Y., Ducommun, B., Oswald, E., and De Rycke, J. (1997). *Escherichia coli* cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G2/M transition by preventing cdc2 protein kinase dephosphorylation and activation. *Infect. Immun.* 65, 5088–5095.
- Cooper, H.S., Everley, L., Chang, W.C., Pfeiffer, G., Lee, B., Murthy, S., and Clapper, M.L. (2001). The role of mutant Apc in the development of dysplasia and cancer in the mouse model of dextran sulfate sodium-induced colitis. *Gastroenterology* 121, 1407–1416.
- Corcelle, E., Djerbi, N., Mari, M., Nebout, M., Fiorini, C., Fénichel, P., Hofman, P., Poujeol, P., and Mograbi, B. (2007). Control of the autophagy maturation step by the MAPK ERK and p38: lessons from environmental carcinogens. *Autophagy* 3, 57–59.
- Cougoux, A., Dalmasso, G., Martinez, R., Buc, E., Delmas, J., Gibold, L., Sauvanet, P., Darcha, C., Déchelotte, P., Bonnet, M., et al. (2014). Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* gutjnl-2013-305257.
- Couturier-Maillard, A., Secher, T., Rehman, A., Normand, S., De Arcangelis, A., Haesler, R., Huot, L., Grandjean, T., Bressenot, A., Delanoye-Crespin, A., et al. (2013). NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J. Clin. Invest.* 123, 700–711.
- Cowan, T.E., Palmnäs, M.S.A., Yang, J., Bomhof, M.R., Ardell, K.L., Reimer, R.A., Vogel, H.J., and Shearer, J. (2014). Chronic coffee consumption in the diet-induced obese rat: impact on gut microbiota and serum metabolomics. *J. Nutr. Biochem.* 25, 489–495.
- Croxen, M.A., and Finlay, B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 26–38.
- 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.
- Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H.-J., Lynch, H.T., Minsky, B., Nordlinger, B., and Starling, N. (2010). Colorectal cancer. *Lancet* 375, 1030–1047.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J.F. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115, 1405–1413.
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127, 412–421.
- Debunne, H., and Ceelen, W. (2013). Mucinous differentiation in colorectal cancer: molecular, histological and clinical aspects. *Acta Chir. Belg.* 113, 385–390.
- Demuth, D.R., Savary, R., Golub, E., and Shenker, B.J. (1996). Identification and analysis of fipA, a *Fusobacterium nucleatum* immunosuppressive factor gene. *Infect. Immun.* 64, 1335–1341.
- Deszo, E.L., Steenbergen, S.M., Freedberg, D.I., and Vimr, E.R. (2005). *Escherichia coli* K1 polysialic acid O-acetyltransferase gene, neuO, and the mechanism of capsule form variation involving a mobile contingency locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5564–5569.

- Devis, A., Dony, A., De Boelpaepe, F., Verhulst, C., and Sersté, J.P. (1989). [Streptococcus bovis septicemia and colonic cancer]. *Acta Chir. Belg.* 89, 58–60.
- Dhawan, P., Ahmad, R., Chaturvedi, R., Smith, J.J., Midha, R., Mittal, M.K., Krishnan, M., Chen, X., Eschrich, S., Yeatman, T.J., et al. (2011). Claudin-2 expression increases tumorigenicity of colon cancer cells: role of epidermal growth factor receptor activation. *Oncogene* 30, 3234–3247.
- Díaz-Muñoz, M.D., Osma-García, I.C., Fresno, M., and Iñiguez, M.A. (2012). Involvement of PGE2 and the cAMP signalling pathway in the up-regulation of COX-2 and mPGES-1 expression in LPS-activated macrophages. *Biochem. J.* 443, 451–461.
- Dimitrakopoulos, O., Liopeta, K., Dimitrakopoulos, G., and Paliogianni, F. (2013). Replication of *Brucella melitensis* inside primary human monocytes depends on mitogen activated protein kinase signaling. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 15, 450–460.
- Dixon, D.A., Blanco, F.F., Bruno, A., and Patrignani, P. (2013). Mechanistic Aspects of COX-2 Expression in Colorectal Neoplasia. In *Prospects for Chemoprevention of Colorectal Neoplasia*, A.T. Chan, and E. Detering, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 7–37.
- Dixon, M.R., Haukoos, J.S., Udani, S.M., Naghi, J.J., Arnell, T.D., Kumar, R.R., and Stamos, M.J. (2003). Carcinoembryonic antigen and albumin predict survival in patients with advanced colon and rectal cancer. *Arch. Surg. Chic. Ill* 138, 962–966.
- Doherty, G.A., Byrne, S.M., Molloy, E.S., Malhotra, V., Austin, S.C., Kay, E.W., Murray, F.E., and Fitzgerald, D.J. (2009a). Proneoplastic effects of PGE2 mediated by EP4 receptor in colorectal cancer. *BMC Cancer* 9, 207.
- Doherty, G.A., Byrne, S.M., Austin, S.C., Scully, G.M., Sadlier, D.M., Neilan, T.G., Kay, E.W., Murray, F.E., and Fitzgerald, D.J. (2009b). Regulation of the apoptosis-inducing kinase DRAK2 by cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 101, 483–491.
- Dove-Edwin, I., de Jong, A.E., Adams, J., Mesher, D., Lipton, L., Sasieni, P., Vasen, H.F.A., and Thomas, H.J.W. (2006). Prospective results of surveillance colonoscopy in dominant familial colorectal cancer with and without Lynch syndrome. *Gastroenterology* 130, 1995–2000.
- Dreux, N., Denizot, J., Martinez-Medina, M., Mellmann, A., Billig, M., Kisiela, D., Chattopadhyay, S., Sokurenko, E., Neut, C., Gower-Rousseau, C., et al. (2013). Point mutations in FimH adhesin of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathog.* 9, e1003141.
- Dubois, D., Delmas, J., Cady, A., Robin, F., Sivignon, A., Oswald, E., and Bonnet, R. (2010). Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2122–2129.
- Duca, F.A., Sakar, Y., Lepage, P., Devime, F., Langelier, B., Doré, J., and Covasa, M. (2014). Replication of obesity and associated signaling pathways through transfer of microbiota from obese prone rat. *Diabetes* DB_131526.
- Duffy, M.J. (2001). Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin. Chem.* 47, 624–630.
- Eaden, J.A., Abrams, K.R., and Mayberry, J.F. (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48, 526–535.

- Eberhart, C.E., Coffey, R.J., Radhika, A., Giardiello, F.M., Ferrenbach, S., and DuBois, R.N. (1994). Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 107, 1183–1188.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–1638.
- Edgar, B.A. (2012). Intestinal stem cells: no longer immortal but ever so clever... *EMBO J.* 31, 2441–2443.
- Edge, S., and Compton, C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM - Springer. *Ann. Surg. Oncol.* 6, 1471–1474.
- Edin, S., Wikberg, M.L., Dahlin, A.M., Rutegård, J., Öberg, Å., Oldenborg, P.-A., and Palmqvist, R. (2012). The Distribution of Macrophages with a M1 or M2 Phenotype in Relation to Prognosis and the Molecular Characteristics of Colorectal Cancer. *PLoS ONE* 7, e47045.
- Egile, C., Loisel, T.P., Laurent, V., Li, R., Pantaloni, D., Sansonetti, P.J., and Carlier, M.F. (1999). Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J. Cell Biol.* 146, 1319–1332.
- Ellmerich, S., Schöller, M., Duranton, B., Gossé, F., Galluser, M., Klein, J.-P., and Raul, F. (2000). Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. *Carcinogenesis* 21, 753–756.
- Elzagheid, A., Emaetig, F., Alkikhia, L., Buhmeida, A., Syrjänen, K., El-Faitori, O., Latto, M., Collan, Y., and Pyrhönen, S. (2013). High cyclooxygenase-2 expression is associated with advanced stages in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 33, 3137–3143.
- Erdem, A.L., Avelino, F., Xicohtencatl-Cortes, J., and Girón, J.A. (2007). Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 189, 7426–7435.
- Erreni, M., Mantovani, A., and Allavena, P. (2011). Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* 4, 141–154.
- Escobar-Páramo, P., Grenet, K., Le Menac'h, A., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Rahimy, M.C., Andreumont, A., et al. (2004). Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5698–5700.
- Essler, M., Linder, S., Schell, B., Hüfner, K., Wiedemann, A., Randhahn, K., Staddon, J.M., and Aepfelbacher, M. (2003). Cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli* stimulates Rho/Rho-kinase-dependent myosin light-chain phosphorylation without inactivating myosin light-chain phosphatase in endothelial cells. *Infect. Immun.* 71, 5188–5193.
- Eyking, A., Ey, B., Rünzi, M., Roig, A.I., Reis, H., Schmid, K.W., Gerken, G., Podolsky, D.K., and Cario, E. (2011). Toll-like receptor 4 variant D299G induces features of neoplastic progression in Caco-2 intestinal cells and is associated with advanced human colon cancer. *Gastroenterology* 141, 2154–2165.
- Fardini, Y., Wang, X., Témoïn, S., Nithianantham, S., Lee, D., Shoham, M., and Han, Y.W. (2011). *Fusobacterium nucleatum* adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity. *Mol. Microbiol.* 82, 1468–1480.
- Fearon, E.R. (2011). Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6, 479–507.

- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.
- 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.
- Fenwick, S.W., Toogood, G.J., Lodge, J.P.A., and Hull, M.A. (2003). The effect of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib on human colorectal cancer liver metastases. *Gastroenterology* 125, 716–729.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W.W., Comber, H., Forman, D., and Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 49, 1374–1403.
- Fiorentini, C., Matarrese, P., Straface, E., Falzano, L., Fabbri, A., Donelli, G., Cossarizza, A., Boquet, P., and Malorni, W. (1998). Toxin-induced activation of Rho GTP-binding protein increases Bcl-2 expression and influences mitochondrial homeostasis. *Exp. Cell Res.* 242, 341–350.
- Van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 241–260.
- Flossmann, E., Rothwell, P.M., and British Doctors Aspirin Trial and the UK-TIA Aspirin Trial (2007). Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. *Lancet* 369, 1603–1613.
- Forssell, J., Oberg, A., Henriksson, M.L., Stenling, R., Jung, A., and Palmqvist, R. (2007). High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 1472–1479.
- Franco, A.A., Mundy, L.M., Trucksis, M., Wu, S., Kaper, J.B., and Sears, C.L. (1997). Cloning and characterization of the *Bacteroides fragilis* metalloprotease toxin gene. *Infect. Immun.* 65, 1007–1013.
- Fraser, M.E., Fujinaga, M., Cherney, M.M., Melton-Celsa, A.R., Twiddy, E.M., O'Brien, A.D., and James, M.N.G. (2004). Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biol. Chem.* 279, 27511–27517.
- Fratti, R.A., Chua, J., and Deretic, V. (2003). Induction of p38 mitogen-activated protein kinase reduces early endosome autoantigen 1 (EEA1) recruitment to phagosomal membranes. *J. Biol. Chem.* 278, 46961–46967.
- Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 12, 298–306.
- Frisan, T., Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., StenérLöw, 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.
- Fujino, H., Toyomura, K., Chen, X., Regan, J.W., and Murayama, T. (2011). Prostaglandin E₂ regulates cellular migration via induction of vascular endothelial growth factor receptor-1 in HCA-7 human colon cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 81, 379–387.
- Funada, Y., Noguchi, T., Kikuchi, R., Takeno, S., Uchida, Y., and Gabbert, H.E. (2003). Prognostic significance of CD8⁺ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 10, 309–313.

- Gafà, R., Maestri, I., Matteuzzi, M., Santini, A., Ferretti, S., Cavazzini, L., and Lanza, G. (2000). Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer* 89, 2025–2037.
- Galiatsatos, P., and Foulkes, W.D. (2006). Familial Adenomatous Polyposis. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 385–398.
- Galmbacher, K., Heisig, M., Hotz, C., Wischhusen, J., Galmiche, A., Bergmann, B., Gentschev, I., Goebel, W., Rapp, U.R., and Fensterle, J. (2010). *Shigella* Mediated Depletion of Macrophages in a Murine Breast Cancer Model Is Associated with Tumor Regression. *PLoS ONE* 5, e9572.
- Gao, Y., Hayes, R.B., Huang, W.-Y., Caporaso, N.E., Burdette, L., Yeager, M., Chanock, S.J., and Berndt, S.I. (2011). DNA repair gene polymorphisms and tobacco smoking in the risk for colorectal adenomas. *Carcinogenesis* 32, 882–887.
- Giardiello, F.M., Casero, R.A., Jr, Hamilton, S.R., Hyland, L.M., Trimbath, J.D., Geiman, D.E., Judge, K.R., Hubbard, W., Offerhaus, G.J.A., and Yang, V.W. (2004). Prostanoids, ornithine decarboxylase, and polyamines in primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 126, 425–431.
- Gill, C.I.R., and Rowland, I.R. (2002). Diet and cancer: assessing the risk. *Br. J. Nutr.* 88 Suppl 1, S73–87.
- De Giorgio, R., and Blandizzi, C. (2010). Targeting Enteric Neuroplasticity: Diet and Bugs as New Key Factors. *Gastroenterology* 138, 1663–1666.
- Giovannucci, E. (2002). Epidemiologic Studies of Folate and Colorectal Neoplasia: a Review. *J. Nutr.* 132, 2350S–2355S.
- Giovannucci, E., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Fuchs, C., Rosner, B.A., Speizer, F.E., and Willett, W.C. (1998). Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. *Ann. Intern. Med.* 129, 517–524.
- Glasser, A.L., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, M.H., Colombel, J.F., and Darfeuille-Michaud, A. (2001). Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect. Immun.* 69, 5529–5537.
- Gold, P., and Freedman, S.O. (1965). Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* 122, 467–481.
- Goodwin, A.C., Destefano Shields, C.E., Wu, S., Huso, D.L., Wu, X., Murray-Stewart, T.R., Hacker-Prietz, A., Rabizadeh, S., Woster, P.M., Sears, C.L., et al. (2011). Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced colon tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 15354–15359.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953–964.
- Greene, F.L., Stewart, A.K., and Norton, H.J. (2002). A new TNM staging strategy for node-positive (stage III) colon cancer: an analysis of 50,042 patients. *Ann. Surg.* 236, 416–421; discussion 421.
- Greenhough, A., Smartt, H.J.M., Moore, A.E., Roberts, H.R., Williams, A.C., Paraskeva, C., and Kaidi, A. (2009). The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 30, 377–386.
- Greenhough, A., Wallam, C.A., Hicks, D.J., Moorghen, M., Williams, A.C., and Paraskeva, C. (2010). The proapoptotic BH3-only protein Bim is downregulated in a subset of colorectal cancers and is repressed by antiapoptotic COX-2/PGE(2) signalling in colorectal adenoma cells. *Oncogene* 29, 3398–3410.

- Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destrée, O., Kielman, M., and Clevers, H. (2005). Expression Pattern of Wnt Signaling Components in the Adult Intestine. *Gastroenterology* 129, 626–638.
- Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.-W., Egan, L.J., Kagnoff, M.F., and Karin, M. (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118, 285–296.
- Grivennikov, S.I. (2013). Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin. Immunopathol.* 35, 229–244.
- 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., Masucci, M.G., and Frisan, T. (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.
- Guignot, J., Chaplais, C., Coconnier-Polter, M.-H., and Servin, A.L. (2007). The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 9, 204–221.
- Guignot, J., Hudault, S., Kansau, I., Chau, I., and Servin, A.L. (2009). Human decay-accelerating factor and CEACAM receptor-mediated internalization and intracellular lifestyle of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* in epithelial cells. *Infect. Immun.* 77, 517–531.
- Gunn, G.R., Zubair, A., Peters, C., Pan, Z.K., Wu, T.C., and Paterson, Y. (2001). Two *Listeria monocytogenes* vaccine vectors that express different molecular forms of human papilloma virus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV-16. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 6471–6479.
- Gupta, R.A., and Dubois, R.N. (2001). Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat. Rev. Cancer* 1, 11–21.
- Gupta, R.B., Harpaz, N., Itzkowitz, S., Hossain, S., Matula, S., Kornbluth, A., Bodian, C., and Ullman, T. (2007). Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology* 133, 1099–1105; quiz 1340–1341.
- Gustafsson, A., Hansson, E., Kressner, U., Nordgren, S., Andersson, M., Wang, W., Lönnroth, C., and Lundholm, K. (2007). EP1-4 subtype, COX and PPAR gamma receptor expression in colorectal cancer in prediction of disease-specific mortality. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 121, 232–240.
- 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.
- Hague, A., Elder, D.J., Hicks, D.J., and Paraskeva, C. (1995). Apoptosis in colorectal tumour cells: induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 60, 400–406.
- Half, E., Bercovich, D., and Rozen, P. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J. Rare Dis.* 4, 22.
- Hammarström, S. (1999). The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin. Cancer Biol.* 9, 67–81.

- Han, Y.W., Shi, W., Huang, G.T., Kinder Haake, S., Park, N.H., Kuramitsu, H., and Genco, R.J. (2000). Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect. Immun.* 68, 3140–3146.
- Han, Y.W., Ikegami, A., Rajanna, C., Kawsar, H.I., Zhou, Y., Li, M., Sojar, H.T., Genco, R.J., Kuramitsu, H.K., and Deng, C.X. (2005). Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria. *J. Bacteriol.* 187, 5330–5340.
- Hawcroft, G., Ko, C.W.S., and Hull, M.A. (2007). Prostaglandin E2-EP4 receptor signalling promotes tumorigenic behaviour of HT-29 human colorectal cancer cells. *Oncogene* 26, 3006–3019.
- Heath, J.P. (1996). Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol. Int.* 20, 139–146.
- Heinimann, K. (2013). Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of Microsatellite Instability Status. *Front. Oncol.* 3, 272.
- Herman, J.G., Umar, A., Polyak, K., Graff, J.R., Ahuja, N., Issa, J.P., Markowitz, S., Willson, J.K., Hamilton, S.R., Kinzler, K.W., et al. (1998). Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6870–6875.
- Higashide, T., Hinoda, Y., Itoh, J., Takahashi, H., Satoh, Y., Ibayashi, Y., Imai, K., and Yachi, A. (1990). Detection of mRNAs of carcinoembryonic antigen and nonspecific cross-reacting antigen genes in colorectal adenomas and carcinomas by in situ hybridization. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 81, 1149–1154.
- Ho, S., Pothoulakis, C., and Koon, H.W. (2013). Antimicrobial peptides and colitis. *Curr. Pharm. Des.* 19, 40–47.
- Homburg, S., Oswald, E., Hacker, J., and Dobrindt, U. (2007). Expression analysis of the colibactin gene cluster coding for a novel polyketide in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 275, 255–262.
- Hooper, L.V., and Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 159–169.
- Hou, L., Jiang, J., Liu, B., Nasca, P.C., Wu, Y., Zou, X., Han, W., Chen, Y., Zhang, B., Xue, F., et al. (2014). Association between smoking and deaths due to colorectal malignant carcinoma: a national population-based case-control study in China. *Br. J. Cancer.*
- Hu, B., Elinav, E., Huber, S., Booth, C.J., Strowig, T., Jin, C., Eisenbarth, S.C., and Flavell, R.A. (2010). Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21635–21640.
- Huang, Z., Sutton, S.E., Wallenfang, A.J., Orchard, R.C., Wu, X., Feng, Y., Chai, J., and Alto, N.M. (2009). Structural insights into host GTPase isoform selection by a family of bacterial GEF mimics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 853–860.
- Hull, M.A., Booth, J.K., Tisbury, A., Scott, N., Bonifer, C., Markham, A.F., and Coletta, P.L. (1999). Cyclooxygenase 2 is up-regulated and localized to macrophages in the intestine of Min mice. *Br. J. Cancer* 79, 1399–1405.
- Hull, M.A., Ko, S.C.W., and Hawcroft, G. (2004). Prostaglandin EP receptors: targets for treatment and prevention of colorectal cancer? *Mol. Cancer Ther.* 3, 1031–1039.
- Humphries, A., and Wright, N.A. (2008). Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 415–424.

- Huycke, M.M., and Moore, D.R. (2002). In vivo production of hydroxyl radical by *Enterococcus faecalis* colonizing the intestinal tract using aromatic hydroxylation. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 818–826.
- Huycke, M.M., Abrams, V., and Moore, D.R. (2002). *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis* 23, 529–536.
- Hwang, S., Gwon, S.-Y., Kim, M.S., Lee, S., and Rhee, K.-J. (2013). *Bacteroides fragilis* Toxin Induces IL-8 Secretion in HT29/C1 Cells through Disruption of E-cadherin Junctions. *Immune Netw.* 13, 213–217.
- Hyngstrom, J.R., Hu, C.-Y., Xing, Y., You, Y.N., Feig, B.W., Skibber, J.M., Rodriguez-Bigas, M.A., Cormier, J.N., and Chang, G.J. (2012). Clinicopathology and outcomes for mucinous and signet ring colorectal adenocarcinoma: analysis from the National Cancer Data Base. *Ann. Surg. Oncol.* 19, 2814–2821.
- Ilantzis, C., DeMarte, L., Screaton, R.A., and Stanners, C.P. (2002). Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia N. Y.* N 4, 151–163.
- Imray, C.H., Radley, S., Davis, A., Barker, G., Hendrickse, C.W., Donovan, I.A., Lawson, A.M., Baker, P.R., and Neoptolemos, J.P. (1992). Faecal unconjugated bile acids in patients with colorectal cancer or polyps. *Gut* 33, 1239–1245.
- Inan, M.S., Rasoulpour, R.J., Yin, L., Hubbard, A.K., Rosenberg, D.W., and Giardina, C. (2000). The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* 118, 724–734.
- Institut de veille sanitaire (2013). <http://www.invs.sante.fr>.
- Irrazábal, T., Belcheva, A., Girardin, S.E., Martin, A., and Philpott, D.J. (2014). The Multifaceted Role of the Intestinal Microbiota in Colon Cancer. *Mol. Cell* 54, 309–320.
- Ishino, K., Mutoh, M., Totsuka, Y., and Nakagama, H. (2012). Metabolic syndrome: A novel high-risk state for colorectal cancer. *Cancer Lett.*
- Jänne, P.A., and Mayer, R.J. (2000). Chemoprevention of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 342, 1960–1968.
- Jantscheff, P., Terracciano, L., Lowy, A., Glatz-Krieger, K., Grunert, F., Micheel, B., Brümmer, J., Laffer, U., Metzger, U., Herrmann, R., et al. (2003). Expression of CEACAM6 in resectable colorectal cancer: a factor of independent prognostic significance. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 21, 3638–3646.
- 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.
- John, B.J., Abulafi, A.M., Poullis, A., and Mendall, M.A. (2007). Chronic subclinical bowel inflammation may explain increased risk of colorectal cancer in obese people. *Gut* 56, 1034–1035.
- Johnson, A.M., Kaushik, R.S., Francis, D.H., Fleckenstein, J.M., and Hardwidge, P.R. (2009). Heat-labile enterotoxin promotes *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial cells. *J. Bacteriol.* 191, 178–186.
- Jones, P.A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 13, 484–492.

- Jones, R.P., Jackson, R., Dunne, D.F.J., Malik, H.Z., Fenwick, S.W., Poston, G.J., and Ghaneh, P. (2012). Systematic review and meta-analysis of follow-up after hepatectomy for colorectal liver metastases. *Br. J. Surg.* 99, 477–486.
- Jubelin, G., Chavez, C.V., Taieb, F., Banfield, M.J., Samba-Louaka, A., Nobe, R., Nougayrède, J.-P., Zumbihl, R., Givaudan, A., Escoubas, J.-M., et al. (2009). Cycle inhibiting factors (CIFs) are a growing family of functional cyclomodulins present in invertebrate and mammal bacterial pathogens. *PloS One* 4, e4855.
- Kaler, P., Godasi, B.N., Augenlicht, L., and Klampfer, L. (2009). The NF-kappaB/AKT-dependent Induction of Wnt Signaling in Colon Cancer Cells by Macrophages and IL-1beta. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.*
- Kane, M.F., Loda, M., Gaida, G.M., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H., Jessup, J.M., and Kolodner, R. (1997). Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 57, 808–811.
- Kanneganti, T.-D., Lamkanfi, M., and Núñez, G. (2007). Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* 27, 549–559.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140.
- Kapiteijn, E., Marijnen, C.A., Nagtegaal, I.D., Putter, H., Steup, W.H., Wiggers, T., Rutten, H.J., Pahlman, L., Glimelius, B., van Krieken, J.H., et al. (2001). Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 345, 638–646.
- Karin, M., and Greten, F.R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 749–759.
- Kawamori, T., Uchiya, N., Kitamura, T., Ohuchida, S., Yamamoto, H., Maruyama, T., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. (2001). Evaluation of a selective prostaglandin E receptor EP1 antagonist for potential properties in colon carcinogenesis. *Anticancer Res.* 21, 3865–3869.
- Kawamori, T., Uchiya, N., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. (2003). Enhancement of colon carcinogenesis by prostaglandin E2 administration. *Carcinogenesis* 24, 985–990.
- Kawamori, T., Kitamura, T., Watanabe, K., Uchiya, N., Maruyama, T., Narumiya, S., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. (2005). Prostaglandin E receptor subtype EP(1) deficiency inhibits colon cancer development. *Carcinogenesis* 26, 353–357.
- Kemik, O., Kemik, A.S., Sumer, A., Begenik, H., Purisa, S., and Tuzun, S. (2013). Human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3): elevated serum levels in colorectal cancer and novel marker of lymphatic and hepatic metastasis. *Hum. Exp. Toxicol.* 32, 167–171.
- Kettunen, H.L., Kettunen, A.S.L., and Rautonen, N.E. (2003). Intestinal immune responses in wild-type and *Apcmin*/+ mouse, a model for colon cancer. *Cancer Res.* 63, 5136–5142.
- Khan, N.A., Kim, Y., Shin, S., and Kim, K.S. (2007). FimH-mediated *Escherichia coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Cell. Microbiol.* 9, 169–178.
- Kheirleisid, E.A.H., Miller, N., Chang, K.H., Curran, C., Hennessey, E., Sheehan, M., and Kerin, M.J. (2013). Mismatch repair protein expression in colorectal cancer. *J. Gastrointest. Oncol.* 4, 397–408.

Kim, D.H., and Jin, Y.H. (2001). Intestinal bacterial beta-glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch. Pharm. Res.* 24, 564–567.

Kim, H., Jen, J., Vogelstein, B., and Hamilton, S.R. (1994). Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am. J. Pathol.* 145, 148–156.

Kim, J., Thanabalasuriar, A., Chaworth-Musters, T., Fromme, J.C., Frey, E.A., Lario, P.I., Metelnikov, P., Rizg, K., Thomas, N.A., Lee, S.F., et al. (2007). The bacterial virulence factor NleA inhibits cellular protein secretion by disrupting mammalian COPII function. *Cell Host Microbe* 2, 160–171.

Kim, J.M., Cho, S.J., Oh, Y.-K., Jung, H.-Y., Kim, Y.-J., and Kim, N. (2002). Nuclear factor-kappa B activation pathway in intestinal epithelial cells is a major regulator of chemokine gene expression and neutrophil migration induced by *Bacteroides fragilis* enterotoxin. *Clin. Exp. Immunol.* 130, 59–66.

Kim, J.M., Jung, H.Y., Lee, J.Y., Youn, J., Lee, C.-H., and Kim, K.-H. (2005a). Mitogen-activated protein kinase and activator protein-1 dependent signals are essential for *Bacteroides fragilis* enterotoxin-induced enteritis. *Eur. J. Immunol.* 35, 2648–2657.

Kim, J.M., Lee, J.Y., and Kim, Y.-J. (2008). Inhibition of apoptosis in *Bacteroides fragilis* enterotoxin-stimulated intestinal epithelial cells through the induction of c-IAP-2. *Eur. J. Immunol.* 38, 2190–2199.

Kim, K.J., Elliott, S.J., Di Cello, F., Stins, M.F., and Kim, K.S. (2003). The K1 capsule modulates trafficking of *E. coli*-containing vacuoles and enhances intracellular bacterial survival in human brain microvascular endothelial cells. *Cell. Microbiol.* 5, 245–252.

Kim, K.J., Chung, J.W., and Kim, K.S. (2005b). 67-kDa laminin receptor promotes internalization of cytotoxic necrotizing factor 1-expressing *Escherichia coli* K1 into human brain microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 280, 1360–1368.

Kim, K.S., Kim, J.-T., Lee, S.-J., Kang, M.A., Choe, I.S., Kang, Y.H., Kim, S.-Y., Yeom, Y.I., Lee, Y.-H., Kim, J.H., et al. (2013a). Overexpression and clinical significance of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 in colorectal cancer. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 415, 12–19.

Kim, M.H., Kang, S.G., Park, J.H., Yanagisawa, M., and Kim, C.H. (2013b). Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology* 145, 396–406.e1–10.

Kirschenbaum, A., Liotta, D.R., Yao, S., Liu, X.H., Klausner, A.P., Unger, P., Shapiro, E., Leav, I., and Levine, A.C. (2000). Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human fetal and adult male reproductive tracts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 3436–3441.

Kis, B., Snipes, J.A., Isse, T., Nagy, K., and Busija, D.W. (2003). Putative cyclooxygenase-3 expression in rat brain cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 1287–1292.

Klimesova, K., Kverka, M., Zakostelska, Z., Hudcovic, T., Hrnčíř, T., Stepankova, R., Rossmann, P., Ridl, J., Kostovcik, M., Mrazek, J., et al. (2013). Altered gut microbiota promotes colitis-associated cancer in IL-1 receptor-associated kinase M-deficient mice. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 1266–1277.

Klug, K., Ehlers, S., Uhlig, S., and Reiling, N. (2011). Mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 regulated control of *Mycobacterium avium* replication in primary murine macrophages is independent of tumor necrosis factor- α and interleukin-10. *Innate Immun.* 17, 470–485.

Knust, Z., and Schmidt, G. (2010). Cytotoxic Necrotizing Factors (CNFs)-A Growing Toxin Family. *Toxins* 2, 116–127.

Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., and Tanaka, T. (2005). Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by a COX-2 inhibitor and PPAR ligands. *BMC Cancer* 5, 46.

Kondo, Y., and Issa, J.-P.J. (2004). Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 23, 29–39.

Kostic, A.D., Gevers, D., Pedamallu, C.S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A.M., Ojesina, A.I., Jung, J., Bass, A.J., Tabernero, J., et al. (2012). Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* 22, 292–298.

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. (2013). *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe* 14, 207–215.

Kraus, S., and Arber, N. (2009). Inflammation and colorectal cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 405–410.

Kruse, J., von Bernstorff, W., Evert, K., Albers, N., Hadlich, S., Hagemann, S., Günther, C., van Rooijen, N., Heidecke, C.-D., and Partecke, L.I. (2013). Macrophages promote tumour growth and liver metastasis in an orthotopic syngeneic mouse model of colon cancer. *Int. J. Colorectal Dis.* 28, 1337–1349.

Kune, G.A., and Vitetta, L. (1992). Alcohol consumption and the etiology of colorectal cancer: a review of the scientific evidence from 1957 to 1991. *Nutr. Cancer* 18, 97–111.

Kurmanova, A., Llorente, A., Polesskaya, A., Garred, O., Olsnes, S., Kozlov, J., and Sandvig, K. (2007). Structural requirements for furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 144–149.

Kuroda, K., Fukuda, T., Yoneyama, H., Katayama, M., Isogai, H., Okumura, K., and Isogai, E. (2012). Anti-proliferative effect of an analogue of the LL-37 peptide in the colon cancer derived cell line HCT116 p53^{+/+} and p53^{-/-}. *Oncol. Rep.* 28, 829–834.

Labonte, A.C., Tosello-Tramont, A.-C., and Hahn, Y.S. (2014). The Role of Macrophage Polarization in Infectious and Inflammatory Diseases. *Mol. Cells*.

Lakatos, P.-L., and Lakatos, L. (2008). Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World J. Gastroenterol. WJG* 14, 3937–3947.

Lal, G., Ash, C., Hay, K., Redston, M., Kwong, E., Hancock, B., Mak, T., Kargman, S., Evans, J.F., and Gallinger, S. (2001). Suppression of Intestinal Polyps in Msh2-deficient and Non-Msh2-deficient Multiple Intestinal Neoplasia Mice by a Specific Cyclooxygenase-2 Inhibitor and by a Dual Cyclooxygenase-1/2 Inhibitor. *Cancer Res.* 61, 6131–6136.

Lane, M.C., Simms, A.N., and Mobley, H.L.T. (2007). complex interplay between type 1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 189, 5523–5533.

Lax, A.J. (2007). New genotoxin shows diversity of bacterial attack mechanisms. *Trends Mol. Med.* 13, 91–93.

- Ledesma, M.A., Ochoa, S.A., Cruz, A., Rocha-Ramírez, L.M., Mas-Oliva, J., Eslava, C.A., Girón, J.A., and Xicohtencatl-Cortes, J. (2010). The Hemorrhagic *Coli* Pilus (HCP) of *Escherichia coli* O157:H7 Is an Inducer of Proinflammatory Cytokine Secretion in Intestinal Epithelial Cells. *PLoS ONE* 5, e12127.
- Lee, D.K., Park, S.Y., Baik, S.K., Kwon, S.O., Chung, J.M., Oh, E.-S., and Kim, H.S. (2004). [Deoxycholic acid-induced signal transduction in HT-29 cells: role of NF-kappa B and interleukin-8]. *Korean J. Gastroenterol.* Taehan Sohwagi Hakhoe Chi 43, 176–185.
- Ley, R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., and Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11070–11075.
- Li, M., Li, J.-Y., Zhao, A.-L., He, J.-S., Zhou, L.-X., Li, Y.-A., and Gu, J. (2009). Comparison of carcinoembryonic antigen prognostic value in serum and tumour tissue of patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis. Off. J. Assoc. Coloproctology G. B. Irel.* 11, 276–281.
- Li, Y., Kundu, P., Seow, S.W., Matos, C.T. de, Aronsson, L., Chin, K.C., Kärre, K., Pettersson, S., and Greicius, G. (2012). Gut microbiota accelerate tumor growth via c-jun and STAT3 phosphorylation in APCMin/+ mice. *Carcinogenesis* 33, 1231–1238.
- Liang, P.S., Chen, T.-Y., and Giovannucci, E. (2009). Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer* 124, 2406–2415.
- Lüchtenborg, M., White, K.K.L., Wilkens, L., Kolonel, L.N., and Marchand, L.L. (2007). Smoking and Colorectal Cancer: Different Effects by Type of Cigarettes? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16, 1341–1347.
- Lynch, H.T., and de la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 919–932.
- Macdonald, L.J., Graham, J.G., Kurten, R.C., and Voth, D.E. (2014). *Coxiella burnetii* exploits host cAMP-dependent protein kinase signalling to promote macrophage survival. *Cell. Microbiol.* 16, 146–159.
- Maciag, P.C., Radulovic, S., and Rothman, J. (2009). The first clinical use of a live-attenuated *Listeria monocytogenes* vaccine: A Phase I safety study of Lm-LLO-E7 in patients with advanced carcinoma of the cervix. *Vaccine* 27, 3975–3983.
- Maddocks, O.D.K., Short, A.J., Donnenberg, M.S., Bader, S., and Harrison, D.J. (2009). Attaching and effacing *Escherichia coli* downregulate DNA mismatch repair protein in vitro and are associated with colorectal adenocarcinomas in humans. *PloS One* 4, e5517.
- Maddocks, O.D.K., Scanlon, K.M., and Donnenberg, M.S. (2013). An *Escherichia coli* Effector Protein Promotes Host Mutation via Depletion of DNA Mismatch Repair Proteins. *mBio* 4.
- Maksimović, S. (2007). [Survival rates of patients with mucinous adenocarcinoma of the colorectum]. *Med. Arh.* 61, 26–29.
- Manichanh, C., Borruel, N., Casellas, F., and Guarner, F. (2012). The gut microbiota in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 599–608.
- Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23, 344–346.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436–444.

Marchesi, J.R., Dutilh, B.E., Hall, N., Peters, W.H.M., Roelofs, R., Boleij, A., and Tjalsma, H. (2011). Towards the human colorectal cancer microbiome. *PloS One* 6, e20447.

Marcq, I., Martin, P., Payros, D., Cuevas-Ramos, G., Boury, M., Watrin, C., Nougayrède, J.-P., Olier, M., and Oswald, E. (2014). The Genotoxin Colibactin Exacerbates Lymphopenia and Decreases Survival Rate in Mice Infected With Septicemic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*

Markowitz, S.D., and Bertagnolli, M.M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 361, 2449–2460.

Martin, H.M., Campbell, B.J., Hart, C.A., Mpofu, C., Nayar, M., Singh, R., Englyst, H., Williams, H.F., and Rhodes, J.M. (2004). Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 127, 80–93.

Martin, J.E., Young, G.P., LE Leu, R.K., and Hu, Y. (2013). Comparing the effects of COX and non-COX-inhibiting NSAIDs on enhancement of apoptosis and inhibition of aberrant crypt foci formation in a rat colorectal cancer model. *Anticancer Res.* 33, 3581–3588.

Martinez-Medina, M., Naves, P., Blanco, J., Aldegue, X., Blanco, J.E., Blanco, M., Ponte, C., Soriano, F., Darfeuille-Michaud, A., and Garcia-Gil, L.J. (2009). Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). *BMC Microbiol.* 9, 202.

Maslowski, K.M., Vieira, A.T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H.C., Rolph, M.S., Mackay, F., Artis, D., et al. (2009). Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 461, 1282–1286.

May, M., Kolbe, T., Wang, T., Schmidt, G., and Genth, H. (2012). Increased Cell-Matrix Adhesion upon Constitutive Activation of Rho Proteins by Cytotoxic Necrotizing Factors from *E. Coli* and *Y. Pseudotuberculosis*. *J. Signal Transduct.* 2012, 570183.

McClellan, J.L., Davis, J.M., Steiner, J.L., Day, S.D., Steck, S.E., Carmichael, M.D., and Murphy, E.A. (2012). Intestinal inflammatory cytokine response in relation to tumorigenesis in the Apc(Min/+) mouse. *Cytokine* 57, 113–119.

McCoy, A.N., Araújo-Pérez, F., Azcárate-Peril, A., Yeh, J.J., Sandler, R.S., and Keku, T.O. (2013). Fusobacterium is associated with colorectal adenomas. *PloS One* 8, e53653.

McCOY, W.C., and MASON, J.M., 3rd (1951). Enterococcal endocarditis associated with carcinoma of the sigmoid; report of a case. *J. Med. Assoc. State Ala.* 21, 162–166.

Meconi, S., Vercellone, A., Levillain, F., Payré, B., Al Saati, T., Capilla, F., Desreumaux, P., Darfeuille-Michaud, A., and Altare, F. (2007). Adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro. *Cell. Microbiol.* 9, 1252–1261.

Meraz, I.M., Arikawa, K., Ogasawara, J., Hase, A., and Nishikawa, Y. (2006). Epithelial cells secrete interleukin-8 in response to adhesion and invasion of diffusely adhering *Escherichia coli* lacking Afa/Dr genes. *Microbiol. Immunol.* 50, 159–169.

Mescoli, C., Albertoni, L., D'incá, R., and Rugge, M. (2013). Dysplasia in inflammatory bowel diseases. *Dig. Liver Dis.* 45, 186–194.

- Miquel, S., Peyretailade, E., Claret, L., de Vallée, A., Dossat, C., Vacherie, B., Zineb, E.H., Segurens, B., Barbe, V., Sauvanet, P., et al. (2010). Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PloS One* 5.
- Miraglia, A.G., Travaglione, S., Meschini, S., Falzano, L., Matarrese, P., Quaranta, M.G., Viora, M., Fiorentini, C., and Fabbri, A. (2007). Cytotoxic necrotizing factor 1 prevents apoptosis via the Akt/IkappaB kinase pathway: role of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *Mol. Biol. Cell* 18, 2735–2744.
- Moertel, C.G., Fleming, T.R., Macdonald, J.S., Haller, D.G., Laurie, J.A., Goodman, P.J., Ungerleider, J.S., Emerson, W.A., Tormey, D.C., and Glick, J.H. (1990). Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 322, 352–358.
- Moncrief, J.S., Obiso, R., Jr, Barroso, L.A., Kling, J.J., Wright, R.L., Van Tassell, R.L., Lysterly, D.M., and Wilkins, T.D. (1995). The enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a metalloprotease. *Infect. Immun.* 63, 175–181.
- Moore, W.E., and Holdeman, L.V. (1974). Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.* 27, 961–979.
- Mora, A., Herrera, A., López, C., Dahbi, G., Mamani, R., Pita, J.M., Alonso, M.P., Llovo, J., Bernárdez, M.I., Blanco, J.E., et al. (2011). Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* 14, 121–141.
- Mounier, J., Popoff, M.R., Enninga, J., Frame, M.C., Sansonetti, P.J., and Van Nhieu, G.T. (2009). The IpaC carboxyterminal effector domain mediates Src-dependent actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells. *PLoS Pathog.* 5, e1000271.
- Mühlbauer, M., Allard, B., Bosserhoff, A.K., Kiessling, S., Herfarth, H., Rogler, G., Schölmerich, J., Jobin, C., and Hellerbrand, C. (2004). Differential effects of deoxycholic acid and taurodeoxycholic acid on NF-κB signal transduction and IL-8 gene expression in colonic epithelial cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 286, G1000–G1008.
- Mutoh, M., Watanabe, K., Kitamura, T., Shoji, Y., Takahashi, M., Kawamori, T., Tani, K., Kobayashi, M., Maruyama, T., Kobayashi, K., et al. (2002). Involvement of Prostaglandin E Receptor Subtype EP4 in Colon Carcinogenesis. *Cancer Res.* 62, 28–32.
- Myung, S.-J., Rerko, R.M., Yan, M., Platzer, P., Guda, K., Dotson, A., Lawrence, E., Dannenberg, A.J., Lovgren, A.K., Luo, G., et al. (2006). 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an in vivo suppressor of colon tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12098–12102.
- Nakanishi, Y., Nakatsuji, M., Seno, H., Ishizu, S., Akitake-Kawano, R., Kanda, K., Ueo, T., Komekado, H., Kawada, M., Minami, M., et al. (2011). COX-2 inhibition alters the phenotype of tumor-associated macrophages from M2 to M1 in ApcMin/+ mouse polyps. *Carcinogenesis* 32, 1333–1339.
- Narahara, H., Tatsuta, M., Iishi, H., Baba, M., Uedo, N., Sakai, N., Yano, H., and Ishiguro, S. (2000). K-ras point mutation is associated with enhancement by deoxycholic acid of colon carcinogenesis induced by azoxymethane, but not with its attenuation by all-trans-retinoic acid. *Int. J. Cancer* 88, 157–161.
- Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.
- Neufert, C., Becker, C., and Neurath, M.F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat. Protoc.* 2, 1998–2004.

Newman, J.V., Kosaka, T., Sheppard, B.J., Fox, J.G., and Schauer, D.B. (2001). Bacterial infection promotes colon tumorigenesis in Apc(Min/+) mice. *J. Infect. Dis.* 184, 227–230.

Nicholls, L., Grant, T.H., and Robins-Browne, R.M. (2000). Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 35, 275–288.

Niho, N., Mutoh, M., Kitamura, T., Takahashi, M., Sato, H., Yamamoto, H., Maruyama, T., Ohuchida, S., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. (2005). Suppression of azoxymethane-induced colon cancer development in rats by a prostaglandin E receptor EP1-selective antagonist. *Cancer Sci.* 96, 260–264.

Ninomiya, I., Nagai, N., Oyama, K., Hayashi, H., Tajima, H., Kitagawa, H., Fushida, S., Fujimura, T., and Ohta, T. (2012). Antitumor and anti-metastatic effects of cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib on human colorectal carcinoma xenografts in nude mouse rectum. *Oncol. Rep.* 28, 777–784.

Nishida, N., Nagahara, M., Sato, T., Mimori, K., Sudo, T., Tanaka, F., Shibata, K., Ishii, H., Sugihara, K., Doki, Y., et al. (2012). Microarray analysis of colorectal cancer stromal tissue reveals upregulation of two oncogenic miRNA clusters. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 3054–3070.

Nishikawa, M., Stapleton, P.P., Freeman, T.A., Gaughan, J.P., Matsuda, T., and Daly, J.M. (2004). NS-398 inhibits tumor growth and liver metastasis of colon cancer through induction of apoptosis and suppression of the plasminogen activation system in a mouse model. *J. Am. Coll. Surg.* 199, 428–435.

Nithianantham, S., Xu, M., Yamada, M., Ikegami, A., Shoham, M., and Han, Y.W. (2009). Crystal Structure of FadA Adhesin from *Fusobacterium nucleatum* Reveals a Novel Oligomerization Motif, the Leucine Chain. *J. Biol. Chem.* 284, 3865–3872.

Normand, S., Delanoye-Crespin, A., Bressenot, A., Huot, L., Grandjean, T., Peyrin-Biroulet, L., Lemoine, Y., Hot, D., and Chamaillard, M. (2011). Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9601–9606.

Nougayrède, J.-P., and Sonnenberg, M.S. (2004). Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. *Cell. Microbiol.* 6, 1097–1111.

Nougayrède, J.-P., Taieb, F., De Rycke, J., and Oswald, E. (2005). Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends Microbiol.* 13, 103–110.

Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., and Oswald, E. (2006). *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 313, 848–851.

Nowrouzian, F.L., and Oswald, E. (2012). *Escherichia coli* strains with the capacity for long-term persistence in the bowel microbiota carry the potentially genotoxic pks island. *Microb. Pathog.* 53, 180–182.

Nugent, M., Miller, N., and Kerin, M.J. (2012). Circulating miR-34a levels are reduced in colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* 106, 947–952.

O’Callaghan, G., Ryan, A., Neary, P., O’Mahony, C., Shanahan, F., and Houston, A. (2013). Targeting the EP1 receptor reduces Fas ligand expression and increases the antitumor immune response in an in vivo model of colon cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 133, 825–834.

- O'Connell, J.B., Maggard, M.A., and Ko, C.Y. (2004). Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1420–1425.
- O'Connor, E.S., Greenblatt, D.Y., LoConte, N.K., Gangnon, R.E., Liou, J.-I., Heise, C.P., and Smith, M.A. (2011). Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 3381–3388.
- O'Hara, A.M., and Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7, 688–693.
- Ochoa, T.J., Rivera, F.P., Bernal, M., Meza, R., Ecker, L., Gil, A.I., Cepeda, D., Mosquito, S., Mercado, E., Maves, R.C., et al. (2010). Detection of the CS20 colonization factor antigen in diffuse-adhering *Escherichia coli* strains. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 60, 186–189.
- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., and Sasakawa, C. (2005). Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science* 307, 727–731.
- Ogino, S., Kirkner, G.J., Nosho, K., Irahara, N., Kure, S., Shima, K., Hazra, A., Chan, A.T., Dehari, R., Giovannucci, E.L., et al. (2008). Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 8221–8227.
- Oguma, K., Oshima, H., Aoki, M., Uchio, R., Naka, K., Nakamura, S., Hirao, A., Saya, H., Taketo, M.M., and Oshima, M. (2008). Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor- α in gastric tumour cells. *EMBO J.* 27, 1671–1681.
- Ordway, J.M., and Curran, T. (2002). Methylation matters: modeling a manageable genome. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 149–162.
- Oshima, M., Dinchuk, J.E., Kargman, S.L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J.M., Evans, J.F., and Taketo, M.M. (1996). Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87, 803–809.
- Oshima, M., Murai, N., Kargman, S., Arguello, M., Luk, P., Kwong, E., Taketo, M.M., and Evans, J.F. (2001). Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res.* 61, 1733–1740.
- Oswald, E., Nougayrède, J.-P., Taieb, F., and Sugai, M. (2005). Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 83–91.
- Ouedraogo, R., Dumas, A., Ghigo, E., Capo, C., Mege, J.-L., and Textoris, J. (2012). Whole-cell MALDI-TOF MS: A new tool to assess the multifaceted activation of macrophages. *J. Proteomics* 75, 5523–5532.
- Owen, R.W. (1997). Faecal steroids and colorectal carcinogenesis. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 222, 76–82.
- Palumbo, P., Amatucci, C., Perotti, B., Dezzi, C., Girolami, M., Illuminati, G., and Angelici, A.M. (2013). The Lynch Syndrome: A Management Dilemma. *Anticancer Res.* 33, 2147–2152.
- Papadopoulos, V.N., Michalopoulos, A., Netta, S., Basdanis, G., Paramythiotis, D., Zatagias, A., Berovalis, P., and Harlaftis, N. (2004). Prognostic significance of mucinous component in colorectal carcinoma. *Tech. Coloproctology 8 Suppl 1*, s123–125.

Patterson, E., O' Doherty, R.M., Murphy, E.F., Wall, R., O' Sullivan, O., Nilaweera, K., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., Ross, R.P., and Stanton, C. (2014). Impact of dietary fatty acids on metabolic activity and host intestinal microbiota composition in C57BL/6J mice. *Br. J. Nutr.* 1–13.

Pavlovic, S., Du, B., Sakamoto, K., Khan, K.M.F., Natarajan, C., Breyer, R.M., Dannenberg, A.J., and Falcone, D.J. (2006). Targeting prostaglandin E2 receptors as an alternative strategy to block cyclooxygenase-2-dependent extracellular matrix-induced matrix metalloproteinase-9 expression by macrophages. *J. Biol. Chem.* 281, 3321–3328.

Payne, C.M., Weber, C., Crowley-Skillicorn, C., Dvorak, K., Bernstein, H., Bernstein, C., Holubec, H., Dvorakova, B., and Garewal, H. (2006). Deoxycholate induces mitochondrial oxidative stress and activates NF- κ B through multiple mechanisms in HCT-116 colon epithelial cells. *Carcinogenesis* 28, 215–222.

Peltomäki, P., and Vasen, H.F. (1997). Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 113, 1146–1158.

Pericleous, M., Mandair, D., and Caplin, M.E. (2013). Diet and supplements and their impact on colorectal cancer. *J. Gastrointest. Oncol.* 4, 409–423.

Peyrin-Biroulet, L., Lepage, C., Jooste, V., Guéant, J.-L., Faivre, J., and Bouvier, A.-M. (2012). Colorectal cancer in inflammatory bowel diseases: a population-based study (1976–2008). *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 2247–2251.

Plaschke, J., Krüger, S., Pistorius, S., Theissig, F., Saeger, H.D., and Schackert, H.K. (2002). Involvement of hMSH6 in the development of hereditary and sporadic colorectal cancer revealed by immunostaining is based on germline mutations, but rarely on somatic inactivation. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 97, 643–648.

Porta, C., Larghi, P., Rimoldi, M., Totaro, M.G., Allavena, P., Mantovani, A., and Sica, A. (2009). Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology* 214, 761–777.

Potten, C.S., Hume, W.J., Reid, P., and Cairns, J. (1978). The segregation of DNA in epithelial stem cells. *Cell* 15, 899–906.

Potten, C.S., Owen, G., and Booth, D. (2002). Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J. Cell Sci.* 115, 2381–2388.

Powolny, A., Xu, J., and Loo, G. (2001). Deoxycholate induces DNA damage and apoptosis in human colon epithelial cells expressing either mutant or wild-type p53. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 193–203.

Prasadaraao, N.V. (2002). Identification of *Escherichia coli* outer membrane protein A receptor on human brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* 70, 4556–4563.

Pritchard, C.C., and Grady, W.M. (2011). Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut* 60, 116–129.

Prorok-Hamon, M., Friswell, M.K., Alswied, A., Roberts, C.L., Song, F., Flanagan, P.K., Knight, P., Codling, C., Marchesi, J.R., Winstanley, C., et al. (2014). Colonic mucosa-associated diffusely adherent afaC+ *Escherichia coli* expressing lpfA and pks are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut* 63, 761–770.

Pugh, S., and Thomas, G.A. (1994). Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. *Gut* 35, 675–678.

- Putze, J., Hennequin, C., Nougayrède, J.-P., Zhang, W., Homburg, S., Karch, H., Bringer, M.-A., Fayolle, C., Carniel, E., Rabsch, W., et al. (2009). Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family Enterobacteriaceae. *Infect. Immun.* 77, 4696–4703.
- Qadri, F., Svennerholm, A.-M., Faruque, A.S.G., and Sack, R.B. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 465–483.
- Quitard, S., Dean, P., Maresca, M., and Kenny, B. (2006). The enteropathogenic *Escherichia coli* EspF effector molecule inhibits PI-3 kinase-mediated uptake independently of mitochondrial targeting. *Cell. Microbiol.* 8, 972–981.
- Raisch, J., Darfeuille-Michaud, A., and Nguyen, H. (2013). Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World J. Gastroenterol.* 19, 2985.
- Raisch, J., Buc, E., Bonnet, M., Sauvanet, P., Vazeille, E., de Vallée, A., Déchelotte, P., Darcha, C., Pezet, D., Bonnet, R., et al. (2014). Colon cancer-associated B2 *Escherichia coli* colonize gut mucosa and promote cell proliferation. *World J. Gastroenterol.* WJG 20, 6560–6572.
- Rakoff-Nahoum, S., and Medzhitov, R. (2007). Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science* 317, 124–127.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004). Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell* 118, 229–241.
- Ramsay, R.G., Ciznadija, D., Vanevski, M., and Mantamadiotis, T. (2003). Transcriptional regulation of cyclooxygenase expression: three pillars of control. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 16, 59–67.
- Ren, S.X., Cheng, A.S.L., To, K.F., Tong, J.H.M., Li, M.S., Shen, J., Wong, C.C.M., Zhang, L., Chan, R.L.Y., Wang, X.J., et al. (2012). Host immune defense peptide LL-37 activates caspase-independent apoptosis and suppresses colon cancer. *Cancer Res.* 72, 6512–6523.
- Ren, S.X., Shen, J., Cheng, A.S.L., Lu, L., Chan, R.L.Y., Li, Z.J., Wang, X.J., Wong, C.C.M., Zhang, L., Ng, S.S.M., et al. (2013). FK-16 derived from the anticancer peptide LL-37 induces caspase-independent apoptosis and autophagic cell death in colon cancer cells. *PloS One* 8, e63641.
- Rendón, M.A., Saldaña, Z., Erdem, A.L., Monteiro-Neto, V., Vázquez, A., Kaper, J.B., Puente, J.L., and Girón, J.A. (2007). Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10637–10642.
- Renz, B.W., Thasler, W.E., Preissler, G., Heide, T., Khalil, P.N., Mikhailov, M., Jauch, K.-W., Kreis, M.E., Rentsch, M., and Kleespies, A. (2013). Clinical outcome of IBD-associated versus sporadic colorectal cancer: a matched-pair analysis. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* 17, 981–990.
- Rex, D.K., Lehman, G.A., Ulbright, T.M., Smith, J.J., Pound, D.C., Hawes, R.H., Helper, D.J., Wiersema, M.J., Langefeld, C.D., and Li, W. (1993). Colonic neoplasia in asymptomatic persons with negative fecal occult blood tests: influence of age, gender, and family history. *Am. J. Gastroenterol.* 88, 825–831.
- Rhee, K.-J., Wu, S., Wu, X., Huso, D.L., Karim, B., Franco, A.A., Rabizadeh, S., Golub, J.E., Mathews, L.E., Shin, J., et al. (2009). Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in wild-type C57BL/6 mice. *Infect. Immun.* 77, 1708–1718.

Ribic, C.M., Sargent, D.J., Moore, M.J., Thibodeau, S.N., French, A.J., Goldberg, R.M., Hamilton, S.R., Laurent-Puig, P., Gryfe, R., Shepherd, L.E., et al. (2003). Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* 349, 247–257.

Rigas, B., Goldman, I.S., and Levine, L. (1993). Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J. Lab. Clin. Med.* 122, 518–523.

Roelofs, H.M., Te Morsche, R.H., van Heumen, B.W., Nagengast, F.M., and Peters, W.H. (2014). Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer. *BMC Gastroenterol.* 14, 1.

Rolhion, N., Barnich, N., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2005). Strong decrease in invasive ability and outer membrane vesicle release in Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 with the yfgL gene deleted. *J. Bacteriol.* 187, 2286–2296.

Römer, W., Berland, L., Chambon, V., Gaus, K., Windschiegl, B., Tenza, D., Aly, M.R.E., Fraissier, V., Florent, J.-C., Perrais, D., et al. (2007). Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature* 450, 670–675.

Rostom, A., Dube, C., and Lewin, G. (2007a). Use of Aspirin and NSAIDs to Prevent Colorectal Cancer (Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US)).

Rostom, A., Dubé, C., Lewin, G., Tsertsvadze, A., Barrowman, N., Code, C., Sampson, M., Moher, D., and U.S. Preventive Services Task Force (2007b). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med.* 146, 376–389.

Roy, K., Hilliard, G.M., Hamilton, D.J., Luo, J., Ostmann, M.M., and Fleckenstein, J.M. (2009). Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. *Nature* 457, 594–598.

Ruan, Z., Yang, Z., Wang, Y., Wang, H., Chen, Y., Shang, X., Yang, C., Guo, S., Han, J., Liang, H., et al. (2009). DNA vaccine against tumor endothelial marker 8 inhibits tumor angiogenesis and growth. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 32, 486–491.

Rubinstein, M.R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., and Han, Y.W. (2013). *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe* 14, 195–206.

Ruemmele, F.M., Schwartz, S., Seidman, E.G., Dionne, S., Levy, E., and Lentze, M.J. (2003). Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Gut* 52, 94–100.

Rutter, M.D., Saunders, B.P., Wilkinson, K.H., Rumbles, S., Schofield, G., Kamm, M.A., Williams, C.B., Price, A.B., Talbot, I.C., and Forbes, A. (2006). Thirty-year analysis of a colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 130, 1030–1038.

Sakamoto, K., and Maeda, S. (2010). Targeting NF- κ B for colorectal cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* 14, 593–601.

Salcedo, R., Worschech, A., Cardone, M., Jones, Y., Gyulai, Z., Dai, R.-M., Wang, E., Ma, W., Haines, D., O'hUigin, C., et al. (2010). MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J. Exp. Med.* 207, 1625–1636.

- Salzman, N.H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjöberg, J., Amir, E., Tegatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., et al. (2010). Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat. Immunol.* *11*, 76–83.
- Sampson, J.R., Dolwani, S., Jones, S., Eccles, D., Ellis, A., Evans, D.G., Frayling, I., Jordan, S., Maher, E.R., Mak, T., et al. (2003). Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *The Lancet* *362*, 39–41.
- Sandler, R.S., Halabi, S., Baron, J.A., Budinger, S., Paskett, E., Keresztes, R., Petrelli, N., Pipas, J.M., Karp, D.D., Loprinzi, C.L., et al. (2003). A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *348*, 883–890.
- Sartor, R.B. (2008). Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* *134*, 577–594.
- Sasaki, M., Sitaraman, S.V., Babbin, B.A., Gerner-Smidt, P., Ribot, E.M., Garrett, N., Alpern, J.A., Akyildiz, A., Theiss, A.L., Nusrat, A., et al. (2007). Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* *87*, 1042–1054.
- Sauer, R., Becker, H., Hohenberger, W., Rödel, C., Wittekind, C., Fietkau, R., Martus, P., Tschmelitsch, J., Hager, E., Hess, C.F., et al. (2004). Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *351*, 1731–1740.
- Sauer, R., Liersch, T., Merkel, S., Fietkau, R., Hohenberger, W., Hess, C., Becker, H., Raab, H.-R., Villanueva, M.-T., Witzigmann, H., et al. (2012). Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *30*, 1926–1933.
- Scheele, J., Stangl, R., and Altendorf-Hofmann, A. (1990). Hepatic metastases from colorectal carcinoma: impact of surgical resection on the natural history. *Br. J. Surg.* *77*, 1241–1246.
- Schetter, A.J., Leung, S.Y., Sohn, J.J., Zanetti, K.A., Bowman, E.D., Yanaihara, N., Yuen, S.T., Chan, T.L., Kwong, D.L.W., Au, G.K.H., et al. (2008). MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* *299*, 425–436.
- Schmidt, M.A. (2010). LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell. Microbiol.* *12*, 1544–1552.
- Schölzel, S., Zimmermann, W., Schwarzkopf, G., Grunert, F., Rogaczewski, B., and Thompson, J. (2000). Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *Am. J. Pathol.* *156*, 595–605.
- Schroeder, G.N., and Hilbi, H. (2008). Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* *21*, 134–156.
- Sears, C.L. (2009). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes. *Clin. Microbiol. Rev.* *22*, 349–369, Table of Contents.
- Sears, C.L., and Garrett, W.S. (2014). Microbes, Microbiota, and Colon Cancer. *Cell Host Microbe* *15*, 317–328.
- Sears, C.L., Myers, L.L., Lazenby, A., and Van Tassell, R.L. (1995). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *20 Suppl 2*, S142–148.

Secher, T., Samba-Louaka, A., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2013). *Escherichia coli* Producing Colibactin Triggers Premature and Transmissible Senescence in Mammalian Cells. *PLoS ONE* 8, e77157.

Segain, J.P., Raingeard de la Blétière, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottière, H.M., and Galmiche, J.P. (2000). Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 47, 397–403.

Seitz, H.K., Simanowski, U.A., Garzon, F.T., Rideout, J.M., Peters, T.J., Koch, A., Berger, M.R., Einecke, H., and Maiwald, M. (1990). Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal cocarcinogenesis in the rat. *Gastroenterology* 98, 406–413.

Seno, H., Oshima, M., Ishikawa, T., Oshima, H., Takaku, K., Chiba, T., Narumiya, S., and Taketo, M.M. (2002). Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res.* 62, 506–511.

Seraj, M.J., Umemoto, A., Kajikawa, A., Mimura, S., Kinouchi, T., Ohnishi, Y., and Monden, Y. (1997). Effects of dietary bile acids on formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in F344 rats. *Cancer Lett.* 115, 97–103.

Servin, A.L. (2005). Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 264–292.

Sewell, D.A., Shahabi, V., Gunn, G.R., 3rd, Pan, Z.-K., Dominiecki, M.E., and Paterson, Y. (2004). Recombinant *Listeria* vaccines containing PEST sequences are potent immune adjuvants for the tumor-associated antigen human papillomavirus-16 E7. *Cancer Res.* 64, 8821–8825.

Shao, J., Lee, S.B., Guo, H., Evers, B.M., and Sheng, H. (2003). Prostaglandin E2 stimulates the growth of colon cancer cells via induction of amphiregulin. *Cancer Res.* 63, 5218–5223.

Shay, J.E.S., Imtiyaz, H.Z., Sivanand, S., Durham, A.C., Skuli, N., Hsu, S., Mucaj, V., Eisinger-Mathason, T.S.K., Krock, B.L., Giannoukos, D.N., et al. (2014). Inhibition of Hypoxia-Inducible Factors Limits Tumor Progression in a Mouse Model of Colorectal Cancer. *Carcinogenesis* bgu004.

Shen, X.J., Rawls, J.F., Randall, T., Burcal, L., Mpande, C.N., Jenkins, N., Jovov, B., Abdo, Z., Sandler, R.S., and Keku, T.O. (2010). Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. *Gut Microbes* 1, 138–147.

Sheng, H., Shao, J., Morrow, J.D., Beauchamp, R.D., and DuBois, R.N. (1998). Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 58, 362–366.

Sheng, H., Shao, J., Washington, M.K., and DuBois, R.N. (2001). Prostaglandin E2 Increases Growth and Motility of Colorectal Carcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* 276, 18075–18081.

Sherwood, L. (2006). Sherwood, L. (2006). *Physiologie humaine*. De boeck 2ème édition.

Shibuya, H., Iinuma, H., Shimada, R., Horiuchi, A., and Watanabe, T. (2010). Clinicopathological and prognostic value of microRNA-21 and microRNA-155 in colorectal cancer. *Oncology* 79, 313–320.

Shirey, K.A., Cole, L.E., Keegan, A.D., and Vogel, S.N. (2008). Francisella tularensis Live Vaccine Strain Induces Macrophage Alternative Activation as a Survival Mechanism. *J. Immunol.* 181, 4159–4167.

Sica, A., Allavena, P., and Mantovani, A. (2008). Cancer related inflammation: The macrophage connection. *Cancer Lett.* 267, 204–215.

- Simmonds, P.C., Primrose, J.N., Colquitt, J.L., Garden, O.J., Poston, G.J., and Rees, M. (2006). Surgical resection of hepatic metastases from colorectal cancer: a systematic review of published studies. *Br. J. Cancer* 94, 982–999.
- Sina, C., Gavrilova, O., Förster, M., Till, A., Derer, S., Hildebrand, F., Raabe, B., Chalaris, A., Scheller, J., Rehmann, A., et al. (2009). G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 7514–7522.
- Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., Thangaraju, M., Prasad, P.D., Manicassamy, S., Munn, D.H., et al. (2014). Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* 40, 128–139.
- Singh, R., Dominiecki, M.E., Jaffee, E.M., and Paterson, Y. (2005). Fusion to Listeriolysin O and delivery by *Listeria monocytogenes* enhances the immunogenicity of HER-2/neu and reveals subdominant epitopes in the FVB/N mouse. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 3663–3673.
- Sinicrope, F.A., and Sargent, D.J. (2012). Molecular Pathways: Microsatellite Instability in Colorectal Cancer: Prognostic, Predictive, and Therapeutic Implications. *Clin. Cancer Res.* 18, 1506–1512.
- Siveen, K.S., and Kuttan, G. (2009). Role of macrophages in tumour progression. *Immunol. Lett.* 123, 97–102.
- Sjöström, L., Narbro, K., Sjöström, C.D., Karason, K., Larsson, B., Wedel, H., Lystig, T., Sullivan, M., Bouchard, C., Carlsson, B., et al. (2007). Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N. Engl. J. Med.* 357, 741–752.
- Slaby, O., Svoboda, M., Fabian, P., Smerdova, T., Knoflickova, D., Bednarikova, M., Nenutil, R., and Vyzula, R. (2007). Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology* 72, 397–402.
- Sobhani, I., Tap, J., Roudot-Thoraval, F., Roperch, J.P., Letulle, S., Langella, P., Corthier, G., Tran Van Nhieu, J., and Furet, J.P. (2011). Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PloS One* 6, e16393.
- Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., Ghibelli, L., and Diederich, M. (2010). The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int. J. Cell Biol.* 2010, 215158.
- Sokol, H., and Chazouilleres, O. (2012). Colorectal neoplasia in PSC–IBD patients: are times changing? *Liver Int.* 32, 175–176.
- Sokol, H., Cosnes, J., Chazouilleres, O., Beaugerie, L., Tiret, E., Poupon, R., and Seksik, P. (2008a). Disease activity and cancer risk in inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *World J. Gastroenterol. WJG* 14, 3497–3503.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., et al. (2008b). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16731–16736.
- Solomon, S.D., Pfeffer, M.A., McMurray, J.J.V., Fowler, R., Finn, P., Levin, B., Eagle, C., Hawk, E., Lechuga, M., Zuber, A.G., et al. (2006). Effect of celecoxib on cardiovascular events and blood pressure in two trials for the prevention of colorectal adenomas. *Circulation* 114, 1028–1035.

Sonoshita, M., Takaku, K., Sasaki, N., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Narumiya, S., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2001). Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice. *Nat. Med.* 7, 1048–1051.

De Souza, W.F., Fortunato-Miranda, N., Robbs, B.K., de Araujo, W.M., de-Freitas-Junior, J.C., Bastos, L.G., Viola, J.P.B., and Morgado-Díaz, J.A. (2013). Claudin-3 overexpression increases the malignant potential of colorectal cancer cells: roles of ERK1/2 and PI3K-Akt as modulators of EGFR signaling. *PloS One* 8, e74994.

Steenport, M., Khan, K.M.F., Du, B., Barnhard, S.E., Dannenberg, A.J., and Falcone, D.J. (2009). Matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 induce macrophage MMP-9: evidence for the role of TNF-alpha and cyclooxygenase-2. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 8119–8127.

Stein, M.-P., Müller, M.P., and Wandinger-Ness, A. (2012). Bacterial pathogens commandeer Rab GTPases to establish intracellular niches. *Traffic Cph. Den.* 13, 1565–1588.

Steinbach, G., Lynch, P.M., Phillips, R.K., Wallace, M.H., Hawk, E., Gordon, G.B., Wakabayashi, N., Saunders, B., Shen, Y., Fujimura, T., et al. (2000). The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N. Engl. J. Med.* 342, 1946–1952.

Steinke, V., Engel, C., Büttner, R., Schackert, H.K., Schmiegell, W.H., and Propping, P. (2013). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)/Lynch syndrome. *Dtsch. Ärztebl. Int.* 110, 32–38.

Stolina, M., Sharma, S., Lin, Y., Dohadwala, M., Gardner, B., Luo, J., Zhu, L., Kronenberg, M., Miller, P.W., Portanova, J., et al. (2000). Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 361–370.

Strockbine, N.A., Marques, L.R., Newland, J.W., Smith, H.W., Holmes, R.K., and O'Brien, A.D. (1986). Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect. Immun.* 53, 135–140.

Sugita, J., Ohtani, H., Mizoi, T., Saito, K., Shiiba, K., Sasaki, I., Matsuno, S., Yagita, H., Miyazawa, M., and Nagura, H. (2002). Close association between Fas ligand (FasL; CD95L)-positive tumor-associated macrophages and apoptotic cancer cells along invasive margin of colorectal carcinoma: a proposal on tumor-host interactions. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 93, 320–328.

Svensson, C.I., and Yaksh, T.L. (2002). The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 553–583.

Swidsinski, A., Khilkin, M., Kerjaschki, D., Schreiber, S., Ortner, M., Weber, J., and Lochs, H. (1998). Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology* 115, 281–286.

Sylvester, P.A., Myerscough, N., Warren, B.F., Carlstedt, I., Corfield, A.P., Durdey, P., and Thomas, M.G. (2001). Differential expression of the chromosome 11 mucin genes in colorectal cancer. *J. Pathol.* 195, 327–335.

Tal, S., Melzer, E., Chsherbakov, T., and Malnick, S. (2014). Metabolic syndrome is associated with increased prevalence of advanced colorectal polyps. *J. Nutr. Health Aging* 18, 22–25.

Tanabe, T., and Tohnai, N. (2002). Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68–69, 95–114.

- Témoin, S., Wu, K.L., Wu, V., Shoham, M., and Han, Y.W. (2012). Signal peptide of FadA adhesin from *Fusobacterium nucleatum* plays a novel structural role by modulating the filament's length and width. *FEBS Lett.* *586*, 1–6.
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., and Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* *138*, 2101–2114.e5.
- Tessner, T.G., Muhale, F., Riehl, T.E., Anant, S., and Stenson, W.F. (2004). Prostaglandin E2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and bax translocation. *J. Clin. Invest.* *114*, 1676–1685.
- Thi, E.P., Lambert, U., and Reiner, N.E. (2012). Sleeping with the enemy: how intracellular pathogens cope with a macrophage lifestyle. *PLoS Pathog.* *8*, e1002551.
- Thumbikat, P., Berry, R.E., Zhou, G., Billips, B.K., Yaggie, R.E., Zaichuk, T., Sun, T.-T., Schaeffer, A.J., and Klumpp, D.J. (2009). Bacteria-induced uropilin signaling mediates bladder response to infection. *PLoS Pathog.* *5*, e1000415.
- Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J.R., and Dutilh, B.E. (2012). A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat. Rev. Microbiol.* *10*, 575–582.
- Toprak, N.U., Yagci, A., Gulluoglu, B.M., Akin, M.L., Demirkalem, P., Celenk, T., and Soyletir, G. (2006). A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *12*, 782–786.
- Torres, A.G., Li, Y., Tutt, C.B., Xin, L., Eaves-Pyles, T., and Soong, L. (2006). Outer membrane protein A of *Escherichia coli* O157:H7 stimulates dendritic cell activation. *Infect. Immun.* *74*, 2676–2685.
- Tsujii, M., and DuBois, R.N. (1995). Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* *83*, 493–501.
- Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., and DuBois, R.N. (1998). Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* *93*, 705–716.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* *444*, 1027–1031.
- Turner, J.R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 799–809.
- Turner, S.M., Scott-Tucker, A., Cooper, L.M., and Henderson, I.R. (2006). Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* *263*, 10–20.
- Uronis, J.M., Mühlbauer, M., Herfarth, H.H., Rubinas, T.C., Jones, G.S., and Jobin, C. (2009). Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PloS One* *4*, e6026.
- Vasen, H.F., Mecklin, J.P., Khan, P.M., and Lynch, H.T. (1991). The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis. Colon Rectum* *34*, 424–425.
- Vasen, H.F., Watson, P., Mecklin, J.P., and Lynch, H.T. (1999). New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* *116*, 1453–1456.

Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K., and Augenlicht, L. (2002). Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 295, 1726–1729.

Vergne, I., Chua, J., Lee, H.-H., Lucas, M., Belisle, J., and Deretic, V. (2005). Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4033–4038.

Verreck, F.A.W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., Hoeve, M.A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R., and Ottenhoff, T.H.M. (2004). Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4560–4565.

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Kern, S.E., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Nakamura, Y., and White, R. (1989). Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244, 207–211.

Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.-G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., et al. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2257–2261.

Vries, R.G.J., Huch, M., and Clevers, H. (2010). Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Mol. Oncol.* 4, 373–384.

Walsh, M.D., Clendenning, M., Williamson, E., Pearson, S.-A., Walters, R.J., Nagler, B., Packenas, D., Win, A.K., Hopper, J.L., Jenkins, M.A., et al. (2013). Expression of MUC2, MUC5AC, MUC5B, and MUC6 mucins in colorectal cancers and their association with the CpG island methylator phenotype. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 26, 1642–1656.

Walter, J., and Ley, R. (2011). The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 411–429.

Wang, D., and Dubois, R.N. (2010a). The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* 29, 781–788.

Wang, D., and Dubois, R.N. (2010b). Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 181–193.

Wang, D., and Dubois, R.N. (2010c). The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* 29, 781–788.

Wang, S., and Olson, E.N. (2009). AngiomiRs—Key regulators of angiogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 205–211.

Wang, X., and Huycke, M.M. (2007). Extracellular Superoxide Production by *Enterococcus faecalis* Promotes Chromosomal Instability in Mammalian Cells. *Gastroenterology* 132, 551–561.

Wang, D., Wang, H., Shi, Q., Katkuri, S., Walhi, W., Desvergne, B., Das, S.K., Dey, S.K., and DuBois, R.N. (2004). Prostaglandin E2 promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor δ . *Cancer Cell* 6, 285–295.

Wang, D., Buchanan, F.G., Wang, H., Dey, S.K., and DuBois, R.N. (2005). Prostaglandin E2 enhances intestinal adenoma growth via activation of the Ras-mitogen-activated protein kinase cascade. *Cancer Res.* 65, 1822–1829.

- Wang, D., Wang, H., Brown, J., Daikoku, T., Ning, W., Shi, Q., Richmond, A., Strieter, R., Dey, S.K., and DuBois, R.N. (2006). CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer. *J. Exp. Med.* *203*, 941–951.
- Wang, E.L., Qian, Z.R., Nakasono, M., Tanahashi, T., Yoshimoto, K., Bando, Y., Kudo, E., Shimada, M., and Sano, T. (2010). High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* *102*, 908–915.
- Wang, J., Gray-Owen, S.D., Knorre, A., Meyer, T.F., and Dehio, C. (1998). Opa binding to cellular CD66 receptors mediates the transcellular traversal of *Neisseria gonorrhoeae* across polarized T84 epithelial cell monolayers. *Mol. Microbiol.* *30*, 657–671.
- Wang, J.Y., Lu, C.Y., Chu, K.S., Ma, C.J., Wu, D.C., Tsai, H.L., Yu, F.J., and Hsieh, J.S. (2007). Prognostic significance of pre- and postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with colorectal cancer. *Eur. Surg. Res. Eur. Chir. Forsch. Rech. Chir. Eur.* *39*, 245–250.
- Wang, T., Cai, G., Qiu, Y., Fei, N., Zhang, M., Pang, X., Jia, W., Cai, S., and Zhao, L. (2012a). Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J.* *6*, 320–329.
- Wang, W.S., Lin, J.K., Chiou, T.J., Liu, J.H., Fan, F.S., Yen, C.C., Lin, T.C., Jiang, J.K., Yang, S.H., Wang, H.S., et al. (2000). Preoperative carcinoembryonic antigen level as an independent prognostic factor in colorectal cancer: Taiwan experience. *Jpn. J. Clin. Oncol.* *30*, 12–16.
- Wang, X., Allen, T.D., May, R.J., Lightfoot, S., Houchen, C.W., and Huycke, M.M. (2008). *Enterococcus faecalis* induces aneuploidy and tetraploidy in colonic epithelial cells through a bystander effect. *Cancer Res.* *68*, 9909–9917.
- Wang, X., Yang, Y., Moore, D.R., Nimmo, S.L., Lightfoot, S.A., and Huycke, M.M. (2012b). 4-hydroxy-2-nonenal mediates genotoxicity and bystander effects caused by *Enterococcus faecalis*-infected macrophages. *Gastroenterology* *142*, 543–551.e7.
- Watanabe, K., Kawamori, T., Nakatsugi, S., Ohta, T., Ohuchida, S., Yamamoto, H., Maruyama, T., Kondo, K., Ushikubi, F., Narumiya, S., et al. (1999). Role of the prostaglandin E receptor subtype EP1 in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* *59*, 5093–5096.
- Webber, J.L., and Tooze, S.A. (2010). Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *EMBO J.* *29*, 27–40.
- Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Höhler, T., Galle, P.R., and Büchler, M.W. (2005). Colorectal cancer. *Lancet* *365*, 153–165.
- Wexler, H.M. (2007). Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clin. Microbiol. Rev.* *20*, 593–621.
- Wiles, T.J., Kulesus, R.R., and Mulvey, M.A. (2008a). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp. Mol. Pathol.* *85*, 11–19.
- Wiles, T.J., Dhakal, B.K., Eto, D.S., and Mulvey, M.A. (2008b). Inactivation of host Akt/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins. *Mol. Biol. Cell* *19*, 1427–1438.
- Winawer, S.J., Zauber, A.G., Ho, M.N., O'Brien, M.J., Gottlieb, L.S., Sternberg, S.S., Wayne, J.D., Schapiro, M., Bond, J.H., and Panish, J.F. (1993). Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N. Engl. J. Med.* *329*, 1977–1981.

Wolfe, M.M., Lichtenstein, D.R., and Singh, G. (1999). Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N. Engl. J. Med.* *340*, 1888–1899.

Wolmark, N., Rockette, H., Fisher, B., Wickerham, D.L., Redmond, C., Fisher, E.R., Jones, J., Mamounas, E.P., Ore, L., and Petrelli, N.J. (1993). The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *11*, 1879–1887.

Wong, A.R.C., Pearson, J.S., Bright, M.D., Munera, D., Robinson, K.S., Lee, S.F., Frankel, G., and Hartland, E.L. (2011). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Mol. Microbiol.* *80*, 1420–1438.

Wong, H.P.S., Yu, L., Lam, E.K.Y., Tai, E.K.K., Wu, W.K.K., and Cho, C.H. (2007a). Nicotine promotes cell proliferation via $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor and catecholamine-synthesizing enzymes-mediated pathway in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *221*, 261–267.

Wong, H.P.S., Yu, L., Lam, E.K.Y., Tai, E.K.K., Wu, W.K.K., and Cho, C.-H. (2007b). Nicotine promotes colon tumor growth and angiogenesis through beta-adrenergic activation. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *97*, 279–287.

Wu, C.-H., Shih, Y.-W., Chang, C.-H., Ou, T.-T., Huang, C.-C., Hsu, J.-D., and Wang, C.-J. (2010). EP4 upregulation of Ras signaling and feedback regulation of Ras in human colon tissues and cancer cells. *Arch. Toxicol.* *84*, 731–740.

Wu, N., Yang, X., Zhang, R., Li, J., Xiao, X., Hu, Y., Chen, Y., Yang, F., Lu, N., Wang, Z., et al. (2013). Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microb. Ecol.* *66*, 462–470.

Wu, S., Lim, K.C., Huang, J., Saidi, R.F., and Sears, C.L. (1998). *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 14979–14984.

Wu, S., Morin, P.J., Maouyo, D., and Sears, C.L. (2003). *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology* *124*, 392–400.

Wu, S., Powell, J., Mathioudakis, N., Kane, S., Fernandez, E., and Sears, C.L. (2004). *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces intestinal epithelial cell secretion of interleukin-8 through mitogen-activated protein kinases and a tyrosine kinase-regulated nuclear factor-kappaB pathway. *Infect. Immun.* *72*, 5832–5839.

Wu, S., Rhee, K.-J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H.-R., Huso, D.L., Brancati, F.L., Wick, E., McAllister, F., et al. (2009). A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat. Med.* *15*, 1016–1022.

Wu, W.K.K., Wong, H.P.S., Luo, S.W., Chan, K., Huang, F.Y., Hui, M.K.C., Lam, E.K.Y., Shin, V.Y., Ye, Y.N., Yang, Y.H., et al. (2005). 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanone from Cigarette Smoke Stimulates Colon Cancer Growth via β -Adrenoceptors. *Cancer Res.* *65*, 5272–5277.

Xie, L., Villeneuve, P.J., and Shaw, A. (2009). Survival of patients diagnosed with either colorectal mucinous or non-mucinous adenocarcinoma: a population-based study in Canada. *Int. J. Oncol.* *34*, 1109–1115.

Xu, M., Yamada, M., Li, M., Liu, H., Chen, S.G., and Han, Y.W. (2007). FadA from *Fusobacterium nucleatum* utilizes both secreted and nonsecreted forms for functional oligomerization for attachment and invasion of host cells. *J. Biol. Chem.* *282*, 25000–25009.

- Yang, L., Huang, Y., Porta, R., Yanagisawa, K., Gonzalez, A., Segi, E., Johnson, D.H., Narumiya, S., and Carbone, D.P. (2006). Host and direct antitumor effects and profound reduction in tumor metastasis with selective EP4 receptor antagonism. *Cancer Res.* 66, 9665–9672.
- Yang, V.W., Shields, J.M., Hamilton, S.R., Spannhake, E.W., Hubbard, W.C., Hyland, L.M., Robinson, C.R., and Giardiello, F.M. (1998). Size-dependent increase in prostanoid levels in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res.* 58, 1750–1753.
- Yang, Y., Wang, X., Moore, D.R., Lightfoot, S.A., and Huycke, M.M. (2012). TNF- α mediates macrophage-induced bystander effects through Netrin-1. *Cancer Res.* 72, 5219–5229.
- Yao, M., Kargman, S., Lam, E.C., Kelly, C.R., Zheng, Y., Luk, P., Kwong, E., Evans, J.F., and Wolfe, M.M. (2003). Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice. *Cancer Res.* 63, 586–592.
- Yoshida, S., Handa, Y., Suzuki, T., Ogawa, M., Suzuki, M., Tamai, A., Abe, A., Katayama, E., and Sasakawa, C. (2006). Microtubule-severing activity of *Shigella* is pivotal for intercellular spreading. *Science* 314, 985–989.
- Zackular, J.P., Baxter, N.T., Iverson, K.D., Sadler, W.D., Petrosino, J.F., Chen, G.Y., and Schloss, P.D. (2013). The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *mBio* 4, e00692–00613.
- Zaki, M.H., Vogel, P., Body-Malapel, M., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2010). IL-18 Production Downstream of the Nlrp3 Inflammasome Confers Protection against Colorectal Tumor Formation. *J. Immunol.* 185, 4912–4920.
- Zaki, M.H., Vogel, P., Malireddi, R.K.S., Body-Malapel, M., Anand, P.K., Bertin, J., Green, D.R., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2011). The NOD-like receptor NLRP12 attenuates colon inflammation and tumorigenesis. *Cancer Cell* 20, 649–660.
- Zhan, Y., Chen, P.-J., Sadler, W.D., Wang, F., Poe, S., Núñez, G., Eaton, K.A., and Chen, G.Y. (2013). Gut Microbiota Protects against Gastrointestinal Tumorigenesis Caused by Epithelial Injury. *Cancer Res.* 73, 7199–7210.
- Zhang, X., Cheng, Y., Xiong, Y., Ye, C., Zheng, H., Sun, H., Zhao, H., Ren, Z., and Xu, J. (2012). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Specific Enterohemolysin Induced IL-1 β in Human Macrophages and EHEC-Induced IL-1 β Required Activation of NLRP3 Inflammasome. *PLoS ONE* 7, e50288.
- Zhang, Y., Sime, W., Juhas, M., and Sjölander, A. (2013). Crosstalk between colon cancer cells and macrophages via inflammatory mediators and CD47 promotes tumour cell migration. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 49, 3320–3334.
- Zhou, Q., Peng, R.-Q., Wu, X.-J., Xia, Q., Hou, J.-H., Ding, Y., Zhou, Q.-M., Zhang, X., Pang, Z.-Z., Wan, D.-S., et al. (2010). The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer. *J. Transl. Med.* 8, 13.
- Zhu, Q., Gao, R., Wu, W., and Qin, H. (2013). The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 34, 1285–1300.
- Zhu, Q., Jin, Z., Wu, W., Gao, R., Guo, B., Gao, Z., Yang, Y., and Qin, H. (2014). Analysis of the intestinal lumen microbiota in an animal model of colorectal cancer. *PLoS One* 9, e90849.

Zouiten-Mekki, L., Serghini, M., Fekih, M., Kallel, L., Matri, S., Ben Mustapha, N., Boubaker, J., and Filali, A. (2013). Rôle de la cellule épithéliale dans l'homéostasie intestinale et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Médecine/sciences* 29, 1145–1150.

Annexes



Annexe 1

High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer.

Emmanuel Buc*, Damien Dubois*, Pierre Sauvanet, Jennifer Raisch, Julien Delmas, Arlette Darfeuille-Michaud*, Denis Pezet*, Richard Bonnet*.

PLos One, Février 2013.

High Prevalence of Mucosa-Associated *E. coli* Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer

Emmanuel Buc^{1,2,4*}, Damien Dubois^{1,2,3*}, Pierre Sauvanet^{1,2,4}, Jennifer Raisch^{1,2}, Julien Delmas^{1,2,3}, Arlette Darfeuille-Michaud^{1,2,3*}, Denis Pezet^{1,2,4*}, Richard Bonnet^{1,2,3*}

1 UMR 1071 Inserm/Université d'Auvergne, Clermont Université, Clermont-Ferrand, France, **2** USC 2018, INRA, Clermont-Ferrand, France, **3** Service de Bactériologie, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France, **4** Service de Chirurgie digestive, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

Abstract

Some *Escherichia coli* strains produce toxins designated cyclomodulins (CMs) which interfere with the eukaryotic cell cycle of host cells, suggesting a possible link between these bacteria and cancers. There are relatively few data available concerning the colonization of colon tumors by cyclomodulin- and genotoxic-producing *E. coli*. We did a qualitative and phylogenetic analysis of mucosa-associated *E. coli* harboring cyclomodulin-encoding genes from 38 patients with colorectal cancer (CRC) and 31 with diverticulosis. The functionality of these genes was investigated on cell cultures and the genotoxic activity of strains devoid of known CM-encoding gene was investigated. Results showed a higher prevalence of B2 phylogroup *E. coli* harboring the colibactin-producing genes in biopsies of patients with CRC (55.3%) than in those of patients with diverticulosis (19.3%), ($p < 0.01$). Likewise, a higher prevalence of B2 *E. coli* harboring the CNF1-encoding genes in biopsies of patients with CRC (39.5%) than in those of patients with diverticulosis (12.9%), ($p = 0.01$). Functional analysis revealed that the majority of these genes were functional. Analysis of the ability of *E. coli* to adhere to intestinal epithelial cells Int-407 indicated that highly adherent *E. coli* strains mostly belonged to A and D phylogroups, whatever the origin of the strains (CRC or diverticulosis), and that most *E. coli* strains belonging to B2 phylogroup displayed very low levels of adhesion. In addition, 27.6% ($n = 21/76$) *E. coli* strains devoid of known cyclomodulin-encoding genes induced DNA damage *in vitro*, as assessed by the comet assay. In contrast to cyclomodulin-producing *E. coli*, these strains mainly belonged to A or D *E. coli* phylogroups, and exhibited a non significant difference in the distribution of CRC and diverticulosis specimens (22% versus 32.5%, $p = 0.91$). In conclusion, cyclomodulin-producing *E. coli* belonging mostly to B2 phylogroup colonize the colonic mucosa of patients with CRC.

Citation: Buc E, Dubois D, Sauvanet P, Raisch J, Delmas J, et al. (2013) High Prevalence of Mucosa-Associated *E. coli* Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer. PLoS ONE 8(2): e56964. doi:10.1371/journal.pone.0056964

Editor: John R. Battista, Louisiana State University and A & M College, United States of America

Received: May 12, 2012; **Accepted:** January 18, 2013; **Published:** February 14, 2013

Copyright: © 2013 Buc et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Ministère Français de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie, l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm U1071), l'Institut National de la Recherche Agronomique (USC-2018) and la Ligue contre le cancer. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rbonnet@chu-clermontferrand.fr

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is currently the third most common cancer in men and women, and the fourth leading cause of cancer death worldwide, with 1.2 million estimated cases and 609,000 estimated deaths per year [1]. Sporadic CRC accounts for about 95% of colorectal cases [2]. Genetic factors are usually thought to account for about 20% of cancer causation with environment contributing the remaining 80% risk [3]. CRC is therefore strongly associated with environmental exposures including bacteria that contribute significantly to the colonic environment. Evidence has accumulated showing that the composition of human intestinal microbiota influences host health status. Microbial dysbiosis is observed in CRC patients and evidence of bacterial interactions in CRC has been reported for *Streptococcus bovis*, *Enterococcus spp.*, *Helicobacter pylori*, *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* (for review see [4]). Various studies clearly demonstrate a link between mucosally adherent *E. coli* and CRC. Studies of cancer patients in the UK and Germany revealed that mucosa-associated *E. coli* are more frequently identified in

colon tissue from patients with adenocarcinomas than in that of controls [5,6]. Swidsinski *et al.* reported that only 3% of colon mucosa biopsies from asymptomatic controls tested were positive for *E. coli* with a bacterial universal PCR [5]. In contrast, biopsies from 92% of patients with colonic adenomas or carcinomas harbored bacteria, with *E. coli* being predominant in 70% of patients [5]. Similarly, Martin *et al.* found that 70% of CRC patients had mucosa-associated bacteria, and that a significant proportion of bacteria belonged to the *E. coli* species. Interestingly, Bronowski *et al.* showed that some *E. coli* strains carry virulence genes previously categorized as specific to uropathogenic *E. coli* (UPEC) [7]. Such *E. coli* strains may trigger cellular proliferation in intestinal tract [8], as seen with other bacteria [9,10].

E. coli is the predominant aero-anaerobic Gram-negative species of the normal intestinal flora and participates in promoting the stability of the luminal microbial flora and in maintaining normal intestinal homeostasis [11]. As a commensal, *E. coli* coexists with its mammalian host in good harmony and rarely causes disease. However, some strains carry a combination of virulence genes that

enable them to cause intestinal (InPEC, Intestinal Pathogenic *E. coli*) and extra-intestinal (ExPEC, Extraintestinal Pathogenic *E. coli*) infections (for reviews see [12–14]). Phylogenetic analysis has shown that *E. coli* is composed of four main phylogenetic groups (A, B1, B2, and D)[15,16]. Pathogenic strains belong mainly to groups B2 and D, while most fecal strains belong to groups A and B1. Strains of groups B2 and D often carry virulence factors that are lacking in group A and B1 strains [17–19].

Among *E. coli* virulence factors, several toxins, called cyclomodulins, are attracting growing attention because they are genotoxic and/or modulate cellular differentiation, apoptosis, and proliferation (for review see [4]). Cytotoxic necrotizing factor (CNF) activates Rho GTPases, which leads to cytoskeletal alterations and affects the cell cycle. The cycle-inhibiting factor (CIF) target NEDD8-conjugated cullins to hijack host-cell signaling pathways [20,21]. The genotoxin colibactin is a hybrid polyketide-non ribosomal peptide compound [22]. Its biosynthesis machinery is encoded by the *pks* genomic island. Colibactin causes DNA double-strand breaks and a chromosomal instability in human eukaryotic cells [22,23]. The cytolethal distending toxin (CDT) also induces DNA damage probably through DNase activity, and a closely related enzyme produced by *Helicobacter hepaticus* promotes the progression of hepatitis to pre-malignant, dysplastic lesions and increases the proliferation of hepatocytes, providing the first evidence that CDT has carcinogenic potential *in vivo* [24–26].

In the present study, we compared the prevalence of cyclomodulin- and genotoxin-encoding genes in mucosa-associated *E. coli* strains from resection specimens of CRCs and diverticulosis. We also investigated the genotoxic activity of mucosa-associated *E. coli* devoid of known genotoxin-encoding genes and their ability to adhere to epithelial intestinal cells.

Materials and Methods

Ethics Statement

Ethical approval for the study was granted by the Clermont-Ferrand research ethics committee. This IRB allowed for the waiver of written consent and approved the process of obtaining verbal consents from potential subjects, because the research involves no procedures for which written consent is normally required outside of the research context and presents no risk of harm to subjects. The biological samples were collected from colon resections, which were required for the treatment of patients. The investigators explained the study to the potential subject verbally, providing all pertinent information such as purpose, procedures, putative risks. Following this verbal explanation, the potential subject was provided with a study information sheet. After allowing the potential subject time to read the study information sheet, the investigator answered any additional questions the potential subject may have had. A verbal agreement to participate in the research was obtained for all patients included in the study. The dates of verbal consent were tracked in a non-identifiable manner.

Patients

In order to study macroscopic samples from resection of colon specimens, we compared patients with CRC and patients with diverticulosis as a non-cancer group. Sixty-nine patients were studied between March 2007 and November 2009 at the university hospital of Clermont-Ferrand, France. Thirty-eight had CRC, and 31 had complicated diverticulosis (Tables S1, S2, S3). Patients from the CRC group had uncomplicated and resectable colon cancer developed either in the proximal colon (from the cecum to the hepatic flexure of the ascendant colon) or

in the distal colon (sigmoid colon). CRC of the transverse or the descendant colon were excluded because of their low occurrence, and to avoid the risks of bias. In all cases, the operation consisted in segmental resection of the colon involved by the tumor with immediate anastomosis without diverting stoma. Patients with complicated CRC (obstruction, perforation or infection) were excluded from the study. Patients from the diverticulosis group had diverticulosis involving the sigmoid colon and required surgery because of a history of complication (recurrent diverticulitis, abscess, peritonitis). We excluded patients with acute or chronic inflammation at the time of surgery, and those with stenosis. In the event of a recent attack of diverticulitis, antibiotics were stopped at least 3 weeks before surgery. Sex ratio was 1.05 and 0.72 for CRC and DIV patients respectively. The age range was 35–95 years for cancer patients (median age, 71 years and average age, 67 years) and 34–81 years for diverticulosis patients (median age, 58 years and average age, 60 years). Samples were taken on resected colon, at the site of malignant tumors for CRC patients and in normal mucosa for diverticulosis patients. Pathologic analysis confirmed the neoplastic features of the samples in CRC patients, and the lack of inflammation or dysplasia in diverticulosis patients. The CRC series comprised 21 proximal and 17 distal colon samples. TNM stage is reported in Tables S1 and S2. Bowel preparation was by oral sodium picosulfate or oral polyethylene glycol the evening before surgery. All resection patients had received cefoxitin (2 g intravenously) at the time of incision and none had received antibiotics in the 4 weeks before sampling.

Sample treatment

The mucosal samples were placed in 10 mL of sterile phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) and transported on ice to the laboratory. The samples were weighed (50 to 100 mg each) and washed thoroughly three times in 10 mL PBS to remove most of the fecal bacteria. Each washing step was followed by centrifugation at 900g for 5 minutes. The specimens were then crushed (Ultra-Turrax, IKA) and incubated for 15 minutes on a tube rotator at room temperature in the presence of Triton 0.1X. Tenfold dilutions of the lysate were then plated on Drigalski agar and chromogenic agar chromID CPS3® (bioMérieux), which allow the identification of *E. coli*. *E. coli* colonies were collected after 24 hours of incubation at 37 °C and the identification of bacteria was confirmed with the automated Vitek II® (bioMérieux) system. When possible a maximum of 96 *E. coli* colonies per sample were collected for molecular typing. The bacteria were subcultured for 24 hours at 37 °C in 96-well plates in Luria Bertani medium, supplemented with 15% glycerol and then stored at –80 °C.

Molecular typing and phylogenetic grouping

Ten colonies per sample were typed with molecular methods to identify the *E. coli* strains (*E. coli* genotypes) colonizing the samples. Two genotyping methods were used, an “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus” sequence (ERIC)-PCR using primer ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') and a “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD)-PCR using primer 1283 (5'-GCG ATC CCC A-3') [27,28]. One representative strain was subsequently analysed and stored at –80 °C in Luria-Bertani medium supplemented with 15% glycerol. *E. coli* strains were then classified according to the *E. coli* Reference Collection (ECOR) system [16] into phylogenetic groups A, B1, B2, and D using a multiplex PCR technique [29]. Strain RS218, which harbors all the genes targeted by the multiplex PCR, was used as positive control.

Detection and identification of cyclomodulin-producing genes

Cyclomodulin-encoding genes were detected by dot-blot DNA hybridization experiments in all *E. coli* strains. The probes were obtained by PCR as previously described [30] (Tables S4 and S5) using the PCR DIG probe synthesis kit (Roche Applied Sciences, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Two-microgram DNA samples were fixed onto positively charged nylon membranes by UV illumination for 20 min. Hybridization was performed with the Roche labeling and detection kit (Roche Applied Sciences) as indicated by the manufacturer. Each spot was checked with a 16S rRNA gene probe. The *pks* island, which contains the colibactin-producing gene cluster, was screened with a probe overlapping the *clbK* and *clbJ* genes. The *cnf* genes were detected with a mixture of probes specific to *cnf1*, *cnf2*, and *cnf3*. The *cdtB* genes were detected by two hybridization experiments with the *cdtB-II-cdtB-III-cdtBV* and *cdtB-I-cdtB-IV* probe mixtures. The *cif* gene was detected using an internal specific probe. The sensitivities and specificities of the probes were checked on each membrane by spotting DNA extracts of all cyclomodulin control strains. Positive hybridizations with a cyclomodulin probe were subjected to confirmatory PCR assays as previously reported [30]. The reaction mixture contained 50 ng DNA sample, 0.2 mM each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.4 μ M each primer, 3 mM MgCl₂, and 1.0 U RedGoldStar DNA polymerase (Eurogentec, Belgium) in the corresponding reaction buffer. Primers located in the 5' and 3' regions of the *pks* island (the *clbA* and *clbQ* genes) were used to confirm the full presence of the colibactin-producing island.

Cytopathic assays

HeLa cells (derived from cervical cancer) purchased from ATCC (ATCC® CCL-2™) were maintained in an atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C in appropriate medium. The cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum (Lonza, Walkersville, MD USA), 1% L-glutamine (Life-Technologies), 200U of penicillin, 50 mg of streptomycin, 0.25 mg of amphotericin B per liter, and 1% hepes buffered saline solution (Lonza). They were seeded in 96-well tissue culture plates at 5×10^4 cells/well for 24 H. The cytopathic effects of CNF and CDTs were investigated in all strains from cell-lysate, as previously described [31]. Briefly, the effects of CDT and CNF were detected by a cell-lysate-interacting test. After 48 H culture at 37 °C with shaking in Luria-Bertani broth medium, bacterial cells were sonicated and sterile filtered separately using 0.22- μ m-pore-size filters. HeLa cells were treated with the sterile sonicated lysates (final protein concentration: 4 μ g/ml) until analysis. The effects of colibactin and Cif were detected by a cell-bacterium-interacting test, based on the interaction between HeLa cells and bacteria. Overnight Luria-Bertani broth cultures of *E. coli* were washed three times and diluted in interaction medium. HeLa cell cultures were infected at multiplicities of infection (MOI, numbers of bacteria per cell at the onset of infection) of 100 and 200. The cells were washed 4 H after inoculation and incubated in cell culture medium with 200 μ g/ml gentamicin until analysis. After 72 H of incubation at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere, the medium was removed by three washes of the HeLa cell monolayers. The morphological changes characteristic of CDT, CNF, colibactin, and Cif were observed after staining with Giemsa stain. Identification was based on the ability of either bacterial lysate containing CNF and CDT or whole live bacteria producing colibactin and Cif to induce a cytopathic effect on epithelial cells analyzed at 3-days post infection. Colibactin, CDT and Cif induced cytopathic effects, as evidenced by enlarged

nuclei and cell distension (megakaryocytosis), while CNF induced multinucleation, and enlargement of HeLa cells. Multinucleation is observed in >50% of cells infected by CNF-producing bacteria and in around 10% of non-infected cells or cells infected with other CM-producing strains. For CNF and CDT, the cytopathic effect is only observable with bacterial lysates. In contrast, for colibactin and Cif, contact between bacteria and host cells is required. The detection of alpha-hemolysin was performed for all strains studied by overnight growth at 37 °C on Columbia sheep blood (5%) agar (Oxoid, Dardilly, France). *E. coli* 25922 (ATCC) was used as the reference strain for alpha-hemolysin production.

Single-cell gel electrophoresis

The genotoxic activity of *E. coli* strains devoid of known CM-encoding genes were investigated using single-cell gel electrophoresis (comet assay). HeLa cell cultures were infected at MOI of 500 with *E. coli* cultured overnight in Luria-Bertani broth. The cells were washed twice 3 H after inoculation and were incubated overnight in cell culture medium with 200 μ g/ml gentamicin at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere. They were then washed with PBS medium and combined with 0.5% low-melting-point agarose (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France) dissolved in sterile PBS at 37 °C. The cell-agarose mixture was applied to a microscope slide precoated with 1.5% normal-melting-point agarose (Molecular Biology Grade, Bio-Rad) dissolved in sterile PBS at 37 °C. A cover slip was applied and allowed to solidify at 4 °C for 60 min. Slides were then placed in 50 mL lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA containing 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) for 2 h at 4 °C in the dark. Slides were immersed in electrophoresis buffer (1 mM EDTA 300 mM NaOH pH 13) for 1 h at 4 °C and an electric field was applied (1 V/cm) for 40 minutes. The slides were neutralized with 400 mM Tris-HCl pH 7.5 and dried. 40 μ l of a 1:10,000 dilution of SybrGreen was applied directly to the slide. Individual cells or comets were viewed by Zeiss Axioplan2 fluorescence microscope. The B2 *E. coli* strain IHE3034 and *E. coli* DH10 β pBACpks were used as positive controls [22]. The B2 *E. coli* strain IHE3034 Δ *clbP* and *E. coli* DH10 β pBAC were used as negative controls [22].

Adhesion assay

Int-407 cells (derived from human intestinal embryonic jejunum and ileum) purchased from ATCC (ATCC® CCL-6™) were maintained in an atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C in appropriate medium. They were cultured in DMEM medium supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum (Lonza, Walkersville, MD USA), 1% L-glutamine (Life-Technologies), 200U of penicillin, 50 mg of streptomycin, 0.25 mg of amphotericin B per liter, and 1% hepes buffered saline solution (Lonza). Briefly, cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/cm² in culture plates for 48 H. The infection was performed at a multiplicity of infection of 10 bacteria per cell. Infected cells were centrifuged at 900 g for 10 min at 25 °C and placed at 37 °C for 3 H. Cells were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2). The epithelial cells were then lysed with 1% Triton X-100 (Sigma) in deionised water. Samples were diluted and plated onto Luria-Bertani (LB) agar plates to determine the number of CFU corresponding to the total number of cell-associated bacteria. Strains *E. coli* K12 and *E. coli* LF82 were used as negative and positive controls, respectively [32]. The results are expressed as number of adherent bacteria per cell after a 3 H infection period.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Fisher exact and chi-square tests. For multiple-group comparisons, an initial chi-square test for heterogeneity was done, and only if this yielded a P value of <0.05 were the individual pairwise comparisons tested.

Results

E. coli strains in colon cancer and diverticulosis samples

The analysis of *E. coli* strains indicated that the number of samples without *E. coli* was significantly higher in diverticulosis patients (19.4%, $n = 6/31$) than in those with CRC (2.6%, $n = 1/38$), $p = 0.04$ (Table 1). Many colonic specimens harbored only one *E. coli* genotype. This was observed in 42.1% ($n = 16/38$) of CRC specimens and in only 25.8% ($n = 8/31$) of diverticulosis but the difference was not significant ($p = 0.12$). Most strains isolated from CRC belonged to the B2 phylogroup (73.7%, $n = 28/38$) in contrast to those isolated from diverticulosis (41.9%, $n = 13/31$), $p < 0.01$ (Table 2). No significant difference in *E. coli* phylogroup distribution was observed, including for B2 *E. coli* strains isolated from proximal (82.4%, $n = 14/17$) and distal colon tumors (66.7%, $n = 14/21$), $p = 0.23$ (Table 2). Overall *E. coli* strains belonging to the B2 phylogroup colonized colon tumors more frequently than they did diverticulosis samples.

Distribution of CM-encoding genes according to *E. coli* phylogenetic groups

The distribution of CM-encoding genes in *E. coli* strains is shown in Table 3 and Tables S1, S2, S3. The most frequent trait was the colibactin-encoding *pks* island (80% of CM-producing *E. coli*, $n = 28/35$ and 24.1% of total *E. coli* strains, $n = 28/116$). All strains associated with the colonic mucosa of patients with CRC or diverticulosis harboring the colibactin-encoding *pks* island belonged to phylogroup B2 ($p < 0.001$ for group B2 versus groups A, B1 and D, individual or combined). In addition, 16.4% ($n = 19/116$) of strains possessed the *cnf* gene; of these only one was *cnf2*-positive and none was *cnf3*-positive, indicating that these strains were not of animal origin [33,34]. All *cnf1*-harboring strains belonged also to phylogroup B2, and accounted for 36.7% ($n = 18/49$) of strains of this phylogroup. As for the *pks* island, the association *cnf1* with phylogroup B2 was strong ($p < 0.001$ for group B2 versus groups A, B1 and D, individual or combined), and 33% ($n = 16/49$) of B2 strains possessed both the *pks* island and the *cnf1* gene ($p < 0.001$ for group B2 versus groups A, B1 and D, individual or combined), as previously observed [30,35]. All but three strains harboring *cnf1* gene exhibited the alpha-hemolytic phenotype. However, the three non-hemolytic *cnf1*-positive strains harbored the *hlyC* gene. The *cdtB* genes were observed in six strains. Although four out of six *cdt*-positive strains belonged to phylogroup B2, no significant association with a particular phylogenetic group was observed, even with the different *cdtB* gene subtypes. *cdtB-I/cdtB-IV* genes ($n = 5$) were more frequently

observed than those of the *cdtB-II-cdtB-III-cdtB-IV* gene group ($n = 1$). The only *cdt-III*-positive strain also harbored the *cnf2* gene, a combination of genes frequently reported in the pVir plasmid and mainly seen in strains of bovine origin [36,37]. The *cdtB* genes showed no particular association with the colibactin-encoding *pks* island or the *cnf1* gene. Since *cdt* genes have been extensively studied in Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strains [38–40], it was decided to investigate *cdtB*-positive strains for *stx* and *eae* genes. No *stx* or *eae* gene was detected in *cdtB*-positive strains. The *cif* gene was detected in three strains that belonged to phylogroups A ($n = 1$) and B1 ($n = 2$) and harbored no other CM-encoding genes. CIF is an effector of the type 3 secretion system encoded by the locus of enterocyte effacement (LEE) observed in enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) [41,42] and the three positive strains in this study possessed the *eae* gene but neither *stx1* nor *stx2* genes, and therefore belonged to the EPEC pathotype.

Phenotypic detection of cyclomodulins

Cell-lysate-interacting tests were used to investigate CNF and CDT production in all strains. The detection of colibactin and CIF production, which require cell-bacterium-interacting tests, was only possible in the non-hemolytic strains, because the hemolysin-producing strains, in contrast to the corresponding lysates, induced rapid cell death. The results are given in Tables S1, S2, S3. Colibactin, CDT and CIF induced cytopathic effects, as evidenced by enlarged nuclei and cell distension (megakaryocytosis), while CNF induced multinucleation in $\geq 50\%$ of cells and enlargement of HeLa cells (Figure 1). For CNF and CDT, the cytopathic effect was only observable with bacterial lysates, whereas a contact between bacteria and host cells was required for colibactin and CIF, as previously reported (Figure 1) [22,31,42]. The observation of a cytopathic effect was associated to the presence of CM-encoding genes. Three strains harboring a *pks* island isolated from diverticulosis, distal and proximal colon specimens did not induce any cytopathic effect. One strain isolated from a diverticulosis sample had a nonfunctional *cnf1* gene and two *cdt*-positive strains showed no cytopathic effect. For the strain harboring *cnf2* and *cdt-III* genes, $>50\%$ cell multinucleation attested to the production of CNF and the wide megakaryocytosis attributed to CNF production or its combination with CDT-III. A cytopathic effect was observed for the strains harboring the *cif* gene. Overall, most CM-encoding genes were functional, notably *cnf* and *cif* (93% and 100%, respectively).

Distribution of CM-encoding genes according to the specimen origin and the phylogroup

The results are shown in Table 4, Figure 2 and Tables S1, S2, S3. Twenty-five CRC specimens among 38 (65.8%) contained CM-positive *E. coli* and only 6 diverticulosis specimens among 31 (19.4%), indicating that CM-harboring strains were preferentially

Table 1. Number of *E. coli* strains collected from patients with CRC and diverticulosis.

Number of <i>E. coli</i> strains per sample	Percentage (number) of samples containing <i>E. coli</i> strains			
	Diverticulosis ($n = 31$)	CRC ($n = 38$)	Proximal colon cancer ($n = 21$)	Distal colon cancer ($n = 17$)
0	19.4 (6)	2.6 (1)	4.8 (1)	0.0 (0)
1	25.8 (8)	42.1 (16)	47.6 (10)	35.2 (6)
>1	54.8 (17)	55.3 (21)	47.6 (10)	64.7 (11)

doi:10.1371/journal.pone.0056964.t001

Table 2. Colonization of diverticulosis and CRC samples by *E. coli* phylogroups (A, B1, B2 and D).

	Percentage (number) of samples containing <i>E. coli</i>			
	A	B1	B2	D
Diverticulosis (n = 31)	41.9 (13)	6.5 (2)	41.9 (13)	32.2 (10)
CRC (n = 38)	28.9 (11)	23.7 (9)	73.7 (28)	26.3 (10)
Distal colon cancer (n = 17)	29.4 (5)	17.6 (3)	82.3 (14)	41.1 (7)
Proximal colon cancer (n = 21)	28.5 (6)	28.6 (6)	66.7 (14)	14.3 (3)

doi:10.1371/journal.pone.0056964.t002

associated with CRC ($p < 0.01$). This difference was associated with a high number of CM-positive B2 *E. coli* in CRC specimens compared to that observed in diverticulosis specimens (Figure 2). Accordingly, strains harboring colibactin-encoding *pks* island were present in 55.3% of CRC specimens ($n = 21/38$) and only in 19.3% of diverticulosis specimens ($n = 6/31$), indicating that *pks* positive strains were significantly ($p < 0.01$) more prevalent in CRC. To a lesser extent, *cnf* and *cdt* positive *E. coli* were significantly ($p \leq 0.02$) more prevalent in the CRC than in the diverticulosis samples. These differences were mainly due to the high prevalence of *pks*-, *cnf*- and *cdt*-positive *E. coli* in distal CRC specimens compared to that in diverticulosis specimens ($p \leq 0.01$). Altogether, these results indicate that CM-positive *E. coli* distribution differs according to specimen origin.

Genotoxicity of *E. coli* devoid of CM-encoding genes

We investigated whether *E. coli* devoid of known CM-encoding genes can induce DNA damage in host cells. Using HeLa cultured cells, the genotoxicity of strains was investigated by single-cell gel electrophoresis assay (or comet assay), the state-of-the-art technique for detecting DNA damage caused by chemical genotoxins. A total of 76 clinical *E. coli* strains were investigated; 15 originated from proximal colon cancer, 21 from distal colon cancer and 40 from diverticulosis. These strains belonged to A ($n = 29$), D ($n = 21$) and B2 ($n = 17$) phylogroups. Interestingly, 27.6% ($n = 21/76$) of *E. coli* strains devoid of known CM-encoding genes induced the formation of comets, which are typical of host cell DNA damage (Figure 3 and Tables S1, S2, S3). In addition, in contrast to CM-producing *E. coli* strains, which belong mainly to the B2 phylogroup, these comet positive strains belonged mainly to A (52%, $n = 11/21$) and D (29%, $n = 6/21$) phylogroups. Comets were observed with 13 strains (32.5%) among 40 isolated from patients with diverticulosis, and with 8 strains (22%) among 36 in

patients with CRC. The distribution of these putative genotoxic strains in the specimens was therefore different from that of CM-encoding strains.

Bacterial adhesion to intestinal epithelial cells

The ability of *E. coli* strains to adhere to Int-407 epithelial cells was compared according to the origin of the strains, their phylogroup and their ability to produce cyclomodulin(s) or unknown genotoxin (positive comet assay). As shown in Figures 4A and B, highly adherent *E. coli* strains mostly belonged to A and D phylogroups, irrespective of the origin of the strains (CRC or

Table 3. Distribution of CM-encoding genes in *E. coli* strains according to phylogroups (A, B1, B2 and D).

	Percentage (number) of <i>E. coli</i> belonging to the phylogroup				
	A (n = 33)	B1 (n = 12)	B2 (n = 49)	D (n = 22)	All (n = 116)
<i>pks</i>	0.0 (0)	0.0 (0)	57.1 (28)	0.0 (0)	24.1 (28)
<i>cnf</i>	0.0 (0)	8.3 (1)	36.7 (18)	0.0 (0)	16.4 (19)
<i>cdt</i>	3.0 (1)	8.3 (1)	8.2 (4)	0.0 (0)	5.2 (6)
<i>cif</i>	6.1 (2)	8.3 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	2.6 (3)
<i>cm</i> ¹	9.1 (3)	16.7 (2) ²	63.3 (31) ²	0.0 (0)	30.2 (36) ²

¹, cyclomodulin-encoding gene;

², some *E. coli* strains harbored more than one CM-encoding genes.

doi:10.1371/journal.pone.0056964.t003

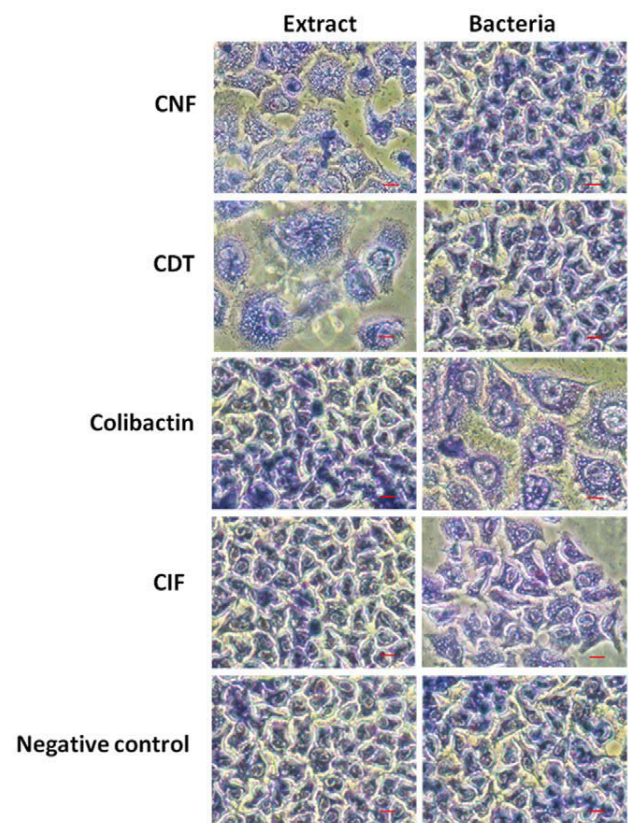


Figure 1. Cytopathic effect induced by *E. coli* live bacteria or protein extracts on epithelial cells at three-day post-infection. For CNF and CDT, the cytopathic effect is only observable with bacterial lysates. In contrast, for colibactin and CIF, a contact between bacteria and host cells is required. Colibactin, CDT and CIF induced cytopathic effects as seen by enlarged nuclei and cell distension (megacocytosis), while CNF induced multinucleation and enlargement of HeLa cells. doi:10.1371/journal.pone.0056964.g001

Table 4. CM-encoding gene content of CRC and diverticulosis samples.

	Number (percentage) of specimens exhibiting CM-encoding genes				
	<i>pks</i>	<i>cnf</i>	<i>cdt</i>	<i>cif</i>	<i>cm</i> ^{1,2}
Diverticulosis (n = 31)	6 (19.3)	4 (12.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (19.4)
CRC (n = 38)	21 (55.3)	15 (39.5)	6 (15.8)	3 (7.9)	25 (65.8)
Distal colon cancer (n = 17)	11 (64.7)	9 (52.9)	4 (23.5)	1 (5.9)	13 (76.5)
Proximal colon cancer (n = 21)	10 (47.8)	6 (28.6)	2 (9.5)	2 (9.5)	12 (57.1)

¹, cyclomodulin-encoding gene;², some *E. coli* strains harbored more than one CM-encoding genes.

doi:10.1371/journal.pone.0056964.t004

diverticulosis). Unexpectedly, most *E. coli* strains belonging to B2 phylogroup displayed very low levels of adhesion. Analysis of the adhesive properties of A and D *E. coli* strains according to their ability to produce cyclomodulin(s) or unknown genotoxin (positive comet assay) showed that there was no significant difference (Figure 4B).

Discussion

The study of colonic mucosa-associated *E. coli* from patients with CRC or diverticulosis indicated that (i) *E. coli* strains belonging to the B2 phylogroup colonized colon cancers more frequently than they did diverticulosis samples, (ii) the CM-encoding genes were overrepresented in colon cancers, especially colibactin-encoding *pks* island, *cnfI* and *cdt* gene, and (iii) the distal colon cancers were more frequently colonized by B2 *E. coli* producing CMs than were the diverticulosis samples.

The *E. coli* strains of the B2 phylogroup are mostly involved in extra-intestinal infections, such as urinary tract infections. They produce numerous virulence factors, notably pili adhesins, that favor colonization of the urinary tract. We can speculate that such adhesins specifically found in B2 *E. coli* also favor the colonization of colon cancer. Bronowski *et al.* observed UPEC-associated genes encoding adhesins among a panel of mucosa-associated *E. coli* isolated from colon cancer, and Martin *et al.* reported that *E. coli* strains isolated from colorectal tumors frequently expressed

hemagglutinins, which favor adhesion to intestinal epithelial Int-407 and HT29 cells [7,43]. One explanation of the high prevalence of B2 *E. coli* in CRC could be that changes in the host mucosa receptor repertoire have an effect on the bacterial population associated with mucosa. A higher level of colonization with B2 *E. coli* has also been observed in inflammatory bowel disease (IBD) [44]. In Crohn's disease patients, such colonization was accompanied by increased ileal expression of the glycoprotein CEACAM6, which acts as a receptor for type 1 pili produced by *E. coli* [45,46]. Interestingly, Crohn's disease-associated B2 *E. coli* strains can induce the expression of CEACAM6 in intestinal epithelial cells, and yet CEACAM6 is a human tumor marker, whose overexpression has been observed in colonic tumors [47,48].

In this study, the CM-encoding genes were overrepresented in CRC compared with diverticulosis samples. Similar results were obtained by Arthur *et al.* when comparing the prevalence of colibactin-producing *E. coli* in CRC patients compared to control patients with diverticulosis, sporadic polyposis, irritable bowel syndrome or hemorrhoids [49]. Our data, which showed differences in prevalence of CM-producing *E. coli* strains belonging to B2 phylogroup, may be underestimated due to our experimental procedure of preparing colonic specimens. We removed most fecal bacteria by washing the specimens thoroughly three times in PBS, but some mucus-associated bacteria were still present. Two studies, by Swidsinski *et al.* and Martin *et al.*, reported higher

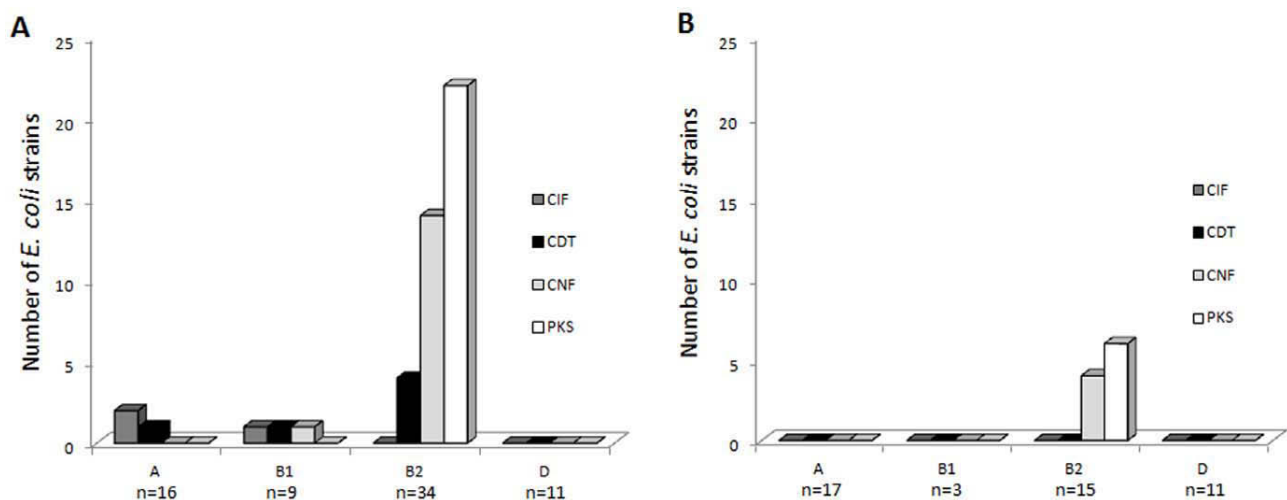


Figure 2. Distribution of *E. coli* strains producing various cyclomodulins according to phylogroups and specimen origins. A, *E. coli* strains (n = 70) isolated from CRC samples (n = 38), and B, *E. coli* strains (n = 46) isolated from diverticulosis samples (n = 31). doi:10.1371/journal.pone.0056964.g002

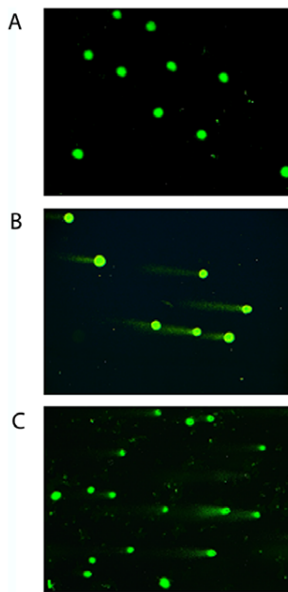


Figure 3. DNA damage was detected by the comet assay in HeLa cells exposed to *E. coli* for 3 h. DNA damage was not detected in HeLa cells infected with the *E. coli* strain IHE3034 $\Delta clbP$ harboring a defective *pks* island (A). Comet assay was positive in HeLa cells infected with the *E. coli* strain IHE3034 harboring *pks* island (B) or with *E. coli* devoid of known cyclomodulin-encoding genes (C). doi:10.1371/journal.pone.0056964.g003

numbers of *E. coli* in colon cancer samples than in controls when biopsy samples were studied after surface mucus removal, indicating that higher number of *E. coli* are in very close association with the mucosa in CRC samples compared to those of controls. The CM-encoding genes identified were *pks* island, *cnf1* and *cdt* gene. Accordingly, Bronowski *et al.* have previously identified among a panel of 10 *E. coli* isolated from biopsies of colon cancers, 3 strains harboring *cnf1* genes and 4 strains harboring a polyketide synthase-encoding gene belonging to *pks* island [7]. The high prevalence of CM-encoding genes in CRC suggests a possible role of CM-encoding *E. coli* in the development of malignant colon tumors. It is well established that colibactin-encoding *pks*-harboring *E. coli* strains are mutagenic and genotoxic *in vitro* and *in vivo* [22,23]. They can promote CRC without affecting intestinal inflammation [50]. In addition, transient infection of human cell lines by such strains induces anchorage-independent colony formation [23], a process involved in metastases. Because of these mutagenic and cell transformation activities, *E. coli* strains harboring the colibactin-encoding *pks* island may affect carcinogenesis at different stages. Cdt also induces DNA breaks in eukaryotic cells [26]. The presence of bacteria harboring *cdt* have already been associated with some lymphomas of the small intestine and can promote the development of hepatic and colon tumors [25,51–54]. CNF promotes cell proliferation by activating the Rho-GTPases and stimulates the transition from G₁ to S phases [55]. In addition, CNF1 inhibits apoptosis and alters tight junction structure and epithelial barrier function [56–58], processes that could favor carcinogenesis. Maddocks *et al.* have shown that EPEC are more frequent in the colon adenocarcinoma tissues than in matched normal colon tissues, with a prevalence of 25% and 0%, respectively [59]. EPEC inject into host cells bacterial effectors, which have an effect on DNA damage repair and the cytoskeleton [59,60]. One effector is the product of the *cif* gene, which alters the ubiquitination process

and thus the degradation of proteins involved in many cellular processes such as cell cycle regulation and cytoskeleton [21,61]. In addition, the murine EPEC-like pathogen, *Citrobacter rodentium*, which harbors the LEE locus, is the cause of transmissible colonic hyperplasia [62], reduces the latency period of chemically induced tumors [63] and promotes colonic adenoma formation in APC/Min mice [64].

The distal colon cancers were more frequently colonized by B2 *E. coli* encoding CMs than the proximal colon cancers or diverticulosis samples, suggesting that the production of CMs directly or indirectly can provide a selective advantage for the colonization of distal colon cancers. This finding could be explained by major differences in the embryologic origin, bacterial flora composition, and physiology of the distal and proximal colons. The proximal colon derives from the midgut whereas the distal colon develops from the hindgut. The epithelial metabolism in the distal colon mainly involves butyrate, and in the proximal epithelium, acetate. Bacterial populations are qualitatively and quantitatively different in the lumen of proximal and distal colons [65], but studies showed that in a given patient similar populations of mucosa-associated bacteria are accommodated along the different parts of the colon irrespective of differences in the luminal content [66–68]. Most CM-producing strains harbor colibactin-encoding *pks* island or the combination of *cnf* genes with *pks* island (79% of CM-producing *E. coli*), suggesting an important role of *pks* island in the distribution of CM-producing *E. coli*. Nougayrède *et al.* proposed that the presence of colibactin-encoding *pks* can favor the colonization of the intestinal tract [22]. As a PK-NRP-type compound, colibactin requires specific precursors belonging to the bacterial secondary metabolism. The physiological features of the distal and proximal colons could modify *E. coli* metabolism and therefore the synthesis of PK-NRP compounds such as colibactin. Consequently, the efficiency of colibactin in promoting colonization may be affected and play a role in the distribution of CM-producing *E. coli*.

Interestingly, the proximal and distal colons also differ by certain aspects of their molecular physiopathology. The genomic instability associated with the microsatellite instability (MSI) phenotype is a hallmark of proximal colon cancer [69]. In contrast, chromosomal instability (CIN) is a major feature of distal colon cancers [69]. The *pks*-harboring *E. coli* induce major chromosomal damage and genetic instability [23]. Moreover, the CNF1-encoding gene, which is frequently associated with *pks* island, induces abnormal chromosome segregation. These CM-encoding *E. coli* strains may therefore have an impact on the development of colon cancers.

The B2 phylogenetic group of *E. coli* is attracting attention because it contains strains responsible for severe infections, and their genetic background is adapted to the acquisition and/or maintenance of numerous virulence factors [19]. However, the *E. coli* strains belonging to the A and D phylogroups account for a large proportion (40% to 55%) of the *E. coli* strains in the intestinal tract [17,70,71]. Surprisingly, we observed that *E. coli* strains belonging to A and D phylogroups, irrespective of the origin of the strains (CRC or diverticulosis), were highly adherent to intestinal epithelial cells compared to B2 *E. coli* strains, which displayed very low levels of adhesion. In addition, some *E. coli* strains belonging to A and D phylogroups in addition to having adhesion ability were able to induce DNA damage, suggesting that these strains have acquired unknown genotoxin(s). The distribution of these strains in CRC and diverticulosis specimens was not significantly different. The genotoxic *E. coli* strains of A and D subgroups, in contrast to B2 CM-producing *E. coli*, are therefore not specifically associated

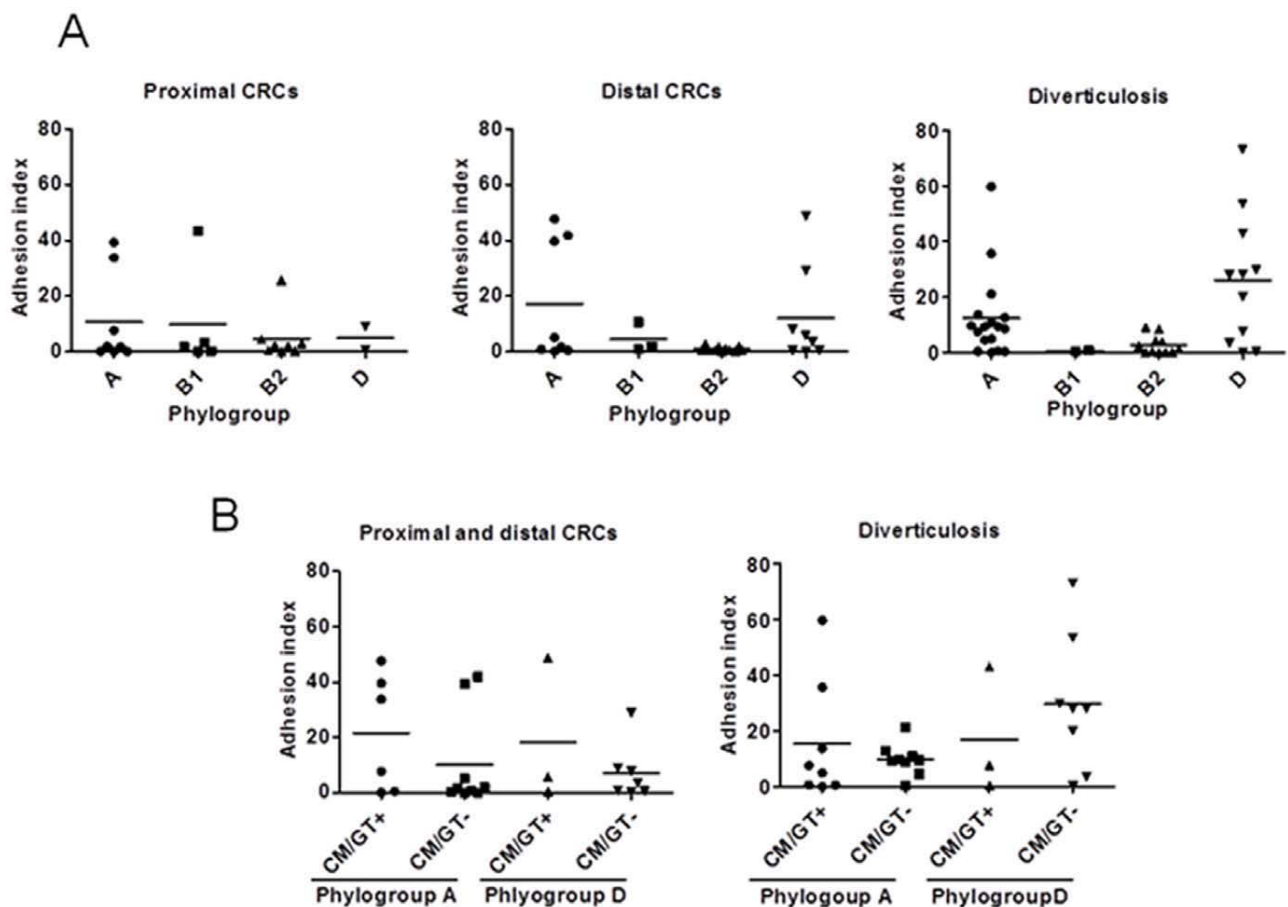


Figure 4. Adhesion ability of *E. coli* strains isolated from diverticulosis and CRC (proximal and distal) samples to Int-407 intestinal epithelial cells. A, adhesion ability according to the specimen origin and *E. coli* phylogroup. B, Adhesion ability of *E. coli* strains isolated from diverticulosis and CRC (proximal and distal) samples and belonging to A and D phylogroups according to their ability to produce or not a cyclomodulin/genotoxin. The results are expressed as number of adherent bacteria per cell after 3 h infection period. Data are means $\pm$ SEM for at least 3 independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0056964.g004

with CRC. However, their presence in close contact with colon tumors may still have an influence on the evolution of CRC.

The mechanism by which CM-producing *E. coli* strains can promote carcinogenesis is probably not due to the bacteria alone, and very likely involves numerous factors such as host susceptibility. DNA repair plays a pivotal role in maintaining genomic integrity with over 130 genes involved in various repair pathways that include base excision repair, nucleotide excision repair, double strand break repair and DNA mismatch repair [72]. In addition, polymorphisms within repair process genes are widely reported to be associated with an extensive range of malignancies that include CRC [73–75]. These polymorphisms can decrease their efficiency and explain susceptibility to the repeated aggressions of host DNA by resident *E. coli* producing genotoxins.

Finally, on the assumption that bacteria are associated with CRC, bacterial strains present at the origin of the cancer may disappear and be replaced by other bacteria better adapted to the cancer environment. In consequence, it remains difficult to determine whether the increase in specific bacteria is the consequence of the presence of malignant tissues or the cause of the cancer. However, these CM-producing bacteria, which colonize the malignant tumors, probably have an impact on the evolution of CRC.

In conclusion, our study showed a high prevalence of CM-producing B2 *E. coli* in biopsies of colon cancers, especially at the distal part. It suggests therefore a possible role of CM-producing *E. coli* in colon cancers. This could be investigated in a longitudinal observational study to clarify the role of CMs in colorectal carcinogenesis. It also emerged that the different endogenous features of the proximal and distal colons and their different responsiveness to exogenous factors probably lead to the emergence of specific bacterial populations which can affect carcinogenesis. As previously reported for ExPEC, cyclomodulins are mostly found in *E. coli* of the B2 phylogroup. However, we observed that colonic mucosa-associated *E. coli* belonging to the phylogroups A and D and devoid of known CM exhibit host cell genotoxic activity and should be considered as potentially harmful.

Supporting Information

Table S1 *E. coli* strains isolated from distal colonic cancers. (DOCX)

Table S2 *E. coli* strains isolated from proximal colon cancers. (DOCX)

Table S3 *E. coli* strains isolated from diverticulosis.
(DOCX)

Table S4 Primers used in this study.
(DOCX)

Table S5 Archetypal *E. coli* control strains used in this study.
(DOCX)

References

- Karsa LV, Lignini TA, Patnick J, Lambert R, Sauvaget C (2010) The dimensions of the CRC problem. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 24: 381–396.
- Kwak EL, Chung DC (2007) Hereditary colorectal cancer syndromes: an overview. *Clin Colorectal Cancer* 6: 340–344.
- Half E, Bercovich D, Rozen P (2009) Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 4: 1–23.
- Collins D, Hogan AM, Winter DC (2011) Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *Lancet Oncol* 12: 504–512.
- Swidsinski A, Khilkin M, Kerjaschki D, Schreiber S, Ortner M, et al. (1998) Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology* 115: 281–286.
- Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, et al. (2004) Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 127: 80–93.
- Bronowski C, Smith SL, Yokota K, Corkill JE, Martin HM, et al. (2008) A subset of mucosa-associated *Escherichia coli* isolates from patients with colon cancer, but not Crohn's disease, share pathogenicity islands with urinary pathogenic *E. coli*. *Microbiology* 154: 571–583. doi:10.1099/mic.0.2007/013086-0.
- Nougayrede JP, Taieb F, De Rycke J, Oswald E (2005) Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends Microbiol* 13: 103–110.
- Wu S, Morin PJ, Maouyo D, Sears CL (2003) *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology* 124: 392–400.
- Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, et al. (2009) A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med* 15: 1016–1022.
- Leser TD, Molbak L (2009) Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environ Microbiol* 11: 2194–2206.
- Chassaing B, Darfeuille-Michaud A (2011) The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140: 1720–1728.
- Croxen MA, Finlay BB (2009) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8: 26–38.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2: 123–140. doi:10.1038/nrmicro818.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66: 4555–4558.
- Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS (1990) Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172: 6175–6181.
- Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, et al. (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* 67: 546–553.
- Escobar-Páramo P, Sabbagh A, Darlu P, Pradillon O, Vaury C, et al. (2004) Decreasing the effects of horizontal gene transfer on bacterial phylogeny?: the *Escherichia coli* case study. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 243–250. doi:10.1016/S1055-7903(03)00181-7.
- Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard A-B, Bui H, Le Bouguéne C, et al. (2004) A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Molecular biology and evolution* 21: 1085–1094. doi:10.1093/molbev/msh118.
- Taieb F, Nougayrede JP, Watrin C, Samba-Louaka A, Oswald E (2006) *Escherichia coli* cyclomodulin Cif induces G2 arrest of the host cell cycle without activation of the DNA-damage checkpoint-signalling pathway. *Cell Microbiol* 8: 1910–1921.
- Jubelin G, Taieb F, Duda DM, Hsu Y, Samba-Louaka A, et al. (2010) Pathogenic bacteria target NEDD8-conjugated cullins to hijack host-cell signaling pathways. *PLoS Pathog* 6: e1001128.
- Nougayrede J-P, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuskiewicz E, et al. (2006) *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 313: 848–851. doi:10.1126/science.1127059.

Acknowledgments

We thank Eric Oswald, José Antonio Orden, Philippe Bidet for kindly providing us with the strains IHE3034AClBP and DH10β pBACpks, C48a and RS218 respectively. We thank Rolande Perroux and Marlène Jan for helpful technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RB DP ADM EB DD. Performed the experiments: DD EB PS JR JD. Analyzed the data: DD EB PS JR DP ADM RB. Contributed reagents/materials/analysis tools: DP RB ADM. Wrote the paper: DD EB ADM RB.

- Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, et al. (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.
- De Rycke J, Oswald E (2001) Cytolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation? *FEMS microbiology letters* 203: 141–148.
- Ge Z, Rogers AB, Feng Y, Lee A, Xu S, et al. (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 DB, Fox JG (2008) In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol* 10: 1599–1607.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19: 6823–6831.
- Wang G, Whittam TS, Berg CM, Berg DE (1993) RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic Acids Res* 21: 5930–5933.
- Bidet P, Metais A, Mahjoub-Messai F, Durand L, Dehem M, et al. (2007) Detection and identification by PCR of a highly virulent phylogenetic subgroup among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* B2 strains. *Appl Environ Microbiol* 73: 2373–2377.
- Dubois D, Delmas J, Cady A, Robin F, Sivignon A, et al. (2010) Cyclomodulins in uropneumonia strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 48: 2122–2129.
- Peres SY, Marches O, Daigle F, Nougayrede JP, Herault F, et al. (1997) A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol Microbiol* 24: 1095–1107.
- Boudeau J, Barnich N, Darfeuille-Michaud A (2001) Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol Microbiol* 39: 1272–1284.
- Sert V, Cans C, Tasca C, Bret-Bennis L, Oswald E, et al. (1999) The bacterial cytolethal distending toxin (CDT) triggers a G2 cell cycle checkpoint in mammalian cells without preliminary induction of DNA strand breaks. *Oncogene* 18: 6296–6304. doi:10.1038/sj.onc.1203007.
- Orden JA, Dominguez-Bernal G, Martinez-Pulgarin S, Blanco M, Blanco JE, et al. (2007) Necrotoxicogenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the eae and ehxA genes. *Int Microbiol* 10: 47–55.
- Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA, Nougayrede JP, Oswald E (2008) Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. *J Clin Microbiol* 46: 3906–3911.
- De Rycke J, Milon A, Oswald E (1999) Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Vet Res* 30: 221–233.
- Johnson TJ, DebRoy C, Belton S, Williams ML, Lawrence M, et al. (2010) Pyrosequencing of the Vir plasmid of necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 144: 100–109.
- Pandey M, Khan A, Das SC, Sarkar B, Kahali S, et al. (2003) Association of cytolethal distending toxin locus cdtB with enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with acute diarrhea in Calcutta, India. *J Clin Microbiol* 41: 5277–5281.
- Bielaszewska M, Fell M, Greune L, Prager R, Fruth A, et al. (2004) Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infect Immun* 72: 1812–1816.
- Orth D, Grif K, Khan AB, Naim A, Dierich MP, et al. (2007) The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. *Diagn Microbiol Infect Dis* 59: 235–242.
- Loukiadis E, Nobe R, Herold S, Tramuta C, Ogura Y, et al. (2008) Distribution, functional expression, and genetic organization of Cif, a phage-encoded type III-secreted effector from enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190: 275–285.
- Marchès O, Ledger TN, Boury M, Ohara M, Tu X, et al. (2003) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Molecular Microbiology* 50: 1553–1567. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03821.x.

43. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, et al. (2004) Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 127: 80–93. doi:10.1053/j.gastro.2004.03.054.
44. Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO (2007) High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* 56: 669–675.
45. Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantschke P, et al. (2007) CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* 117: 1566–1574.
46. Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, Darcha C, Chan CH, et al. (2009) Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med* 206: 2179–2189.
47. Scholzel S, Zimmermann W, Schwarzkopf G, Grunert F, Rogaczewski B, et al. (2000) Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *Am J Pathol* 156: 595–605.
48. Jantschke P, Terracciano L, Lowy A, Glatz-Krieger K, Grunert F, et al. (2003) Expression of CEACAM6 in resectable colorectal cancer: a factor of independent prognostic significance. *J Clin Oncol* 21: 3638–3646.
49. Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, et al. (2012) Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota. *Science* 338: 120–123.
50. Janelle AC, Tomkovich SE, Muehlbauer M, Ting-Jia F, Dogan B, et al. (2012) The *E. coli* Genotoxic Island Pks Promotes Colorectal Cancer (CRC) Without Impacting Intestinal Inflammation. *Gastroenterology* 142: S-639.
51. Lecuit M, Abachin E, Martin A, Poyart C, Pochart P, et al. (2004) Immunoproliferative small intestinal disease associated with *Campylobacter jejuni*. *N Engl J Med* 350: 239–248.
52. Nagamine CM, Sohn JJ, Rickman BH, Rogers AB, Fox JG, et al. (2008) *Helicobacter hepaticus* infection promotes colon tumorigenesis in the BALB/c-Rag2(-/-) Apc(Min/+) mouse. *Infect Immun* 76: 2758–2766.
53. Nagamine CM, Rogers AB, Fox JG, Schauer DB (2008) *Helicobacter hepaticus* promotes azoxymethane-initiated colon tumorigenesis in BALB/c-IL10-deficient mice. *Int J Cancer* 122: 832–838.
54. Fox JG, Feng Y, Theve EJ, Raczynski AR, Fiala JL, et al. (2010) Gut microbes define liver cancer risk in mice exposed to chemical and viral transgenic hepatocarcinogens. *Gut* 59: 88–97.
55. Lemonnier M, Landraud L, Lemichez E (2007) Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiol Rev* 31: 515–534.
56. Fiorentini C, Matarrese P, Straface E, Falzano L, Fabbri A, et al. (1998) Toxin-induced activation of Rho GTP-binding protein increases Bcl-2 expression and influences mitochondrial homeostasis. *Exp Cell Res* 242: 341–350.
57. Hopkins AM, Walsh SV, Verkade P, Boquet P, Nusrat A (2003) Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function. *J Cell Sci* 116: 725–742.
58. Malorni W, Fiorentini C (2006) Is the Rac GTPase-activating toxin CNF1 a smart hijacker of host cell fate? *Faseb J* 20: 606–609.
59. Maddocks OD, Short AJ, Donnenberg MS, Bader S, Harrison DJ (2009) Attaching and effacing *Escherichia coli* downregulate DNA mismatch repair protein in vitro and are associated with colorectal adenocarcinomas in humans. *PLoS One* 4: e5517.
60. Vogelmann R, Amieva MR (2007) The role of bacterial pathogens in cancer. *Curr Opin Microbiol* 10: 76–81.
61. Marchès O, Ledger TN, Boury M, Ohara M, Tu X, et al. (2003) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Molecular Microbiology* 50: 1553–1567. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03821.x.
62. Schauer DB, Zabel BA, Pedraza IF, O'Hara CM, Steigerwalt AG, et al. (1995) Genetic and biochemical characterization of *Citrobacter rodentium* sp. nov. *J Clin Microbiol* 33: 2064–2068.
63. Barthold SW, Jonas AM (1977) Morphogenesis of early 1, 2-dimethylhydrazine-induced lesions and latent period reduction of colon carcinogenesis in mice by a variant of *Citrobacter freundii*. *Cancer Res* 37: 4352–4360.
64. Newman JV, Kosaka T, Sheppard BJ, Fox JG, Schauer DB (2001) Bacterial infection promotes colon tumorigenesis in Apc(Min/+) mice. *J Infect Dis* 184: 227–230.
65. Bleday R, Braidt J, Ruoff K, Shellito PC, Ackroyd FW (1993) Quantitative cultures of the mucosal-associated bacteria in the mechanically prepared colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 36: 844–849.
66. Poxton IR, Brown R, Sawyerr A, Ferguson A (1997) The mucosal anaerobic gram-negative bacteria of the human colon. *Clin Infect Dis* 25 Suppl 2: S111–113.
67. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, et al. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308: 1635–1638. doi:10.1126/science.1110591.
68. Green GL, Brostoff J, Hudspeth B, Michael M, Mylonaki M, et al. (2006) Molecular characterization of the bacteria adherent to human colorectal mucosa. *J Appl Microbiol* 100: 460–469. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02783.x.
69. Gervaz P, Cerottini JP, Bouzourene H, Hahnloser D, Doan CL, et al. (2002) Comparison of microsatellite instability and chromosomal instability in predicting survival of patients with T3N0 colorectal cancer. *Surgery* 131: 190–197.
70. Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventré A, et al. (2001) Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* 147: 1671–1676.
71. Zhang L, Foxman B, Marrs C (2002) Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *J Clin Microbiol* 40: 3951–3955.
72. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T (2001) Human DNA repair genes. *Science* 291: 1284–1289.
73. An Y, Jin G, Wang H, Wang Y, Liu H, et al. (2008) Polymorphisms in hMLH1 and risk of early-onset lung cancer in a southeast Chinese population. *Lung Cancer* 59: 164–170.
74. Hirata H, Hinoda Y, Kawamoto K, Kikuno N, Suehiro Y, et al. (2008) Mismatch repair gene MSH3 polymorphism is associated with the risk of sporadic prostate cancer. *J Urol* 179: 2020–2024.
75. Koessler T, Oestergaard MZ, Song H, Tyrer J, Perkins B, et al. (2008) Common variants in mismatch repair genes and risk of colorectal cancer. *Gut* 57: 1097–1101.

Annexe 2

Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer.

Jennifer raisch, Arlette Darfeuille-Michaud, Nguyen Hang.

World Journal of Gastroenterology, Mai 2013.

Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer

Jennifer Raisch, Arlette Darfeuille-Michaud, Hang Thi Thu Nguyen

Jennifer Raisch, Arlette Darfeuille-Michaud, Hang Thi Thu Nguyen, M2iSH, UMR 1071 Inserm, University of Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France

Jennifer Raisch, Arlette Darfeuille-Michaud, Hang Thi Thu Nguyen, INRA USC 2018, 63000 Clermont-Ferrand, France

Arlette Darfeuille-Michaud, Centre Hospitalier Universitaire, 63000 Clermont-Ferrand, France

Author contributions: Raisch J and Nguyen HTT wrote the paper; Darfeuille-Michaud A supervised the manuscript.

Supported by The Ministère de la Recherche et de la Technologie (JE2526, France), Inserm and University of Auvergne (UMR1071), INRA (USC-2018); Grants from the Association François Aupetit (AFA to Arlette Darfeuille-Michaud), and the European Union FP7 People Marie Curie International Incoming Fellowship (IIF to Hang Nguyen)

Correspondence to: Hang Thi Thu Nguyen, PhD, Assistant Professor, M2iSH, UMR 1071 Inserm, University of Auvergne, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France. hang.nguyen@udamail.fr

Telephone: +33-4-73178372 Fax: +33-4-73178371

Received: January 24, 2013 Revised: March 29, 2013

Accepted: April 10, 2013

Published online: May 28, 2013

Key words: MicroRNAs; Immune response; Inflammation; Inflammatory bowel disease; Colorectal cancer

Core tip: MicroRNAs (miRNAs), a key class of gene expression regulators, have emerged as crucial players in various biological processes such as cellular proliferation and differentiation, development and apoptosis. A better understanding of the function of miRNAs is providing new insights into the molecular basis of human pathologies, and new biomarkers for disease diagnosis and therapy.

Raisch J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HTT. Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World J Gastroenterol* 2013; 19(20): 2985-2996 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v19/i20/2985.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v19.i20.2985>

Abstract

MicroRNAs, a key class of gene expression regulators, have emerged as crucial players in various biological processes such as cellular proliferation and differentiation, development and apoptosis. In addition, microRNAs are coming to light as crucial regulators of innate and adaptive immune responses, and their abnormal expression and/or function in the immune system have been linked to multiple human diseases including inflammatory disorders, such as inflammatory bowel disease, and cancers. In this review, we discuss our current understanding of microRNAs with a focus on their role and mode of action in regulating the immune system during inflammation and carcinogenesis.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs, miR) are small (approximately 20-22 nucleotides), non-coding RNAs that post-transcriptionally regulate gene expression by binding to the 3'-untranslated region of target mRNAs, leading to mRNA degradation or translational inhibition^[1].

Since the identification of the first miRNA, *lin-4*, in *Caenorabditis elegans* in 1993^[2,3], thousands of miRNA genes have been identified in animal and plant genomes^[4]. As a class, miRNAs account for about 1%-2% of genes in worms, flies, and mammals^[5]. Each miRNA can target hundreds of mRNAs within a given cell type, and a single mRNA is often the target of multiple miRNAs, and thus over half of the human transcriptome is predicted to be under miRNA regulation, embedding this post-transcriptional control pathway within nearly every biological process^[5].

Given its fundamental biological roles, it is not sur-

prising that miRNA expression is tightly controlled and that its deregulation can lead to various diseases. In this review, we summarize our current knowledge about the physiological role of miRNAs in mammalian biology and the manner in which miRNA activities contribute to diseases including inflammatory disorders and cancer.

MIRNA BIOSYNTHESIS AND REGULATION

Biosynthesis

Our knowledge of miRNA biogenesis and regulation has been greatly expanded in recent years^[1]. The canonical miRNA biogenesis takes place in a multi-step process and involves two RNase III endonucleases, Dicer and Drosha. MiRNAs are encoded by genomic DNA and are most commonly transcribed by RNA polymerase II, which generates a primary miRNA (pri-miRNA) transcript. Within the primary transcripts, miRNAs form stem-loop structures, which contain the mature miRNA as part of an imperfectly paired double-stranded stem connected by a short terminal loop. Pri-miRNAs are then processed by a microprocessor complex, a multiprotein complex with the two core components, Drosha and Di George Syndrome critical region 8 (DGCR8)^[6-8]. This results in the formation of a hairpin-shaped RNA molecule of 70-100 bp called miRNA precursor or pre-miRNA, which is then exported into the cytoplasm in a process involving the nucleocytoplasmic shuttle Exportin-5 and in a Ran-GTP-dependent manner^[9-11]. In cytoplasm, the pre-miRNA hairpin is cleaved by the endonuclease DICER into an imperfect miRNA:miRNA* duplex of 21-23 nucleotides in length^[12]. After separation of the two strands of the duplex, one of the strands (the mature miRNA) is transferred into an Argonaute (Ago) protein located in the RNA-induced silencing complex (RISC or miRISC), which is involved in the repression of gene expression by leading miRNAs to specific target mRNAs, whereas the other strand (the star-strand) is degraded. It has been shown that strand selection and RISC assembly in mammals are accomplished by a complex that contains Dicer, Ago and the double-stranded RNA binding protein TRBP^[13-15]. MiRNAs target mRNAs by interacting with sites of imperfect complementarity. Short “seed” sequences at the 5'-ends of miRNAs (nucleotides 2-8) are critical, and in some cases fully sufficient, for target selection^[16,17].

Regulation

Although there have been recent advances in our knowledge of the biogenesis of the miRNA pathway, relatively little is known about the mechanisms regulating the activity of the pathway's components. Several recent studies indicate that the regulation of miRNA expression and function occurs at three levels: transcription, processing and subcellular localization^[17,18].

The first, and one of the most important, mechanisms controlling miRNA abundance is the regulation of pri-

miRNA transcription, which could be positively or negatively regulated by different factors such as transcription factors, enhancers, silencers and epigenetic modification in miRNA promoters^[16]. For example, the oncogene c-myc can bind to the promoter of the miR-17-5p cluster, thereby up-regulating expression of the miRNAs encoded by the cluster^[19,20]. Similarly, the tumour suppressor p53 has been shown to upregulate the transcription of miR-34 family members, inhibiting important factors of cell proliferation and survival, such as Bcl2 and Cdk4 and 6^[21-24]. A region of miRNA genes is located within CpG islands involving the epigenetic control of miRNA transcription. It is estimated from recent works that 5%-10% of mammalian miRNAs are epigenetically regulated^[19,25-27].

Several post-transcriptional regulatory mechanisms that affect miRNA processing at different stages, from the pri-miRNA transcripts to the delivery of mature miRNAs to their target mRNAs, have recently been investigated^[18]. For example, p53 can form a complex with Drosha, which increases the processing of pri-miRNAs to pre-miRNAs^[28]. Histone deacetylase I can enhance pri-miRNA processing by deacetylating the protein DGCR8 of the microprocessor complex^[29]. Cytokines such as interferons have been shown to inhibit Dicer expression, decreasing the processing of pre-miRNAs^[30].

MICRORNAS AND IMMUNE SYSTEM

The immune system has evolved to maintain self-tolerance and to recognize efficiently specific pathogens. The innate immune system acts as a first protector providing an immediate response to pathogens, and propagation of the innate response activates the adaptive immune system. Both innate and adaptive immune responses are highly regulated, and recent studies have shed light on the role of miRNAs in this intricate system^[31,32]. The role of miRNAs in immune responses will be discussed in this section.

MicroRNAs and innate immune response

The innate immune system is activated *via* recognition of pathogen-associated molecular patterns by toll-like receptors (TLRs)^[33], which will recruit adaptor proteins to the receptor, followed by activation of downstream signalling pathways such as the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) pathway^[34]. This signal transduction ultimately leads to induction of immune gene expression.

The first study examining the effect of lipopolysaccharide (LPS)-mediated activation of TLR signalling on miRNA production identified miR-155, miR-146a and miR-132, which are induced in human macrophages by LPS^[35]. Further analysis showed that miR-155 is induced by LPS, cytokine IFN- β and various TLR ligands in murine macrophages^[36,37]. MiR-155, once induced, is involved in the activation of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6), enzyme linked immunosorbent assay pathway *via* targeting the Fas-associated

death domain protein, I B kinase ϵ , and receptor (TNF receptor superfamily)-interacting serine-threonine kinase 1^[37]. MiR-155 plays a role in the innate immune response by regulating suppressor of cytokine signalling (SOCS)-1, a negative regulator of dendritic cell antigen-presenting capacity^[37-39]. Likewise, miR-155-deficient dendritic cells exhibit impaired antigen presentation and therefore are unable to activate T cells to promote inflammation^[39]. One study demonstrated that in human myeloid-derived DCs, knockdown of miR-155 expression significantly increased protein expression of the pro-inflammatory cytokine IL-1^[40]. The same study also showed that miR-155 directly inhibited expression of the pro-inflammatory signalling protein TAK1-binding protein 2 (TAB2, also known as MAP3K7IP2), which could be a mechanism underlying its anti-inflammatory property^[40]. In contrast, other studies have shown that miR-155 can enhance inflammatory responses. Overexpression of miR-155 in mouse bone marrow leads to a myeloproliferative phenotype that is similar to that observed transiently after LPS stimulation^[41]. MiR-155 can negatively regulate SHIP1, an important negative regulator of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and the downstream AKT pathway^[42,43]. SHIP1, which is similar to SOCS1, is a negative regulator of TLR4 signaling^[44], and hence repression of SHIP1 by miR-155 may counter this negative regulation and increase downstream AKT signalling.

Like miR-155, miR-146a is induced by LPS, TNF- α and IL-1 β in a NF- κ B-dependent manner. MiR-146a in turn inhibits expression of two components of the TLR4 signaling pathway, IL-1 receptor associated kinase and TNF receptor-associated factor-6^[35]. Thus, miR-146a functions as a negative feedback regulator of the TLR/NF- κ B pathway. MiR-155 and miR-146 expression is increased in macrophages in response to LPS stimulation, while miR-125b expression is decreased. MiR-125b can target TNF- α mRNA, and a decrease in its expression leads to elevated TNF- α production and consequently increased inflammatory response^[37].

Macrophage inflammatory response to infection involves the upregulation of several miRNAs, such as miR-21, miR-9 and miR-147^[45-47]. These miRNAs can also be induced by TLR signaling, and can negatively regulate activation of inflammatory pathways in myeloid cells. MiR-9 represses NF- κ B subunit 1 (NFKB1/p50 unit) and helps to maintain a constant level of NF- κ B1 protein expression during TLR4-mediated activation of monocytes and neutrophils^[46]. MiR-147 has been shown to attenuate TLR2, TLR3 and TLR4-mediated production of inflammatory proteins such as TNF- α and IL-6^[47]. Induction of miR-21 inhibits PDCD4, an IL-10 inhibitor, thereby derepressing IL-10. IL-10 in turn inhibits miR-155, allowing SHIP1 to be derepressed and inhibit TLR signaling^[45,48]. Hence, immune responses are highly regulated by TLRs-mediated upregulation of different miRNAs.

In addition to miRNA induction by TLR signaling, recent studies have also reported inflammatory repres-

sion, such as miR-155 repression, in response to anti-inflammatory cytokine IL-10^[49].

MicroRNAs and adaptive immune response

In addition to their role in regulating the innate immune system, miRNAs have been implicated in adaptive immunity by controlling the development and activation of T and B cells.

T cells

Specific miRNA expression profiles have been reported in different T cell subsets and stages of development^[50-52], suggesting that miRNA-mediated regulation of signalling networks in T cells, and probably other immune cells, is dynamic and highly regulated. Interestingly, miRNA profiling in naive, effector and memory CD8⁺ T cells has revealed that a few highly expressed miRNAs are dynamically regulated during antigen-specific T-cell differentiation^[52]. Mice exhibiting T-cell specific deletion of Dicer had lower numbers of mature T cells with abnormally developed T-cell subsets than wild-type mice, indicating that miRNAs are required for T cell development^[53,54]. Two specific miRNAs have been implicated in T cell development, and probably account for some of the phenotype of Dicer-deficient T cells. The miR-17-92 cluster suppresses expression of pro-apoptotic proteins, including BCL-2-interacting mediators of cell death (BIM or BCL2L11) and phosphatase and tensin homologue. This miRNA cluster is thought to increase T cell survival during development and is expressed during the double negative 2 stage of thymopoiesis^[55].

The role of miRNAs in the differentiation of T cells into distinct effector T helper cell subsets has been recently reported. It was demonstrated that miR-326 regulates differentiation of TH17 cells both *in vitro* and *in vivo*^[56]. MiR-155 is implicated in regulatory T (T_{reg}) cell formation and function, since forkhead box P3 (FOXP3), a transcription factor that is required for the development and function of T_{reg} cells, may directly regulate the expression of this miRNA^[57]. Furthermore, miRNA-155-deficient mice are immunodeficient, indicating the implication of miR-155 in homeostasis and the immune system^[39]. Similarly, using genetic deletion and transgenic approaches, Thai and colleagues showed the important role of miR-155 in the mammalian immune system, specifically in regulating T helper cell differentiation and the germinal center reaction to produce an optimal T cell-dependent antibody response^[58]. Certain miRNAs, such as the miR-17-92 cluster, might be involved in the development and function of T follicular helper cells (specialized T cells that provide selective signals to supporting germinal center B cells), which are essential for long-lived antibody responses^[59,60]. In addition, miR-181a, which is increased during early T cell development and down-regulated in mature CD4 T cells such as Th1 and Th2 effector cells, can enhance TCR signaling strength by inhibiting multiple phosphatases that negatively regulate the TCR signaling cascade^[61]. Finally, conditional deletion

of *Dicer* or *Drosha* in T_{reg} cells led to lethal autoimmune inflammatory disease, accompanied by impaired development or function of T_{reg} cells, indicating the role of miRNAs in T_{reg} cell biology^[62-64].

B cells

Distinct miRNA profiles in naive, germinal central and post-germinal central B cells have been reported^[65-67], suggesting the implication of miRNAs in B cell development and maturation. A pioneer study showed that miR-181 is highly expressed in B cells of mouse bone marrow, and its ectopic expression in hematopoietic stem and progenitor cells resulted in an increase in the percentage of B-lineage cells but not in T cells or myeloid cells^[68], indicating the role of lineage-specific miRNAs in regulating lymphocyte development. Conditional deletion of *Dicer* in B cells completely arrested B cell development in mice, which is thought to be due to dysregulated expression of the pro-apoptotic protein BIM, probably during the selection of effective antigen receptors^[69]. Notably, B cells lacking miR-17-92 family and *Dicer*-deficient B cells exhibited similar gene expression profiles^[70], suggesting that this miRNA cluster could play a determining role in the regulation of B cell development.

Recent studies have explored the role of miR-150, a miRNA specifically expressed by mature lymphocytes, in B cell differentiation^[51,71,72]. MiR-150 expression increases during B-cell maturation in bone marrow, and its constitutive expression blocked B cell development at the transition from the pro-B-cell to pre-B-cell developmental stage, leading to severe defects in the production of mature B cells^[71]. MiR-150-deficient mice exhibited a 2-fold increase in splenic B-1 cell numbers, with a relative decrease in those of B-2 cells, but had no apparent defect in the development of other lymphoid-derived T- and B-cell types^[72]. Mice expressing a miR-150 transgene early in life also had dramatically impaired B cell development with normal T cell levels. These defects in miR-150 gain- and loss-of-function were further shown to be due to dysregulation of c-Myb, a target of miR-150 and a transcription factor that controls multiple steps of lymphocyte development^[72]. MiR-155-deficient B cells showed defects in antibody class switching and differentiation into plasma cells, resulting in an impaired humoral response to T cell-dependent antigenic stimulation^[39,58,73]. The constitutive expression of miR-34a blocked B cell development at the pro-B to pre-B cell transition, leading to a reduction in mature B cells^[74]. This block appeared to be mediated by miR-34a-inhibited expression of the transcription factor Foxp1^[74], which is an essential regulator of B cell development^[75]. Together, these studies show the important role of miRNAs in normal B cell development.

MICRORNAS AND INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

As miRNAs play a critical role in the regulation of the immune system, failure of miRNA regulation is associ-

Table 1 MicroRNAs dysregulated in ulcerative colitis and/or Crohn's disease

	Up-regulated	Down-regulated	Source, reference
UC vs healthy	miR-16, miR-21, miR-23a, miR-24, miR-29a, miR-126, miR-195, let-7f, miR-21, miR-155	miR-192, miR-375, miR-422b	Sigmoid colon ^[77]
	miR-21, miR-155		Colon ^[78]
	miR-7, miR-31, miR-135b, miR-223, miR-29a, miR-29b, miR-126*, miR-127-3p, miR324-3p	miR-188-5p, miR-25, miR-320a, miR-346	Colonic mucosa ^[79]
	(miR-196a, miR-29a, miR-29b, miR-126*, miR-127-3p, miR324-3p) ¹	(miR-188-5p, miR-25, miR-320a, miR-346) ²	
CD vs healthy	miR-28-5p, miR-151-5p, miR-199a-5p, miR-340*, miRplus-E1271, miR-103-2*, miR-362-3p, miR-532-3p	miR-505*	Peripheral blood ^[80]
	miR-9, miR-126, miR-130a, miR-181c, miR-375, miR-26a, miR-29b, miR-30b, miR-34c-5p, miR-126*, miR127-3p, miR-133b, miR-155, miR324-3p, miR-21, miR-22, miR-29c, miR-31, miR-106a, miR-146a, miR146b-3p, miR-150		Colonic mucosa ^[79]
	(miR-9*, miR-30a*, miR-30c, miR-223 miR-25a, miR-29b, miR-30b, miR-34c-5p, miR-126*, miR127-3p, miR-133b, miR-155, miR-196a, miR324-3p, miR-21, miR-22, miR-29c, miR-31, miR-106a, miR-146a, miR146b-3p, miR-150) ¹		
	miR-199p-5a, miR-362-3p, miR-340*, miR-532-3p, miRplus-E1271	miR-149*, miRplus-F1065	Peripheral blood ^[80]
UC vs CD		(miR-150, miR-196b, miR-199a-3p, miR-199b-5p, miR-223, miR-320a) ²	Colonic mucosa ^[79]
	miR-28-5p, miR-103-2*, miR-149*, miR-151-5p, miR-340*, miR-532-3p, miRplus-E1153	miR-505*	Peripheral blood ^[80]

¹miRNAs upregulated specifically in non-inflamed colonic mucosa; ²miRNAs downregulated specifically in non-inflamed tissue colonic mucosa. UC: Ulcerative colitis; CD: Crohn's disease.

ated with several human disorders such as inflammatory bowel disease (IBD) (Table 1), which is a chronic inflammatory gastrointestinal disorder. Although the etiology of IBD remains largely unknown, extensive studies in the last decades have suggested that it involves environmental and genetic factors that lead to dysfunction of the epithelial barrier with consequent deregulation of the mucosal immune system and responses to gut microbiota^[76].

Distinguished miRNA expression profiles have been recently described in tissues of patients with active and inactive UC, CD, irritable bowel syndrome (IBS), infectious colitis (IC), and microscopic colitis (MC)^[77]. Wu and colleagues demonstrated that active UC was associated

with the differential expression of 11 miRNAs (3 significantly decreased and 8 significantly increased in UC tissues). MiR-192, the expression of which is decreased in active UC, was predominantly localized to colonic epithelial cells, and targeted macrophage inflammatory peptide (MIP)-2 α , a chemokine expressed by epithelial cells^[77]. In colonic epithelial cells, TNF- α -induced MIP-2 α expression was inhibited by a miR-192 mimic. In contrast, miR-21 is significantly increased in patients with active UC compared to healthy subjects. In inactive UC patients, miR-375 and miR-422 expression was increased, while that of miR-192 was unaltered compared to healthy subjects^[77]. Inactive UC showed similar expression levels of miR-375, miR-422b, and miR-23a to IBS and IC tissues. The miRNAs differently expressed in active UC were not dysregulated in MC and CD. This study highlights the specific miRNA expression patterns in active and inactive IBD tissues, and suggests that miRNAs could regulate expression of proteins implicated in the pathogenesis.

Another study showed the upregulated expression of several miRNAs in active UC compared to healthy colonic biopsies, suggesting that upregulation of miRNAs may be responsible for the development of intestinal inflammation in UC^[78]. MiR-21 was found among the upregulated miRNAs, which is consistent with the findings of Takagi *et al.*^[78].

Of interest, Fasseu and colleagues identified restricted subsets of miRNAs abnormally expressed in inactive colonic mucosa of IBD patients^[79]. This elegant study identified 14 (in UC) and 23 (in CD) miRNAs with significantly altered expression (> 5 -fold increase or < 0.05 -fold decrease) in quiescent colonic mucosa compared to healthy control tissues. Eight of the miRNAs (miR-26a, -29a, -29b, -30c, -126*, -127-3p, -196a, -324-3p) were commonly dysregulated in non-inflamed UC and CD. Six miRNAs (miR-196b, -199a-3p, -199b-5p, -320a, -150, -223) displayed significantly distinct dysregulation of expression between non-inflamed UC and CD colonic biopsies. Interestingly, several miRNA genes with dysregulated expression mapped within acknowledged IBD-susceptibility loci. In addition, significant dysregulated expression of four and five miRNAs specific to inflamed UC or CD tissues, respectively, compared to healthy controls was observed^[79]. This study sheds light on the role of miRNAs as contributors to IBD susceptibility, in particular their implication in the onset and/or relapse of inflammation from quiescent mucosa of IBD patients.

There have been recent reports of differential miRNA expression profiles in the peripheral blood of IBD patients^[80]. Four miRNAs (miR-199a5p, -362-3p, -532-3p and miRplus-E1271) were upregulated and one miRNA (miRplus-F1065) was downregulated in the peripheral blood of patients with active CD, but not inactive CD, compared to healthy controls^[80]. Both active and inactive CD patients had increased expression of miR-340 and decreased expression of miR-149 in the blood. Expression of three miRNAs (miR-103-2, 262-3p, 532-3p) was increased in the blood of both active and inactive UC

patients. In addition, a subset of 11 miRNAs can distinguish active CD from active UC^[80]. This study importantly supports the evidence that distinct peripheral blood miRNA profiles in different circulating immune cell types are associated with IBD.

Efforts have been made to understand the mechanisms underlying the implication of miRNAs in the pathogenesis of IBD. The potential association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in pre-miRNA coding regions and IBD susceptibility has been analyzed. A study in a Japanese cohort of 170 UC patients and 403 healthy controls revealed the association of three SNPs (rs11614913, rs2910164, and rs3746444) in coding regions of pre-miR-196a2, pre-miR-146a and pre-miR-499^[81]. Of particular interest, the CD-associated SNP C313T in immunity-related GTPase family, M (*IRGM*) gene caused a loss in binding of miR-196^[82] (Figure 1). *IRGM* plays an important role in the immune system by its involvement in the autophagy process. In addition, miR-196 is overexpressed in the inflamed epithelium of CD patients and downregulates the *IRGM* protective variant (c.313C) but not the risk-associated allele (c.313T)^[82]. Loss of tight regulation of *IRGM* expression by miR-196 resulted in defects in autophagy-mediated control of intracellular replication of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC), leading to abnormal persistence of AIEC in host cells (Figure 1). This suggests that the association of *IRGM* with CD could arise from abnormal miRNA-mediated *IRGM* regulation, which affects the efficacy of autophagy, thereby contributing a synonymous polymorphism as a likely causal variant.

Intestinal microbiota is increasingly recognized as a risk for, and a causal factor of, IBD. Our recent studies showed that miRNAs are involved in the regulation of host gene expression by gut microbiota^[83]. In another study, we showed that miRNAs play a role in determining the unique physiological characteristics of intestinal epithelial cells, such as their differentiation during migration along the crypt/villus axis^[84]. In particular, expression of CD98, a transmembrane glycoprotein that regulates integrin signalling, cellular homeostasis and innate immune response in the gut^[85], and its function are directly under the control of miRNAs during the differentiation of intestinal epithelial cells^[86]. MiRNAs could also be involved in the upregulation of CD98 during intestinal inflammation and IBD^[86]. The biological importance of miRNAs in the pathogenesis of IBD is becoming clearer, and targeting miRNAs in the gastrointestinal tract may be a promising approach for future therapeutic opportunities.

MICRORNAS AND COLORECTAL CANCERS

The transformation of a normal epithelium into a cancerous state involves modifications in several genes that are involved in different stages of carcinogenesis such as apoptosis, proliferation, limitless replicative potential of tumor cells, angiogenesis, migration and invasion^[87].

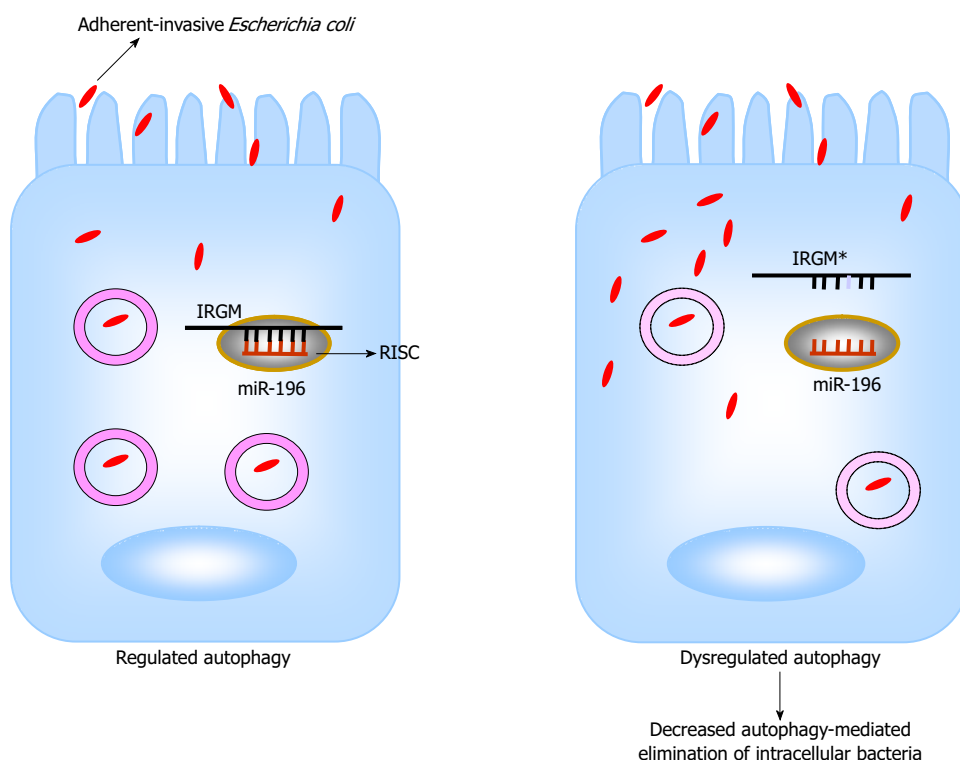


Figure 1 Hypothetical model for the involvement of miR-196 in the pathogenesis of Crohn's disease. MicroRNAs (miRNAs, miR) 196 normally targets immunity-related GTPase family, M (IRGM) mRNA within RNA-induced silencing complex (RISC) for a negative regulation (left panel). The IRGM risk allele (IRGM*) mRNA lacks the binding site for miR-196 and therefore is not regulated by this miRNA (right panel). During Crohn's disease, loss of tight regulation of IRGM* expression by miR-196 may lead to defects in autophagy with most intracellular bacteria replication occurring in dysfunctional vacuoles^[82] (dotted cycle). This consequently results in abnormal persistence of pathogens in host cells, which could further worsen disease status^[82].

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers worldwide. Its incidence is greater in industrial countries than in developing countries^[88]. MiRNAs have been shown to play an important role in oncogenesis by regulating the expression of genes involved in cancer initiation, promotion and development^[89]. Hundreds of miRNAs mapped to the human genome regions that are known to be altered in cancer, and a similar number of miRNAs are aberrantly expressed in cancerous tissues^[90,91]. By analyzing miRNA expression profile (miRNome) of prostate, stomach, pancreas, lung, breast and colon tumors, Volinia and colleagues identified a solid cancer miRNA signature including those with well-characterized cancer association, such as miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-92, miR-106a, and miR-155^[92]. In particular, 21 miRNAs are up-regulated and 1 is down-regulated in colon tumors compared to normal tissue^[92]. MiRNA profiles can identify different tissue and tumor types better than mRNA expression patterns, making them attractive targets for development as cancer biomarkers^[93]. Distinguished miRNA profiles can even be found in the serum of patients with cancers. The functions of such circulating miRNAs have not been identified, but profiling of serum miRNAs might be a powerful approach for early cancer diagnosis. The cancer-associated miRNAs may function as oncogenes or tumor suppressors depending on their role in carcinogenesis. Some of the best examples of such miRNAs will be discussed in this section

(Figure 2).

Oncogenic miRNAs

MiR-21 is one of the most up-regulated miRNAs in various cancers, including CRC^[92,94], and was identified as an independent predictor of overall survival in the validation set containing tumor samples from 113 patients with CRC^[95]. It has been shown that miR-21 is involved in invasion, intravasation and metastasis processes by targeting the tumor suppressor PDCD4^[96], and in CRC tissues expression of miR-21 is inversely correlated with that of PDCD4 compared to normal tissue^[97]. Shibuya and colleagues suggested that miR-21 expression may predict poor prognosis in CRC^[98]. Likewise, these authors also examined the prognostic value of miR-155 in CRC since its expression is up-regulated in tumor tissues compared to normal adjacent tissues from CRC patients^[98]. MiR-155 was previously shown to target the tumor protein 53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1), a pro-apoptotic stress-induced p53 target, and significant reduction or loss of TP53INP1 expression was detected during adenocarcinoma progression^[99].

MiR-17-92 and miR-106b-25 clusters are known to be up-regulated in CRC stromal tissues compared with normal stroma^[100]. They include, respectively, multiple mature miRNAs, miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b1, miR-92-1^[101], and miR-106b, miR-93 and miR-25^[102]. These miRNA clusters play an important role

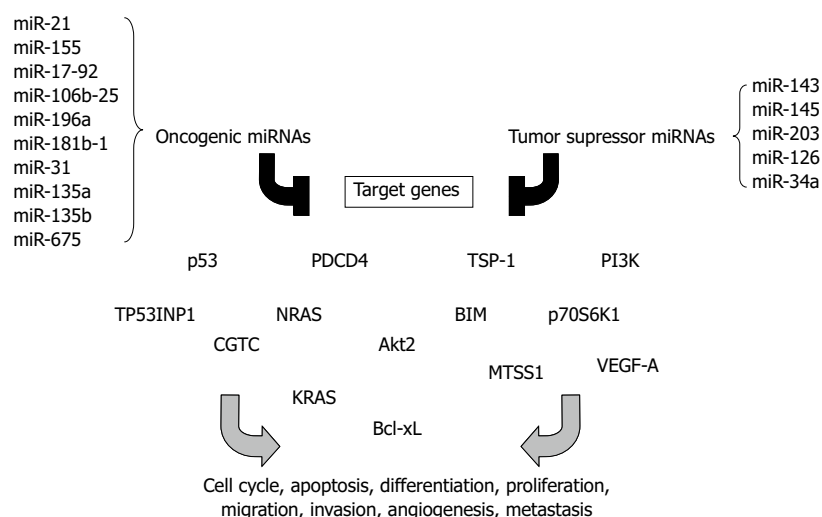


Figure 2 Overview of “oncogenic” and “tumor suppressor” microRNAs related to colorectal cancer described in this review, their targets and different carcinogenesis pathways in which they have been implicated.

during carcinogenesis^[92,100,103,104]. An anti-apoptotic effect of miR-17-92 appears to be one of the mechanisms underlying its procarcinogenic role in CRC development and progression^[105]. Abrogation of miR-92a leads to cell apoptosis, and there is a correlation between the miR-17-92 overexpression in tumors of CRC patients and the downregulated expression of BIM, a member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis^[105]. Some works have reported that there is an interconnection between the expression of miR-17-92 cluster and angiogenesis, which occurs later in tumor development and is one of the most important stages in carcinogenesis. Dews and colleagues demonstrated that the anti-angiogenic factors thrombospondin-1 (tsp-1) and connective tissue growth factor (CTGC) are down-regulated by this cluster in intestinal epithelial cells expressing constitutively the oncogene c-myc^[106], which was shown to be involved in regulation of miR-17-92 expression^[20]. MiR-18 targets tsp-1 and miR-19 modulates the expression of CTGF^[107].

Other miRNAs have also been identified as causal factors in colon carcinogenesis. For example, miR-196a had higher expression level in CRC tissues than in normal epithelial tissues^[108]. MiR-196a exerts a pro-oncogenic influence in CRC as a high level of its expression promotes the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells such as increased cell detachment, migration and invasion^[109]. MiR-31 is often up-regulated in CRC and its high expression associated with advanced tumor stage but the clinical significance is unclear^[110]. MiR-181b-1, miR-135a, miR-135b, miR-675 are also known to be up-regulated in CRC tumors^[111]. MiR-135a is able to promote the growth and invasion of CRC cells by targeting the metastasis suppressor 1^[112].

Tumor suppressor miRNAs

Mir-143 and miR-145 are among the best examples of tumor suppressor miRNAs. The expression of these miRNAs is down-regulated in CRC tumors, and in other

cancers such as breast, prostate, cervical and lymphoid cancer^[113-115]. Many studies have reported that down-regulation of miR-143 and miR-145 correlates with poor prognosis^[110,115,116]. The expression and post-transcriptional maturation of these miRNAs were recently shown to be enhanced by the tumor suppressor p53 in response to DNA damages in CRC cell lines^[28,117]. In particular, miR-143 is involved in inhibition of oncogene KRAS expression^[118]. MiR-145 is reported to inhibit tumor growth and angiogenesis by directly targeting p70S6K1^[117], which is activated by mTOR, and its overexpression in cancer cells induces tumor angiogenesis^[119-121]. Another study reported that this miRNA is able to inhibit tumor growth and angiogenesis in breast cancer by targeting N-RAS and VEGF-A, which are key players in carcinogenesis^[122].

It was recently demonstrated that miR-34a is down-regulated in colon tumors and also in circulating blood^[123]. Furthermore, ectopic expression of miR-34a in CRC cell line reduces cell proliferation, demonstrating that this miRNA has a tumor suppressive function in colon carcinogenesis^[124]. Several studies conducted in 2007 revealed that miR-34a can target p53, leading to apoptosis and cell cycle arrest^[21-24,125]. MiR-203 is identified as another tumor suppressor miRNA. Its low expression was found *in vitro* in CRC cell lines and was correlated with tumor size in CRC. MiR-203 can inhibit proliferation of cancer cell lines^[126]. Li *et al.*^[127] showed that miR-203 overexpression significantly decreased cell proliferation and survival and induced cell apoptosis in the p53-mutated CRC cells. The tumor suppressive role of miR-203 was mediated by negatively regulating Akt2 expression *via* mRNA degradation. In addition, overexpression of miR-203 decreased expression of the anti-apoptotic gene Bcl-xL, leading to a resistance to apoptosis^[127]. MiR-126 is specifically expressed in endothelial cells and is known to be down-regulated in CRC compared to normal tissue *via* an unknown mechanism^[128]. *In vitro* studies suggested that a loss in negative regulation of p85 subunit of PI3K

by miR-126 could lead to a selective growth advantage during colon carcinogenesis^[129].

CONCLUSION

MiRNAs are a class of gene regulators that have recently emerged as key players in the innate and adaptive immune system. Changes in miRNA expression are observed in many human diseases such as inflammatory bowel disease and cancers. Dysregulated miRNA expression profiles in IBD have been reported and could be used as diagnostic biomarkers but further studies are needed to examine the mechanism of their action in the etiopathogenesis of this disease and their clinical utility. Emerging evidence suggests that miRNAs play important roles in the pathogenesis of a limited range of human cancers. Some miRNAs may be directly involved in cancer development by controlling cell differentiation and apoptosis, while others may be involved in cancers by targeting cancer oncogenes and/or tumor suppressors. Given the critical role of miRNAs, current studies are focusing on their association with CRC incidence and prognosis and on the possibility of using circulating miRNAs or fecal miRNA expression as noninvasive early detection biomarkers. These data suggest that miRNAs may be potential molecular classifiers, early detection biomarkers, and therapeutic targets for CRC. Finally, miRNA-based cancer therapy has been limited to targeting a single miRNA^[130,131]. However, it has been recently shown that the small molecule enoxacin, a fluoroquinolone used as an antibacterial compound, enhances the miRNA-processing machinery by binding to TRBP^[132]. Thus, if most cancers are characterized by a dysregulation of global mature miRNA expression, restoration of the global miRNome may be an attractive approach in cancer therapy. In conclusion, a better understanding of the function of miRNAs is providing new insights into the molecular basis of human pathologies, and new biomarkers for disease diagnosis and therapy.

REFERENCES

- 1 Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 228-234 [PMID: 19255566 DOI: 10.1038/ncb0309-228]
- 2 Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993; **75**: 855-862 [PMID: 8252622 DOI: 10.1016/0092-8674(93)90530-4]
- 3 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993; **75**: 843-854 [PMID: 8252621 DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y]
- 4 Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**: D152-D157 [PMID: 21037258 DOI: 10.1093/nar/gkq1027]
- 5 Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; **136**: 215-233 [PMID: 19167326 DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.002]
- 6 Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; **425**: 415-419 [PMID: 14508493 DOI: 10.1038/nature01957]
- 7 Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004; **432**: 235-240 [PMID: 15531877 DOI: 10.1038/nature03120]
- 8 Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004; **432**: 231-235 [PMID: 15531879 DOI: 10.1038/nature03049]
- 9 Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; **303**: 95-98 [PMID: 14631048 DOI: 10.1126/science.1090599]
- 10 Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; **17**: 3011-3016 [PMID: 14681208 DOI: 10.1101/gad.1158803]
- 11 Bohnsack MT, Czapinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 2004; **10**: 185-191 [PMID: 14730017]
- 12 Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 2001; **106**: 23-34 [PMID: 11461699 DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00431-7]
- 13 Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005; **436**: 740-744 [PMID: 15973356 DOI: 10.1038/nature03868]
- 14 Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Lainé S, Sack R, Gatignol A, Filipowicz W. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* 2005; **6**: 961-967 [PMID: 16142218 DOI: 10.1038/sj.embor.7400509]
- 15 Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005; **123**: 631-640 [PMID: 16271387 DOI: 10.1016/j.cell.2005.10.022]
- 16 Rügger S, Großhans H. MicroRNA turnover: when, how, and why. *Trends Biochem Sci* 2012; **37**: 436-446 [PMID: 22921610 DOI: 10.1016/j.tibs.2012.07.002]
- 17 Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; **136**: 642-655 [PMID: 19239886]
- 18 Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell* 2010; **38**: 323-332 [PMID: 20471939 DOI: 10.1016/j.molcel.2010.03.013]
- 19 Breving K, Esquela-Kerscher A. The complexities of microRNA regulation: miRandering around the rules. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; **42**: 1316-1329 [PMID: 19800023 DOI: 10.1016/j.biocel.2009.09.016]
- 20 O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005; **435**: 839-843 [PMID: 15944709 DOI: 10.1038/nature03677]
- 21 Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N, Bentwich Z, Oren M. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell* 2007; **26**: 731-743 [PMID: 17540598 DOI: 10.1016/j.molcel.2007.05.017]
- 22 He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 2007; **447**: 1130-1134 [PMID: 17554337 DOI: 10.1038/nature05939]
- 23 Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, Meister G, Hermeking H. Differential regulation

- of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle* 2007; **6**: 1586-1593 [PMID: 17554199 DOI: 10.4161/cc.6.13.4436]
- 24 **Chang TC**, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mulendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 2007; **26**: 745-752 [PMID: 17540599 DOI: 10.1016/j.molcel.2007.05.010]
- 25 **Brueckner B**, Stresemann C, Kuner R, Mund C, Musch T, Meister M, Sultmann H, Lyko F. The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res* 2007; **67**: 1419-1423 [PMID: 17308078 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4074]
- 26 **Han L**, Witmer PD, Casey E, Valle D, Sukumar S. DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer Biol Ther* 2007; **6**: 1284-1288 [PMID: 17660710 DOI: 10.4161/cbt.6.8.4486]
- 27 **Toyota M**, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; **68**: 4123-4132 [PMID: 18519671 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0325]
- 28 **Suzuki HI**, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 2009; **460**: 529-533 [PMID: 19626115 DOI: 10.1038/nature08199]
- 29 **Wada T**, Kikuchi J, Furukawa Y. Histone deacetylase 1 enhances microRNA processing via deacetylation of DGCR8. *EMBO Rep* 2012; **13**: 142-149 [PMID: 22222205 DOI: 10.1038/embor.2011.247]
- 30 **Wiesen JL**, Tomasi TB. Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. *Mol Immunol* 2009; **46**: 1222-1228 [PMID: 19118902 DOI: 10.1016/j.molimm.2008.11.012]
- 31 **Dalal SR**, Kwon JH. The Role of MicroRNA in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2010; **6**: 714-722 [PMID: 21437020]
- 32 **Lu LF**, Liston A. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology* 2009; **127**: 291-298 [PMID: 19538248]
- 33 **Takeda K**, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**: 335-376 [PMID: 12524386 DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126]
- 34 **Dunne A**, O'Neill LA. Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Lett* 2005; **579**: 3330-3335 [PMID: 15876435 DOI: 10.1016/j.febslet.2005.04.024]
- 35 **Taganov KD**, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 12481-12486 [PMID: 16885212 DOI: 10.1073/pnas.0605298103]
- 36 **O'Connell RM**, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 1604-1609 [PMID: 17242365 DOI: 10.1073/pnas.0610731104]
- 37 **Tili E**, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, Fabbri M, Alder H, Liu CG, Calin GA, Croce CM. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* 2007; **179**: 5082-5089 [PMID: 17911593]
- 38 **Lu LF**, Thai TH, Calado DP, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, Loeb GB, Lee H, Yoshimura A, Rajewsky K, Rudensky AY. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity* 2009; **30**: 80-91 [PMID: 19144316 DOI: 10.1016/j.immuni.2008.11.010]
- 39 **Rodriguez A**, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA, Vetrie D, Okkenhaug K, Enright AJ, Dougan G, Turner M, Bradley A. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 2007; **316**: 608-611 [PMID: 17463290 DOI: 10.1126/science.1139253]
- 40 **Ceppe M**, Pereira PM, Dunand-Sauthier I, Barras E, Reith W, Santos MA, Pierre P. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 2735-2740 [PMID: 19193853 DOI: 10.1073/pnas.0811073106]
- 41 **O'Connell RM**, Rao DS, Chaudhuri AA, Boldin MP, Taganov KD, Nicoll J, Paquette RL, Baltimore D. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med* 2008; **205**: 585-594 [PMID: 18299402 DOI: 10.1084/jem.20072108]
- 42 **Costinean S**, Sandhu SK, Pedersen IM, Tili E, Trotta R, Perrotti D, Ciarlariello D, Neviani P, Harb J, Kauffman LR, Shidham A, Croce CM. Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase and CCAAT enhancer-binding protein beta are targeted by miR-155 in B cells of Emicro-MiR-155 transgenic mice. *Blood* 2009; **114**: 1374-1382 [PMID: 19520806 DOI: 10.1182/blood-2009-05-220814]
- 43 **O'Connell RM**, Chaudhuri AA, Rao DS, Baltimore D. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 7113-7118 [PMID: 19359473 DOI: 10.1073/pnas.0902636106]
- 44 **Sly LM**, Rauh MJ, Kalesnikoff J, Song CH, Krystal G. LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance. *Immunity* 2004; **21**: 227-239 [PMID: 15308103 DOI: 10.1016/j.immuni.2004.07.010]
- 45 **Sheedy FJ**, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C, O'Leary JJ, Ruan Q, Johnson DS, Chen Y, O'Neill LA. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol* 2010; **11**: 141-147 [PMID: 19946272 DOI: 10.1073/pnas.0810909106]
- 46 **Bazzoni F**, Rossato M, Fabbri M, Gaudiosi D, Mirolo M, Mori L, Tamassia N, Mantovani A, Cassatella MA, Locati M. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 5282-5287 [PMID: 19289835]
- 47 **Liu G**, Friggeri A, Yang Y, Park YJ, Tsuruta Y, Abraham E. miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 15819-15824 [PMID: 19721002 DOI: 10.1073/pnas.0901216106]
- 48 **O'Neill LA**, Sheedy FJ, McCoy CE. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 163-175 [PMID: 21331081]
- 49 **McCoy CE**, Sheedy FJ, Qualls JE, Doyle SL, Quinn SR, Murray PJ, O'Neill LA. IL-10 inhibits miR-155 induction by toll-like receptors. *J Biol Chem* 2010; **285**: 20492-20498 [PMID: 20435894 DOI: 10.1074/jbc.M110.102111]
- 50 **Merkerova M**, Belickova M, Bruchova H. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *Eur J Haematol* 2008; **81**: 304-310 [PMID: 18573170 DOI: 10.1111/j.1600-0609.2008.01111.x]
- 51 **Monticelli S**, Ansel KM, Xiao C, Socci ND, Krichevsky AM, Thai TH, Rajewsky N, Marks DS, Sander C, Rajewsky K, Rao A, Kosik KS. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol* 2005; **6**: R71 [PMID: 16086853 DOI: 10.1186/gb-2005-6-8-r71]
- 52 **Wu H**, Neilson JR, Kumar P, Manocha M, Shankar P, Sharp PA, Manjunath N. miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One* 2007; **2**: e1020 [PMID: 17925868 DOI: 10.1371/journal.pone.0001020]
- 53 **Cobb BS**, Nesterova TB, Thompson E, Hertweck A, O'Connor E, Godwin J, Wilson CB, Brockdorff N, Fisher AG, Smale ST, Merkenschlager M. T cell lineage choice and differen-

53. tionation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J Exp Med* 2005; **201**: 1367-1373 [PMID: 15867090 DOI: 10.1084/jem.20050572]
54. **Muljo SA**, Ansel KM, Kanellopoulou C, Livingston DM, Rao A, Rajewsky K. Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *J Exp Med* 2005; **202**: 261-269 [PMID: 16009718 DOI: 10.1084/jem.20050678]
55. **Xiao C**, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J, Henderson JM, Kutok JL, Rajewsky K. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* 2008; **9**: 405-414 [PMID: 18327259 DOI: 10.1038/ni1575]
56. **Du C**, Liu C, Kang J, Zhao G, Ye Z, Huang S, Li Z, Wu Z, Pei G. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol* 2009; **10**: 1252-1259 [PMID: 19838199 DOI: 10.1038/ni.1798]
57. **Zheng Y**, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 2007; **445**: 936-940 [PMID: 17237761 DOI: 10.1038/nature05563]
58. **Thai TH**, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, Murphy A, Frenthewey D, Valenzuela D, Kutok JL, Schmidt-Supprian M, Rajewsky N, Yancopoulos G, Rao A, Rajewsky K. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 2007; **316**: 604-608 [PMID: 17463289 DOI: 10.1126/science.1141229]
59. **Johnston RJ**, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, Dent AL, Craft J, Crotty S. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 2009; **325**: 1006-1010 [PMID: 19608860 DOI: 10.1126/science.1175870]
60. **Yu D**, Rao S, Tsai LM, Lee SK, He Y, Sutcliffe EL, Srivastava M, Linterman M, Zheng L, Simpson N, Ellyard JI, Parish IA, Ma CS, Li QJ, Parish CR, Mackay CR, Vinuesa CG. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* 2009; **31**: 457-468 [PMID: 19631565 DOI: 10.1016/j.immuni.2009.07.002]
61. **Li QJ**, Chau J, Ebert PJ, Sylvester G, Min H, Liu G, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Skare P, Klein LO, Davis MM, Chen CZ. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* 2007; **129**: 147-161 [PMID: 17382377 DOI: 10.1016/j.cell.2007.03.008]
62. **Chong MM**, Rasmussen JP, Rudensky AY, Littman DR. The RNaseIII enzyme Drosha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease. *J Exp Med* 2008; **205**: 2005-2017 [PMID: 18725527 DOI: 10.1084/jem.20081219]
63. **Liston A**, Lu LF, O'Carroll D, Tarakhovsky A, Rudensky AY. Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function. *J Exp Med* 2008; **205**: 1993-2004 [PMID: 18725526]
64. **Zhou X**, Jeker LT, Fife BT, Zhu S, Anderson MS, McManus MT, Bluestone JA. Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J Exp Med* 2008; **205**: 1983-1991 [PMID: 18725525]
65. **Tan LP**, Wang M, Robertus JL, Schakel RN, Gibcus JH, Diepstra A, Harms G, Peh SC, Reijmers RM, Pals ST, Kroesen BJ, Kluin PM, Poppema S, van den Berg A. miRNA profiling of B-cell subsets: specific miRNA profile for germinal center B cells with variation between centroblasts and centrocytes. *Lab Invest* 2009; **89**: 708-716 [PMID: 19349957 DOI: 10.1038/labinvest.2009.26]
66. **Basso K**, Sumazin P, Morozov P, Schneider C, Maute RL, Kitagawa Y, Mandelbaum J, Haddad J, Chen CZ, Califano A, Dalla-Favera R. Identification of the human mature B cell miRNome. *Immunity* 2009; **30**: 744-752 [PMID: 19446474]
67. **Xiao C**, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 2009; **136**: 26-36 [PMID: 19135886]
68. **Chen CZ**, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; **303**: 83-86 [PMID: 14657504 DOI: 10.1126/science.1091903]
69. **Koralov SB**, Muljo SA, Galler GR, Krek A, Chakraborty T, Kanellopoulou C, Jensen K, Cobb BS, Merkenschlager M, Rajewsky N, Rajewsky K. Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell* 2008; **132**: 860-874 [PMID: 18329371]
70. **Ventura A**, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA, Jacks T. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 2008; **132**: 875-886 [PMID: 18329372 DOI: 10.1016/j.cell.2008.02.019]
71. **Zhou B**, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 7080-7085 [PMID: 17438277]
72. **Xiao C**, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, Rajewsky N, Bender TP, Rajewsky K. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* 2007; **131**: 146-159 [PMID: 17923094]
73. **Vigorito E**, Perks KL, Abreu-Goodger C, Bunting S, Xiang Z, Kohlhaas S, Das PP, Miska EA, Rodriguez A, Bradley A, Smith KG, Rada C, Enright AJ, Toellner KM, MacLennan IC, Turner M. microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* 2007; **27**: 847-859 [PMID: 18055230]
74. **Rao DS**, O'Connell RM, Chaudhuri AA, Garcia-Flores Y, Geiger TL, Baltimore D. MicroRNA-34a perturbs B lymphocyte development by repressing the forkhead box transcription factor Foxp1. *Immunity* 2010; **33**: 48-59 [PMID: 20598588 DOI: 10.1016/j.immuni.2010.06.013]
75. **Hu H**, Wang B, Borde M, Nardone J, Maika S, Allred L, Tucker PW, Rao A. Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development. *Nat Immunol* 2006; **7**: 819-826 [PMID: 16819554]
76. **Blumberg R**, Cho J, Lewis J, Wu G. Inflammatory bowel disease: an update on the fundamental biology and clinical management. *Gastroenterology* 2011; **140**: 1701-1703 [PMID: 21530735 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.03.013]
77. **Wu F**, Zikusoka M, Trindade A, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, Brant SR, Chakravarti S, Kwon JH. MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 alpha. *Gastroenterology* 2008; **135**: 1624-1635.e24 [PMID: 18835392]
78. **Takagi T**, Naito Y, Mizushima K, Hirata I, Yagi N, Tomatsuri N, Ando T, Oyamada Y, Isozaki Y, Hongo H, Uchiyama K, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. Increased expression of microRNA in the inflamed colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; **25** Suppl 1: S129-S133 [PMID: 20586854]
79. **Fasseu M**, Tréton X, Guichard C, Pedruzzi E, Cazals-Hatem D, Richard C, Aparicio T, Daniel F, Soulé JC, Moreau R, Bouhnik Y, Laburthe M, Groyer A, Ogier-Denis E. Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One* 2010; **5**: e13160 [PMID: 20957151]
80. **Wu F**, Guo NJ, Tian H, Marohn M, Gearhart S, Bayless TM, Brant SR, Kwon JH. Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011; **17**: 241-250 [PMID: 20812331 DOI: 10.1002/ibd.21450]
81. **Okubo M**, Tahara T, Shibata T, Yamashita H, Nakamura M, Yoshioka D, Yonemura J, Kamiya Y, Ishizuka T, Nakagawa Y, Nagasaka M, Iwata M, Yamada H, Hirata I, Arisawa T. Association study of common genetic variants in pre-microRNAs in patients with ulcerative colitis. *J Clin Immunol* 2011; **31**: 69-73 [PMID: 20848167 DOI: 10.1007/s10875-010-9461-y]
82. **Brest P**, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, Vouret-Craviari V, Mari B, Barbry P, Mosnier JF, Hébuterne X, Harel-Bellan A, Mograbi B, Darfeuille-Michaud A, Hof-

- man P. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet* 2011; **43**: 242-245 [PMID: 21278745]
- 83 **Dalmasso G**, Nguyen HT, Yan Y, Laroui H, Charania MA, Ayyadurai S, Sitaraman SV, Merlin D. Microbiota modulate host gene expression via microRNAs. *PLoS One* 2011; **6**: e19293 [PMID: 21559394 DOI: 10.1371/journal.pone.0019293]
- 84 **Dalmasso G**, Nguyen HT, Yan Y, Laroui H, Srinivasan S, Sitaraman SV, Merlin D. MicroRNAs determine human intestinal epithelial cell fate. *Differentiation* 2010; **80**: 147-154 [PMID: 20638171]
- 85 **Nguyen HT**, Merlin D. Homeostatic and innate immune responses: role of the transmembrane glycoprotein CD98. *Cell Mol Life Sci* 2012; **69**: 3015-3026 [PMID: 22460579 DOI: 10.1007/s00018-012-0963-z]
- 86 **Nguyen HT**, Dalmasso G, Yan Y, Laroui H, Dahan S, Mayer L, Sitaraman SV, Merlin D. MicroRNA-7 modulates CD98 expression during intestinal epithelial cell differentiation. *J Biol Chem* 2010; **285**: 1479-1489 [PMID: 19892711]
- 87 **Hanahan D**, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**: 646-674 [PMID: 21376230]
- 88 **Weitz J**, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; **365**: 153-165 [PMID: 15639298]
- 89 **Dalmay T**, Edwards DR. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene* 2006; **25**: 6170-6175 [PMID: 17028596 DOI: 10.1038/sj.onc.1209911]
- 90 **Kasinski AL**, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**: 849-864 [PMID: 22113163 DOI: 10.1038/nrc3166]
- 91 **Calin GA**, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 2999-3004 [PMID: 14973191 DOI: 10.1073/pnas.0307323101]
- 92 **Volinia S**, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 2257-2261 [PMID: 16461460]
- 93 **Lu J**, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; **435**: 834-838 [PMID: 15944708 DOI: 10.1038/nature03702]
- 94 **Meng F**, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; **133**: 647-658 [PMID: 17681183]
- 95 **Schetter AJ**, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008; **299**: 425-436 [PMID: 18230780]
- 96 **Asangani IA**, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 2008; **27**: 2128-2136 [PMID: 17968323]
- 97 **Chang KH**, Miller N, Kheirleiseid EA, Ingoldsby H, Hennessy E, Curran CE, Curran S, Smith MJ, Regan M, McAnena OJ, Kerin MJ. MicroRNA-21 and PDCD4 expression in colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2011; **37**: 597-603 [PMID: 21546206]
- 98 **Shibuya H**, Iinuma H, Shimada R, Horiuchi A, Watanabe T. Clinicopathological and prognostic value of microRNA-21 and microRNA-155 in colorectal cancer. *Oncology* 2010; **79**: 313-320 [PMID: 21412018]
- 99 **Gironella M**, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, Garcia S, Nowak J, Yeung ML, Jeang KT, Chaix A, Fazli L, Motoo Y, Wang Q, Rocchi P, Russo A, Gleave M, Dagorn JC, Iovanna JL, Carrier A, Pébusque MJ, Dusetti NJ. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 16170-16175 [PMID: 17911264]
- 100 **Nishida N**, Nagahara M, Sato T, Mimori K, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Sugihara K, Doki Y, Mori M. Microarray analysis of colorectal cancer stromal tissue reveals upregulation of two oncogenic miRNA clusters. *Clin Cancer Res* 2012; **18**: 3054-3070 [PMID: 22452939 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1078]
- 101 **Stefani G**, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 219-230 [PMID: 18270516]
- 102 **Hudson RS**, Yi M, Esposito D, Glynn SA, Starks AM, Yang Y, Schetter AJ, Watkins SK, Hurwitz AA, Dorsey TH, Stephens RM, Croce CM, Ambs S. MicroRNA-106b-25 cluster expression is associated with early disease recurrence and targets caspase-7 and focal adhesion in human prostate cancer. *Oncogene* 2012; Epub ahead of print [PMID: 22986525 DOI: 10.1038/onc.2012.424]
- 103 **Petrocca F**, Vecchione A, Croce CM. Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res* 2008; **68**: 8191-8194 [PMID: 18922889]
- 104 **Mendell JT**. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* 2008; **133**: 217-222 [PMID: 18423194]
- 105 **Tsuchida A**, Ohno S, Wu W, Borjigin N, Fujita K, Aoki T, Ueda S, Takanashi M, Kuroda M. miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer Sci* 2011; **102**: 2264-2271 [PMID: 21883694 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02081.x]
- 106 **Dews M**, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Sevignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT, Thomas-Tikhonenko A. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet* 2006; **38**: 1060-1065 [PMID: 16878133]
- 107 **Urbich C**, Kuehnbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2008; **79**: 581-588 [PMID: 18550634]
- 108 **Motoyama K**, Inoue H, Takatsuno Y, Tanaka F, Mimori K, Uetake H, Sugihara K, Mori M. Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. *Int J Oncol* 2009; **34**: 1069-1075 [PMID: 19287964]
- 109 **Schimanski CC**, Frerichs K, Rahman F, Berger M, Lang H, Galle PR, Moehler M, Gockel I. High miR-196a levels promote the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 2089-2096 [PMID: 19418581]
- 110 **Slaby O**, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology* 2007; **72**: 397-402 [PMID: 18196926]
- 111 **Schee K**, Fodstad Ø, Flatmark K. MicroRNAs as biomarkers in colorectal cancer. *Am J Pathol* 2010; **177**: 1592-1599 [PMID: 20829435]
- 112 **Zhou W**, Li X, Liu F, Xiao Z, He M, Shen S, Liu S. MiR-135a promotes growth and invasion of colorectal cancer via metastasis suppressor 1 in vitro. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2012; **44**: 838-846 [PMID: 23017832]
- 113 **Esquela-Kerscher A**, Slack FJ. OncomiRs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 259-269 [PMID: 16557279]

- 114 **Iorio MV**, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; **65**: 7065-7070 [PMID: 16103053]
- 115 **Michael MZ**, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; **1**: 882-891 [PMID: 14573789]
- 116 **Schepeler T**, Reinert JT, Ostensfeld MS, Christensen LL, Silahdaroglu AN, Dyrskjot L, Wiuf C, Sørensen FJ, Kruhoffer M, Laurberg S, Kauppinen S, Ørntoft TF, Andersen CL. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res* 2008; **68**: 6416-6424 [PMID: 18676867]
- 117 **Xu Q**, Liu LZ, Qian X, Chen Q, Jiang Y, Li D, Lai L, Jiang BH. MiR-145 directly targets p70S6K1 in cancer cells to inhibit tumor growth and angiogenesis. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**: 761-774 [PMID: 21917858]
- 118 **Chen X**, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, Cai X, Wang K, Wang G, Ba Y, Zhu L, Wang J, Yang R, Zhang Y, Ren Z, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene* 2009; **28**: 1385-1392 [PMID: 19137007]
- 119 **Liu LZ**, Zheng JZ, Wang XR, Jiang BH. Endothelial p70 S6 kinase 1 in regulating tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2008; **68**: 8183-8188 [PMID: 18829578 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0819]
- 120 **Skinner HD**, Zheng JZ, Fang J, Agani F, Jiang BH. Vascular endothelial growth factor transcriptional activation is mediated by hypoxia-inducible factor 1 α , HDM2, and p70S6K1 in response to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *J Biol Chem* 2004; **279**: 45643-45651 [PMID: 15337760 DOI: 10.1074/jbc.M404097200]
- 121 **Li W**, Tan D, Zhang Z, Liang JJ, Brown RE. Activation of Akt-mTOR-p70S6K pathway in angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2008; **20**: 713-719 [PMID: 18813808]
- 122 **Zou C**, Xu Q, Mao F, Li D, Bian C, Liu LZ, Jiang Y, Chen X, Qi Y, Zhang X, Wang X, Sun Q, Kung HF, Lin MC, Dress A, Wardle F, Jiang BH, Lai L. MiR-145 inhibits tumor angiogenesis and growth by N-RAS and VEGF. *Cell Cycle* 2012; **11**: 2137-2145 [PMID: 22592534]
- 123 **Nugent M**, Miller N, Kerin MJ. Circulating miR-34a levels are reduced in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2012; **106**: 947-952 [PMID: 22648208 DOI: 10.1002/jso.23174]
- 124 **Tsuchiya N**, Nakagama H. MicroRNA, SND1, and alterations in translational regulation in colon carcinogenesis. *Mutat Res* 2010; **693**: 94-100 [PMID: 20883704]
- 125 **Hermeking H**. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 2010; **17**: 193-199 [PMID: 19461653]
- 126 **Chiang Y**, Song Y, Wang Z, Chen Y, Yue Z, Xu H, Xing C, Liu Z. Aberrant expression of miR-203 and its clinical significance in gastric and colorectal cancers. *J Gastrointest Surg* 2011; **15**: 63-70 [PMID: 21063914 DOI: 10.1007/s11605-010-1367-8]
- 127 **Li J**, Chen Y, Zhao J, Kong F, Zhang Y. miR-203 reverses chemoresistance in p53-mutated colon cancer cells through downregulation of Akt2 expression. *Cancer Lett* 2011; **304**: 52-59 [PMID: 21354697]
- 128 **Díaz R**, Silva J, García JM, Lorenzo Y, García V, Peña C, Rodríguez R, Muñoz C, García F, Bonilla F, Domínguez G. Deregulated expression of miR-106a predicts survival in human colon cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; **47**: 794-802 [PMID: 18521848 DOI: 10.1002/gcc.20580]
- 129 **Guo C**, Sah JF, Beard L, Willson JK, Markowitz SD, Guda K. The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; **47**: 939-946 [PMID: 18663744 DOI: 10.1002/gcc.20596]
- 130 **Bader AG**, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res* 2010; **70**: 7027-7030 [PMID: 20807816 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2010]
- 131 **Duchaine TF**, Slack FJ. RNA interference and micro RNA-oriented therapy in cancer: rationales, promises, and challenges. *Curr Oncol* 2009; **16**: 61-66 [PMID: 19672426]
- 132 **Melo S**, Villanueva A, Moutinho C, Davalos V, Spizzo R, Ivan C, Rossi S, Setien F, Casanovas O, Simo-Riudalbas L, Carmona J, Carrere J, Vidal A, Aytes A, Puertas S, Ropero S, Kalluri R, Croce CM, Calin GA, Esteller M. Small molecule enoxacin is a cancer-specific growth inhibitor that acts by enhancing TAR RNA-binding protein 2-mediated microRNA processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 4394-4399 [PMID: 21368194 DOI: 10.1073/pnas.1014720108]

P- Reviewers Chi SG, Monticelli S **S- Editor** Gou SX
L- Editor A **E- Editor** Zhang DN



Annexe 3

Carcinogénèse colorectale : impact des bactéries toxigènes ou pro-inflammatoires

Colorectal carcinogenesis : impact of toxigenic or pro-inflammatory bacteria

Guillaume Dalmasso, Marie-Agnès Bringer, Jennifer Raisch, Antony Cougnoux, Mathilde

Bonnet, Denis Pezet, Richard Bonnet, and Arlette Darfeuille-Michaud

Carcinogénèse colorectale : impact des bactéries toxigènes ou pro-inflammatoires

Colorectal carcinogenesis : impact of toxigenic or pro-inflammatory bacteria

Guillaume Dalmasso^{1,2}, Marie-Agnès Bringer^{1,2}, Jennifer Raisch^{1,2}, Antony Cougnoux^{1,2},
Mathilde Bonnet^{1,2}, Denis Pezet^{1,2,3}, Richard Bonnet^{1,2,3}, and Arlette Darfeuille-Michaud^{1,2,3}

Corresponding author: Arlette Darfeuille-Michaud

Address: M2iSH, UMR Inserm 1071 / Université d'Auvergne, usc INRA 2018

28 place Henri Dunant

63000 Clermont-Ferrand

France

E-mail: arlette.darfeuille-michaud@udamail.fr

Tel: +33 (0)4 73 754 920 **Fax:** +33 (0)4 73 754 922

1. Clermont Université, UMR 1071 Inserm/Université d'Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France
2. INRA, USC 2018, 63000 Clermont-Ferrand, France
3. Centre Hospitalier Universitaire, 63000 Clermont-Ferrand, France

Résumé

Longtemps négligé dans le développement du cancer colorectal (CCR), nous assistons depuis quelques années à un regain d'intérêt pour le microbiote intestinal dans cette pathologie. Les techniques de séquençage à haut débit ont révélé des dysbioses intestinales chez les patients atteints d'un CCR. Des bactéries accélèrent la tumorigenèse colique en ayant une activité pro-inflammatoire ou en produisant des toxines. Ces bactéries sont capables d'accélérer l'apparition des tumeurs, d'augmenter leur taille/nombre et leur caractère invasif dans des modèles murins de cancer intestinal renforçant l'idée que les bactéries joueraient un rôle significatif dans le CCR.

Mots-clés : cancer colorectal, microbiote, toxine, cyclomoduline, inflammation

Abstract

Neglected for a long time, intestinal microbiota is sought to be involved in colorectal cancer (CRC). High throughput screening has revealed gut dysbiosis ie a change in microbiota composition, in CRC patients. Bacteria increase tumorigenesis via a proinflammatory activity or by the production of toxins. In intestinal cancer animal models, those microbes accelerate tumors formation as well as their size/number and invasive behavior, emphasizing the hypothesis that microbiota might be a key player in CRC.

Keywords: colorectal cancer, microbiota, toxin, cyclomodulin, inflammation

Introduction

Malgré des mesures préventives efficaces et une sensibilisation accrue de la population, le cancer colorectal (CCR) reste le deuxième cancer le plus fréquent quelque soit le sexe (1). Le nombre de nouveaux cas diagnostiqués annuellement dans le monde est estimé à 1,2 million et il est responsable d'environ 600.000 décès chaque année (1). Plus de 90% des cas de CCR sont d'origine sporadique et surviennent chez des personnes ayant peu ou pas d'antécédents familiaux, ce qui montre l'importance des facteurs environnementaux dans sa genèse.

Carcinogénèse colorectale et microbiote intestinal

Par son rôle clé dans l'homéostasie intestinale, en particulier dans la régulation de la réponse inflammatoire, le maintien d'un équilibre entre prolifération, différenciation, et mort cellulaire, le microbiote intestinal, aussi appelé flore intestinale, est soupçonné d'être un facteur étiologique du CCR. Il est principalement composé de bactéries dont le nombre est 10 fois supérieur à celui des cellules humaines, stable chez l'individu sain et diversifié. Le répertoire génétique correspondant est au moins 150 fois plus important que celui du génome humain et a donc une influence importante sur la physiologie de l'hôte. Les échanges qui régissent les relations entre le microbiote intestinal et son hôte, sont habituellement d'ordre symbiotique et s'inscrivent dans le cadre d'une coopération avec un avantage partagé. Cependant, en cas de dysbiose, c'est à dire un changement de composition ou de stabilité des populations bactériennes de l'intestin, le microbiote peut être associé à des troubles intestinaux ou extra-intestinaux.

L'étude du microbiote intestinal dans le contexte du CCR suscite actuellement un regain d'intérêt. La densité bactérienne augmente tout au long du tractus digestif pour atteindre une densité maximale dans le côlon ($\sim 10^{11}$ bactéries/g de matière). L'augmentation de la densité bactérienne est corrélée avec une augmentation du risque de cancer intestinal, qui est maximal

dans le côlon (2). Des souris traitées par des agents carcinogènes ou génétiquement modifiées pour développer spontanément un cancer intestinal ($APC^{Min/+}$) développent significativement moins de tumeurs et des tumeurs de plus petite taille en condition axénique qu'en présence du microbiote intestinal (3). De plus, il a été montré que le transfert d'un microbiote dysbiotique provenant de souris ayant développé un CCR favorise l'émergence du CCR chez les animaux inoculés (4).

L'ensemble des études visant à analyser les bactéries associées aux tumeurs de patients atteints de CCR comparativement à celles retrouvées au niveau de la muqueuse colique de patients contrôles montre l'existence d'un microbiote dysbiotique associé au CCR. Même si aucun microbiote dysbiotique « type » n'a pu être à ce jour relié au CCR, une abondance anormale de certaines espèces bactériennes a été relevée. Des études indépendantes basées sur des cultures bactériennes traditionnelles ont ainsi mis en évidence que 71% des adénocarcinomes de CCR sont colonisés par *Escherichia coli* contre seulement 42% des tissus sains (5) et une augmentation du nombre de ces bactéries avec l'avancement du stade tumoral (6). Les méthodes moléculaires ont également montré la présence d'un microbiote différent au niveau des adénocarcinomes avec une surreprésentation de *Fusobacterium nucleatum* et/ou du groupe *Bacteroides/Prevotella* (3, 7). Il est difficile de définir si l'émergence de microbiotes dysbiotiques est la cause ou la conséquence du CCR. Un modèle proposé pour expliquer le rôle des bactéries dans le CCR est le modèle « driver-passenger » (3). Selon ce modèle, sous l'influence de facteurs environnementaux ou génétiques, la muqueuse colique de patients à risque de développer un CCR serait colonisée par des bactéries dites « driver », c'est-à-dire capable d'initier la carcinogenèse. Les altérations cellulaires et tissulaires qui vont s'opérer au niveau de la muqueuse colique entraîneraient alors des modifications des conditions environnementales locales, favorisant l'émergence de bactéries opportunistes dites « passenger ». L'expansion au niveau du site tumoral de bactéries ayant des propriétés

oncogéniques, au détriment de bactéries aux propriétés « suppresseur de tumeurs » pourrait ainsi participer à la promotion tumorale.

Carcinogénèse colorectale et bactéries productrices de cyclomodulines

Les adénocarcinomes coliques sont souvent colonisés par des souches de *E. coli* produisant des toxines appelées cyclomodulines car affectant le cycle cellulaire. Deux d'entre elles, la colibactine et CNF sont particulièrement prévalentes chez les *E. coli* associées au CCR (8).

La colibactine est produite à partir d'enzymes codés par l'îlot génomique *pks* (9). Des études récentes et indépendantes ont montré que les *E. coli* porteurs de l'îlot *pks* sont plus fréquemment isolés à partir d'adénocarcinomes coliques que de tissus contrôles (55-67% vs 19-21% respectivement) (8, 10). Ces bactéries induisent des cassures double brin et une instabilité de l'ADN eucaryote entraînant *in vitro* un blocage du cycle cellulaire (9, 10). Chez la souris, les *E. coli pks* seuls sont incapables d'induire spontanément un CCR. Cependant, les *E. coli pks* augmentent le nombre d'adénocarcinomes coliques et leur caractère invasif dans des modèles murins de CCR associés à l'inflammation (10, 11). Ces résultats peuvent paraître contradictoires puisque la colibactine induit un arrêt de la prolifération cellulaire *in vitro*. Une étude récente propose une action indirecte de la colibactine qui réconcilie ces deux observations (11). Cette toxine modifie dans les cellules épithéliales intestinales l'expression du microARN-20a-5p, qui affecte l'expression de l'enzyme SENP1 impliquée dans la stabilisation de p53 *via* sa modification post-traductionnelle par les peptides SUMO. Ainsi, les bactéries orientent les cellules vers la sénescence, un état physiologique caractérisé par un arrêt du cycle cellulaire et la production de facteurs de croissance, notamment l'HGF (hepatoocyte growth factor) capable d'induire la prolifération de cellules non infectées. D'une manière intéressante, des biopsies humaines de CCR colonisées par des *E. coli pks* présentent des taux élevés de miR-20a-5p et l'activation de la voie HGF (11).

Les *E. coli* isolés d'adénocarcinomes produisent fréquemment la cyclomoduline CNF1. Ces souches sont observées dans 40% des adénocarcinomes contre seulement 13% dans des tissus contrôles (8). CNF1 active des Rho GTPases et ainsi dérégule de nombreux processus cellulaires (12). Elle stimule le cycle cellulaire comme la protéine CagA de *Helicobacter pylori*, un des meilleurs exemples de toxines carcinogènes. Elle entraîne l'apparition d'altérations du fuseau mitotique, de la cytokinèse, de la ségrégation des chromosomes, une aneuploïdie, la rupture des jonctions cellulaires et la motilité cellulaire (12). CNF1 bloque aussi la différenciation des cellules et augmente l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL. Dans des cellules épithéliales, CNF1 induit de plus une activation prolongée du facteur de transcription NF- κ B et de la voie COX2/PGE-2, des facteurs pro-inflammatoires reconnus de la carcinogenèse colorectale.

D'autres cyclomodulines de *E. coli* pourraient affecter le développement du CCR. Cependant, peu d'études spécifiques ont été menées à ce jour et leur prévalence semble faible dans le contexte du CCR. Des *E. coli* producteurs de la cyclomoduline CDT (cytolethal distending toxin) ont été isolées dans 16% des biopsies de tumeurs collectées chez des patients atteints de CCR contre 0% dans des tissus contrôles (8). CDT porte une activité enzymatique DNase, qui provoque des cassures double brin de l'ADN et *in fine* un blocage du cycle cellulaire pour revue (12). Une exposition prolongée à une dose faible de CDT augmente la fréquence des mutations génétiques et des aberrations chromosomiques dans des cellules en culture et permet aux cellules de pousser en agar mou, un signe d'une transformation maligne (13).

Les *E. coli* pathogènes intestinaux entéro-pathogènes (ECEP) et entérohémorragiques (ECEH) peuvent produire la cyclomoduline Cif. Ces pathovars ont été détectés dans 8-25% des adénocarcinomes coliques contre 0% dans des tissus sains (8). Cif inactive l'enzyme E2 du système d'ubiquitination et entraîne ainsi une inhibition de la voie ubiquitine/protéasome pour revue (12). Cette activité suggère une action pléiotropique pouvant affecter des protéines clefs

de la cancérogenèse. Les conséquences sont le blocage de l'apoptose et du cycle cellulaire suite à l'accumulation des protéines CKI p21^{CIP} et p27^{KIP}. Les cellules peuvent cependant continuer à synthétiser de l'ADN et la teneur en ADN des cellules augmente par endoréduplication. Ce processus pourrait engendrer des anomalies génétiques susceptibles de favoriser le développement tumoral.

Carcinogénèse colorectale et bactéries pro-inflammatoires

Plusieurs études méta-génomiques montrent que *F. nucleatum* est surreprésenté au niveau des adénocarcinomes coliques. Il vient récemment d'être montré que ces bactéries stimulent la tumorigénèse dans le modèle murin de CCR APC^{Min/+} en favorisant l'infiltration du tissu tumoral par des cellules immunitaires (14). L'analyse de tissus tumoraux colonisés par la bactérie, en modèle murin et chez l'Homme, a montré que ceux-ci présentent une signature d'expression génique pro-inflammatoire et proliférative. Par ailleurs, *F. nucleatum* exprime une adhésine, FadA, qui en se fixant sur l'E-cadhérine active la voie Wnt/ β -caténine et la prolifération des cellules épithéliales intestinales (14). Des expériences de xénogreffe ont montré que l'inhibition de FadA permettait de bloquer la prolifération de la masse tumorale. Enfin, ces bactéries produisent la toxine FIP capable de bloquer le cycle cellulaire en milieu de phase G1. Cependant aucune étude *in vivo* n'a encore été menée pour évaluer son rôle éventuel dans la tumorigénèse colique.

Bacteroides fragilis est une bactérie pathogène opportuniste du microbiote intestinal. Des souches entérotoxiques, habituellement responsables de diarrhées inflammatoires aiguës chez l'enfant, sont retrouvées chez près de 38% des patients souffrant d'un CCR contre 12% des sujets contrôles (15). Ces bactéries sont capables d'induire une colite aiguë qui se transforme en inflammation chronique de côlon pouvant perdurer plusieurs mois (15). Elles accélèrent la transformation oncogénique dans un modèle murin de CCR APC^{Min/+} (15). En clivant l'E-

cadhérine, l'entérotoxine de ces bactéries, appelée BFT (*Bacteroides fragilis* toxin) ou fragilysine, active la voie WNT, qui joue un rôle essentiel dans la prolifération cellulaire et la carcinogénèse colique (15). La fragilysine induit également une réponse immunitaire de type Th17 responsable de l'apparition des tumeurs dans le modèle murin APC^{Min} (15). Ainsi, une colonisation prolongée à ces bactéries pourrait entretenir une inflammation colique chronique favorisant la transformation de l'épithélium tumoral.

Autres bactéries associées au CCR

Par ailleurs, une fréquence anormalement élevée du portage digestif des bactériémies *Streptococcus gallolyticus gallolyticus* (*S. bovis* biotype I) et *Enterococcus faecalis* ont été observées chez les patients atteints de CCR. *S. gallolyticus gallolyticus* induit une inflammation ainsi que la surexpression de l'oncogène c-Myc et de la protéine anti-apoptotique Bcl2. *E. faecalis* produit des ions superoxydes génotoxiques et induit une instabilité chromosomique *in vivo*. Ces bactéries pourraient donc elles aussi contribuer au développement du CCR.

Conclusion

Pour confirmer les données préliminaires suggérant un lien entre certaines bactéries et la carcinogénèse colorectale, des études doivent être menées sur de larges cohortes prospectives capables d'explorer plus avant l'évolution du microbiote intestinale au cours de la maladie. Cependant, si appréhender la composition du microbiote intestinal et du méta-génome correspondant est important, son étude fonctionnelle semble être une étape clef pour mieux comprendre son impact.

Références

1. Jemal A, Bray F, Center MM et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61, 69–90.
2. Sobhani I, Amiot A, Le Baleur Y et al. Microbial dysbiosis and colon carcinogenesis: could colon cancer be considered a bacteria-related disease? *Ther Adv Gastroenterol* 2013;6, 215–229.
3. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR et al. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol* 2012;10.1038/nrmicro2819.
4. Hu B, Elinav E, Huber S et al. Microbiota-induced activation of epithelial IL-6 signaling links inflammasome-driven inflammation with transmissible cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110, 9862–9867.
5. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA et al. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 2004;127, 80–93.
6. Bonnet M, Buc E, Sauvanet P et al. Colonization of the Human Gut by *E. coli* and Colorectal Cancer Risk. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2014;20, 859–867.
7. Sobhan I, Tap J, Roudot-Thoraval F et al. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PloS One* 2011;6, e16393.
8. Buc E, Dubois D, Sauvanet P et al. High Prevalence of Mucosa-Associated *E. coli* Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer. *PloS One* 2013;8, e56964.
9. Nougayrède J-P., Homburg S, Taieb F et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 2006;313, 848–851.
10. Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer et al. Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota. *Science* 2012;338, 120–123.
11. Cougnoux A, Dalmaso G, Martinez R et al. A. Bacterial genotoxin colibactin promotes tumourigenesis by inducing cellular senescence in tumour. *in press*
12. Nougayrède J-P., Taieb F, De Rycke J et al. Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends Microbiol* 2005;13, 103–110.
13. Guidi R, Guerra L, Levi L et al. Chronic exposure to the cytolethal distending toxins of Gram-negative bacteria promotes genomic instability and altered DNA damage response. *Cell Microbiol* 2013;15, 98–113.

14. Kostic AD, Chun E, Robertson L et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe* 2013;14, 207–215.

15. Dejea C, Wick E and Sears C.L. Bacterial oncogenesis in the colon. *Future Microbiol* 2013;8, 445–460.

Légende de la figure

Figure 1 : La séquence «adénome-carcinome» associée à la carcinogénèse colique et les rôles possibles des bactéries du microbiote intestinal dans ce processus.

