



HAL
open science

Etude de microbiote biliaire associé aux cholangiocarcinomes (CCA) et caractérisation des mécanismes impliqués

Massa Saab

► **To cite this version:**

Massa Saab. Etude de microbiote biliaire associé aux cholangiocarcinomes (CCA) et caractérisation des mécanismes impliqués. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2021. Français. NNT : 2021PESC0053 . tel-03667959

HAL Id: tel-03667959

<https://theses.hal.science/tel-03667959>

Submitted on 13 May 2022

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.

UNIVERSITE PARIS EST CRETEIL
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE DE DOCTORAT
Mention : PATHOLOGIE ET RECHERCHE CLINIQUE

Présentée par

Massa SAAB

Etude de microbiote biliaire associé aux cholangiocarcinomes (CCA)
et
caractérisation des mécanismes impliqués

Soutenue publiquement le 05 juillet 2021

Directeur de Thèse : Pr. Iradj SOBHANI

Pr. Françoise BOTTEREL – CHARTIER

Pr. Jean- Baptiste BACHET

Pr. Thomas APARICIO

Pr. Magali SVRCEK

Dr. Houria NEBBAD LECHANI

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examinatrice

Remerciement

Tout d'abord, je tiens à remercier le Professeur Iradj SOBHANI pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de son équipe.

Merci de m'avoir acceptée, soutenue, de m'avoir permis de participer à ce projet de 3 ans. Ce fut une fierté pour moi d'être votre thésard. Je vous remercie de m'avoir encadré, conseillé et guidé tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier vivement l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté de juger mon travail :

Au Professeur Françoise BOTTEREL– CHARTIER, je vous remercie d'avoir accepté d'être la présidente de mon jury.

Je remercie également Professeur Jean- Baptiste BACHET et le Professeur Thomas APARICIO d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de mon manuscrit.

Merci au Professeur Magali SVRCEK et docteur Houria NEBBAD LECHANI d'avoir accepté de siéger à ce jury et d'avoir bien voulu examiner cette thèse.

Je remercie ma mère Alieh et mon frère Ali pour leur encouragement, leur support leur compréhension. Merci d'être là, à côté de moi.....

Mohamad, mon homme que j'aime infiniment, merci pour ta compréhension et tes encouragements toujours et de m'avoir supporté surtout durant la rédaction.

Je remercie tous mes amis pour leur amitié et leur soutien inconditionnel.

Enfin, Je dédie cette thèse :

A mes très chers parents, surtout mon père qui m'a laissé depuis longtemps mais je suis sûr qu'il me surveille de son paradis. Ma mère aucun mot n'exprime ton amour et ton soutien. Je vous aime fortement

Sommaire

Remerciement.....	2
Sommaire	3
Liste des abréviations.....	5
Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	9
Résumé.....	10
Abstract.....	12
I. Introduction.....	14
1. Cholangiocarcinomes (CCAs).....	14
i. Généralité.....	14
ii. Epidémiologie.....	15
iii. Facteurs de risque.....	18
iv. Diagnostic.....	21
a) Clinique – Biologie.....	22
b) Imagerie.....	22
c) Cytologie-Histopathologie.....	24
d) Immunohistochimie (IHC).....	24
v. Prise en charge des patients atteints de CCA.....	26
vi. Evolution et pronostic.....	28
2. Microbiote.....	29
i. Généralité.....	29
ii. Cancers et microbiote.....	32
iii. Microbiote biliaire.....	36
a) Voies biliaires : production et sécrétion de la bile.....	36
b) Interaction bile et microbiote :.....	37
c) Colonisation bactérienne de la voie biliaire.....	40
iv. Etude de microbiote biliaire dans des conditions physiologiques et pathologiques.....	42
a) Conditions physiologiques.....	42
b) Conditions pathologiques.....	43
3. Epigénétique.....	69

i.	Généralité	69
a)	Méthylation de l'ADN :.....	70
b)	Modifications des histones post-traductionnelles (PTMs):	72
c)	MicroARN :	73
ii.	Les modifications épigénétiques de l'organisme	77
iii.	Epigénétique et cancer.....	79
iv.	Epigénétique et CCAs	85
II.	Objectifs	89
III.	Matériels et méthodes.....	91
1.	Analyse de Microbiote.....	91
2.	Analyse Epigénétique	94
IV.	Résultats.....	101
	Etude 1 : Caractérisation du microbiote biliaire dans cholangiocarcinome extrahépatique (Manuscrit 1 publié).	101
	Etude 2 : La méthylation de l'ADN un biomarqueur pour le cholangiocarcinome par analyse bio-informatique et immunohistochimique (Projet du manuscrit 2 en cours de soumission).....	119
V.	Discussion, Conclusions générales.....	150
VI.	Références	156

Liste des abréviations

5hmC : 5- hydroxymethylcytidine

5mC : 5-methylcytosine

AB : Acide biliaire

AC : Acide cholique

AUDC : Acide Ursodésoxycholique

CCA : Cholangiocarcinome

CCAd : Cholangiocarcinomes distaux

CCAe : Cholangiocarcinomes extra-hépatiques

CCAi : Cholangiocarcinomes intra-hépatiques

CCAp : Cholangiocarcinomes péri-hilaire

CCR : Cancer colorectal

CDCA : Acide chénodésoxycholique

CEO : Carcinome épidermoïde de l'œsophage

CG : Centre germinatif

CHC : Carcinome hépatocellulaire

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPRE : Cholangiopancréatographie rétrograde endoscopique

CPRM : Cholangiopancréatographie-IRM

CSP : Cholangite sclérosante primitive

CTGF : Facteur de croissance du tissu conjonctif

CTLA-4 : Lymphocytes T cytotoxiques

CVB : Carcinome de la vésicule biliaire

CIRC : Centre International de recherche sur le cancer

DBP : Drainage biliaire préopératoire

DCA : Acide désoxycholique

DES : Dysplasie squameuse de l'œsophage

DNAme : Méthylation de l'ADN

DNMTs : ADN méthyltransférases

H₂S : Sulfure d'hydrogène

HATs : Histones acétyltransférases

HDACs : Histones déacétylases
HDMs : Histones méthyl-déméthylases (HDMs)
HMTs : Histones méthyltransférases
HSB : Hydrolase des sels biliaires
IAB : Inductibles des acides biliaires
IgA : Immunoglobulines A
IHC : Immunohistochimie
IMC : Indice de masse corporelle
IMRT : Radiothérapie par modulation d'intensité
IRM : imagerie par résonance magnétique
KMTs : Histone lysine methyltransferases
CBP : Cholangite biliaire primitive
LCA : Acide lithocholique
MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
NASH : Stéatose hépatique non alcoolique
NGS : Séquençage de nouvelle génération
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PD-1 : Protéine 1 de la mort cellulaire programmée
PDAC : Adénocarcinome canalaire pancréatique
PROM1 : Prominin-1
PTMs : Modifications post-traductionnelles
RCH : Rectocolite hémorragique
RTC-3D : Radiothérapie conformationnelle 3D
SHM : Hypermutation somatique
SO : Sphincter d'Oddi
SOX2: SRY-box 2
TDM : Tomodensitométrie
TEP-TDM-FDG : Tomographie par émission de positons au 2- [18] -Fluoro-2-désoxy-D-glucose couplée à un scanner dédié
TLR: Toll-like-receptor
US: Échographie
VIM : Vimantine

RISC : Complexe de blocage de l'expression génique par des ARN

Oct4 : Octamère

IDH : Isocitrate déshydrogénase

HNF4 α : Facteur nucléaire hépatocytaire 4 α

HDAC6 : Histone désacétylase 6

EZH2 : Histone méthyltransférase

TEM : Transition épithélialo-mésenchymateuse

Liste des figures

Figure 1: Classification anatomique des cholangiocarcinomes (CCAs).

Figure 2. Représentation de l'incidence mondiale des cholangiocarcinomes (CCAs).

Figure 3 : Représentation de la Mortalité liées aux CCAs dans le monde.

Figure 4: Prise en charge des trois sous-types de CCA.

Figure 5 : Nombre et répartition des espèces bactériens dans le corps humain.

Figure 6 : Différentes fonctions du microbiote intestinal vis-à-vis l'hôte.

Figure 7 : Composition de la flore bactérienne dans les différentes parties du tractus gastro-intestinal.

Figure 8 : Trois grands mécanismes de modification épigénétique.

Figure 9 : Liste des modifications post-traductionnelles de différents acides aminés des différentes histones, ainsi que les enzymes associées.

Figure 10 : Tableau présentant différentes lysines méthyltransférases, nature et propriétés biologiques de leur substrat.

Figure 11 : Mécanismes épigénétiques favorisés des facteurs environnementaux : réponses physiologiques et pathologiques.

Figure 12 : Modifications de la méthylation de l'ADN dans la carcinogenèse et le vieillissement.

Figure 13 : ARN non codants dans le cholangiocarcinome et leur relation avec différents processus tumorigènese.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Variation de l'incidence des CCAs (intra hépatiques-CCAI et extra hépatiques CCAe) dans quelques régions de monde.

Tableau 2 : Facteurs de risque lié aux CCAs.

Tableau 3: Microbiote biliaire (estimée sur le genre bactérien) dans les maladies biliaires.

Tableau 4: Études du microbiote biliaire dans plusieurs maladies biliaires.

Tableau 5 : Méthylation de promoteurs des gènes impliqués dans différents types de cancer.

Tableau 6 : Modifications des histones dans différents types de cancer.

Tableau 7 : Changements de miARN dans différents types de cancer.

Tableau 8 : Altérations épigénétiques dans le cholangiocarcinome.

Tableau 9 : Caractéristiques des patients.

Tableau 10 : Immunohistochimie.

Résumé

Le cancer est la première cause de mortalité en France. Les Cholangiocarcinomes (CCAs) ou cancers des voies biliaires représentent 3% de l'ensemble des cancers digestifs. Le CCA intrahépatique avec 10 à 20 % de l'ensemble, est la deuxième tumeur primitive maligne du foie derrière le carcinome hépatocellulaire (CHC). La bile est un fluide stérile biologique, synthétisé dans le foie, hébergé dans la vésicule biliaire et libéré dans le duodénum après la prise alimentaire. Les populations microbiennes des différentes parties du tractus gastro-intestinal des mammifères (estomac, intestin grêle, colon) ont été étudiées. Des changements dans le microbiote fécal humain (Dysbiose) ont été associés au développement de cancer colorectal, du pancréas et du poumon. La dysbiose est liée aux modifications de l'ADN des cellules de l'hôte ; ces dernières sont davantage liées aux modifications épigénétiques. Bien que les anomalies géniques des tumeurs et les facteurs environnementaux prépondérants dans les CCA soient caractérisés, la carcinogenèse biliaire reste mal connue. En particulier, notre connaissance du microbiote biliaire reste fragmentaire.

Nous avons caractérisé le microbiote biliaire chez des patients atteints du CCA extra-hépatique (CCAe) et chez des sujets témoins sans tumeurs. Des échantillons de bile ont été prélevés lors de la cholangiographie pancréatique rétrograde par voie endoscopique (CPRE) chez 28 patients atteints de CCAe sporadiques et 47 sujets témoins (porteurs de calculs biliaires). La bile a été soumise aux extractions d'ADN bactérien ainsi qu'à la caractérisation de méthylation du génome humain grâce, respectivement, au séquençage d'ARN16s bactérien et des puces de méthylation (Illumina). De plus, les profils de méthylation des gènes ont été caractérisés dans des échantillons tissulaires d'adénocarcinomes pancréatiques et de CCAs.

Nous avons pu montrer une dysbiose biliaire associée aux CCAs, identifier une signature épigénétique liée aux CCAs dont nous avons distingué la spécificité par référence à des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). Deux gènes candidats ont ainsi été sélectionnés à l'issue d'analyses de puces des méthylations et leurs expressions ont été ensuite étudiées par la technique d'immunohistochimie (IHC) dans les tissus tumoraux de CCAs intra- et extra-hépatiques et d'adénocarcinomes pancréatiques. Nous avons conclu sur une possible relation entre la dysbiose biliaire et le niveau d'expression des deux gènes par le phénomène de

dysméthylation. Ces résultats pourraient avoir un impact diagnostique et devenir des cibles thérapeutiques.

Mots clés : Cholangiocarcinomes, Cancers des voie biliaire, Environnement, Séquençage ARNr 16S, Microbiote, bactéries, Dysbiose, Cholangiographie pancréatique rétrograde par voie endoscopique, Epigénétique, CCA intrahépatique, CCA extrahépatique, Adénocarcinome pancréatique, Puces de méthylation, Biles, PBMC, Hypométhylation, Hyperméthylation, IHC, SFN, WISP1.

Abstract

Cancer is the leading cause of death in France. Cholangiocarcinomas (CCAs) or biliary tract cancers represent 3% of all cancers in the GIT. Intrahepatic CCAs (CCAI), with 10 to 20% of the total, are the second most common primary malignant tumor of the liver after hepatocarcinoma. Bile is a biologically sterile fluid, synthesized in the liver, housed in the gallbladder, and released into the duodenum in response to the food intake. Microbial populations, roughly called Microbiota, and housed in different parts of the GIT (stomach, small intestine, colon) have been studied. Changes in the human microbiota (Dysbiosis) have been associated with the development of colorectal, pancreatic and lung cancer. Dysbiosis is strongly associated with DNA alteration in the host cells more through epigenetic pathway rather than somatic gene mutations. Although somatic gene modification within tumours and environmental factors involved in CCAs are characterized biliary carcinogenesis is poorly understood. In particular our knowledge from the biliary microbiota remains fragmentary.

We characterized the biliary microbiota in patients with extrahepatic CCA (CCAe) and in control subjects without tumors (those with lithiasis). Bile samples were collected through Endoscopic Retrograde Cholangio-Pancreatography (ERCP) from 28 sporadic CCAe patients and 47 controls with gallstones. Bile was subjected to bacterial DNA extractions as well as human genome methylation characterization using bacterial RNA16 sequencing and methylation arrays (Illumina), respectively. In addition, gene methylation profiles were characterized in tissue samples from a series of pancreatic adenocarcinoma and CCAs.

We have characterized a biliary dysbiosis associated with CCAs, and identified an epigenetic signature specifically linked with CCAs as assessed by tissue and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) analyses. Two out of gene candidates were selected by methylation chips analysis were further studied by using immunohistochemistry (IHC) in either intra- and extra-hepatic CCA and pancreatic adenocarcinoma tumor tissues. We concluded on a possible relationship between biliary dysbiosis and the expression level of these genes due to the phenomenon of dysmethylation. These results could have a diagnostic impact and become therapeutic targets.

Keywords: Cholangiocarcinomas, Biliary tract cancers, Environment, 16S rRNA sequencing, Microbiota, Bacteria, Dysbiosis, Endoscopic retrograde cholangiopancreatography, Epigenetics, Intrahepatic CCA, Extrahepatic CCA, Pancreatic adenocarcinoma, Methylation chips, Biles, PBMCs, Hypomethylation, Hypermethylation, IHC, SFN, WISP1.

I. Introduction

1. Cholangiocarcinomes (CCAs)

i. Généralité

CCA est une tumeur maligne et hétérogène des voies biliaires qui se développe à partir des cellules épithéliales biliaires ou cholangiocytes (1) (en grec, le mot *chole* signifie bile et *angeion* signifie vaisseau). Chaque cellule biliaire a des caractéristiques différentes en fonction de la localisation dans l'arbre excréto-biliaire de la vésicule biliaire ou dans des canaux de Hering. Ce qui explique la présence des différents sous-types de cholangiocarcinomes (2).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (3) , les cholangiocarcinomes se répartissent en 2 localisations (4) (**Figure 1**):

- 1- Cholangiocarcinomes intra-hépatiques (CCAi) ou périphériques siégeant au sein des parenchymes hépatiques (environ 15 % des cholangiocarcinomes) (5).
- 2- Cholangiocarcinomes extra-hépatiques (CCAe) incluant les Cholangiocarcinomes extra hépatiques proximaux (péri-hilaire) (CCAp) (environ 60 % des cholangiocarcinomes) développés entre les canaux biliaires de second ordre et le canal cystique et les Cholangiocarcinomes extra-hépatiques distaux (CCAd) (bas de cholédoque) développés au niveau de la voie biliaire principale en dessous de la bifurcation du canal cystiques et les adénocarcinomes de la vésicule biliaires (environ 25 % des cholangiocarcinomes) (6–8).

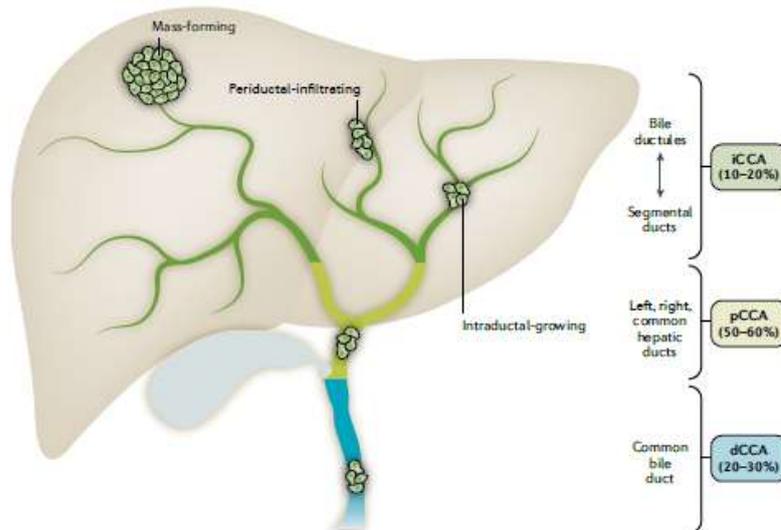


Figure 1: Classification anatomique des cholangiocarcinomes (CCAs). Les CCAs sont classés en CCA intrahépatique (CCAi) et extra_hépatiques (CCAE) incluant les CCA péri-hilaire (CCAp) et CCA distale (CCAd). (Adapté Jesus M. Banales et al.2020) (9).

ii. Epidémiologie

Représentant 3 % des cancers digestifs, les CCAs sont rares et constituent la 2ème tumeur maligne hépatobiliaire la plus fréquente et soit 10 à 20 % de l'ensemble des cancers primitifs du foie (3,6,7) .

En France, le taux d'incidence des CCAs est 1,3 cas pour 100000 (3) (**Figure 2**). Cette incidence est variable selon les régions géographiques et augmente depuis ces 30 dernières années dans les pays occidentaux représentant alors la sixième cause la plus fréquente des lésions malignes du tractus gastro-intestinal dans ces pays. Elle est forte en Asie du Sud-Est (jusqu'à 85/100000 en Thaïlande) et c'est la plus grande valeur mondiale. Cependant, elle est faible dans certains pays d'Occident (0,3/100000 au Canada) (10,11) (**Figure 2**).

Plusieurs études ont rapporté l'incidence des CCAs dans le monde ; les résultats sont résumés dans le tableau suivant (**Tableau 1**).



Figure 2. Représentation de l'incidence mondiale des cholangiocarcinomes (CCAs).
 (Adapté Jesus et al., 2016) (3).

Selon l'OMS et les Bases de données de l'Organisation Pan American de santé (12) qui ont étudié la mortalité dans 32 sites sélectionnée en Europe, en Amérique, en Asie et en Océanie, la mortalité due aux CCAs a augmenté dans le monde au cours des périodes 2000-2004, 2005-2009 et 2010-2014 (Figure3).

La mortalité due aux CCAs est plus élevée chez les hommes que chez les femmes et dans les pays de l'Asie par rapport au reste du monde. Ainsi le taux de mortalité au Japon est estimé à 2,81 pour 100 000 hommes. Toutefois, aux États-Unis, l'augmentation de la mortalité entre 2004 et 2014 chez les Afro-Américains (45%) est estimée supérieure à celle des asiatiques de race jaune (22 %) ou blanche (20 %) (13).

De survenue rare avant 45 ans, l'incidence des CCAS est maximale à la 7ème décade. Les variations de l'incidence et de la mortalité reflètent probablement l'influence des facteurs environnementaux et des prédispositions génétiques potentielles (3,4,14) .

Etudes avec Année	Sous-types CCA	Femme	Homme	Totale
Islande, 2016	CCAI	+	*	ND
	CCAe	+	*	ND
USA, 2016	CCAI	+	+	+
	CCAe	*	*	*
Canada, 2016	CCAI	ND	ND	+
	CCAe	ND	ND	+
Danemark, 2007	CCAI	-	-	-
	CCAe	-	-	-
UK, 2006	CCAI	+	+	ND
	CCAe	-	-	ND

Tableau 1 : Variation de l'incidence des CCAs (intra hépatiques-CCAI et extra hépatiques CCAe) dans quelques régions de monde. (+ augmentation de taux d'incidence ; - diminution de taux d'incidence ; * taux d'incidence stable ; ND : non déterminés).

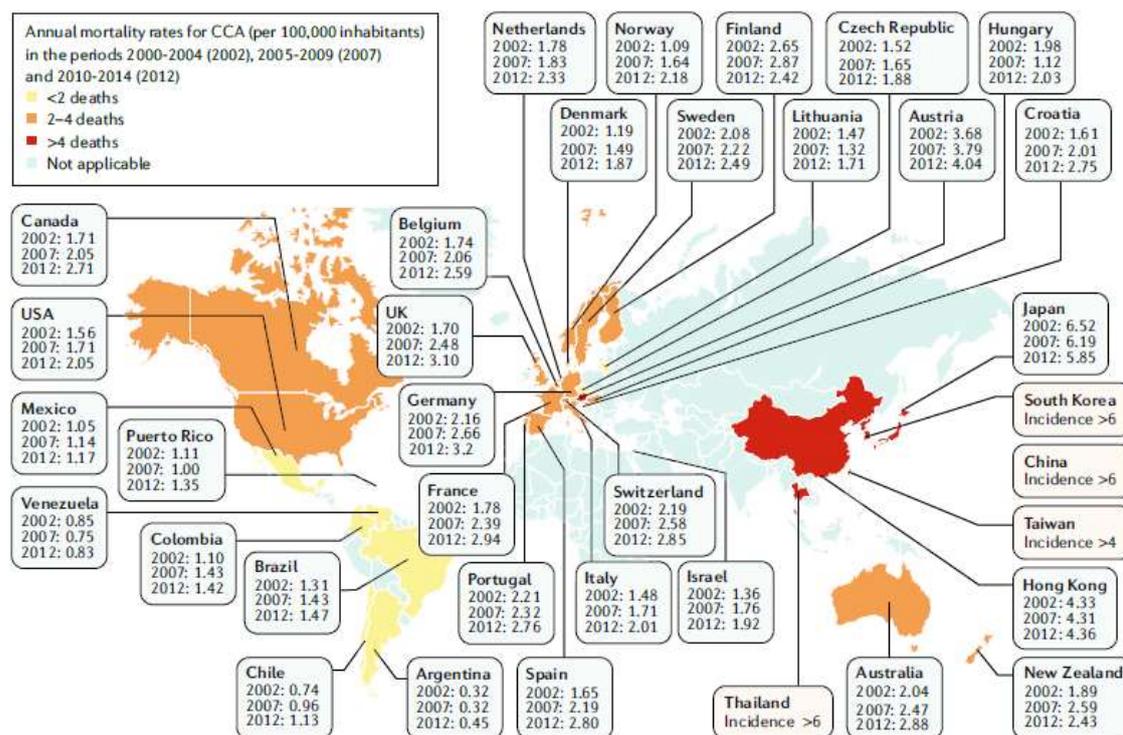


Figure 3 : Représentation de la Mortalité liées aux CCAs dans le monde.

Taux annuels de mortalité par âge dans le monde pour les cholangiocarcinomes (CCAs) (nombre de décès pour 100 000 habitants, y compris les 3 sous types de CCA : CCA intrahépatique, le CCA proximal et le CCA distal). Les données se rapportent aux périodes 2000-2004 (2002), 2005-2009 (2007) et 2010-2014 (2012). Le jaune indique les pays/régions à faible mortalité (<2 décès pour 100 000 personnes), l'orange indique les pays/régions avec une mortalité comprise entre 2 et 4 décès pour 100 000 personnes, et le rouge indique les pays/régions où la mortalité est élevée (>4 décès pour 100 000 personnes). Mortalité dans les pays/régions de l'Est où le CCA est très répandu (c'est-à-dire la Thaïlande, Chine, Taïwan et Corée du Sud) n'ont pas encore été signalés et, par conséquent, l'incidence des CCAs est indiquée dans ces pays. (Adapté Jesus M. Banales et al.2020 ; Banales et al 2016) (3,9).

iii. Facteurs de risque

Les variations géographiques et ethniques dans l'épidémiologie des CCAs reflètent des influences génétiques et environnementales et peuvent rendre compte de l'hétérogénéité de l'entité de CCA. Des facteurs de risque, communs pour les 3 sous types de CCA et des facteurs de risque spécifiques pour chaque sous type de CCA sont rapportés (**Tableau 2**) (3,4). Au cours des dernières décennies (1990-2016), on assiste à une reconnaissance de plusieurs facteurs de risque reconnus à l'échelle mondiale qui pourraient expliquer l'augmentation des taux de

CCAs. Par exemple, la consommation élevée d'alcool, le tabagisme et dans une moindre mesure, les infections virales (virus B et C de l'hépatite VHB ou VHC), ont été rapportées comme des facteurs augmentant le risque de développement de CCA (15). De la même manière, l'obésité ainsi que le syndrome métabolique et/ou la présence d'une stéatose hépatique non alcoolique (NASH), méritent une attention centrale à l'avenir en raison de leur forte distribution (15).

Une caractéristique commune à ces facteurs de risque est qu'ils sont associés à une inflammation chronique de l'épithélium biliaire et à la stase biliaire. Dans la littérature des études case-témoin et méta-analyses ont rapporté des facteurs de risque de CCA. Parmi les autres maladies inflammatoires qui exposent au risque de CCA, on peut citer l'inflammation chronique de l'épithélium biliaire et de stase biliaire (16).

On peut citer la rectocolite hémorragique (RCH) et la cholangite sclérosante primitive (CSP), deux pathologies bénignes représentant deux principaux facteurs de risque de survenue de CCA dans en occident (17). On estime que 10 à 15 % des patients avec CSP développeront un CCA.

En Asie du Sud-Est, un sous type des CCAs est associé aux infections parasitaires par *Opisthorchis Viverrini* (avec un risque relatif majoré de 2550) et, de façon moins bien établie, aux infections par *Clonorchis Sinensis*. En Thaïlande, où le CCAi est le cancer le plus fréquent, la cause est essentiellement parasitaire par des douves *Opisthorchis Viverrini* et *Clonorchis Sinensis* (18).

De plus, les facteurs de risque connus pour le carcinome hépatocellulaire CHC : cirrhose est plus récemment identifié comme facteur favorisant les CCAi. La cirrhose constituait un facteur de risque significatif (25 % des cas) du cholangiocarcinome intrahépatique. Une consommation excessive d'alcool, notée chez près de la moitié des patients, était associée de façon significative aux deux types de cholangiocarcinomes (19).

D'autres études ont mis en évidence une relation entre l'existence d'un diabète, la consommation de tabac ou un antécédent de cholécystectomie et la survenue d'un CCA intra- ou extra hépatique (20).

Les maladies kystiques congénitales, comme le kyste du cholédoque; le syndrome de Caroli et la fibrose hépatique congénitale sont aussi des facteurs de risque (21) (22).

L'ensemble des facteurs de risque liés aux CCAs est représenté dans le **tableau 2**.

Facteurs de risques	Types d'études	OR de l'étude sélectionnée
Kyste cholédocien (15)	Méta-analyse	OR 26,71 pour CCAi OR 34,94 pour CCAe
Lithiase cholédocienne (15)	Méta-analyse	OR 10,08 pour CCAi OR 18,58 pour CCAe
Cholécystite lithiasique (15)	Méta-analyse	OR 1,75 pour CCAi OR 2,94 pour CCAe
Maladie de Caroli (23)	Étude en population	OR 38 pour CCAi OR 97 pour CCAe
Cholangite sclérosante primaire (23)	Étude en population	OR 22 pour CCAi OR 41 pour CCAe
Cirrhose (15)	Méta-analyse	OR 15,32 pour CCAi OR 3,82 pour CCAe
Hépatite chronique B (15)	Méta-analyse	OR 4,75 pour CCAi OR 2,11 pour CCAe
Hépatite chronique C (15)	Méta-analyse	OR 4,28 pour CCAi OR 1,98 pour CCAe
Hémochromatose (23)	Étude en population	OR 2,1 pour CCAi
Maladie inflammatoire chronique intestinale (15)	Méta-analyse	OR 2,68 pour CCAi OR 2,37 pour CCAe
Pancréatite chronique(23)	Étude en population	OR 2,7 pour CCAi OR 6,6 pour CCAe

Douve du foie (<i>Opisthorchis viverrini</i> , <i>Clonorchis sinensis</i>) (24)	Méta- analyse	OR 5 iCCA > Ecca
Diabète de type 2 (25)	Méta- analyse	OR 1,73 pour CCAi OR 1,5 pour CCAe
Maladie du foie gras non alcoolique (26)	Méta- analyse	OR 2,2 pour CCAi OR 1,5 pour CCAe
Obésité (15)	Méta- analyse	OR 1,14 pour CCAi OR 1,2 pour CCAe
Hypertension (15)	Méta- analyse	OR 1,10 pour CCAi OR 1,21 pour CCAe
Alcoolisme (15)	Méta- analyse	OR 3,15 pour CCAi OR 1,75 pour CCAe
Tabagisme (15)	Méta- analyse	OR 1,25 pour CCAi OR 1,69 pour CCAe

Tableau 2 : Facteurs de risque lié aux CCAs. Les facteurs de risques communs aux trois sous types de CCA ou spécifique de chaque sous-type sont distingués. OR : Odd ratio désigne le risque relatif lié à ce facteur ; CCAe : Cholangiocarcinome extrahépatique ; CCAi : Cholangiocarcinome intrahépatique. (Adaptée Référence 14,23-26 ; Jesus M. Banales et al.2020) (9).

iv. Diagnostic

Il peut être difficile de diagnostiquer le CCA en raison de sa nature paucicellulaire, de sa localisation anatomique, et des signes cliniques discrets. Le diagnostic nécessite une approche pluridisciplinaire qui fait appel à la fois à la clinique, des examens biochimiques, radiologiques et histologiques. Les circonstances de découverte d'un CCA diffèrent selon la localisation mais le diagnostic histologique est le plus souvent tardif conduisant à un stade avancé de la tumeur. Environ 5-10 % des cancers biliaires sont diffus ou multifocaux (Thésaurus National de Cancérologie Digestive 2008).

a) Clinique – Biologie

Les CCAs sont généralement asymptomatiques au cours des premiers stades. Le symptôme le plus fréquent de CCA péri-hilaire (proximal) et de CCA distal est l'ictère en raison d'une obstruction des voies biliaires (27). L'ictère est moins fréquent dans le CCAi, et surtout associé à la maladie à un stade avancé. Les autres symptômes sont ceux d'une maladie néoplasique avancée telle l'asthénie, des douleurs abdominales, la nausée, l'anorexie et la perte de poids. Des examens complémentaires biologiques mettent en évidence l'origine choléstatique de l'ictère, une cytolyse. Les taux sériques de biomarqueurs tumoraux non spécifiques, tels que CA19-9, sont actuellement mesurés pour aider à diagnostic différentiel d'un processus évoquant un CCA, mais ils ne sont pas fiables en raison de leur faible sensibilité et les faux positifs en cas de cholestase biologique en particulier dans les stades précoces de la maladie (28). Ce marqueur a un intérêt indiscutable dans le suivi des patients ou en cours de traitement.

Des troubles d'hémostase peuvent être notés chez des patients ictériques depuis plus de trois semaines en raison du défaut de synthèse des facteurs Vitamine K dépendants habituellement constaté lors du défaut d'absorption de la bile par l'intestin.

b) Imagerie

Différentes techniques d'imagerie peuvent être utilisées pour le diagnostic des CCAs : échographie (US), tomodensitométrie (TDM) CT-scan, cholangio-pancréatographie rétrograde endoscopique (CPRE), imagerie par résonance magnétique-IRM ou cholangio-pancréatographie par résonance magnétique bilio-IRM, et la tomographie par émission de positons au 2- [18] -Fluoro-2-désoxy-D-glucose couplée à un scanner dédié (TEP-TDM-FDG). Enfin la cholangiographie transhépatique percutané, réalisée exceptionnellement en cas de difficulté d'accès par voie endoscopique rétrograde (estomac opéré ; cancer du hile ; sténose duodénale ; etc...).

La **CPRE** est l'examen clef à visée diagnostique et thérapeutique dans l'ensemble des CCAs. Il s'agit d'une technique invasive permettant le recueil d'effluent biologique (bile) dans lequel des cellules isolées serviront d'examen (cytologie) spécifique pour le diagnostic positif de CCA. Le **dispositif Spyglass** en association à la CPRE permet dans des cas sélectionnés à procéder à des prélèvements tissulaires par biopsies. Ailleurs l'examen histologique peut être réalisé sur les biopsies écho guidées ou dirigées sous scanner et/ou des pièces chirurgicales.

L'Échographie hépato-biliaire montre une ou des masses intrahépatiques sans ou avec peu de dilatation de voies biliaires faisant évoquer le CCAi ; ailleurs elle montre une dilatation des voies biliaires intrahépatique au-dessus d'un obstacle hilair et/ou extrahépatique en rapport avec un CCAe. Le scanner injecté hépato biliaire et la bilio-IRM restent les examens de choix pour les CCAs distaux (29).

Diagnostic des CCAs selon les sous types :

-CCA intrahépatique : Le diagnostic de CCA intrahépatique est généralement effectué comme pour une lésion de masse hépatique, souvent lors de la surveillance de routine par imagerie chez les patients atteints de cirrhose ou de cholangiopathie intra hépatique; Chez les patients atteints de cirrhose, l'échographie la surveillance du patients atteints et traités pour carcinome hépato cellulaire (CHC) permet le diagnostic de CCAi à un stade précoce (30). Dans un foie cirrhotique, le diagnostic différentiel du CHC et de CCAi peut être difficile. Le marqueur tumoral CA 19-9 est le principal biomarqueur sérique utilisé dans le diagnostic des cholangiocarcinomes (31) (32) est normal en cas de CHC ; les niveaux de CA 19-9 >1 000 U/ml ont été associés à la présence de maladies métastatiques (33).

-CCA extra hépatique proximal ou péri-hilaire : la tomodensitométrie, l'IRM et la cholangiopancréatographie par résonance magnétique Bilio-IRM sont utilisées pour la détection de CCA péri-hilaire.

L'échographie endoscopique (EchoEndo) seule est associée à un taux élevé de détection des tumeurs par rapport à l'utilisation de la tomodensitométrie ou de l'IRM, avec une meilleure performance dans la détection de CCAe par rapport à CCAi (100 % contre 83 %, respectivement) (30). L'aspiration à l'aiguille fine lors de l'EchoEndo est l'outil majeur de diagnostic. Toutefois, elle comporte un risque de pancréatite dans les cas de CCA intra pancréatique. La biopsie transcutanée sous contrôle radiologique est possible mais elle comporte un risque d'ensemencement de la tumeur: parmi 191 patients atteints de CCAp, 5 patients sur 6 (83%) ayant subi une biopsie transpéritonéale de la tumeur primaire et ont développé des métastases péritonéales, contre 14 sur 175 (8%) de ceux qui n'ont pas subi de biopsie transpéritonéale (34).

La cholangiopancréatographie rétrograde endoscopique (CPRE) est également utilisé dans le diagnostic de CCA péri-hilaire en permettant la détection des sténoses biliaires malignes d'une

part, et l'acquisition d'échantillons de brossage biliaire pour une évaluation cytologique et génétique.

c) Cytologie-Histopathologie

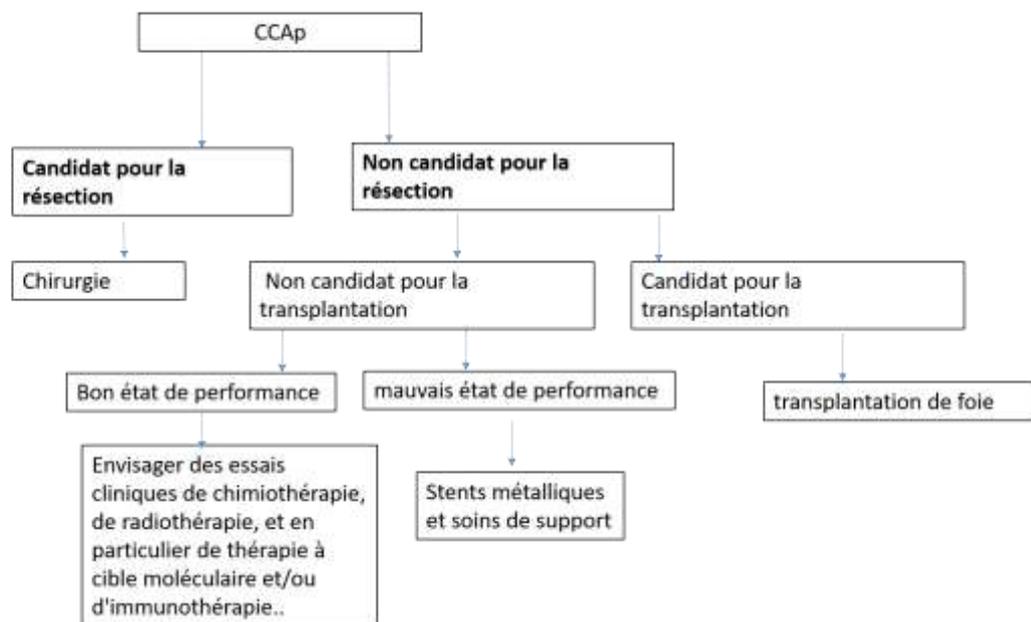
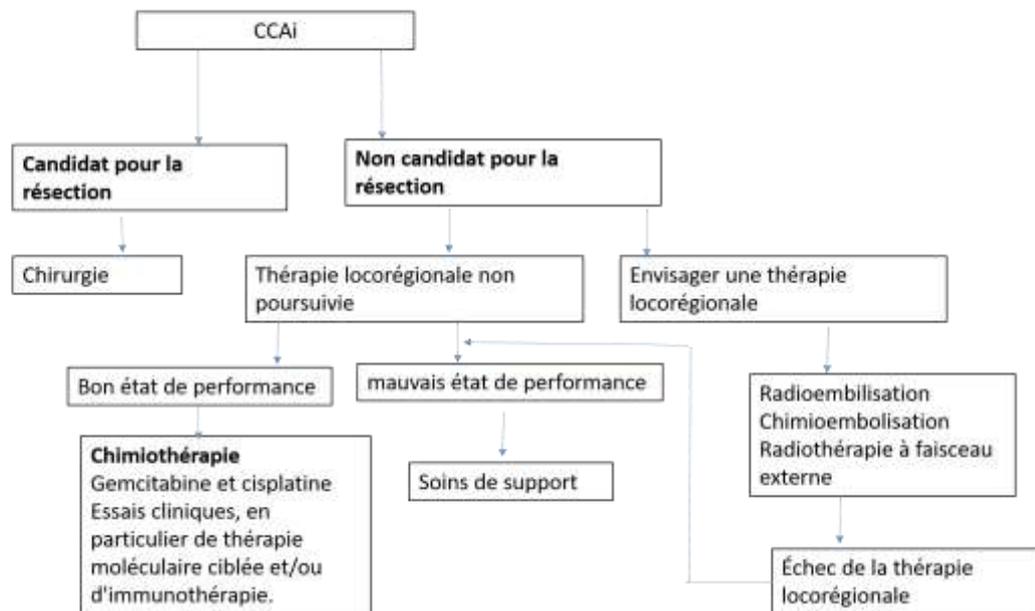
Les techniques cytologiques présentent un intérêt dans le diagnostic de CCA péri-hilaire mais ils sont difficiles à gérer en raison de la difficulté des prélèvements adéquats. Le séquençage de nouvelle génération (NGS) de cibles oncogènes connues ou candidates peut améliorer l'utilité diagnostique de la cytologie biliaire classique.

Les techniques histologiques sont possibles par voie endoscopique rétrograde dans les CCA intrapancréatique ou lors de l'utilisation de Spyglass ; ailleurs c'est par voie transcutanée d'une masse intrahépatique et/ou hilaire.

d) Immunohistochimie (IHC)

L'IHC est devenue une technique d'appoint indispensable en anatomie pathologique. Elle ne peut être interprétée qu'en fonction des orientations diagnostiques cliniques et morphologiques. Les biomarqueurs dans les tissus tumoraux peuvent être d'une valeur particulière pour les CCA, car ils pourraient prédire le pronostic (c'est-à-dire la survie globale et la récurrence tumorale) et la réponse aux thérapies adjuvantes potentielles. Des marqueurs ont été identifiés par IHC chez les CCA qui à la fois peuvent réduire le temps et faciliter le diagnostic des CCA pour une prise en charge plus rapide et plus efficace. PROM1 (Prominin-1/CD133) (35), CTGF (Facteur de croissance du tissu conjonctif) (36), VIM (Vimantine) (37) et SOX2 (SRY-box 2) (38) ont montré une forte expression chez les CCA par IHC.

-CCA distal: Les mêmes outils qui sont utilisés pour le diagnostic de CCAp, tomographie assistée par ordinateur (CT), Cholangiopancreatographie-IRM (CPRM), Echo-endoscopie la CPRE sont utilisées pour diagnostiquer CCA distal.



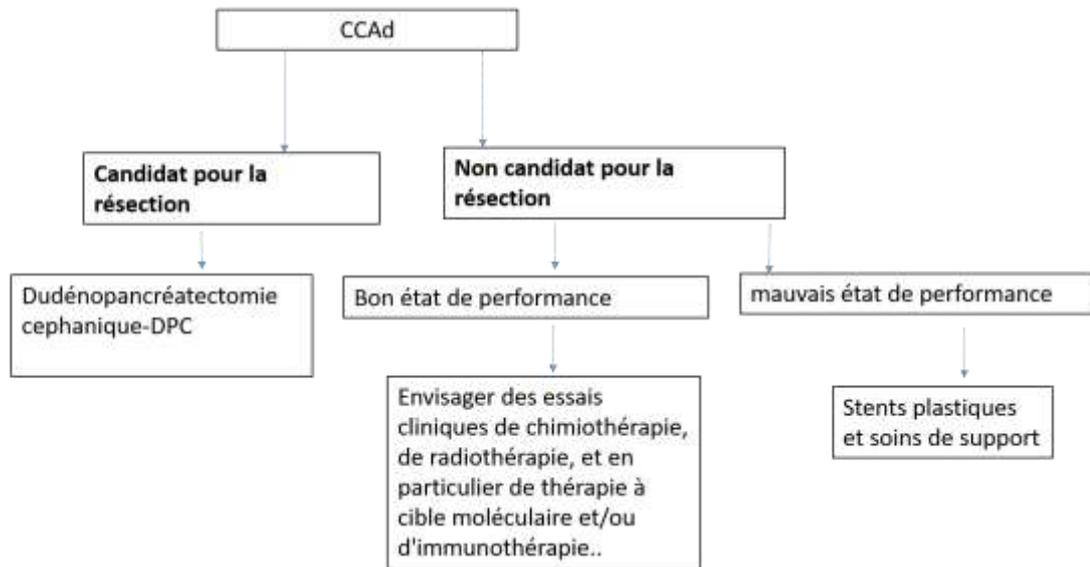


Figure 4: Prise en charge des trois sous-types de CCA. (Adapté Sumera et al.2018) (4).

v. Prise en charge des patients atteints de CCA

Chez la plupart des patients atteints de CCA, le diagnostic est effectué tardivement, lorsque la maladie est à un stade avancé, et lorsque les options thérapeutiques sont réduites, ce qui aboutit à un pronostic sombre. Toutefois, dans la faible proportion de cas, à un stade précoce (~35%) de CCAi, les résections de la tumeur ou la transplantation du foie peut être potentiellement le traitement curatif (3).

-Chirurgie et transplantation hépatique : Actuellement le traitement à visée curative des CCAi est la chirurgie. Cette chirurgie présente certaines spécificités techniques en fonction de la localisation du cancer. La résection chirurgicale de CCAp est une option potentiellement curative pour les patients ne présentant pas les critères d'exclusion suivants : atteinte bilatérale des voies biliaires de second ordre, atteinte vasculaire bilatérale ou controlatérale, présence d'une maladie métastatique et cholangite sclérosante primaire (CSP). Les progrès chirurgicaux, tels que la lobectomie étendue, la reconstruction vasculaire et les techniques permettant d'augmenter le volume du foie restant ont facilité la résection de tumeurs traditionnellement considérées comme non résecables (39–42). Cependant, seule une

minorité de patients atteints de la maladie à un stade précoce sont des candidats pour cette option de traitement. Les critères de sélection - chez un candidat par ailleurs approprié pour une transplantation hépatique - comprennent la présence d'une tumeur non résécable d'un diamètre radial <3 cm et l'absence de métastases intrahépatiques ou extrahépatiques (43). La transplantation hépatique après une radi-chimiothérapie néoadjuvante offre les meilleurs résultats pour les patients atteints de CCAp non résécable (43).

-Chimiothérapie : L'association de gemcitabine et d'oxaliplatine est actuellement la chimiothérapie de première intention pour les patients atteints d'un cholangiocarcinome à un stade avancé qui ne se prête pas aux options chirurgicales, quel que soit le sous-type anatomique de la maladie. Une étude (44) a rapporté une survie médiane de 11,7 mois avec cette association contre 8,1 mois avec la gemcitabine seule.

-Immunothérapie : Le système immunitaire est le système dédié à reconnaître et à détruire les cellules cancéreuses. Il est régulé par un réseau complexe de points de contrôle immunitaires qui empêchent une activation immunitaire incontrôlée. Les cancers possèdent plusieurs mécanismes d'échappement immunitaire qui limitent la réponse immunitaire anti-tumorale. L'expression de protéines de contrôle immunitaire, telles que l'antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4) et la protéine 1 de la mort cellulaire programmée (PD-1), et la perte d'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sont les principaux points cibles. Les mécanismes exacts qui sous-tendent l'échappement immunitaire des cholangiocarcinomes restent à élucider. Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire, des anticorps qui bloquent les interactions inhibitrices entre CTLA-4 ou PD-1 et leurs ligands ont démontré une activité antitumorale robuste et durable chez des sous-ensembles de patients (45). En effet, divers inhibiteurs de points de contrôle immunitaires ont maintenant été approuvés pour le traitement de plusieurs tumeurs malignes. Les études en cours sur ces agents, les thérapies combinées et les nouvelles thérapies cellulaires (46) sont très prometteuses pour identifier de nouvelles indications, améliorer les taux de réponse actuels, affiner la sélection et le séquençage des traitements et lever la résistance aux traitements.

-Thérapies ciblées : Pour les patients atteints de CCA qui ne sont pas candidats à une résection chirurgicale ou à une transplantation hépatique, il convient d'envisager l'inclusion dans des essais cliniques, en particulier ceux évaluant un traitement ciblé.

-Radiothérapie : Les progrès technologiques ont amélioré la sécurité et l'efficacité de la radiothérapie externe pour le cholangiocarcinome, classiquement non retenue en raison de la toxicité des organes adjacents (47). La tomодensitométrie hélicoïdale multiphase à haute résolution et l'IRM multiparamétrique du foie et de l'arbre biliaire ont permis une détermination plus précise de la localisation du cancer et de l'étendue du ciblage de la radiothérapie. De plus, la planification du traitement et le calcul des doses basés sur la tomодensitométrie permettent une estimation précise des doses de rayonnement délivrées à la tumeur et aux tissus non malins (48,49). En outre, des techniques de radiothérapie externe avancées, telles que la radiothérapie conformationnelle 3D (RTC-3D) et la radiothérapie par modulation d'intensité (IMRT), sont utilisées pour délivrer un rayonnement conforme à la cible tout en épargnant les tissus non malins.

La curiethérapie guidée par l'image et à haut débit de dose peut également être utilisée comme traitement primaire ou pour fournir un rappel de rayonnement à des patients sélectionnés atteints d'une maladie localisée (50,51). Ensemble, ces avancées technologiques pourraient permettre une augmentation de la dose de radiothérapie aux tumeurs biliaires et / ou une meilleure protection des tissus non malins, améliorant ainsi le rapport thérapeutique de la radiothérapie dans le traitement des cholangiocarcinomes.

vi. Evolution et pronostic

En l'absence de traitement, la médiane de survie dans les cholangiocarcinomes avancé ou métastatique est de l'ordre de 3 à 6 mois. Seul un traitement chirurgical agressif permet d'améliorer la survie pour atteindre environ 2 ans. Ainsi, dans les CCAi, la survie à 5 ans varie de 8 à 47% après résection ; les chiffres de survie étant meilleurs avec des marges de résection saines (16). Néanmoins, malgré une résection optimale, les taux de récurrence à 5 ans peuvent atteindre 79% dans les séries publiées actuellement (52).

Une survie de plus de 5 ans après résection a été rapporté dans 22 à 44% des CCAi, 11 à 41% des CCAp et 27 à 37% des CCAd (53).

2. Microbiote

Dans ce chapitre, nous allons présenter, le microbiote en générale, puis le microbiote intestinal son rôle vis-à-vis l'hôte et son rôle dans le cancer. Après nous verrons le microbiote biliaire, plus précisément la sécrétion de la bile et son interaction avec le microbiote intestinale et la colonisation bactérienne des voies biliaires. La dernière partie sera consacrée à présenter des études qui traitent du microbiote biliaire dans des conditions physiologiques et pathologiques.

i. Généralité

Les cancers digestifs sont pour la majorité liés aux facteurs de l'environnement. Il n'est pas aisé d'appréhender l'environnement dans son exhaustivité. C'est pourquoi, l'étude du microbiote, pourrait permettre d'analyser l'impact de l'environnement sur les cellules épithéliales (incluant la muqueuse biliaire), dans le cadre du processus de carcinogénèse.

Le microbiote humain est l'ensemble des microorganismes non pathogènes dit commensaux (bactéries, virus, parasites, champignons) hébergés par le corps humain (54). Ces bactéries se situent au niveau de tube digestif, dans bouche, sur la peau et dans les cavités (**Figure 5**).

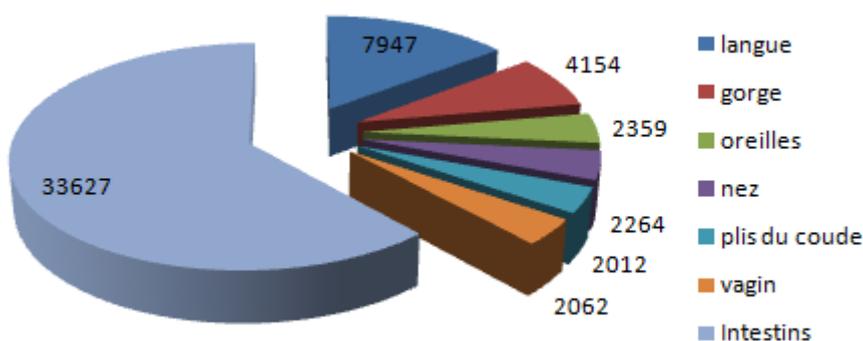


Figure 5 : Nombre et répartition des espèces bactériennes dans le corps humain.
Etude réalisée sur 200 sujets. (Adapté Huse SM et al 2012) (55).

Différentes études ont suggéré et mis en évidence le rôle important des microbiotes dans la physiologie de l'hôte. En effet, une interaction entre nos microbes et nos cellules dès notre

naissance et tout au long de la vie est à l'origine de nombreuses fonctions essentielles pour assurer l'hémostase humaine (**Figure 6**) (56,57).

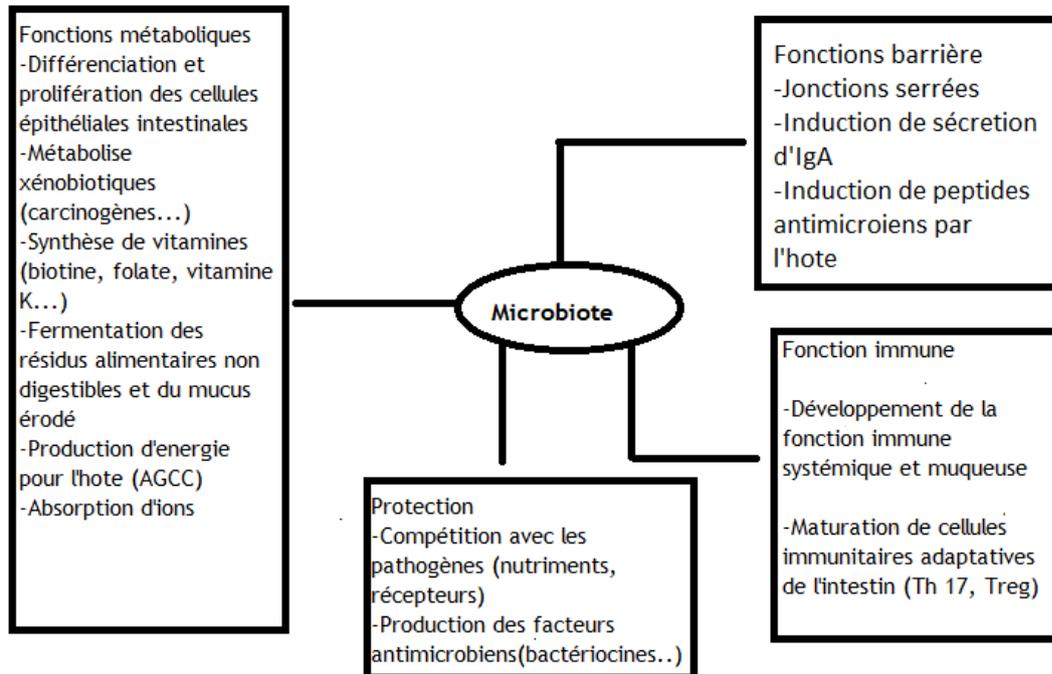


Figure 6 : Différents fonctions du microbiote intestinal vis-à-vis l'hôte. (Adapté Carole Fumat. Microbiote et immunité intestinale).

i. **Microbiote du tube digestif**

Le tractus gastro-intestinal des humains et d'autres mammifères abrite un microbiote complexe (essentiellement des bactéries) environ 10^{14} à 10^{15} microorganismes, le microbiote intestinal. Des variations quantitatives et qualitatives sont observées au niveau de microbiote intestinal tout au long du tube digestif de la bouche jusqu'à l'anus (**Figure 7**). Chaque individu possède son propre microbiote.

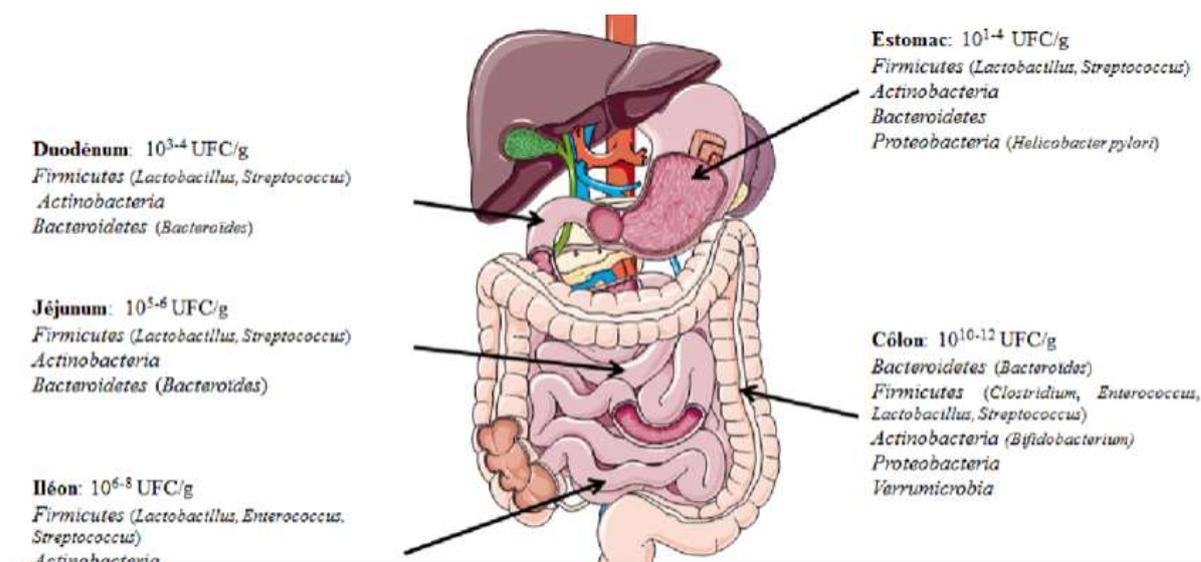


Figure 7 : Composition de la flore bactérienne dans les différentes parties du tractus gastro-intestinal. (Adapté Le Lay | 2015) (58).

La majorité des études portant sur la caractérisation de celui-ci, ont été axées sur le microbiote du colon, en raison de l'accès facile aux échantillons (selles ou biopsies tissulaires) et de l'abondance bactérienne très élevée. Des études ont suggéré un rôle important du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte. La composition bactérienne de microbiote respecte une symbiose (équilibre) entre les entérocytes et les microorganismes dans des conditions physiologiques. Les 3 phyla bactériens qui dominent le microbiote intestinale sont le phylum *Firmicutes*, *Bacteroidetes* et *Actinobacteria* (59). Lors de l'apparition d'un état pathologique, on observe une rupture de cet équilibre, qui se manifeste par une perte de diversité bactérienne, c'est la dysbiose (60).

La majorité des bactéries qui compose le microbiote n'est pas cultivable. L'approche métagénomique, qui consiste à séquencer l'ensemble du génome bactérien (métagénome) a récemment permis de s'affranchir des limites relatives à la culture bactérienne traditionnelle. La métagénomique quantitative permet d'identifier et d'estimer la diversité phylogénétique bactérienne. De plus, le génome bactérien (microbiome) permettra la déclinaison fonctionnelle du milieu.

L'alternative à l'étude du métagénome entier, longue et coûteuse, est de procéder au séquençage nucléotidique de l'ARN ribosomique 16S qui permet d'établir une classification taxonomique basée sur l'homogénéité des séquences. Les différentes espèces bactériennes

peuvent être classées selon leur appartenance à un Phylum, puis Class, Ordre, Famille, Genre, Espèce et parfois Sous-Espèce (61).

ii. Cancers et microbiote

La relation entre le cancer et les microbiotes est complexe. Le cancer soit est considéré comme un trouble lié à la génétique de l'hôte et ou bien à des facteurs environnementaux. Les microorganismes sont impliqués dans ~15% des tumeurs malignes humaines (62). Les microbes présents au niveau des muqueuses peuvent faire partie du microenvironnement tumoral des tumeurs malignes du tractus aérodigestif (63–67).

Le microbiote contribue à la cancérogenèse en modifiant les risques de l'hôte selon trois catégories :

- 1- Modification de l'équilibre entre prolifération et mort des cellules de l'hôte
- 2- Modification du fonctionnement du système immunitaire
- 3- Modification du métabolisme de l'hôte.

Le microbiote intestinal joue également un rôle dans la détoxification des composants alimentaires, la réduction de l'inflammation et le maintien d'un équilibre dans la croissance et la prolifération des cellules hôtes. La possibilité de thérapies anticancéreuses à base de microbes suscite l'intérêt depuis plus de 100 ans, depuis les toxines de Coley (68) (l'une des premières formes de bactériothérapie anticancéreuse) jusqu'à l'ère actuelle des microbes de conception de la biologie synthétique et des greffes de microbiote. L'étude des rôles des microbes et du microbiote dans le cancer nécessite donc une perspective globale.

Sur les $3,7 \times 10^30$ microbes vivant sur Terre (69), seuls 10 sont désignés par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) comme étant cancérogènes pour l'homme (62). Bien que la plupart de ces microbes cancérogènes colonisent de larges pourcentages de la population humaine, seul un sous-ensemble d'individus affectés développe un cancer.

Les tumeurs apparaissant sur les surfaces limites, telles que la peau, l'oropharynx, les voies respiratoires, digestives et urogénitales qui abritent un microbiote, ce qui complique l'étude de causalité cancer-microbe. L'enrichissement d'un microbe sur le site d'une tumeur ne signifie pas que ce microbe est directement associé à la maladie, et encore moins qu'il en est la cause. Les microbes peuvent plutôt trouver la tension d'oxygène ou les sources de carbone d'une tumeur permissives et profiter d'une niche nutritionnelle sous-utilisée. La diminution

de l'abondance de certains microbes peut également exposer l'hôte à un risque accru de développement d'un cancer sur des sites locaux ou éloignés de ce changement microbien. Il est donc essentiel de disposer de cadres rigoureux pour interpréter les données sur le microbiote associé aux tumeurs (65).

En 1956, Warburg a émis l'hypothèse que l'altération du métabolisme cellulaire est à l'origine de la carcinogenèse (70), et le métabolisme des cellules cancéreuses est actuellement une cible thérapeutique prometteuse (71). Les microbes participent à une gamme d'activités métaboliques de l'hôte. Les métabolites microbiens ou co-métabolites (générés avec les contributions de l'hôte et du microbe) peuvent contribuer au tonus inflammatoire et peuvent influencer l'équilibre de la prolifération et de la mort cellulaire dans les tissus (64). La prise en compte des effets du métabolisme d'un microbiote, et en particulier des métabolites microbiens générés dans le microenvironnement tumoral, sur la croissance et la propagation du cancer ajoute un autre angle thérapeutique et diagnostique pour cibler les cancers par des altérations métaboliques.

Il est aujourd'hui clairement établi que le microbiote intestinal joue un rôle dans certaines pathologies du système digestif (cancer colorectal, cancer gastrique, cancer de l'œsophage), dans le cancer de foie et de pancréas et le microbiote orale joue un rôle dans le cancer des poumons.

Dans le tractus gastro-intestinal, une dysbiose à la fois qualitative, quantitative et fonctionnelle chez les individus atteints de cancer colorectal (CCR) a pu être définie. L'équipe EC2M3 (EA7375 UPEC) a mis en évidence une augmentation significative des genres bactériens *Prevotella* et *Fusobacterium*, ainsi qu'une diminution de *Faecalibacterium*, *Coriobacteridae* et *Roseburia* chez les personnes atteintes de CCR (72).

Le cancer gastrique est considéré comme un cancer associé à un processus inflammatoire chronique. Connu comme facteur de risque de classe I, infection par *Helicobacter pylori* peut stimuler les réponses immunitaires et l'inflammation, réguler de nombreuses voies de signalisation, et induit l'atrophie épithéliale et la dysplasie (73).

Une étude utilisant le séquençage de l'ARNr 16S a montré que la communauté microbienne chez les individus avec *H. pylori*-positifs se caractérisent par une augmentation des nombres de *Proteobacteria*, de *Spirochètes* et d'*Acidobactéries*, ainsi qu'une diminution du nombre d'*Actinobactéries*, de *Actéroïdes*, et *Firmicutes* (74). Inversement, chez les individus *H. pylori*-

négative les phylums les plus abondants sont les *Firmicutes*, *Bacteroidetes* et *Actinobacteria* (75). La dysbiose microbienne est également associée à la carcinogénèse gastrique (76). L'utilisation de PCR quantitative, a été démontré que les patients atteints de cancer gastrique portent une composition très diversifiée de microbiote, illustrée par la réduction de *Porphyromonas*, *Neisseria*, le groupe *TM7*, *Prevotella pallens*, *Streptococcus sinensis* et simultanément l'enrichissement de *Lactobacillus coleohominis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *Lachnospiraceae* (77–79).

L'œsophage est traditionnellement considéré comme un lieu exempt de microbes, avec des passagers microbiens limités provenant de la déglutition et du reflux gastro-œsophagien. En appliquant la technologie de séquençage de l'ARNr 16S, des études ont montré que certains microbes spécifiques peuplent la muqueuse œsophagienne, notamment les phyla *Firmicutes*, les *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, et *Fusobacteria*. En outre, des communautés microbiennes distinctes ont été trouvées dans l'œsophage d'individus atteints de carcinome épidermoïde de l'œsophage (CEO) (stade I-II) et de dysplasie squameuse de l'œsophage (DSE) par rapport à l'œsophage normal (80).

Conformément au microbiote de la muqueuse normale gastrique, les phyla les plus courants dans les échantillons de la CEO et DSE sont les *Protéobactéries*, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* (80), qui sont impliqués dans le processus tumorigène de l'œsophage lorsque le microbiote œsophagien est en dysbiose (81,82).

Bien que le foie soit généralement considéré comme stérile, l'environnement hépatique est influencé par les agents pathogènes ou les métabolites produits par le microbiote du tube digestif par le biais du système veineux portal (83).

Le foie exerce un effet essentiel sur la communauté microbienne de l'hôte en filtrant le flux sanguin et en ainsi qu'en métabolisant et en neutralisant les toxines provenant des microbes intestinaux. La dysbiose microbienne intestinale contribue à l'hépatocarcinogénèse car le microbiote et les métabolites microbiens sont détectés par les cellules immunitaires résidant dans le foie et sont capables de modifier le métabolisme hépatique (83). La stéatose hépatique non alcoolique (NASH) est considéré comme le principal facteurs de risque du carcinome hépatocellulaire (CHC). Il convient de noter que la dysbiose du microbiote intestinal est l'un des principaux inducteurs de la stéatose hépatique non alcoolique (84,85). L'abondance d'*E. coli* dans les selles des patients atteints de CHC est beaucoup plus importante que celle dans les selles des témoins sains (86).

Le pancréas est un organe digestif extra-gastrique. L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC), un des cancers les plus mortels dans le monde, est le type le plus courant de cancer du pancréas. Des études ont démontré que le microbiote intestinal pourrait influencer la carcinogénèse du pancréas (87,88) en favorisant l'inflammation, en activant la réponse immunitaire, et en perpétuant l'inflammation associée au cancer (89).

Le poumon est constamment exposé aux microorganismes présents dans l'air et dans les voies respiratoires supérieures. L'acquisition du microbiome pulmonaire est un événement crucial chez le nouveau-né pour protéger le poumon des lésions (90). Le tissu pulmonaire héberge un microbiote actif et unique avec moins de diversité, comparé à celui de l'intestin, Ce microbiote est moins affecté par les médicaments, et les habitudes alimentaires, ce qui peut créer une pression sélective sur les communautés qui se reproduisent. La composition spécifique du microbiome pulmonaire résulte de l'équilibre de trois phénomènes: l'immigration microbienne, l'élimination microbienne et les taux de reproduction relatifs (91).

Une étude évaluant le microbiote salivaire a révélé que les profils bactériens sont significativement différents chez les patients atteints de cancers des poumons par rapport à ceux des sujets témoins. En particulier, *Capnocytophaga*, *Selenomonas* et *Veillonella* se sont révélés plus abondants chez les patients atteints de carcinome épidermoïde pulmonaire et d'adénocarcinome alors que *Neisseria* était moins abondant que chez les témoins (92). Une autre étude a comparé des échantillons de brossage bronchique provenant du site cancéreux et du site non cancéreux controlatéral de 24 patients atteints de cancer de poumon et de 18 témoins sains. Les auteurs ont démontré que le microbiote associé au cancer des poumons est extrêmement divergent de celui trouvé chez les sujets sains avec une diminution significative de la diversité microbienne. Le genre *Streptococcus* était significativement plus abondant dans les cas de cancer que dans les contrôles, tandis que *Staphylococcus* était plus abondant dans les contrôles (93).

Bard et al (94) ont évalué la composition du microbiote intestinal chez les patients atteints du cancer de seins avec des caractéristiques cliniques différentes. La majorité des participants présentaient un carcinome canalaire invasif de stade précoce. Les patients atteints d'un cancer de grade III (n = 7) avaient des nombres absolus plus élevés de *Blautia spp.* par rapport aux patients de grade I (p = 0,048). De plus, les nombres absolus de *Bifidobacterium* et *Blautia*, et les proportions de *Faecalibacterium Prausnitzii* et *Blautia*, variaient selon les stades cliniques, suggérant que le microbiote intestinal pourrait être lié au développement et à

l'évolution du cancer des seins. Dans cette étude, des différences significatives ont également été observées pour les nombres absolus de bactéries totales et pour certaines groupes bactériens (*Faecalibacterium Prausnitzii*, *Firmicutes*, *Blautia* et *Egerthella*) selon l'indice de masse corporelle (IMC).

Une autre étude a montré que les phyla *Firmicutes* et *Bacteroidetes* étaient également les bactéries les plus nombreuses observées dans les selles de 31 femmes atteintes d'un cancer du sein à un stade précoce (95). Cette étude a évalué la relation entre la composition du microbiote intestinal avec les caractéristiques clinico-biologiques du cancer du sein.

Le nombre total de *Bacteroidetes*, *Clostridium coccoïdes cluster*, *Clostridium Leptum cluster*, *Faecalibacterium prausnitzii*, et *Blautia spp.* Étaient significativement plus élevés dans les groupes de stades cliniques II/III que dans les stades cliniques 0/I, et que les *Blautia spp.* étaient plus élevés dans les cas de grade histo-pronostique les plus sévères. De plus, les auteurs ont trouvé une diminution significative dans l'abondance des bactéries totales et dans trois groupes bactériens (*Firmicutes*, *Faecalibacterium prausnitzii*, et *Blautia*) en fonction de l'IMC des participants, le nombre de bactéries étant plus faible chez les patients en surpoids et obèses (95).

iii. Microbiote biliaire

a) Voies biliaires : production et sécrétion de la bile

Le système biliaire est constitué d'un réseau complexe des voies et d'organes qui participent à la production et le transport de la bile (96). La production de la bile est un processus biologique complexe débutant dans les canalicules biliaires, qui sont formés par les membranes apicales de deux hépatocytes adjacents péri-centriques reliés par des jonctions serrées (97). La membrane de l'hépatocyte est dotée d'une membrane apicale qui intervient à la fois dans les deux systèmes de transport indépendants et dépendants des sels biliaires, qui sont des séries de protéines de transport adénosine lié à la triphosphate (adénosine triphosphate-binding). Ces dernières fonctionnent comme des pompes d'exportation pour les sels biliaires et d'autres solutés organiques (98). Ces systèmes de transport créent des gradients osmotiques dans les canalicules biliaires, qui donnent la force motrice pour le flux dans la lumière par l'intermédiaire des aquaporines (97). Les jonctions serrées maintiennent

les hépatocytes ensemble et forment une barrière physique entre le sang et la lumière canaliculaire, facilitant ainsi la "perméabilité paracellulaire " (97,99).

Les canalicules biliaires conduisent le flux de bile à contre-courant de la direction du sang et se connectent avec les branches initiales de l'arbre biliaire, c'est-à-dire les canaux de Hering (100) . Ces structures se poursuivent en conduits dont le diamètre augmente progressivement : petits conduits biliaires (diamètre <15 µm), conduits interlobulaires (15-100 µm), les conduits septaux (100-300 µm), les canaux de surface (300-400 µm), les canaux segmentaires (400-800 µm) et les canaux hépatiques (>800 µm) (101). La rencontre des canaux hépatiques droit et gauche au niveau du hile hépatique forme le canal hépatique commun qui est rejoint par le canal cystique de la vésicule biliaire pour former le canal biliaire commun. Le canal biliaire commun passe par la tête du pancréas et se termine par le sphincter d'Oddi (SO) en pénétrant dans la paroi duodénale pour former l'ampoule de Vater, qui le relie au canal pancréatique (102). Le SO est un segment de muscle lisse circulaire et longitudinal qui incorpore le canal biliaire commun distal et le canal pancréatique, contenus dans la paroi duodénale (103).

Une fois que la bile est sécrétée dans l'arbre biliaire, elle est exposée aux cholangiocytes qui modifient la bile à travers une séquence de processus de sécrétion et d'absorption afin de réguler son débit et son alcalinité en fonction des fonctions physiologiques (97).

La sécrétion biliaire est ensuite régulée par de facteurs, dont les hormones gastro-intestinales et les nerfs cholinergiques (104). Le produit sécrétoire final est acheminé à la vésicule biliaire, puis au duodénum.

Bien que la vésicule biliaire ne soit pas essentielle pour la sécrétion de la bile, elle aide à son stockage pour préparer la digestion des graisses (102). Pendant le jeûne, la vésicule biliaire est remplie de bile (103). Seuls environ 50 % de la bile hépatique atteint la vésicule biliaire pour être concentrée et stockée, tandis que le reste de la bile contourne la vésicule biliaire pour entrer dans le duodénum et subir un cycle entéro-hépatique continu. Pendant la digestion, la cholécystokinine stimule la contraction de la vésicule biliaire et du canal biliaire commun et le relâchement du SO, ce qui entraîne la décharge jusqu'à 80 % du contenu de la vésicule biliaire dans le duodénum (105).

b) Interaction bile et microbiote :

La bile est une solution aqueuse vitale composée de ~95% d'eau dont les principaux constituants comprennent des acides biliaires, cholestérol, phospholipides, la bilirubine et les acides aminés qui sont des solutés organiques et inorganiques dissous (97).

Les acides biliaires (AB) représentent 50 % des composants organiques de la bile. Les ABs sont des produits hydrosolubles composés de 24 carbones et ils sont produits par le métabolisme du cholestérol (97,106).

Il existe deux processus et sites anatomiques pour la biosynthèse des ABs :

-Les ABs primaires qui sont synthétisés à partir du cholestérol dans le foie, puis ils sont modifiés par des enzymes bactériennes dans l'intestin (105). Les deux ABs primaires synthétisés dans le foie sont l'acide cholique (AC), un sel biliaire trihydroxylé, et l'acide chénodésoxycholique (CDCA), un sel biliaire dihydroxylé (106).

Ces sels peuvent être conjugués à la chaîne latérale avec de la taurine ou de la glycine, un processus qui métabolise les ABs en acides plus forts limitant leur réabsorption passive au niveau de l'arbre biliaire (97).

- Les ABs secondaires qui sont produits par des bactéries intestinales appartenant à la classe des *Clostridia* (107), en éliminant le groupe hydroxyle en C7, transformant l'acide cholique en acide désoxycholique (DCA) et le CDCA en acide lithocholique (LCA) (105,106,108).

Pendant le transit dans le cæcum et le côlon, les ABs conjugués peuvent également être "déconjugués" par activité enzymatique décrite sous le nom d'hydrolase des sels biliaires (HSB) rompant ainsi la liaison avec la glycine ou la taurine par des; l'activité HSB est exprimée par des espèces de bactéries intestinales à Gram positif comme *Lactobacillus* (109–113), *Enterococcus* (114,115), *Bifidobacterium* (116–118), et *Clostridium* (119).

L'activité HSB a également été décrite chez le commensal Gram-négatif *Bacteroides spp.* et dans le domaine des *Archaea*, comme *Methanobrevibacter smithii* et *Methanosphaera stadtmanae* (120). En outre, de nombreuses espèces entériques (*Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, et *Escherichia coli*) peuvent oxyder les groupes hydroxyles des ABs, ce qui conduit à la formation d'acides gras essentiels et à la production de sels iso-biles (β -hydroxy) (121), tels que l'acide ursodésoxycholique (AUDC) qui sont parmi les AB les plus hydrophiles. La plupart de ces AB, conjugués ou non, sont réabsorbés dans l'intestin distal, où ils subissent une circulation entéro-hépatique, maintenant ainsi le pool de l'AB.

Ce pool est recyclé 6 à 10 fois par jour et ce "recyclage" exerce des effets régulateurs importants sur plusieurs fonctions hépatiques, biliaires et intestinales (122).

Ainsi, le microbiote intestinal exerce une forte influence sur la bile. Plus précisément, les bactéries intestinales sont capables de modifier la composition du pool des ABs.

Puisque la transformation des ABs primaires en ABs secondaires dépend de l'action des bactéries, les modifications du microbiote intestinal qui expriment l'activité HSB et les enzymes inductibles des acides biliaires (IAB) affectent les fonctions et les propriétés de signalisation des ABs. Des perturbations quantitatives ou qualitatives du pool de AB ont été liées à plusieurs maladies humaines, telles que le syndrome métabolique (123,124), les cancers gastro-intestinaux humains (125,126), les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (127). Les ABs sont également impliqués dans la pathogenèse de plusieurs maladies biliaires ; par exemple dans les cholangiopathies auto-immunes, dans l'initiation de la cholestase, et la progression vers la fibrose des atteintes hépatiques (128).

De plus, l'interaction qui se produit dans le tractus gastro-intestinal entre le microbiote intestinal et le système immunitaire est indispensable au maintien de l'homéostasie humaine (56,57). Les ABs deviennent ainsi des médiateurs importants des mécanismes de signalisation des fonctions immunologiques. L'activation de récepteurs de l'acide biliaire, tels que FXR et TGR5, qui s'accompagne d'une diminution de la production de cytokines inflammatoires (129,130) en illustre un exemple typique.

Avec la sécrétion d'acide gastrique et des enzymes pancréatique, la bile est responsable de l'augmentation de gradient d'abondance du microbiote intestinal du duodénum au rectum du côlon (131). En fait, la bile possède d'importantes propriétés antimicrobiennes.

La nature amphipathique des ABs exerce des effets destructeurs sur la membrane en se liant et dissolvant les lipides de la membrane et détermine la lyse cellulaire (132–134). Ce processus d'émulsification implique une action détergente qui est négativement corrélée avec le nombre de groupes hydroxyle dans la molécule. Ainsi, les ABs primaires sont plus toxiques que les ABs secondaires.

Une fois entrés dans le cytoplasme bactérien, les ABs provoquent d'autres mécanismes cytotoxiques, y compris l'acidification interne du cytoplasme et de la génération des composés toxiques comme le sulfure d'hydrogène (H₂S), qui est produit par le clivage de la taurine conjuguée des sels biliaires (129). De plus, la bile est capable de provoquer les dommages de l'ADN (135), un stress oxydatif (136) et des effets osmotiques (137) contre les bactéries.

En plus des propriétés antimicrobiennes physiques et chimiques, la bile contribue à la défense immunologique de l'organisme contre les infections entériques par la sécrétion d'immunoglobulines A (IgA), de peptides, des cytokines inflammatoires telles la TNF α , des leucotriènes et de leurs métabolites qui stimulent le système immunitaire inné de l'intestin

(97,138–140). En outre, les ABs activent le récepteur nucléaire FXR α , qui agit comme un médiateur des effets antibactériens (141).

Toutes ces propriétés, confèrent à la bile une activité antimicrobienne. Ce qui a conduit à la supposition que la bile est stérile dans des conditions non pathologique (141–145).

De plus, la difficulté de recueillir des échantillons de bile, associée au manque de sensibilité des techniques de culture pour détecter les microbes dans les échantillons à faible charge, a longtemps soutenu cette hypothèse.

Suite au développement des techniques du séquençage, il a été confirmé la présence de microbes dans des échantillons de bile autrement considérés comme stériles par des techniques de culture (146). Ce qui a autorisé l'expression « microbiote biliaire ».

c) Colonisation bactérienne de la voie biliaire

La voie biliaire possède plusieurs systèmes de défense pour protéger la bile et la muqueuse biliaire contre la colonisation bactérienne et l'infection.

Les propriétés antimicrobiennes mentionnées plus haut de la bile réduisent la concentration de bactéries dans le duodénum (131). De la même manière, le sphincter d'Oddi (SO) agit comme une barrière mécanique qui sépare le duodénum de l'arbre biliaire empêchant alors le passage par reflux de bactéries provenant du tractus gastro-intestinale.

De plus, l'écoulement de la bile, exerce un effet nettoyant fonctionnel pour éliminer les agents pathogènes et les substances potentiellement nocives des voies biliaires. En fait, environ 800-1000 ml de bile s'écoulent par les voies biliaires tous les jours (147).

Même si certains micro-organismes parviennent à surmonter ces systèmes, le mucus biliaire sécrété par l'épithélium biliaire les empêche d'adhérer à la muqueuse du tractus biliaire (147). De plus, la concentration plus élevée de ABs à ce niveau exerce une toxicité plus élevée envers les bactéries (105).

L'épithélium biliaire présente également un large éventail de récepteurs pour les facteurs impliqués dans l'immunité innée, tels que les toll-like-receptor (TLR1, TLR6 et TLR9Q), et des adaptateurs de surface et intracellulaires qui servent de médiateurs dans la signalisation et l'initiation de la réponse inflammatoire (148,149). En outre, les peptides antimicrobiens, dont la β -défensine-1 et -2 humains, sont largement exprimés dans l'arbre biliaire intrahépatique (150).

Les macrophages tissulaires et les cellules de Kupffer du foie, activées par les cytokines pro-inflammatoires, sont responsables de la destruction des microbes et de la présentation des antigènes aux lymphocytes T et aux plasmocytes dans les ganglions lymphatiques mésentériques ou dans les glandes lymphoïdes mineures adjacentes aux voies biliaires. L'activation de la réponse adaptative augmente la production d'immunoglobulines biliaires, principalement sous forme de IgA sécrétoire (138).

A leurs tours, les micro-organismes doivent posséder des mécanismes pour résister à l'action de la bile et de survivre dans les conditions environnementales présentées par la bile. Les bactéries répondent par des adaptations au pH et aux effets détergents de la bile. En particulier, elles renforcent leur membrane, en modifiant sa composition lipidique et en augmentant l'expression des porines, de protéines transmembranaires et des hydrolases des sels biliaires (HSB).

En général, les bactéries à Gram négatif présentent une plus grande résistance à la bile que les bactéries à Gram positif (62). *Salmonella spp.* (151), *Escherichia coli* (152) et certaines espèces d'*Helicobacter* (153) possèdent une tolérance incroyable à de fortes concentrations de ABs.

Plusieurs agents pathogènes à Gram positif, dont *Listeria spp.* (154), *Enterococcus faecalis* (155) et *Clostridia* (156), ont également démontré leur capacité à coloniser la bile.

Les microbes peuvent atteindre les voies biliaires par différentes voies :

1- La voie ascendante à travers la SO qui été considérée comme la voie d'entrée la plus fréquente des bactéries dans le système biliaire :

A- Le dysfonctionnement du SO comme la laxité du SO, affectent l'activité de ce «gatekeeper», se traduisant par une augmentation du passage des bactéries par reflux duodéal (157).

B- La Sphinctérotomie, réalisée pendant la cholangiopancreatographie rétrograde (CPRE) ou une intervention chirurgicale, entraîne une perte de fonction et l'intégrité de la SO.

C- L'obstruction incomplète à l'écoulement de la bile, comme observé dans la maladie lithiasique et dans l'ampullome, est un autre facteur de risque de contamination et d'infection (158,159).

2- De plus, les bactéries peuvent atteindre les voies biliaires par voie hématogène. -En effet, l'épithélium biliaire est nourri par un réseau de capillaires appelés plexus vasculaires péri-biliaires (160). Ce plexus provient de la branche terminale de l'artère hépatique et a une connexion anastomose avec le système vasculaire de la veine porte (160).

Par conséquent, la translocation bactérienne dans la circulation portale (147,161) peut conduire des bactéries à l'intérieur du système biliaire en raison de l'augmentation de la perméabilité intestinale (162–164).

iv. Etude de microbiote biliaire dans des conditions physiologiques et pathologiques

Les voies biliaires ont longtemps été considérées comme stériles. Pourtant, il a récemment été mis en lumière l'existence d'un microbiote biliaire résident, en conditions physiologiques. Le microbiote peut être analysé grâce aux outils de biologie moléculaire tant la plupart des bactéries (anaérobie strict) sont difficilement cultivables. La mise en évidence de bactéries dans un organe dit stérile n'est pas inhabituel en tant que telle. Il est intéressant de noter que des microorganismes peuvent également être détectés dans des organes (par exemple, l'appareil reproducteur féminin humain et le système urinaire humain) dont les effluents sont supposés être stériles (165,166).

C'est pourquoi nous allons présenter les études qui ont porté sur le microbiote biliaire dans les deux conditions : physiologiques et pathologiques.

a) Conditions physiologiques

Sur la base des séquences de la métagénomique, des études récentes sur l'homme (167) et l'animal (168) ont indiqué que la vésicule biliaire peut abriter une communauté de bactéries (non cultivables) dans des conditions dites « non pathologiques » (169).

Des études sur le mucus biliaire de vésicule de porcs en bonne santé (168) et des hamsters infectés par les douves de foie (*O. Vivverini*) (170) ont été rapportées et qui peuvent être résumées ainsi:

Chez l'homme comme chez l'animal, des niveaux de *Firmicutes* et de *Proteobacteria*, sont élevés et seulement un faible nombre des *Bacteroidetes* sont détectés. Cependant, il faut noter que ces résultats sont basés uniquement sur une approche moléculaire de séquençage d'ARN 16S bactérien et on ne peut pas exclure que certaines séquences d'ADN bactériens détectés soient issues de la contamination des bactéries mortes ou des débris, qui ne reflètent pas la présence de microbiote vivant.

L'étude réalisée par Jiménez., et al (168) menée au microscope a confirmé la présence des bactéries intactes dans la mucus biliaire et adhérente à la muqueuse et jusqu'à hauteur de 4,8 fois 10 à la puissance 4 bactérie par ml de bile de porcs . La majorité du microbiote biliaire est incultivable en conditions habituelles de laboratoire (171). Les études sur les porcs montrent que les bactéries de phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes* et *Bacteroidetes* peuplent l'éco système des voies biliaires (168). Au niveau de genre *Staphylococcus*, *Streptocoque*, *Kocuria*, *Rothia*, *Acinetobacter* et *Psychrobacter* ont été isolés de différents des échantillons, suggérant leur place en tant que membres de microbiote biliaire chez le porc (168).

Dans une étude récente (172) sur le microbiote biliaire de 27 donneurs de foie (13 sans et 14 avec une lithiase), le séquençage de l'ARNr 16S a mis en évidence la présence d'*Actinobactéria*, *Firmicutes* et *Bacteroidetes* dans les échantillons de bile et les tissus de la vésicule biliaire des sujets sans calculs biliaires. Une augmentation significative de l'abondance de la famille des *Propionibacteriaceae* et le genre *Sphingomonas* a également été signalé chez les individus sans lithiase par rapport aux personnes ayant des calculs biliaires. Toutes ces études font preuve de la présence d'un microbiote biliaire dans des conditions non pathologiques.

b) Conditions pathologiques

Les limites relatives à la culture bactérienne traditionnelle sont contournées grâce aux progrès techniques en métagénomique (bactérienne) en particulier le séquençage d'ARNr 16S; plusieurs études ont caractérisé le microbiote biliaire dans des situations pathologies :

-Calculs biliaires

Le microbiote biliaire chez des patients avec des calculs biliaires de cholestérol a été étudié par Wu et al. (167) (**tableau 1**) dans des échantillons de bile (n=26), calculs biliaires (n=27) et les selles (n=29).

De façon surprenante, la communauté bactérienne a été estimée plus diverse dans le système biliaire que dans l'intestin pour les mêmes patients. Environ 160 espèces différentes appartenant à 6 Phyla ont pu être détectés dans les liquides biliaires. Malgré certaines différences, il y avait une grande similitude entre le microbiote intestinal (selles) et biliaire (biles) des patients avec calculs biliaires (167) :

- des niveaux plus bas des *Bacteroidetes* dans les voies biliaires.

-des niveaux plus élevées de *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Saccharibacteria (TM7)*, *Cyanobactérie*.

-un niveau similaire de *Firmicutes*.

Les phyla dominants du microbiote biliaire chez les patients atteints de calculs biliaires ont été confirmés ultérieurement par d'autres études (173,174).

Comme prévu, certains de ces phyla possèdent une plus grande résistance à des conditions environnementales extrêmes, telles que celles présentes dans les voies biliaires. Notamment le phylum *Proteobacteria* comprend des genres tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, et *Helicobacter*, qui ont tous été associés à plusieurs maladies gastro-intestinales (175).

- Cholangite biliaire primitive (CBP)

La CBP est une hépatopathie chronique auto-immune, caractérisée par une destruction progressive des voies biliaires intrahépatiques de petit calibre. Hiramatsu et al. (176) ont étudié le microbiote biliaire par le séquençage de l'ARNr 16S. Des échantillons de bile ont été prélevés de la vésicule biliaire de 19 patients atteints de CBP lors d'une transplantation hépatique.

Des séquences bactériennes ont été trouvées chez 10 des 15 patients atteints de CBP. Le *Staphylococcus aureus* était le microorganisme le plus fréquemment détecté (5/15 patients atteints de CBP, 33% ; 40% de tous les clones de CBP). *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae* et d'autres streptocoques faisaient partie des autres bactéries fréquemment trouvées (**Tableau 3 et 4**).

- Cholangite sclérosante primitive (CSP)

La cholangite sclérosante primitive (CSP) se caractérise par une inflammation, une fibrose et une destruction progressive des voies biliaires à l'intérieur ou à l'extérieur du foie, aboutissant à une cirrhose biliaire.

Pereira et al (177) ont étudié le microbiote biliaire de patients atteints de CSP à différents stades de la maladie en utilisant le séquençage de l'ARNr 16S. Notamment, ils n'ont pas trouvé de différences significatives dans le microbiote biliaire des patients atteints de CSP au stade précoce par rapport aux témoins.

- CCA extrahépatique

Avilés-Jiménez et al (178) ont étudié le microbiote biliaire de 10 patients atteints de CCA extrahépatique en comparaison à des contrôles avec des pathologies biliaires bénignes (PBB), en utilisant le séquençage de l'ARN 16S (**Tableau 3 et 4**). Le Phyla *Protéobactéria* a été observée dans tous les échantillons. Les genres *Methylophilaceae*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Helicobacter* et *Campylobacter* étaient les plus fréquemment identifiés chez les patients atteints de CCAe.

Ils ont détecté des gènes de virulence associés d'*Helicobacter pylori*, tels que associés aux toxines CagA et VacA, dans la plupart des échantillons des deux groupes, ce qui suggère un possible rôle carcinogène dans les voies biliaires.

Maladies	Microbiote biliaire
Calculs biliaires	<i>Enterobacteriaceae, Ruminococcaceae, Clostridiales, Alistipes, Bacteroidales, Anoxybacillus, Clostridium (C.), Thermus, Catabacteriaceae, Propionibacterium, Enterococcus, Acinetobacter, Staphylococcus, Caulobacter, Pseudomonas, Massilia, Brevibacillus, Lactococcus, Paludibacter, Weissella</i>
Cholangite biliaire primitive (CBP)	<i>Staphylococcus, Enterococcus, Streptococcus, Lactohacillus, Helicobacter, Propionibacterium, Corynebacterium, Agrobacterium, Flavobacterium, Clostridium, Micrococcus</i>
Cholangite sclérosante primitive (CSP)	<i>Streptococcus, Prevotella, Fusobacterium, Veillonella, Haemophilus, Neisseria, Alloprevotella, Leptotrichia, Porphyromonas, Cronobacter</i>
CCA extrahépatique	<i>Prevotella, Actinomyces, Streptococcus, Fusobacterium, Novosphingobium, Helicobacter</i>

Tableau 3: Microbiote biliaire (estimée sur le genre bactérien) dans les maladies biliaires. (Adapté calculs biliaires (167), CBP (176), CSP (177), cancer (178)).

Références	Pays	Taille de l'échantillon	Type de l'échantillon	Modes de prélèvement	Méthodes d'analyses	Résultats de microbiote
Conditions physiologiques (bonne santé)						
Jimenez et al (168)	Espagne	Porc N=6	Bile, mucus et biopsies de la vésicule biliaire	La vésicule biliaire a été retirée des truies sacrifiées. La bile a été extraite à l'aide d'une seringue stérile. Une fois la vésicule biliaire complètement vidée, la couche superficielle de mucus a été recueillie et trois biopsies ont été réalisées.	Séquençage des amplicons de la région V1-V2 du gène de l'ARNr 16S	L'écosystème de la vésicule biliaire de porcs sains est principalement peuplé de bactéries largement équilibrées entre les phyla <i>Firmicutes</i> (34%), <i>Actinobacteria</i> (32%) et <i>Proteobacteria</i> (32%). Les <i>Bacteroidetes</i> représentent une part moins importante (2% des isolats). Au niveau des genres, <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Rothia</i> , <i>Acinetobacter</i> et <i>Psychrobacter</i> ont été isolés dans différents échantillons.

Molinero et al (172)	Espagne	Humain N=27	Bile	Prélèvement stérile lors de greffes de foie à partir de donneurs cadavériques.	Séquençage des amplicons de la région V3-V4 du gène de l'ARNr 16S	Prévalence des <i>Actinobactéries</i> , <i>Firmicutes</i> et <i>Bacteroidetes</i> dans les échantillons de bile et les tissus de la vésicule biliaire des sujets sans calculs biliaires. Une augmentation significative de l'abondance de la famille des <i>Propionibacteriaceae</i> et du genre <i>Sphingomonas</i> a également été rapportée par rapport aux individus ayant des calculs biliaires.
Cholélithiase						
Swidsinski et al (146)	Allemagne	Humain N=20	Calculs biliaires	Prélèvement chez des patients ayant des calculs biliaires symptomatiques et ont subi une chirurgie.	Des fragments de gènes bactériens ont été amplifiés in vitro à partir de l'ADN extrait de calculs de la vésicule biliaire. L'analyse comparative de la	De l'ADN bactérien a été trouvé dans les calculs biliaires dont la teneur en cholestérol était comprise entre 70 et 90 %, mais pas dans ceux dont la teneur en cholestérol était supérieure à 90 %. Trois groupes bactériens ont

					séquence de l'ARNr 16S a été utilisée pour l'identification	été identifiés: <i>Propionibacteria</i> (45%), <i>Clostridia</i> (35%) et <i>Enterobacteria</i> (25%).
Références	Pays	Taille de l'échantillon	Type de l'échantillon	Modes de prélèvement	Méthodes d'analyse	Résultats de microbiote
Wu XT et al(179)	Chine	Humain N=30	Calculs biliaires	Tous les patients avaient des calculs biliaires symptomatiques et ont subi une cholécystectomie.	L'ADN a été extrait du cholestérol dans les vésicules biliaires et des amorces pour identifier l'existence des bactéries par le technique de PCR emboîtée (NP-PCR). dans la vésicule biliaire et des amorces pour une identifier l'existence de bactéries par la technique de PCR emboîtée (NP-PCR)	De l'ADN bactérien a été obtenu dans 86,7% des calculs biliaires. Les séquences d'ADN les plus fréquentes étaient celles liées aux <i>Propionibacteria</i> (26,7%) et à <i>E.coli</i> (23,3%); l'ADN de <i>Streptococcus pyogenes</i> était de 6,7%, des séquences hétérogènes multiples ont été trouvées dans 23,3% des cas comme résultat de multiples infections/colonisations par <i>E. coli</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> et <i>Streptococcus pyogenes</i> ou

Références	Pays	Taille de l'échantillon	Type de l'échantillon	Modes de prélèvement	Méthodes d'analyse	Résultats de microbiote
Swidsinski et al (180)	Allemagne	Humain N=100	Calculs biliaires	Au moment de la cholécystectomie et 6 mois après.	L'ADN a été extrait et soumis à un séquençage de l'ARNr 16S.	d'autres micro-organismes non identifiés. 78% à culture négative des calculs biliaires de cholestérol présentaient de faibles concentrations bactériennes et seuls quelques calculs à culture négative (12%) présentaient des concentrations comparables à celles des calculs à culture positive. L'analyse génomique du calcul biliaire avec culture biliaire positive a montré une prédominance des souches bactériennes identifiées par la culture, suggérant une infection

						en cours. La plupart d'entre elles appartiennent à des souches bactériennes telles que <i>Bacillus</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Carnobacterium</i> et <i>Burkholderia</i> .
Lee et al (181)	USA	Humain N=14	Calculs biliaires	Pendant la cholécystectomie et la cholangiopancréatographie endoscopique (CPRE)	Les produits de PCR ont été soumis à la séquençage de l'ARNr 16S.	Les séquences d'ADN bactérien sont généralement présentes dans les calculs biliaires à cholestérol mixte (jusqu'à 95 %

						de contenu en cholestérol), à pigment brun et à canal cholédoque, mais rarement dans les calculs biliaires à cholestérol pur. La présence d'un gène codant pour la β -glucuronidase a été constatée dans la plupart des calculs biliaires à cholestérol mixte et des séquences bactériennes <i>E. coli</i> et de <i>Pseudomonas</i> ont été identifiées dans tous les calculs biliaires à pigment et à cholestérol mixte.
Wu T et al (167)	Chine	Humain N=29	Calculs biliaires, bile, selles	Au cours de la cholécystectomie, un calcul a été retiré de la vésicule biliaire de manière aseptique et un échantillon de bile a été extrait à l'aide	Séquençage des amplicons de la région V1-V2 du gène de l'ARNr 16S	Une dysbiose du microbiote intestinal a été observée chez les patients atteints de calculs biliaires par rapport aux sujets sains. Dans l'intestin des patients, il existe une

				d'un tube à aiguille stérile. Avant l'opération, les selles de tous les patients ont également été recueillies.		surcroissance de <i>Protéobactéries</i> , de <i>TM7</i> , de <i>Ténéricutes</i> , d' <i>Actinobactéries</i> , de <i>Thermi</i> et de <i>Cyanobactéries</i> et une augmentation de l'abondance de <i>Bacteroidetes</i> dans les voies biliaires.
Saltykova et al (173)	Fédération de Russie	Humain N=56 (30 infectés et 26 non infecté par <i>O.felineus</i>)	Bile	Pendant la cholécystectomie, 5-10 ml de bile sont aspirés de la vésicule biliaire dans des conditions stériles	Séquençage à base d'Illumina ciblant le gène de l'ARNr 16S procaryote	L'infection par <i>Opisthorchis felineus</i> a modifié le microbiome biliaire. La bile des participants atteints d' <i>Opisthorchiasis</i> présentait un plus grand nombre de <i>Synergistetes</i> , <i>Spirochaetes</i> , <i>Planctomycetes</i> , <i>TM7</i> et <i>Verrucomicrobia</i> .
Références	Pays	Taille de l'échantillon	Type de l'échantillon	Modes de prélèvement	Méthodes d'analyses	Résultats de microbiote

Ye et al (174)	Chine	Humain N=6	liquide Salivaire, gastrique, duodéal et bile.	Les échantillons salivaires ont été recueillis après riçage par 20 ml de serum physiologique. Les échantillons de liquide gastrique, de fluide duodéal et de bile ont été prélevés à l'aide d'endoscopes à vision latérale strictement stériles.	Séquençage des amplicons de la région V3-V4 du gène de l'ARNr 16S	Toutes les bactéries biliaires observées étaient détectables dans le tube digestif supérieur. Le microbiote biliaire présentait une similarité comparativement plus élevée avec le microbiote duodéal, par rapport à ceux des autres régions, mais avec une diversité réduite. Les genres <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , et un genre non classifié et <i>Pyramidobacter</i> étaient abondants dans la bile.
Références	Pays	Taille de l'échantillon	Type de l'échantillon	Modes de prélèvement	Méthodes d'analyse	Résultats de microbiote

Shen et al (182)	Chine	Humain N=15	Bile	CPRE	le séquençage du métagénome entier (WMS) et le séquençage de l'ARNr 16S	Les bactéries de la cavité buccale et des voies respiratoires étaient plus répandus dans les échantillons de bile que les bactéries intestinales.
Gutiérrez-Díaz et al (183)	Espagne	Humain N=14	Bile	Pendant une cholécystectomie.	Séquençage des amplicons de la région V3 du gène de l'ARNr 16S	Chez les patients atteints de lithiase biliaire, la consommation de produits laitiers était négativement associée aux taux de <i>Bacteroidaceae</i> et de <i>Bacteroides</i> , et plusieurs types de fibres et d'acides gras étaient liés à l'abondance de <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Chitinophagaceae</i> , <i>Propionibacteraceae</i> , <i>Bacteroides</i> et <i>Escherichia-Shigella</i> .

Kose et al (184)	Australie	Humain N=4	Calculs biliaires	Pendant cholécystectomie.	une PCR quantitative et séquençage de l'ARNr 16S.	Dans les calculs pigmentés analysés, les gènes impliqués dans la formation de biofilms ont été principalement récupérés à partir de <i>Klebsiella</i> et d' <i>Enterococcus</i> cliniquement pathogènes. <i>Klebsiella</i> était également présent dans l'un des calculs biliaires de cholestérol, tandis que les autres calculs de cholestérol analysés présentaient une prédominance de bactéries Gram-positives qui n'ont pas été identifiées dans les calculs pigmentés.
CHOLANGITE SCLÉROSANTE PRIMAIRE (CSP)						

Folseraas et al(185)	Scandinavie, Allemagne, Central Europe centrale, USA	Humain N=715 CSP N=2962 contrôles	Bile	CPRE	Analyse d'association de données couvrant l'ensemble du génome.	Une augmentation significative de l'abondance <i>des Firmicutes</i> et une diminution parallèle <i>des Proteobacteria</i> ont été observées. <i>Proteobacteria</i> a été observée ainsi que des différences dans l'abondance des <i>Bacteroidetes</i> , <i>Actinobacteria</i> , et <i>Tenericutes</i> chez les patients présentant des génotypes de perte de fonction FUT2 et les non-sécréteurs.
Pereira et al(177)	Finlande	Humain N=80 CSP N=46 contrôles	Bile	CPRE	Séquençage des amplicons de la région V1-V3 du gène de l'ARNr 16S	Les communautés bactériennes des sujets sans CSP et des patients avec CSP au stade précoce étaient similaires. L'abondance des <i>Streptocoques</i> était également positivement corrélée à une augmentation de la gravité de la maladie.

Références	Pays	Taille de l'échantillon	Type de l'échantillon	Modes de prélèvement	Méthodes d'analyse	Résultats de microbiote
Cancer						
Avilés-Jiménez et al (178)	Mexique	Humain N=10 CCAe N=10 contrôles	Cellules épithéliales du canal biliaire	Brossage CPRE	Séquençage des amplicons de la région V4 du gène de l'ARNr 16S .	Le microbiote du cholangiocarcinome extrahépatique a montré des changements significatifs dans la composition microbienne. Le phylum <i>Proteobacteria</i> a dominé tous les échantillons. <i>Nesterenkonia</i> a diminué, tandis que <i>Methylophilaceae</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Novosphingobium</i> et <i>H. pylori</i> ont augmenté chez les patients atteints de cholangiocarcinome.

Chng et al (186)	Singapour, Thaïlande, Roumanie	Human N=28 CCA avec infection <i>O. Viverrini</i> N=32 CCA sans infection <i>O. viverrini</i>	Tissu hépatique , bile, muqueuse gastrique	Soixante échantillons de tumeurs primaires et d'échantillons normaux adjacents appariés (foie non-néoplasique) ont été obtenus auprès du tissu respiratoire	L'amplification par réaction en chaîne par polymérase (PCR) de l'ARNr 16S a été réalisée à l'aide d'amorces qui ciblent la région V3 à V6 du gène de l'ARNr 16S	Une perturbation systémique du microbiome a été notée dans les échantillons de tumeurs par rapport aux échantillons normaux (pas de cancer) pour plusieurs familles bactériennes, avec une augmentation significative des espèces de <i>Stenotrophomonas</i> dans les tumeurs. La comparaison des groupes associés à <i>Opisthorchis viverrini</i> par rapport aux groupes non associés a identifié un enrichissement pour des bactéries entériques spécifiques (<i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> et <i>Enterococcaceae</i>). L'analyse fonctionnelle des microbiomes du cholangiocarcinome a révélé un potentiel plus élevé de production d'acides biliaires et d'ammoniac dans les tissus associés à <i>O. viverrini</i> , reliant le microbiote altéré à la carcinogénèse.
Plieskatt et al (170)	Thaïlandia	Hamsters N=4 hamsters	Selles, bile	La bile de la vésicule biliaire et le contenu	Des amorces universelles ont été	Les analyses de communautés microbiennes ont révélé que l'infection

		infecté <i>O. viverrini</i> N=4 témoins		colorectal ont été prélevés sur chaque hamster sacrifié 6 semaines après l'infection par <i>O. viverrini</i>	utilisées pour amplifier les régions hypervariables (HVR) 7-9 du gène de l'ARNr 16S bactérien	par la douve a perturbé le microbiome du tractus gastro-intestinal, augmentant <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Ruminococcaceae</i> et <i>Lactobacillaceae</i> , tout en diminuant <i>Porphyromonadaceae</i> , <i>Erysipelotrichaceae</i> et <i>Eubacteriaceae</i> . L'opisthorchiasis présente un phénotype inflammatoire robuste avec une élévation notable de l'IL-6. L'inflammation du système biliaire entraîne une fibrose périductale, précurseur du cholangiocarcinome.
Scheufele et al (187)	Munich	Humain Cancer du canal cholédoque distal N=36 Carcinome ampullaire N=26 Carcinome de la tête du pancréas N=228	Bile	Per opératoire Des échantillons de bile peropératoires ont été obtenus directement après la transection de la voie biliaire principale à l'aide d'un écouvillon.	L'écouvillon a été conservé à température ambiante et transporté au service de microbiologie pour culture et évaluation du profil de résistance aux antibiotiques. Les résultats des tests microbiologiques ont	Il existe des différences fondamentales dans le microbiome biliaire des patients atteints de cancer péri ampullaire qui subissent un drainage biliaire préopératoire (DBP) et ceux qui ne le font pas. Le drainage biliaire préopératoire induit une évolution du microbiome biliaire vers un spectre plus agressif et résistant, ce qui nécessite une stratégie d'antibiothérapie peropératoire.

					<p>été rapportés en fonction du type de bactérie, y compris le profil de sensibilité et de résistance des micro-organismes cultivés. Les cultures microbiologiques des plaies incisionnelles infectées n'étaient pas obtenues de manière systématique.</p>	
--	--	--	--	--	--	--

Tsuchiya et al (188)	Bolivie, Chili	Humain Cancer de la vésicule biliaire N=7 Cholelithiasis N=30	Bile	Cholécystectomie.	Séquençage des amplicons de la région V3-V4 du gène de l'ARNr 16S	<i>Salmonella typhi</i> et <i>Helicobacter sp.</i> n'ont pas été détectés dans la bile des patients atteints de carcinome de la vésicule biliaire (CVB). En tant qu'espèces Prédominantes, <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Enetrobacter sp.</i> ont été détectés dans la bile des patients atteints de CVB. Les espèces présentes dans la bile des patients atteints de cholélithiase étaient <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> et <i>Enerococcus gallinarum</i> . <i>Escherichia coli</i> a été détecté dans les échantillons de bile des patients atteints de CVB et de cholélithiase.
----------------------	----------------	---	------	-------------------	---	---

Chen et al (189)	Chine	Humain CCAd N=8, cholédocholithiase récurrente N=16 Calculs du canal cholédoque N=44	Bile	CPRE	Extraction d'ADN et pyroséquençage MiSeq des amplicons de l'ARNr16S	Chez les patients atteints d'un cholangiocarcinome distal, l'abondance des <i>Gemmatimonadetes</i> , <i>Nitrospirae</i> , <i>Chloroflexi</i> , <i>Latescibacteria</i> , <i>Unclassified_Bacteria</i> et <i>Planctomycetes</i> était plus élevée que chez les patients atteints de lithiase biliaire. <i>Escherichia/Shigella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> et <i>Faecalibacterium</i> étaient les plus abondants
---------------------	-------	---	------	------	--	--

CHOLÉCYSTITE, CHOLANGITE ET AUTRES MALADIES INFECTIEUSES BILIAIRES

Liu et al (190)	China	Humain Cholécystite aiguë N=25 Témoins N=13	Selles, bile	Les échantillons fécaux. Les échantillons de bile ont été obtenus lors d'un drainage biliaire transhépatique percutané ou lors d'un drainage de la vésicule biliaire par voie endoscopique.	Extraction de l'ADN, amplification du gène de l'ARNr 16S et pyroséquençage ; isolement et identification de la souche d' <i>E. coli</i> dans la bile et analyse des endotoxines.	<i>E. coli</i> était le principal micro-organisme pathogène biliaire, à côté d'autres tels que <i>Klebsiella spp</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , et <i>Enterobactercloacae</i> dans la bile des patients. Le niveau d'endotoxine biliaire était significativement lié au nombre d' <i>Enterobacteriaceae</i> , en particulier <i>E. coli</i> .
--------------------	-------	--	--------------	--	--	---

Références	Pays	Taille de l'échantillon	Type de l'échantillon	Modes de prélèvement	Méthodes d'analyse	Résultats de microbiote
Yun et al (191)	Corée	Humain N=161 avec culture négative N=54 avec culture positive	Bile	Cholécystectomie	Culture bactériennes ; différents antibiotiques ont été utilisés en fonction du type d'organisme isolé, et les résultats exprimés comme sensibles, intermédiaires ou résistants selon les normes cliniques.	<i>Escherichia coli</i> et <i>Klebsiella</i> étaient le plus fréquents parmi les bactéries Gram -. <i>Enterococcus</i> était le plus fréquent parmi les bactéries Gram + Moins de 5 % de résistance contre les carbapénèmes, les bêta-lactamines, les antibiotiques glycopeptides et le linézolide.
Liang et al (192)	Chine	Humain N=18 avec SOL N= 27 patients sans SOL.	Bile	Des échantillons de bile ont été extraits de la voie biliaire principale à l'aide d'un injecteur sans germes de 5 ml avant toute manipulation invasive sur le canal biliaire comme lors de la chirurgie, endoscopie.	Le pyroséquençage de l'ARNr 16S et spectrométrie de masse par chromatographie liquide	Un microenvironnement du canal biliaire avec une infection bactérienne plus sévère et une lithogénicité plus forte ont été retrouvés chez les patients présentant un sphincter d'Oddi défailant. Les <i>Protéobactéries</i> et les <i>Firmicutes</i> étaient les phyla les plus répandus, en particulier les <i>Enterobacteriaceae</i> . Les patients atteints de reflux biliaire

						possédaient plus diversité microbienne plus grande. Dans le groupe avec trouble du sphincter d'Oddi , des pathobiontes (<i>Bilophila</i> et <i>Shewanella</i>), étaient plus et les bactéries commensales moins abondantes
Itthitaetrakool et al (193)	Thaïlande	Hamsters et Hamsters N=14 hamsters infecté <i>O. viverrini</i> N=12 témoins	Tissu du foie	Le tissu hépatique au niveau de la région hilare et contenant un grand canal biliaire a été immédiatement prélevé après le sacrifice des hamsters	Amplification des gènes de l'ARNr 16S, du gène spécifique du genre <i>Helicobacter</i> et du gène <i>ureA</i> de <i>H. pylori</i>	Les identités des bactéries cultivées pour l'enrichissement suggèrent que l'infection chronique par <i>O. viverrini</i> modifie le microbiome du foie et favorise la croissance d' <i>Helicobacter spp.</i> Hypothèse d'une synergie entre <i>O. viverrini</i> et <i>Helicobacter</i> dans le renforcement des maladies hépatobiliaires est suggérée
ENDOPROTHÈSE BILIAIRE						
Vaishnavi et al (194)	Inde	Humain N=51 Cholangite N=31 non-Cholangite	Stents	Les stents ont été récupérés par voie endoscopique	Mise en culture en anaérobie et aérobie de l'extrémité de prothèse. Pour l'identification des bactéries anaérobies.	Les bactéries les plus fréquemment identifiées étaient <i>Pseudomonas</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> ,

					L'ADN microbien extrait dans la phase de croissance et identification moléculaire	<i>Aeromonas, Proteus et Enterobacter.</i> La concentration en protéines des biofilms s'est avérée significativement plus élevée dans les endoprothèses placées chez les patients atteints de cholangite que chez ceux qui n'en étaient pas atteints dépendant du diamètre. La formation de biofilms était plus importante chez les patients dont la durée de séjour était plus longue
--	--	--	--	--	---	---

TRASPLANTATION DU FOIE

Kabar et al (195)	Allemagne	Humain N=38	Bile et selles	Les stents ont été récupérés par voie endoscopique La bile a été recueillie par drainage biliaire percutané et pendant la CPRE après une transplantation du foie.	La bile a été étalée sur gélose en aérobie et anaérobies et incubée entre 35° et 37°C 24 h et 48 h. Pour l'identification, la spectrométrie de masse par désorption ionisation laser a été utilisée. Si les échantillons de selles étaient examinés de la	Parmi les échantillons de bile isolés, 64,2% étaient Gram +, 22,2% étaient Gram - et 13,6% révélaient la présence de <i>Candida albicans</i> . La bactérie Gram + la plus était <i>Enterococcus faecium</i> . Les bactéries Gram - les plus abondantes étaient <i>E. coli</i> et <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Il y avait une forte corrélation entre les micro-
-------------------	-----------	----------------	----------------	--	--	---

					même manière. La sensibilité aux antibiotiques a été évaluée	organismes trouvés dans la bile et ceux isolés des selles.
Liu et al(196)	Chine	Humain N=5 transplantés hépatiques présentant une lésion biliaire N= 4 transplantés hépatiques sans lésion biliaire	Bile	Prélèvement dans un tube en T après stérilisation.	Séquençage des amplicons de la région V4-V5 du gène de l'ARNr 16S	Les <i>Firmicutes</i> et <i>les Proteobacteria</i> étaient les phyla prédominants. <i>Enterococcus</i> , <i>Rhizobizum</i> , <i>Nevskia</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Bacillus</i> étaient les genres les plus courants.

Tableau 4: Études du microbiote biliaire dans plusieurs maladies biliaires. (Adapté selon les références suivants 146, 167, 168, 170, 172-174, 177-196)

3. Epigénétique

i. Généralité

Les séquences d'ADN sont transcrites en ARNm puis traduites en protéines. Si les anomalies structurelles d'ADN (mutation, délétion, inversion, etc...) peuvent aboutir en non-expression d'un gène, des phénomènes indépendants de la structure peuvent impacter cette expression. L'épigénétique désigne l'ensemble des mécanismes régulant l'expression des gènes de façon non liée à l'intégrité ou non des séquences géniques.

Au cours du développement et de la différenciation cellulaire, les mécanismes épigénétiques participent dans un premier temps à l'établissement d'un nouvel état cellulaire, puis au maintien de cet état permettant de stabiliser l'identité cellulaire. Ces processus sont nécessaires au fonctionnement normal des organismes multicellulaires. Les modifications épigénétiques régulent également l'expression de gènes en fonction des conditions environnementales. Il s'agit d'un phénomène conférant à l'organisme la plasticité nécessaire pour s'adapter à son environnement et la capacité à induire des phénotypes alternatifs à partir d'un même génotype (197).

Au cours de la vie d'un organisme, les cellules somatiques comme germinales peuvent développer des dérégulations épigénétiques et peuvent transmettre ces changements à leur progéniture. Des changements et altérations de l'épigénome peuvent apparaître au cours du temps, sous l'influence de facteurs internes, externes et/ou stochastiques, et peuvent être responsables de l'apparition de nombreuses pathologies. Les dérégulations de l'épigénome sont des mécanismes importants participant au développement et à la progression tumorale. Ces anomalies épigénétiques peuvent être réversibles, par opposition aux mutations se développant en parallèle dans le génome de la tumeur, et peuvent donc constituer d'éventuelles cibles thérapeutiques.

Les fonctions du génome sont inexorablement liées à l'épigénome. La régulation épigénétique impacte l'état transcriptionnel, la compaction locale ou globale de la chromatine, et le partitionnement du matériel épigénétique pendant les réponses aux dommages de l'ADN et la progression du cycle cellulaire. Au niveau moléculaire, l'épigénétique est basée sur différents mécanismes incluant la méthylation de l'ADN (DNAm), les microARNs, les modifications post-traductionnelles (PTMs) d'histones.

L'expression des gènes indépendamment de la séquence génique peut être impactée par trois processus principaux (**Figure 8**) :

a) Méthylation de l'ADN :

C'est le processus épigénétique le plus largement étudié.

D'un point de vue biochimique, cette marque épigénétique est caractérisée par l'addition covalente d'un groupement méthyle (CH₃) sur le carbone 5 des cytosines pour former la 5-méthylcytosine (5mC), principalement dans un contexte de dinucléotides CpG. La méthylation de l'ADN est catalysée par une famille d'enzymes appelées ADN méthyltransférases (DNMTs). DNMT3A et DNMT3B, dites ADN méthyltransférases « de novo », sont capables de méthyler de l'ADN précédemment non-modifié. DNMT1 fonctionne au cours de la réplication de l'ADN afin de copier le profil de méthylation du brin d'ADN parental sur le brin nouvellement synthétisé : il s'agit de l'ADN méthyltransférase dite « de maintenance ». Ces DNMTs, impliquées dans l'embryogénèse, voient leur expression significativement diminuée dans les cellules différenciées, suggérant que le profil de méthylation de l'ADN des cellules post-mitotiques est stable.

La méthylation de l'ADN dans les îlots CpG joue un rôle central dans la stabilité génomique et dans l'expression des gènes des mammifères (198).

Normalement, les événements de méthylation de novo sont secondaires à la répression des gènes. Ils servent de mémoire à long terme des décisions antérieures d'expression génique qui régule la fonction des cellules, et empêche la réactivation des gènes dans les générations de cellules suivantes (199,200).

La déméthylation de l'ADN peut être un processus passif lié à la prolifération des cellules, ou un processus actif. La déméthylation active est médiée par les enzymes de la famille TET, capables d'oxyder les cytosines méthylées pour former notamment des résidus de 5-hydroxyméthylcytidine (5hmC), qui sont ensuite remplacés par des cytosines non-méthylées via des mécanismes de réparation de l'ADN (201). Par ailleurs, l'enzyme AID, essentielle au processus d'hypermutation somatique (SHM) dans les cellules B du centre germinatif (GC), pourrait être une nouvelle candidate pour la déméthylation active de l'ADN. La déamination des 5mC entraînerait la formation de mésappariements T>G, induisant le recrutement de la machinerie de réparation de l'ADN, et ainsi la correction de la thymine en cytosine non méthylée (202,203). La déméthylation active des séquences régulatrices des gènes fait partie

intégrante des mécanismes qui conduisent la différenciation cellulaire par le biais de l'expression génétique (204,205).

La méthylation de l'ADN est notamment impliquée dans l'empreinte génomique, l'inactivation du chromosome X ou encore la suppression d'éléments transposables. Elle est aussi associée à la répression des gènes lorsqu'elle est située sur des régions régulatrices, empêchant ainsi la fixation de facteurs de transcription ou favorisant le recrutement de complexes corépresseurs de la transcription au niveau des promoteurs des gènes cibles. Par ailleurs, il a été suggéré que la méthylation des corps de gènes pouvait promouvoir la transcription (206). Cependant, des études récentes du méthylome de l'ADN et du transcriptome ont révélé que leur association est plus nuancée que ce qui avait été observé précédemment.

La méthylation de l'ADN peut en effet avoir de multiples rôles en fonction du contexte, notamment la présence d'autres modifications épigénétiques (207).

L'hydroxyméthylation de l'ADN, longtemps considérée comme étant un état transitoire, est présente de manière stable sur certains promoteurs, au niveau de corps de gènes activement transcrits et de régions régulatrices actives ou en état de pause. Le rôle de la 5hmC dans la régulation de la transcription des gènes reste cependant éluif. Il a été notamment suggéré qu'il était dépendant du type cellulaire et du contexte chromatinien (208).

-Méthylation d'ADN et cancer

Ces deux modifications des cytosines sont dérégulées dans de nombreux cancers.

En effet, l'oncogenèse est associée à une hypométhylation globale de l'ADN, une diminution globale du taux de 5hmC, ainsi qu'une hyperméthylation localisée de certains loci (207,208). Bien que ces aberrations du profil de méthylation ne soient pas toujours associées à l'expression des gènes, il a été montré que cette marque épigénétique pouvait être utilisée comme biomarqueurs pour le diagnostic, l'établissement du pronostic et le suivi de réponse aux traitements des patients atteints de cancers (209). Par ailleurs, une surexpression, des mutations ou des délétions des DNMTs ont été détectées dans différents cancers (210). Des protéines TET sont également mutées, anormalement transloquées ou sous-exprimées dans de nombreux cancers (211). De plus, l'utilisation de molécules inhibant les DNMTs sur plusieurs modèles de cancer a montré une réelle efficacité sur la prolifération et la survie des cellules tumorales, notamment via la réactivation de suppresseur de tumeur. La méthylation

de l'ADN constitue donc une cible thérapeutique potentielle dans les cancers. Des essais cliniques sont actuellement en cours dans différentes tumeurs solides (209).

b) Modifications des histones post-traductionnelles (PTMs):

Le premier niveau de compaction de l'ADN est caractérisé par l'enroulement de l'hélice d'ADN autour d'un octamère d'histone : c'est ce qui forme le nucléosome, et à une plus grande échelle, la chromatine. Il existe 5 classes d'histones : les histones H2A, H2B, H3 et H4 forment le cœur de l'octamère, alors que l'histone HP1 qui est l'histone « de liaison » permettant de stabiliser le nucléosome. Chaque classe d'histones (sauf H4) comprend plusieurs sous types, dont le profil d'expression dépend de la réplication ou du contexte cellulaire. Les histones exprimées dans les cellules proliférantes sont qualifiées de « canoniques ». Les autres sous-types, appelés les « variants d'histones », sont plus amplement exprimés dans les cellules différenciées par rapport aux cellules proliférantes (212) et jouent un rôle crucial dans la régulation de la ségrégation des chromosomes, de la transcription, de la réparation de l'ADN et bien d'autres processus (213,214).

Les acides aminés de la queue N-terminale des histones peuvent être modifiés au niveau post-traductionnel grâce à différents processus, tels que la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitylation ou encore la SUMOylation (215). Ces modifications chimiques sur différents acides aminés sont catalysées par de nombreuses enzymes, incluant les histones méthyltransférases (HMTs) et déméthylases (HDMs), les histones acétyltransférases (HATs) et déacétylases (HDACs), etc. (**Figure 9**). Un nombre croissant d'études mettent en évidence qu'une grande majorité des enzymes capables de modifier les histones sont également capables de modifier des protéines non-histones, régulant ainsi leur activité ou leur stabilité (216). Les PTMs d'histones sont héritées au cours de la phase de réplication du cycle cellulaire, et peuvent être éditées en cas de différenciation cellulaire ou en réponse à diverses perturbations.

La combinaison de différentes PTMs d'histones forme un « code histone » déterminant la structure et la fonction de région particulière de la chromatine (217). Les marques histones affectent le statut biochimique de la chromatine, et donc son degré de compaction et la structure du génome dans le noyau en phase répliative, en mitose et en interphase (218). Par ailleurs, elles représentent également un socle reconnu par les protéines dites « lectrices » au

niveau de régions régulatrices, recrutant elles-mêmes différents acteurs régulant la transcription des gènes, la réplication de l'ADN (219) ou encore la réponse aux dommages à l'ADN. De ce fait, les modifications post traductionnelles des histones jouent un rôle important dans le statut prolifératif des cellules, leur adaptabilité face à des perturbations externes, mais également dans les processus de différenciation et le maintien de l'identité cellulaire.

La collaboration d'un consortium international a permis de générer des profils de multiples modifications d'histones sur le génome entier, ayant des fonctions distinctes (H3K4me3 pour les promoteurs, H3K4me1 pour les enhancers, H3K27ac pour les régions régulatrices actives, H3K36me3 pour les régions transcrites, H3K27me3 pour la répression médiée par Polycomb et H3K9me3 pour l'hétérochromatine). L'acétylation et la désacétylation des lysines des histones entraînent respectivement l'activation (décompactations) et la répression (compaction) de la région chromatinienne affectée. Les lysines acétylées au niveau d'enhancers peuvent être reconnues par des protéines à bromo-domaines BET, recrutant elles-mêmes d'autres protéines régulant la transcription.

Le rôle de la méthylation des histones est moins évident, et dépend notamment du résidu méthylé. Le rôle de différentes classes d'histone lysine méthyltransférases (KMTs) ainsi que les modifications d'histones qu'elles catalysent est présenté dans la **Figure 10**.

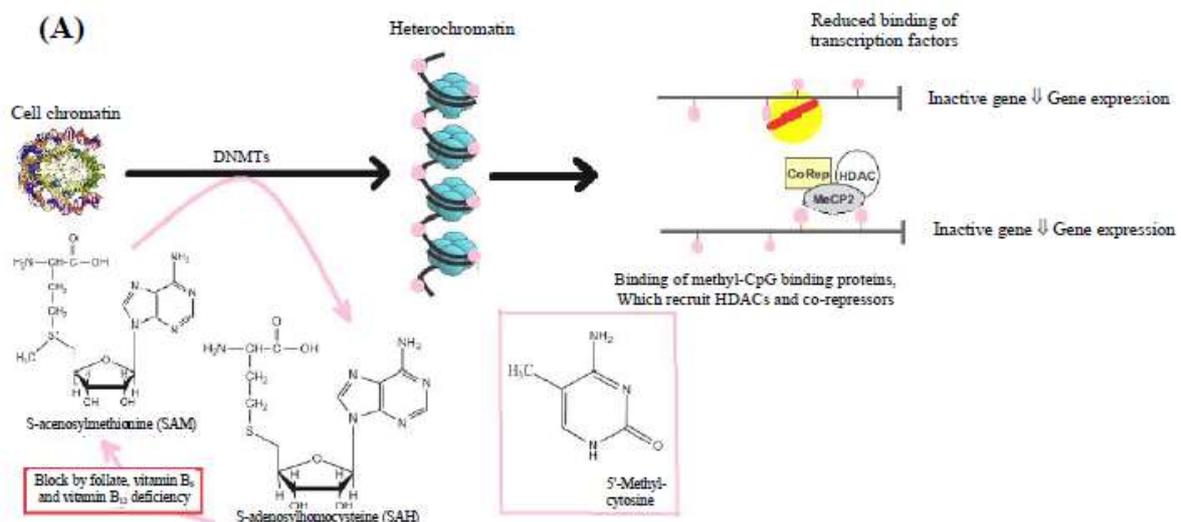
c) *MicroARN* :

Les microARNs sont des ARNs non-codants de 18-24 nucléotides capables de réguler l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel en se fixant, en collaboration avec le complexe RISC (Complexe de blocage de l'expression génique par des ARN)(RNA-induced silencing complex), sur la région 3'UTR de leur ARN messagers (ARNm) cibles. Cette interaction conduit à la diminution de la traduction ou la dégradation de l'ARNm. Leur potentiel de régulation est vaste : plus de 60% des gènes codant pour des protéines sont estimés susceptibles d'être des cibles de miARNs. Ces derniers constituent un mécanisme épigénétique redondant, d'une part du fait que chaque miARN peut avoir plusieurs ARNm cibles, mais également que chaque ARNm peut être ciblé par différents miARNs (220). Bien que les miARNs soient des facteurs héréditaires à travers la mitose et la méiose, capables de réguler l'expression des gènes sans changer la séquence d'ADN (221).

-MicroARNs et cancer

Les miARNs jouent un rôle important dans différents processus cellulaires, dont la prolifération, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation, la capacité d'invasion, et des fonctions spécifiques telles que les réponses immunitaires, les sécrétions hormonales ou l'angiogenèse. Tous ces processus sont impliqués dans le développement et l'évolution de cancers (222). L'expression de différents miARNs est dérégulée dans la plupart des cancers à travers différents mécanismes, dont des défauts de la machinerie de biogénèse des miARN, l'amplification/délétion de régions contenant des miARNs, ou un contrôle transcriptionnel aberrant (223). Les miARNs peuvent également être dérégulés par une méthylation anormale de l'ADN ou par des altérations des PTMs des histones (224). D'autre part, plusieurs miARNs, les épi-miARNs, sont capables de réguler différents acteurs épigénétiques (PRC1, PRC2, DNMTs, HDACs...); ces épi-miARN sont souvent dérégulés dans les cancers (225).

Les trois principaux mécanismes de modification épigénétique (méthylation d'ADN, modification des histones, synthèse de miARN) sont présentés dans la **figure 8**.



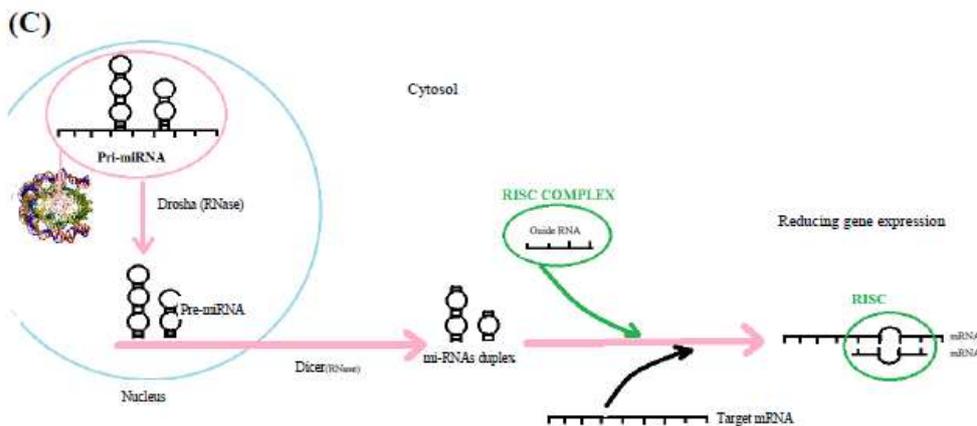
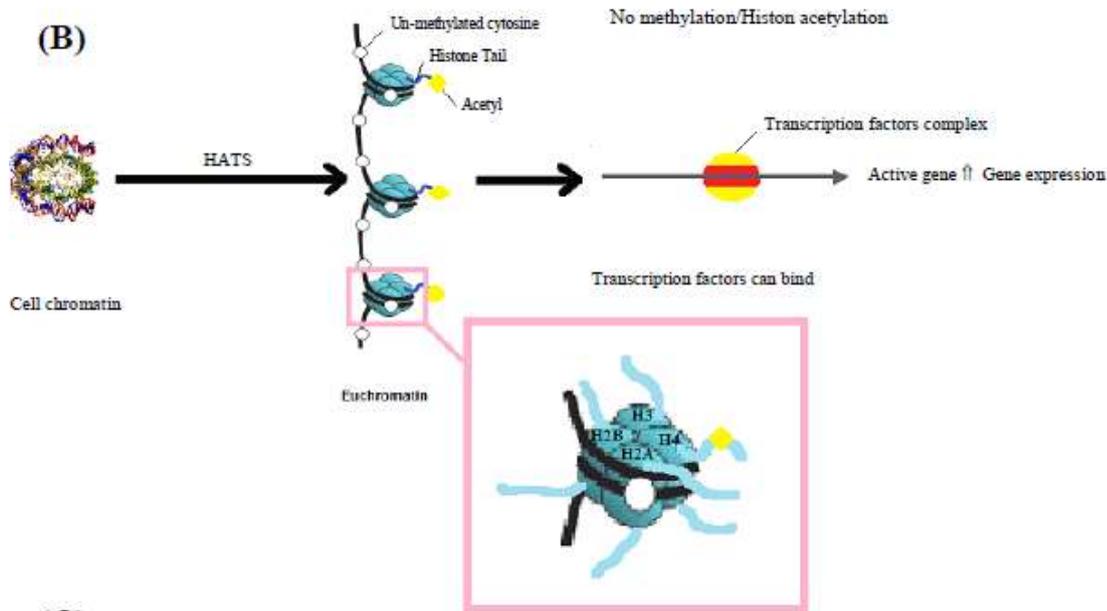


Figure 8 : Trois grands mécanismes de modification épigénétique. A) La méthylation de l'ADN. La méthylation de l'ADN est médiée par des enzymes ADN méthyltransférase sur les sites CpG. Elle peut également diminuer l'expression des gènes en réduisant la liaison des facteurs de transcription ou en augmentant la liaison des protéines du méthyl-CpG (226–229). B) Modification des histones. L'acétylation des histones, en particulier des résidus lysine des queues d'histones, est une modification importante des histones qui peut accélérer la liaison des facteurs de transcription puis l'expression des gènes à côté de la déméthylation de l'ADN (228–230). C) Les miARNs. La formation de miARNs commence

Methylase	Substrate	Yeast (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>Drosophila</i>	Mammals	Biochemical/ biological properties
KMT1	H3K9	Not detected	Su(var)3-9 KMT1A/B G9a KMT1C	SUV39H1/2 KMT1A/B G9A GLP KMT1C/D SETDB1 ATF7IP CAF1 HP1 KMT1E	Heterochromatin formation/silencing
KMT2	H3K4	Cps40 Cps60 Cps25 Cps50 Cps30 Set1 ySet1/COMPASS	Ash2 Dpy30 Rbbp5 Wds Cxxc1 Ash2 Dpy30 Set1 Rbbp5 Wdr82 Hcf Lpt Ash2 Dpy30 Rbbp5 Wds Utr Pat Ptp KMT2A/B KMT2F/G KMT2C/D Drosophila COMPASS Family	ASH2 DPY30 RBBP5 WDR5 MEN1 KMT2A/B HCF1 ASH2 DPY30 RBBP5 UTX PA1 MLL3/4 RBBP5 WDR5 PTIP MCOAS KMT2C/D Mammalian COMPASS Family	Active transcription; homeotic gene expression; nuclear hormone receptor signaling
KMT3	H3K36	Set2 CTD RNA Pol II KMT3A	Set2 Mes-4 CTD RNA Pol II KMT3A	SET2 WHSC1 CTD RNA Pol II KMT3A KMT3B	Active transcription
KMT4	H3K79	Dot1 KMT4	Grappa KMT4	AF10 DOT1 AF9 ENL TRRAP AF17 KMT4 DotCom	Active transcription; cell-cycle regulation; Wnt signaling
KMT5	H4K20	Not detected	PR-Set7 KMT5A Su(var)4-20 KMT5B/C	PR-Set7 KMT5A SUV4-20H1/H2 KMT5B/C	Transcriptional repression; DNA damage response
KMT6	H3K27	Not detected	Nurf56 Su(z)12 E(z) Eso/ Esci Jing Pol Jarid2 KMT6	RBBP4/ RBBP7 SUZ12 EZH1/ EZH2 EED AEBP2 PHF1 MTF2 PHF19 KMT6	Polycomb silencing; X chromosome inactivation; cell fate determination

Figure 10 : Tableau présentant différentes lysines méthyltransferases et la nature et les propriétés biologiques de leur substrat. (Adapté SnapShot de la revue Cell « Histone Lysine Methylase Complexes », par M. Mohan, H.M. Herz et A. Shilatifard).

ii. Les modifications épigénétiques de l'organisme

Les modifications épigénétiques sont un processus dynamique reflétant une interaction complexe entre un organisme et son environnement. Par exemple, l'acétylation des résidus lysine dans les sous-unités d'histone peut généralement avoir pour effet de promouvoir la transcription des gènes, ou la méthylation de Lys9 ou Lys27 de l'histone H3 est corrélée à la répression des gènes. En revanche, la méthylation de Lys4, Lys36 ou Lys79 de H3 est ordinairement associée à l'activité génique (230). La quantité héritable des expressions génétiques est d'environ 30 %, alors que ce pourcentage est réduit à environ 23 % dans les cellules cultivées en culture.

De telles associations entre les niveaux de méthylation et les variations génétiques ont été constatées dans plusieurs organismes, tissus et populations cellulaires (231,233,234).

Des études animales (235) ont montré que l'apprentissage contextuel dépendant de l'hippocampe peut susciter une mémoire liée à la peur remarquablement persistante, et que ce comportement dépend de la méthylation de l'ADN de novo. Les inhibiteurs des DNMT pourraient abolir la mémoire liée à la peur en empêchant la méthylation de l'ADN. D'autres études ont suggéré que l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN influencent la formation de la mémoire, et que la méthylation de l'ADN joue un rôle clé dans le stockage des souvenirs à long terme dans les régions corticales du cerveau (231,235).

Le rôle de la méthylation dans l'horloge biologique a fait l'objet d'une découverte intéressante ces dernières années. L'étude de 353 marqueurs épigénétiques (méthylation du dinucléotide CpG) dans l'ADN a permis de prédire le vieillissement des tissus (236). De même, le rôle de la méthylation et de l'acétylation au cours de la différenciation a été démontré en étudiant les régions promotrices de facteur de transcription 4 se liant à un octamère (Oct4) (octamer-binding transcription factor 4) (237). Au cours de ces dernières décennies, des mécanismes épigénétiques ont été impliqués dans plusieurs maladies liées au vieillissement. Le processus de vieillissement a été associé à ce qui semble être des changements stochastiques dans les modèles de méthylation de l'ADN dans de multiples tissus qui commencent dans l'embryon et se poursuivent lentement au fil du temps. Une étude (236) a comparé les locis méthylés dans des conditions physiologiques et pathologiques de 30 tissus différents provenant d'adultes et d'enfants a démontré que les événements de méthylation de l'ADN se produisent d'une manière hautement spécifique, et forment des modèles de vieillissement biologique spécifiques aux tissus. De même, une autre étude (238) a obtenu un estimateur de l'âge très précis sur la base de 71 CpGs provenant de l'ADN du sang adulte, qui est devenu un prédicteur de la santé humaine. Par la suite, une étude (239) a utilisé une moyenne de 10 biomarqueurs sanguins cliniques de l'âge pour sélectionner les CpG sanguins qui estiment l'âge biologique prédisant théoriquement la date du décès. Les marqueurs de méthylation peuvent être utilisés pour estimer l'âge et la mortalité liés à la maladie. En effet, la mortalité toutes causes est largement étudiée en association avec l'âge de méthylation de l'ADN. L'étude (240) réalisé sur 5124 personnes âgées du nord-est des États-Unis, a démontré que l'âge de la méthylation était associé à la mortalité, ce qui a été confirmé par des études plus récentes (241,242). En outre, une étude portant sur 86 jumeaux danois a révélé que le jumeau dont l'âge de

méthylation de l'ADN était le plus élevé au départ présentait une probabilité de 69 % de mourir le premier, sur une période de suivi de 10 ans (243).

Les mesures du vieillissement biologique basées sur la méthylation de l'ADN ont été associées à un risque accru de cancer et une survie plus courte au cancer, indépendamment de principaux facteurs de risque pour la santé (244,245).

Ces processus régulent l'expression des gènes en modulant la structure de la chromatine ou en régulant la liaison de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN. L'une des caractéristiques les plus importantes de ces mécanismes est qu'ils peuvent être modulés par de facteurs environnementaux tels que l'alimentation, le stress, l'activité physique, les habitudes de travail et la consommation d'alcool (246–248) (**Figure 11**) .

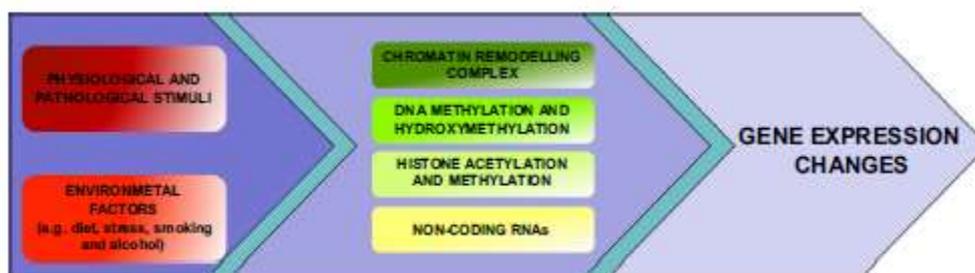


Figure. 11. L'ensemble des mécanismes épigénétiques qui favorisent les effets des stimuli physiologiques et pathologiques et des facteurs environnementaux sur l'expression des gènes. (Adapté Pagiatakis et al 2019) (249).

iii. Epigénétique et cancer

Le cancer est une maladie qui résulte de l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques.

Pour plusieurs cancers, le facteur de risque le plus important est l'âge (250). Les perturbations du génome sont liées aux modifications de l'environnement cellulaire, d'inflammation, la diminution de la fonction immunitaire et l'accumulation de dommages à l'ADN ce qui entraînerait une transformation maligne (251).

Afin d'élucider le rôle de la régulation épigénétique dans le cancer, plusieurs études ont, au cours des dernières décennies, concentré leur attention sur les mécanismes épigénétiques modifiés au cours du cancer. La dérégulation de la méthylation de l'ADN est l'une des

perturbations épigénétiques les plus courantes dans le cancer. La méthylation de l'ADN est une marque épigénétique associée à la régulation de la transcription et la structure de génome.

La perte de la méthylation de l'ADN au niveau d'éléments régulateurs et répétitifs tels que les éléments Alu (Alu) et les longs *éléments* nucléaires intercalés (LINE1) a été associée à une augmentation de l'instabilité génomique, entraînant des arrangements chromosomiques ce qui conduirait à la formation de tumeurs (252,253). À l'inverse, il a été démontré que dans certains types de tumeurs, c'est l'hyperméthylation des îlots CpG dans les régions promotrices de gènes suppresseurs de tumeurs qui est associée au développement du cancer (254) (**Figure 12**).

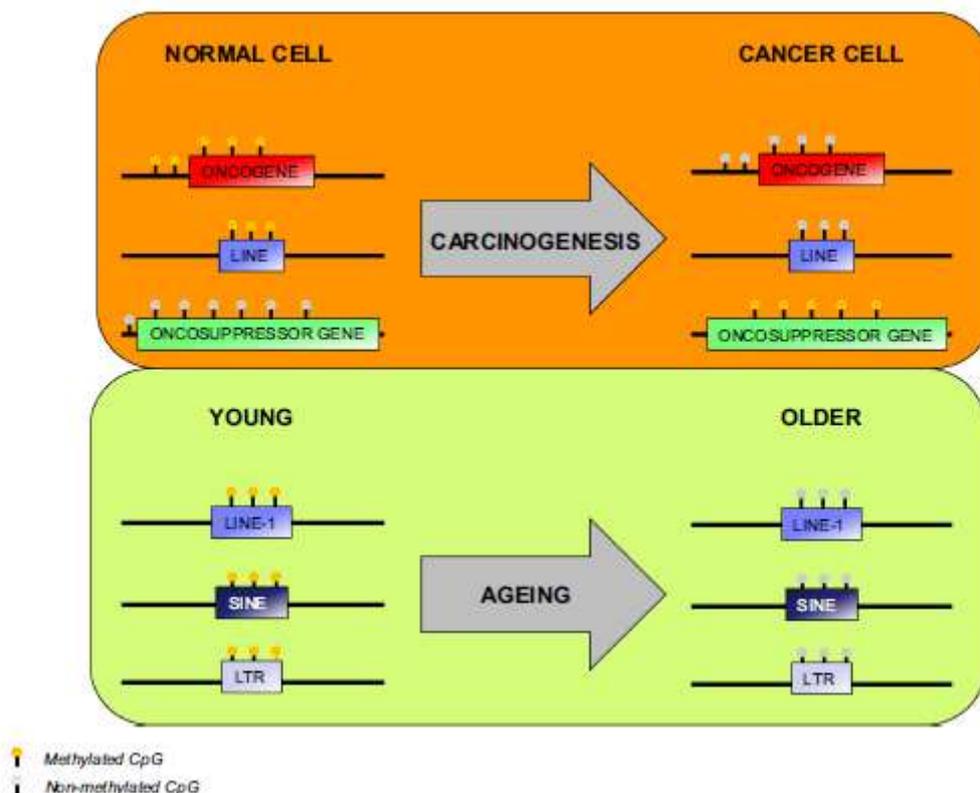


Figure 12 : Résumé des modifications de la méthylation de l'ADN dans la carcinogène et le vieillissement. (Adapté Pagiatakis et al 2019) (249).

Les modifications épigénétiques ont un effet considérable sur le cancer. L'hyperméthylation des régions promotrices des gènes suppresseurs de tumeurs peut inactiver de nombreuses fonctions suppressives de tumeurs. Les niveaux de méthylation jouent également un rôle important dans les divisions cellulaires, la réparation de l'ADN, la différenciation, l'apoptose,

l'angiogenèse, les métastases, la réponse aux facteurs de croissance, la détoxification et la résistance aux médicaments (227). De telles caractéristiques ont favorisé d'énormes progrès dans la détection précoce du cancer à l'aide des niveaux de méthylation. Par exemple, l'hyperméthylation des régions promotrices des gènes APC et RASSF1A est considérée comme un marqueur épigénétique commun pour la détection précoce du cancer (255). De même, l'hyperméthylation de la région promotrice de TP53 a été signalée comme un marqueur commun pour l'évaluation du développement du cancer (256). Il existe également d'autres types de modifications épigénétiques dans le cancer. Ces dernières années, la dérégulation des miRNA a été confirmée dans le cancer du sein, ce qui pourrait être utilisé comme biomarqueurs diagnostiques (257). De même, l'hyper- et l'hypo-méthylation de plusieurs gènes dans le cancer du sein ont été confirmées (258).

L'instabilité des microsatellites, l'instabilité chromosomique et le phénotype de méthylation des îlots CpG ont été identifiés comme trois mécanismes majeurs affectant la fonction des gènes dans le cancer colorectal (CCR). L'instabilité des microsatellites se produit dans 15% des CCR, ce qui peut entraîner une instabilité du phénotype par des gènes de réparation des mésappariements mutés ou méthylés (259). Dans une analyse complète des tumeurs CCR chez les patients iraniens, Brim et al. (260) ont démontré un taux d'instabilité des microsatellites élevé (18%). À partir de 15 gènes cibles de méthylation connus, APC2, PTPRD, EVL, GPNMB, MMP2 et SYNE1 se sont révélés méthylés dans la plupart des échantillons, qui peuvent être potentiellement utilisés comme marqueurs cliniques et pathologiques spécifiques du CCR dans cette population (260). Il a été rapporté que la pathogenèse du CCR est contrôlée par les miARNs, qui peuvent agir comme régulateurs des voies oncogènes et suppresseurs de tumeurs, responsables du développement du cancer. Il a été confirmé que différents miARNs peuvent être utiles comme biomarqueurs et sont potentiellement applicables dans l'évaluation du pronostic et la détection des stades du CCR (257). Il a également été observé qu'en l'absence d'activité O6-méthylguanine-DNMT en tant que protéine de réparation de l'ADN, les gènes spécifiques, tels que K-ras et p53, pourraient être accumulés par transition G-à-A. De plus, l'hyperméthylation près du codon de départ méthyl guanine-DNMT dans le locus spécifique est critique pour la progression du cancer, qui peut avoir une valeur pronostique chez les patients atteints de CCR (261).

Il a été indiqué aussi que les miARNs jouent un rôle important dans de nombreux types de cancer : leucémie myéloïde aiguë, leucémie lymphocytaire aiguë, leucémie myéloïde

chronique, leucémie lymphocytaire chronique, carcinome de l'endomètre, cancer gastro-intestinal, cancer du poumon, cancer de la vessie, tumeurs de la thyroïde et adénocarcinomes de l'œsophage. Par conséquent, les applications potentielles des miARNs dans le diagnostic et le pronostic de ces cancers seront mises en évidence dans un avenir proche (257).

Les gènes de l'isocitrate déshydrogénase 1 (IDH1) et de l'IDH2 sont fréquemment mutés dans les gliomes de bas grade, les leucémies myéloïdes aiguës de novo chez l'adulte et dans les sous-ensembles de chondrosarcomes et de lymphomes. De manière intéressante, une corrélation élevée entre le phénotype de méthylation des histones et de l'ADN dans les gliomes mutants IDH a été rapportée (230). Dans **les tableaux 5, 6 et 7**, les modifications épigénétiques dans différents types de cancer sont présentées.

Type de cancer	Gènes	Méthylation du promoteur	Référence
Sein	RARB2, MSH2, ESR1B, AKR1B1, COL6A2, GPX7, HIST1H3C, HOXB4, RASGRF2, TM6SF1, ARHGEF7, TMEFF2, RASSF1, BRCA1, STRATIFIN, RASSF1A	Hyperméthylation	262
Gastrique	RUNX3	Hyperméthylation	262
Foie	CDKN2A	Hyperméthylation	262
Œsophage	APC	Hyperméthylation	262
Colorectal	SEPT9, hMLH1, CDKN2A/p16, HTLF, ALX4, TMEFF2/HPP1, NGFR, SFRP2, NEUROG1, RUNX3, UBE2Q1	Hyperméthylation	263,264
Poumon	RARB2, RASSF1A, CHFR, STRATI-FIN, SHOX2, RASSF1A, APC1	Hyperméthylation	262

Tableau 5. Méthylation des promoteurs dans différents types de cancer (262–264). (Adapté Azam Moosavi et al 2016) (232).

Type de cancer	Type de modification de l'histone	Référence
Adénocarcinome du poumon	Hyper-régulation de l' α -2 glycoprotéine 1 en conséquence de l'acétylation globale des histones.	265
Carcinome pulmonaire non à petites cellules	Désacétylation globale de H3	266
Gastrique	Triméthylation globale de H3K9 [107] Silence de RUNX3 en conséquence de l'augmentation de la diméthylation de H3K9 et de la diminution de l'acétylation de H3	267, 268
Prostate	Acétylation globale de H3K9, H3K18, et H4K12 et diméthylation de H4K3 et H3K4 [109] Activation de PTEN, CYLD, p53 et FOXO3a par la modulation de la méthylation et de la désacétylation des histones H3K9 [110].	269,270
Colorectal	Désacétylation globale de H3K9	271
Pancréatique	Acétylation de la région promotrice de l'histone H3 de C/EPB α [112]	272

Tableau 6. Modifications des histones dans différents types de cancer (265–272) (Adapté Azam Moosavi et al 2016) (232).

Type de cancer	Types de miRNA [(+)= hyper-régulation/(-)= hypo-régulation
Carcinomes épidermoïdes de l'œsophage	miR-21(+)
Poumon	miR-17-92 (+) miR-34c, miR-145, et miR-142-5p, let-7(-)
Carcinome épidermoïde primaire de la tête et du cou	miR-1, miR-133a, miR-205, et let-7d(-) hsa-miR-21(+)
Gastrique	miR-106a(+) miR-433 et miR-9(-)
Prostate	miR-135b et miR-194(+) miR-23b, miR-100, miR-145, miR-221, miR-222(-)
Mélanome	miR-182(+)
Hépatocellulaire	miR-18a(-)
Colorectal	miR-let 7g, miR-21, miR-20a, famille de miR-17-19, miR31, miR 135, miR-181b, et miR 200c (+) miR-34, miR-let7, miR-143, miR-145, miR-133b, et miR-126(-)
Vessie	miR-2 23, miR-26b, miR-221, miR-103-1, miR-185, miR-23 b, miR- 203, miR 17-5p, miR-23, miR-205(+) miR-29c, miR-26a, miR-30c, miR-30e-5p, miR-45, miR-30a-3p, miR-133a, miR-133b, miR-195, miR-125b, and miR-199a (-)
Sein	miR-21, miR-155, miR-23, et miR-191(+) miR-205, miR-145, miR-10b, et miR-125b (-)

Tableau 7. Les changements de miARN dans différents types de cancer (231,257,273). (Adapté Azam Moosavi et al 2016) (232).

iv. Epigénétique et CCAs

Il a été démontré que l'épigénétique jouait un rôle important dans l'initiation et la progression des CCAs, en affectant le phénotype tumoral en l'absence de modifications des séquences d'ADN (274).

La dérégulation de la méthylation, les modifications des histones et l'expression aberrante des ARN non codants favorisent une transcription et un déséquilibre de l'expression génique qui modifie l'homéostasie cellulaire et entraîne la transformation maligne.

Des études épigénétiques ont montré des mutations fréquentes à la fois dans IDH1 et IDH2 dans le CCA (275,276). Les mutations dans l>IDH sont associées à une hyperméthylation des îlots de CpG, ce qui suggère une dérégulation globale au sein du programme transcriptionnel (275). L>IDH1 a été souligné comme étant un rhéostat épigénétique qui, lorsqu'il est muté a été proposée pour remodeler le paysage génomique avec une conséquence globale sur la machinerie transcriptionnelle, déclenchant une altération du processus cellulaire de différenciation (277). Il est important de noter que les mutations de l>IDH provoquent la dérégulation du facteur nucléaire hépatocytaire 4 α (HNF4 α), bloquant la différenciation des hépatocytes et favorisant ainsi le cancer des voies biliaires (278). Les promoteurs de plusieurs gènes impliqués dans la voie de signalisation Wnt sont hyperméthylés dans les tissus de CCA (279). Un certain nombre de publications suggèrent fortement que les changements épigénétiques sont des événements précoces dans le processus malin, en reliant l'épigénétique de la tumeur au microenvironnement (280) et ouvrant des possibilités de détection précoce de CCA (281). En particulier, la surexpression de l'histone désacétylase 6 (HDAC6) a été rapporté dans le CCA ; elle favorise le raccourcissement du cil primaire et l'hyperprolifération subséquente (282).

De plus en plus, des études confirment la dérégulation de la méthylation dans les cellules des CCAs par rapport aux cellules normales avec une hyperméthylation prévalent dans plusieurs sites CpG dans les cellules CCA (279,283).

L'une des plus grandes études d'analyses génétiques et épigénétiques intégratives en CCA, incluant 489 CCA de dix pays / régions, a montré comment la composition moléculaire de CCA va au-delà de la différenciation selon le site anatomique (284).

En effet, en combinant le séquençage d'ADN avec des analyses transcriptomiques et des méthylation de l'ADN, quatre groupes (clusters) de CCA avec des résultats cliniques différents ont été identifiés.

Deux sous types de CCA hyperméthylés se sont démarqués, avec une association intéressante entre l'hyperméthylation des îlots CpG et les tumeurs liées à la douve du foie, une augmentation du taux de mutation, une régulation négative de l'enzyme de déméthylation de l'ADN (TET1), une régulation positive de l'histone méthyltransférase (EZH2) et une augmentation du taux de événements de désamination.

Inversement, le sous-groupe des CCAis enrichi en mutations IDH1/2 et BAP1, ainsi qu'en translocations de FGFR, présentait une hyperméthylation des îlots CpG (les régions qui flanquent immédiatement les îlots CpG jusqu'à 2 kb de distance). Ce schéma différent suggère comment la dérégulation épigénétique précoce causée par des événements cancérigènes externes (par exemple, la douve du foie) sont à la base du développement de CCA dans le premier groupe, alors que dans le deuxième groupe, les aberrations épigénétiques surviennent probablement comme une conséquence en aval de mutations somatiques (IDH) qui produisent des oncométabolites responsables de l'hyperméthylation de l'ADN.

Ces différences ont de remarquables implications cliniques, car d'une part, les événements épigénétiques précoces pourraient être utilisés pour la détection précoce des tumeurs du premier groupe (en utilisant des marqueurs quantitatifs de méthylation de l'ADN dans la bile des individus à risque) (285) et d'autre part, les mutations clonales des tumeurs pourraient être un marqueur de thérapies ciblées efficaces (comme les inhibiteurs de l>IDH).

Les données sur le méthylome peuvent également fournir des informations sur l'origine des cellules de CCA. CCA est une tumeur à forte occurrence génétique et épigénétique qui semblent présenter un enrichissement d'événements liés à la régulation des cellules souches embryonnaire (286–288). Les tumeurs mutées par l>IDH plutôt ressemblent au profil des CCAs cholangiocellulaires qui montrent une expression génique de la transition épithélialo-mésenchymateuse (TEM) (288).

Les modifications d'histones ont été peu étudié dans les CCAs. Les enzymes histone désacétylase (HDAC) sont responsables de la régulation de l'acétylation des histones qui affecte finalement l'organisation de la chromatine. HDAC montre une hyper-régulation dans la CCA in vitro (289), et sont étudiés comme cibles de traitement. Les résultats suggèrent

également que les inhibiteurs d'HDAC, ainsi que le Dasatinib, pourraient être particulièrement actif dans les cellules tumorales mutées par IDH (290,291) .

Les ARN non codants représentent environ 98% des ARN humains et incluent les microARN (miARN) et les longs non codants ARN, entre autres. Ces ARN non codants régulent l'expression des gènes cibles affectant toutes les caractéristiques du phénotype du cancer de la prolifération cellulaire et la migration vers TEM et la réglementation de la cil primaire dans les cholangiocytes (292–296) (**Figure 13**).

Les altérations épigénétiques les plus courantes identifiées dans le CCA sont (IDH1 et IDH2) (297–301) et les facteurs de remodelage de la chromatine (histone-lysine N-méthyltransférase 2C, également appelée MLL3) (302), y compris le complexe SWI / SNF (ARID1A, PBRM1 et BAP1) (230,260,261,264) et la voie de signalisation Notch dérégulée, qui est un élément clé de la différenciation des cholangiocyte et développement de cancer des voies biliaires (**Tableau 8**).

Cible moléculaire	Rôle fonctionnel	Caractéristiques cliniques possibles	Référence
IDH1, IDH2	Maintien du génome (épigénétique, Méthylation de l'ADN)	Altération de la méthylation Statut et Survie	(297–301), (275–278)
Complexe SWI-SNF (ARID1A, PBRM1, BAP1)	Activation du remodelage de la chromatine	Mauvais pronostic	(297–301)
Lignée mixte de leucémie 3 (MLL3 ou KMT2C)	Méthyltransférase ou remodelage de la chromatine	Activation	(302)
HDAC6	Régule la morphologie ou la fonctionnalité primaire du cilium	Surexprimé	(282)

Tableau 8. Altérations épigénétiques trouvées dans le cholangiocarcinome. (Adapté Jesus et al 2016)(3).

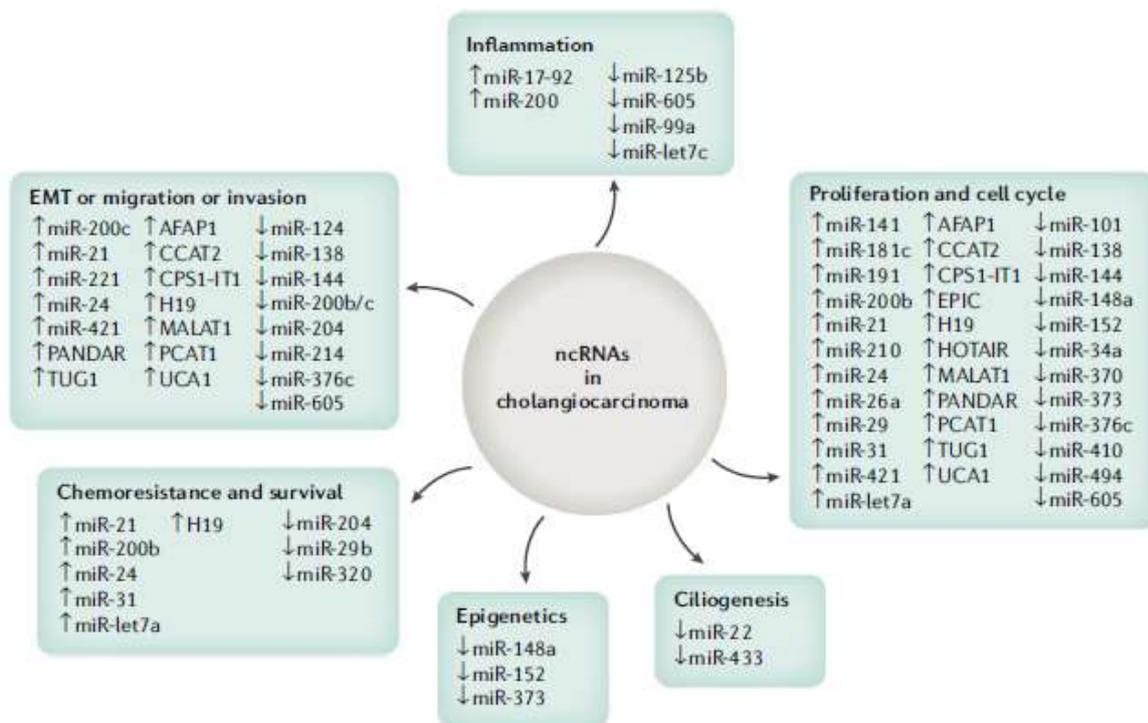


Figure 13 : ARN non codants dans le cholangiocarcinome et leur relation avec différents processus tumorigène. Les ARN non codants (ARNnc) qui se sont avérés être dérégulés (vers le haut ou vers le bas) dans le cholangiocarcinome et qui ont des rôles clés dans la régulation des processus cellulaires, tels que la prolifération, le cycle cellulaire, la ciliogenèse, l'épigénétique, l'inflammation, chimiorésistance, survie, transition épithélialo-mésenchymateuse (TEM), migration et invasion. (Adapté Jesus et al 2020) (9).

II. Objectifs

Le Cholangiocarcinome est un cancer de mauvais pronostic avec un arsenal thérapeutique limité. Les variations géographiques et ethniques dans l'épidémiologie des CCAs reflètent des influences génétiques et environnementales et peuvent rendre compte de l'hétérogénéité de l'entité de CCA.

Les étapes tissulaires de la carcinogenèse biliaire sont mal connues mais est décrite sur le schéma de l'évolution du cancer gastrique de type intestinal où la muqueuse gastrique normale fait la place de l'hyperplasie suivie de la métaplasie et la dysplasie avant la survenue de l'adénocarcinome.

Dans cette approche le microbiote biliaire apparaît comme un élément clé dans la physiopathologie des CCAs. La dysbiose au cours des CCAs est en cours de caractérisation grâce au développement et à l'utilisation de nouveaux outils. L'ARNr 16S puis les techniques de séquençage avec l'aide de la bio-informatique ont permis le séquençage de génome du microbiote. Ces nouvelles données permettent de mieux caractériser le microbiote biliaire pour définir cette dysbiose.

Au-delà de cette action directe, le microbiote s'inscrit dans un écosystème complexe dont le bon fonctionnement permet le maintien de l'homéostasie. Au cours d'une dysbiose, les modifications de l'équilibre bactérien pourraient participer à la promotion de la carcinogenèse. Ces modifications de l'écosystème sont autant de pistes pour tenter de restaurer une symbiose.

Dans ce contexte, notre étude vise à :

Caractériser le microbiote biliaire sans à priori et identifier une dysbiose biliaire chez des individus atteints de CCA en comparaison à des sujets contrôles avec des pathologie biliaire bénigne (PBB) car il est difficile d'obtenir de la bile des sujets normaux.

Le cancer est une maladie qui résulte de l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques. De plus, le comportement des bactéries vis-à-vis des cellules de l'hôte met davantage l'épigénèse en branle que des modifications structurales d'ADN. Ainsi, les bactéries pourraient impacter l'expression des gènes en modulant la structure de la chromatine ou en régulant la liaison de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN. Ces

modifications sont sous le contrôle d'autres facteurs environnementaux et le temps d'exposition (vieillessement).

Dans ce contexte, notre étude vise à :

Caractériser le profil des gènes hypo et hyper méthylés circulant à l'aide de l'analyse de cellules sanguines et tissulaire tumorale en comparaison aux tissus normaux chez les patients atteints de CCA, pour identifier des gènes candidats dont l'expression est modifiée.

III. Matériels et méthodes

1. Analyse de Microbiote

1.1 Patients et méthodes

Entre 2010 et 2016, du liquide biliaire a été prélevé au cours d'une CPRE chez 75 personnes consécutives adressées à des centres tertiaires et présentant une obstruction biliaire et suspectés d'avoir soit une CCA, ou une lithiase des voies biliaires. Un centre hospitalier et universitaire (Hôpital Firouzgar, Teheran-Iran) a été à l'origine de la collection biologique.

Conformément à la Déclaration d'Helsinki, le protocole de recherche de surveillance et d'obtention d'échantillons de sang et de bile a été approuvé par le Comité d'éthique de l'Université des sciences médicales d'Iran sous l'ID : IR.IUMS.REC.1397.115 encadrant l'activité du centre partenaire.

Après l'explication complète du but et des procédures de l'étude par un médecin, les patients ont signé un document de consentement officiel, qui doit être conservé par le partenaire iranien pendant 15 ans. Tous les participants étaient des adultes ayant une cognition supérieure à la normale. Les critères d'inclusion étaient les suivants : adultes âgés de 21 ans ou plus ; suspicion d'obstruction biliaire due à un cholangiocarcinome ou à une lithiase sur la base de taux élevés d'enzymes hépatiques et de bilirubine totale ; présence d'une sténose à l'échoendoscopie ou à la cholangiopancréatographie par résonance magnétique (CPRM). Les critères d'exclusion étaient les suivants : antécédents d'hépatite virale, d'hépatite auto-immune, d'hépatite alcoolique, de stéatohépatite non alcoolique (NASH), d'hépatite induite par des médicaments et de chimiothérapie. Lors d'une CPRE les patients ont eu un brossage biliaire après le prélèvement d'un mL de bile. Pour éviter tout contact et toute contamination avec la muqueuse duodénale lors de la CPRE, une fois la sortie du canal de l'endoscope positionnée à l'entrée du canal biliaire, un cathéter biliaire a été utilisé pour la canalisation du canal biliaire et un 1 à 2 ml de bile a été prélevé avant le brossage pour la cytologie ; les deux échantillons ont été utilisés pour les analyses microbiologiques et pathologiques et ont été transférés au laboratoire du centre de recherche gastro-intestinale et hépatique (GILDRC) du CHU et conservés à -80°C jusqu'à l'analyse. Les patients dont la cytologie ou les biopsies

suggéraient une CCAe ont été enregistrés et pré sélectionnés jusqu'à ce que les lésions soient confirmées histologiquement sur la base des échantillons biopsiques ou chirurgicaux (le cas échéant). Pendant la période d'étude qui n'a pas dépassé 15 mois, la population totale de l'étude comprenait 30 patients atteints d'une CCAe et 50 patients atteints d'une lithiase, ces derniers étant considérés comme des contrôles, en raison du diagnostic final de pathologie biliaire bénigne. Cinq patients ont été exclus de l'analyse (deux dans le groupe CCAe et trois dans le groupe contrôle) en raison de l'absence d'échantillons protocolaires ou de confirmation de la maladie. Les échantillons congelés ont été transférés au laboratoire de l'EC2M3 en France en condition contrôlée pour l'extraction et le séquençage de l'acide désoxyribonucléique (ADN). En bref, 28 patients CCAe ont été comparés à 47 témoins. Les patients ont été classés en deux sous-groupes supplémentaires : ceux présentant des maladies associées, telles que le diabète, les maladies inflammatoires de l'intestin (MII), la cholangite sclérosante primaire (CSP) et la pancréatite, ainsi que ceux ne présentant aucune maladie associée.

1.2 Extraction d'ADN biliaire

Les liquides biliaires ont été immédiatement congelés après le CPRE jusqu'à l'extraction de l'ADN. Une même procédure d'extraction d'ADN non biaisée a été appliquée à tous les échantillons, avant que la métagénomique ciblée ne soit réalisée. La pré-extraction par homogénéisation des billes qui est assurée la rupture de paroi des cellules, a été suivie de l'extraction à l'aide d'un kit commercial QiaSymphony (Qiagen, Hilden, Allemagne), selon les instructions du fournisseur. L'ADN ainsi extrait a été soumis ensuite au processus de séquençage. Un contrôle négatif a été testé dans chaque série, et des contrôles positifs ont été utilisés pour évaluer la performance des techniques métagénomiques de détection des bactéries (Zymobiomics®, Ozyme, Montigny le Bretonneux, France).

1.3 Métagénomique ciblée

La métagénomique ciblée comprend l'étude de bibliothèques d'amplicons des domaines V3-V4 (16S-V3V4) (303) du gène bactérien ARNr 16S. Les amplicons ont été préparés à partir de

d'une solution finale de 5mL d'extraits d'acides nucléiques, selon le protocole de préparation de la bibliothèque de séquençage métagénomique 16S fourni par le fabricant (Illumina, San Diego, Californie, USA). Le contrôle de qualité a été évalué à l'aide d'un ScreenTape D1000 sur une TapeStation (Agilent, Santa Clara, Californie, États-Unis). Les quantités d'ADN ont été déterminées par le kit Quant-it dsDNA Assay (ThermoFischer, Waltham, MA, États-Unis) sur un Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Allemagne).

Toutes les librairies ont été normalisées en nM, regroupées et dénaturées avant le séquençage en fin de pair (v3-v4, 2 x 300 pb) sur un appareil MiSeq (Illumina, San Diego, Californie, États-Unis). Les régions bactériennes ciblées ont été séquencées selon les instructions du fabricant (304).

Au total, 10 483 756 « paired-reads » ont été séquencés (137 944,16 +/- 41 883,18 read/échantillon, longueur : 25-251bp). Après vérification de la qualité avec le logiciel FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>, v0.11.9), les reads de moins de Q20 (en utilisant une fenêtre coulissante de 5pb) et d'une longueur minimale de 100bp (en utilisant trimmomatic, v0.39) (305) ont été filtrées pour défaut de qualité. Les reads de qualité ont été fusionnées à l'aide du logiciel FLASH2 (v2.2.0, <https://github.com/dstreett/FLASH2/blob/master/README>) (306), ce qui a donné 120 716,70 +/- 38 924,65 (87,4 +/- 5,6 %) paires combinées par échantillon. Nous avons ensuite utilisé les logiciels MALT (v0.4.1, <https://software-ab.informatik.uni-tuebingen.de/download/malt/welcome.html>) et Megan6 (v6.17.0) (307) avec la base de données ARNr SILVA (v132) (308) pour l'assignation taxonomique, en utilisant les paramètres adaptés à l'ARN16S ("SemiGlobal" / "mif" / "LCA"). Les abondances ont été exportées sous forme de matrice d'observation biologique (BIOM) pour des analyses supplémentaires en lien avec les données cliniques.

1.4 Analyse des données

Les différences liées au sexe, aux maladies associées et au diabète ont été évaluées à l'aide du test χ^2 (Chi-squared) (GraphPrism 8), tandis que les différences liées à l'âge et à l'indice de masse corporelle (IMC) ont été évaluées à l'aide du test t (la distribution normale a été évaluée à l'aide du test de D'Agostino-Pearson). Des analyses finales ont été effectuées chez des contrôles (N=47) et des patients atteints de CCA (N=28). Les valeurs ont été considérées

comme statistiquement significatives pour la valeur de $p < 0,05$. L'analyse du PCoA, des chiffres et du microbiote différentiel a été réalisée à l'aide de l'application Shiny pour l'analyse métagénomique (Shaman) intégrée dans le programme de l'Institut Pasteur de Paris disponible en ligne (<http://shaman.pasteur.fr/>) (309). Pour l'analyse d'abondance différentielle, nous avons utilisé le tableau BIOM et le fichier " cible " qui associe chaque échantillon à ses variables explicatives. Les abondances des bactéries ont été résumées aux niveaux Phylum et Genre. L'analyse statistique dans SHAMAN est basée sur le paquet DESeq2/R qui modélise les comptes d'abondance avec une distribution binomiale négative. Pour le plan expérimental, nous avons sélectionné les variables suivantes : sexe, IMC, âge, diagnostic (contrôle/CCA) et maladies associées. Nous avons également inclus l'interaction entre le diagnostic et les maladies associées dans le modèle. Nous avons utilisé des paramètres par défaut, tels que la "normalisation pondérée non nulle", selon Volant et al (310) et tient compte de manière plus précise de la sparsité de la matrice. SHAMAN/DESeq2 produit la moyenne de base et le FoldChange (et \log_2 FoldChange) et une valeur p ajustée. Les résultats ont été corrigés à l'aide de la méthode d'ajustement de Benjamini-Hochberg. Pour être retenu comme différentiellement abondant, un taxon (phylum ou genre) devait remplir les critères suivants : valeur p ajustée $< 0,05$ et baseMean > 100 .

2. Analyse Epigénétique

2.1. Patients

Une cohorte totale de 68 échantillons incluant tissus et effluents (sang et bile) d'individus a été utilisée pour l'analyse de méthylation.

Le liquide biliaire, milieu directement en contact avec CCAe de 30 patients ($n = 6$ CCA, $n = 12$ lithiase et $n = 12$ cancers du pancréas), a été soumis à des puces de méthylation biliaire (les caractéristiques des patients sont résumées dans le tableau 9 A. Les échantillons de sang de 8 patients ($n = 4$ ACC et $N = 4$ contrôles), ont été soumis à des analyses de puces PBMC ; les caractéristiques des patients sont résumées dans le tableau 9 A. Il n'y avait pas de différence significative entre ces deux groupes en termes d'âge, de sexe ou d'IMC.

Les expressions protéiques des gènes présentant un profil de méthylation à la fois dans le sang et dans la bile, tel qu'obtenu après les analyses de puces de méthylation, ont été évaluées chez 30 patients (10 avec des adénocarcinomes pancréatiques, 10 avec des CCAe et 10 avec des CCAi) en utilisant l'IHC (les caractéristiques des patients sont résumées dans le tableau 9 A. Il n'y avait pas de différence significative entre ces groupes en termes d'âge, de sexe ou d'IMC.

Les échantillons ont été obtenus entre 2014 et 2016 dans les hôpitaux de l'Université Henri Mondor (Créteil-APHP), Hôpitaux universitaires Pitié Salpêtrière - Charles Foix (Paris-APHP) en France et Firouzgre (Téhéran-Iran), trois centres tertiaires. Ils consistaient en un prélèvement de sang total (5 ml) et de bile (1-2mL) chez 75 individus consécutifs sous CPRE (détails décrits ailleurs (14) qui a été réalisé pour le diagnostic et la thérapie de l'obstruction biliaire. Brièvement, la méthylation du liquide biliaire chez 6 patients avec CCAe a été comparé à ceux de 12 individus avec une lithiase biliaire et 12 patients avec un adénocarcinome pancréatique et la méthylation des PBMCs chez 4 patients CCAe a été comparé aux PBMC de 4 individus contrôles avec une lithiase biliaire, en utilisant des puces de méthylation dédiés. Conformément à la Déclaration d'Helsinki, les protocoles de recherche et la surveillance ont été expliqués aux patients et un consentement éclairé a été obtenu pour le prélèvement d'échantillons de sang et de bile, comme décrit ailleurs (311). En France, conformément à la loi française, l'étude a été approuvée par le comité d'éthique de Paris Ile de France selon le principe de "non-opposition" du patient pour l'utilisation des échantillons obtenus pour le diagnostic en intention de recherche sous l'unité réglementaire de l'Assistance Publique hôpitaux de Paris-APHP (URC).

2.2 Méthodes

Des échantillons de tissus chirurgicaux comprenant des composants normaux homologues provenant de patients atteints de CCAe (n=10), de CCAi (n=10) et d'adénocarcinome pancréatique (n=10) et provenant des Hôpitaux Universitaires Pitié Salpêtrière - Charles Foix (Paris-APHP). L'étude investigatrice a été soumise à la déclaration de non-opposition du patient pour l'utilisation des échantillons obtenus pour le diagnostic en intention de recherche. Les données disponibles dans les dossiers cliniques ont été obtenues.

Les caractéristiques des patients et des tumeurs sont résumées dans le tableau 9 B. Aucun des patients recrutés n'avait reçu de radiothérapie, d'hormonothérapie ou d'autres thérapies antitumorales connexes avant la chirurgie. Il n'y avait pas de différence significative entre les différents groupes en termes de sexe ou d'IMC, mais il y avait une différence significative en termes d'âge entre les deux groupes : CCA intrahépatique et adénocarcinome pancréatique, avec une valeur p de 0,0029.

A-

	Nombre des cas	Genre N Femelle: Male	Indice de masse Corporelle (IMC), moyen (écart-type)	Age, moyen (écart-type)
Contrôle	16	9:7	25 (5)	66.5 (10)
CCAe	20	8:12	25.5 (5)	66.3 (9)
CCAi	10	5:5	22 (4)	65 (7)
Adénocarcinomes pancréatiques	22	10:12	21 (3)	71.5 (5)
Totale	68	68		

B-

Caractéristiques	Adénocarcinomes pancréatiques N=10	CCAe N=10	CCAi N=10
Genre			
Classification TNM	T3 N1=5 T2 Na1= 1 T3 N0= 3 T3 N1b= 1	T3 N0=1 T3 N1= 3 T2 N0= 1 T2a N1= 1 No identifié=4	T2 N0=1 T3 N1x= 1 T1 N0= 1 T2b N0 M0= 1 No identifié=6
Chimiothérapie	Oui= 7 Non= 1 Non identifié= 2	Oui= 3 Non= 3 Non identifié= 4	Non= 3 Non identifié= 7

Tableau 9: Caractéristiques des patients. A. Pour la puce de méthylation des PBMC, la puce de méthylation de la bile et pour l'IHC. B. Caractéristiques de la tumeur pour l'IHC.

Test de Fisher pour la comparaison des sexes et test de Wilcoxon ou Kruskal-Wallis pour les comparaisons d'IMC et d'âge. Pas de différence significative (valeur $p < 0,05$).

2.3. Extraction de l'ADN et détection de la méthylation à l'aide des puces de méthylation

Des échantillons de sang périphérique ont été obtenus auprès de patients atteints de CCAe et des contrôles et les lymphocytes circulants ont été isolés selon la méthode Ficoll. Celle-ci consistait d'abord en une centrifugation pour séparer le plasma ; ensuite, une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) a été ajoutée à la couche tampon et remise en suspension

pour obtenir des PBMCs selon le gradient de densité Ficoll. Le produit final a été conservé à -80 °c jusqu'à l'analyse.

L'ADN génomique a été isolé des PBMC et du liquide biliaire, en utilisant respectivement le QIAamp DNA Blood MiniKit (Qiagen, Hilden, Allemagne) et le QIAamp DNA MiniKit (Qiagen, Hilden, Allemagne). La qualité des ADN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose.

Les ADN ont été modifiés à l'aide du protocole bisulfite selon les instructions du fabricant et comme décrit avant d'être incubés avec deux puces de méthylation dédiées d'Illumina (INTEGRAGEN, France) selon les recommandations du fabricant : Illumina Infinium `HumanMethylation27` (v1.27K) (27578 sondes) et Infinium Methylation Epic BeadChip (MethEpic v1.0) 85K (865918 sondes) pour la bile et les PBMC, respectivement. R (On trouvera des détails à ce sujet dans la réf. 312). L'ensemble du processus, de la conversion au bisulfite de l'ADN matrice à la numérisation des puces, prend quatre jours ouvrables. La conversion au bisulfite des échantillons d'ADN génomique est faite à l'aide du kit de méthylation de l'ADN Zymo EZ. Les échantillons traités au bisulfite ont été traités à l'aide de puces dédiées. Après le traitement, les cytosines non méthylées se convertissent en uracile, alors que les cytosines méthylées restent inchangées. Le statut de méthylation de chaque sonde a été déterminé en calculant le rapport des signaux fluorescents et les valeurs exprimées comme 0 (non méthylée) à 1 totalement méthylée.

2.4 Classification du statut des sondes

Nous avons défini un statut pour chaque sonde comme hypo-, none- ou hyper-méthylée dans chaque groupe selon le niveau de méthylation allant de 0=non-méthylée jusqu'à 1=complètement méthylée : 1) nous calculons la valeur médiane (M) des valeurs bêta d'un groupe (les sondes associées à une valeur $p > 0,05$ ont été définies comme "NA" (non disponible), 2) au moins 75 % des échantillons d'un groupe ont une valeur bêta inférieure (resp. supérieure) à 0,2 (resp. 0,6). Ainsi, le statut de chaque sonde a été défini comme hypométhylé si $M \leq 0,2$ ou hyperméthylé si $M \geq 0,6$ selon une inspection visuelle de la distribution de toutes les valeurs bêta pour chaque puce. Dans le cas contraire, le statut était défini comme non méthylé.

Les sondes présentant des différences entre deux groupes ont ensuite été conservées comme sondes candidates pour une analyse plus approfondie ; par exemple, une sonde non méthylée

dans le groupe témoin avec un $M < 0,2$ et hyperméthylée ($M > 0,6$) dans le groupe CCA a été considérée. Ces sondes candidates ont été considérées comme des sondes "différentielles". Ensuite, pour toutes les sondes différentielles, les gènes correspondants ont été identifiés et utilisés pour une analyse plus approfondie.

2.5 Validation de l'expression génique

Tous les spécimens de tissus ont été fixés avec du formol à 10% et inclus dans de la paraffine. Un bloc représentatif contenant des tissus tumoraux et non tumoraux a été sélectionné pour chaque tumeur et coloré par Hemalin-Eosine (HE) afin de sélectionner les zones tissulaires pour effectuer l'analyse immunohistochimique.

2.6 Caractérisation immunohistochimique de l'expression génique

L'immunohistochimie a été réalisée sur des lames de tissu déparaffinées de 4 μ m. Pour l'exposition de l'antigène, nous avons utilisé un démasquage CC1. L'IHC pour le SFN et le WISP1 a été réalisée sur un autostainer Ventana (Benchmark GX, Tucson, AZ, USA) en utilisant respectivement un anticorps polyclonal anti WISP1 de lapin (PA5-29150) et un anticorps monoclonal anti-SFN de souris (1433S01) et les kits d'amplification OptiView et de détection DAB IHC OptiView comme système de détection.

Des informations détaillées sur les anticorps utilisés et les protocoles de coloration sont données dans le tableau 10. Le tissu de Malpighien (tissu de la peau) et le tissu glandulaire de l'estomac ont été utilisés comme contrôle positif respectivement pour les anticorps de coloration cytoplasmique spécifique de SFN et WISP1.

Anticorps	Compagnie	Clone	Clonalité	Dilution	Incubation	Révélation de l'antigène	Détection
SNF (14-3-3 sigma)	Thermo Fisher	1433S01	Mono Souris	1/200	30 min. RT	20min. 99°C PH 9.0	OptiView DAB
WISP1	Thermo Fisher		Poly Lapin	1/300	60 min. RT	32min. 95°C PH 8.2	OptiView DAB

Tableau 10: Immunohistochimie. Informations détaillées sur les anticorps utilisés et les protocoles de coloration.

2.7 Semi-quantification en IHC

Pour évaluer l'expression de SFN et WISP1, un score semi quantitatif a été évalué en utilisant un système à quatre niveaux : aucune coloration (0), faible (1+), modérée (2+) et forte (3+). Les cas présentant une coloration faible ou nulle (0 et 1+) ont été considérés comme "négatifs". Les cas présentant une coloration modérée ou forte (2+ et 3+) ont été considérés comme "positifs".

2.8 Analyse statistique

Les comparaisons ont été effectuées à l'aide du test de Fisher pour le sexe, des tests non paramétriques tels le test de Kruskal-Wallis entre trois groupes (et si cela était significatif, nous avons effectué des comparaisons de wilcoxon par paire avec correction de Holm pour les tests multiples) et le test de Wilcoxon entre deux groupes pour l'âge et l'indice de masse corporelle (IMC) (R v3.6.3). Nous avons utilisé le test de Fisher (GraphPrism 8) pour analyser la différence entre l'expression de SFN et de WISP1 dans divers sous-groupes de tissus tumoraux. Les différences ont été considérées comme significatives pour une valeur de $p < 0,05$.

IV. Résultats

Etude 1 : Caractérisation du microbiote biliaire dans cholangiocarcinome extrahépatique (Manuscrit 1 publié).

Le cholangiocarcinome extrahépatique (CCA) représente 3% des cancers digestifs. Le rôle du microbiote biliaire en tant que modulateur lié à l'environnement a été peu étudié dans le cas de CCA, et aussi l'impact des maladies associées n'a pas encore été évalué. Nous avons caractérisé le microbiote biliaire chez les patients atteints de CCAe afin d'identifier une dysbiose spécifique liée aux CCAs. Les effluents biliaires ont été collectés durant le cholangiographie pancréatique rétrograde endoscopique (CPRE) chez 28 patients souffrant d'une CCA et 47 patients souffrant de calculs biliaires, considérés ici comme des contrôles. Les effluents biliaires ont été soumis à une extraction d'ADN bactérien et au séquençage de l'ARNr 16S, en utilisant la technologie Illumina. Dans l'ensemble, 32 % des cas de CCA et 22 % des cas de contrôle présentaient une autre maladie associée, telle que le diabète, la pancréatite, une maladie intestinale inflammatoire de l'intestin ou une cholangite sclérosante primaire. Ces maladies associées ont été prises en compte dans les comparaisons qui ont été faites. L'analyse des coordonnées principales (PCoA) a permis de détecter une différence significative de la composition du microbiote biliaire entre les patients atteints de CCA et les contrôles sans

une maladie associée. Parmi les phyla les plus abondants, les *Protéobactéries* ne différaient pas de manière significative entre les patients atteints de CCA et les contrôles, alors que les niveaux de *Firmicutes* étaient plus bas et ceux de *Bacteroidetes* plus élevés chez les patients atteints de CCA par rapport aux contrôles. Les genres les plus les plus abondants étaient *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Klebsiella* et *Pyramidobacter* dans le microbiote biliaire de CCA. De plus, les niveaux des genres *Bacteroides*, *Geobacillus*, *Meiothermus*, et *Anoxybacillus* étaient significativement plus élevés dans le microbiote biliaire des patients atteints de CCA, sans maladie associées, par rapport aux contrôles . Une dysbiose spécifique liée à CCA a été identifiée par rapport aux contrôles , indépendamment des maladies associées. Ceci suggère qu'une communauté de micro-organismes pourrait être impliquée dans la pathogenèse de CCA.

RESEARCH ARTICLE

Characterization of biliary microbiota dysbiosis in extrahepatic cholangiocarcinoma

Massa Saab^{1*}, Denis Mestivier^{1,2}, Masoudreza Sohrabi³, Christophe Rodriguez^{2,3,4}, Mahmood Reza Khonsari³, Amirhossein Faraji³, Iradj Sobhani^{1,2,3,4,5*}

1 Early Detection of Colon Cancer Using Molecular and Microbial Markers (EC2M3)-EA 7375 Team, University Paris-Est Creteil (UPEC), Créteil, France, **2** Bioinformatic Core Facility, IMRB UMR 955 – INSERM, UPEC, Créteil Cedex, France, **3** Gastrointestinal and Liver Diseases Research Center (GILDRC), Iran University of Medical Sciences and Firouzgar hospital (Prof. F. Zamani), Tehran, Iran, **4** Team 8, Inserm U955, Créteil, France, **5** Department of Gastroenterology, CHU Henri Mondor-APHP, Créteil, France

* massa.saab93@gmail.com (SM); iradj.sobhani@aphp.fr (SI)



OPEN ACCESS

Citation: Saab M, Mestivier D, Sohrabi M, Rodriguez C, Khonsari MR, Faraji A, et al. (2021) Characterization of biliary microbiota dysbiosis in extrahepatic cholangiocarcinoma. *PLoS ONE* 16(3): e0247798. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247798>

Editor: Pradeep Dudeja, University of Illinois at Chicago, UNITED STATES

Received: July 21, 2020

Accepted: February 12, 2021

Published: March 9, 2021

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247798>

Copyright: © 2021 Saab et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The 16S rRNA amplicon sequencing data are available from the European Nucleotide Archive (ENA) database

Abstract

Extrahepatic cholangiocarcinoma (CCA) accounts for 3% of digestive cancers. The role of biliary microbiota as an environment-related modulator has been scarcely investigated in CCA, and the putative impact of associated diseases has not been yet assessed. We characterized the biliary microbiota in CCA patients in order to identify a specific CCA-related dysbiosis. The biliary effluents were collected through an endoscopic retrograde pancreatic cholangiography (ERCP) examination involving 28 CCA and 47 patients with gallstones, herein considered as controls. The biliary effluents were submitted to bacterial DNA extraction and 16S rRNA sequencing, using Illumina technology. Overall, 32% of CCA and 22% of controls displayed another associated disease, such as diabetes, pancreatitis, inflammatory bowel disease, or primary sclerosing cholangitis. Such associated diseases were considered in the comparisons that were made. Principal coordinate analysis (PCoA) detected a significant disparity of biliary microbiota composition between CCA patients and controls without an associated disease. Amongst the most abundant phyla, *Proteobacteria* did not significantly differ between CCA patients and controls, whereas *Firmicutes* levels were lower and *Bacteroidetes* higher in CCAs' biliary microbiota than in the controls' microbiota. The most abundant genera were *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Klebsiella*, and *Pyramidobacter* in CCA's biliary microbiota. Additionally, levels of *Bacteroides*, *Geobacillus*, *Meiothermus*, and *Anoxybacillus* genera were significantly higher in CCA patients' biliary microbiota, without an associated disease, in comparison with controls. A specific CCA-related dysbiosis was identified as compared to controls independently from associated diseases. This suggests that a microorganism community may be involved in CCA pathogenesis.

Introduction

Cholangiocarcinomas (CCA) are relatively rare malignant tumors of the bile ducts, representing around 3% of digestive cancers [1]. CCA are either intrahepatic (CCAi) or located only in the extrahepatic biliary tracts (CCAe). CCAi constitutes the second-most common malignant

(<http://www.ebi.ac.uk/ena>) under the accession number PRJEB43183.

Funding: Funding for DNA analyses: UFR Sante-Paris12; UPEC Creteil-France; this routine annual funding of EC2M3 Lab had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: No Competing Interest.

liver tumor, representing 10–20% of primary liver cancers, following hepatocarcinomas that are the most common. In France, about 2,000 new cases are registered per year, resulting in CCA being the sixth-most-common malignant tumor of the gastrointestinal tract, whose incidence is increasing. In several Asian countries including the middle east, the incidence of CCA is still higher than in Western countries [2].

The circumstances of discovering a CCA differ according to the location. The diagnosis is often delayed, thus only made at an advanced disease stage [3, 4]. The endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) of pancreato-biliary tracts is an invasive technique, which is nonetheless necessary for both CCA diagnosis and therapy. This investigation enables the collection of biological effluents like the bile on which the cytology analysis is conducted. This analysis is designed to confirm CCA diagnosis. The prognosis of biliary tumors is poor, with a 5-year survival rate estimated at 5%. The surgery is currently considered the standard of curative therapy [5]. To improve prognosis of CCA, its pathogenesis needs deeper investigation. This is challenging, given that CCA is a heterogeneous disorder that is likely influenced by environmental factors [6]. Thus, one could assume that, like for many digestive cancers whose incidence has increased during recent decades due to environmental factors, the CCA incidence would continue to rise.

Ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis (PSC) are two benign diseases that both enhance the risk of developing CCA in the Western world [7]. These diseases induce a chronic inflammation within the bile ducts that favors carcinogenesis. Intrahepatic biliary lithiasis, a common disease in Asia, is another inflammatory disease that enhances the risk of CCA. In Southeast Asia, CCA is associated with parasitic infections like *Opisthorchis viverrini* and, albeit less well-established, with *Clonorchis Sinensis* infections [8].

Although exhaustive analysis of environment factors is challenging, this has been facilitated by studying the microbiota [9–12]. Indeed, changes within the human microbiota, which are roughly designed as dysbiosis, have been associated with the development of colon, oral, and lung cancers [10–12]. Microbiota is thought to generate physiological function alterations, which are likely to promote different diseases, including various cancers [13].

To illustrate, an increase in short-chain fatty acid producers, through changes in the numbers of *Fusobacterium*, *Prevotella*, and *Campylobacter*, has been observed in colorectal cancer patients [14]. Notably, *Fusobacterium*, *Prevotella*, and *Campylobacter* were all three found to be significantly more abundant in CCA, further suggesting they may play a role in gastrointestinal cancers, possibly through unregulated inflammatory response [15]. However, the distinct features of gut microbiota in patients with CCA and the interactions of CCA with gut microbiota have not yet been clarified. Xiaodong *et al.* were the first to characterize intestinal microbiota, bile acids, and cytokines in patients with CCA. These authors proposed some diagnostic markers, including short chain acids of biliary acid metabolites and two bacteria genera (*Lactobacillus* and *Alloscardovia*) for identifying CCAi [16].

Interestingly, microorganisms may also be detected in organs (*e.g.*, human female reproductive tract and human urinary system) whose effluents are assumed to be sterile [17, 18].

The bile, whose main components include bile acids, cholesterol, and phospholipids, functions as a biological detergent that emulsifies and solubilizes lipids, thus conferring them antimicrobial activity [19]. For this reason, the healthy biliary tract is generally considered a sterile environment [20]. However, based on metagenomics sequences, recent human [21] and animal studies [22] have indicated that the gallbladder may also harbor a complex of non-cultivable bacteria under non-pathological conditions [20].

Furthermore, sequencing of 16S ribosomal ribonucleic acid (RNA) has rendered it possible to estimate taxonomic profiling according to phylum, class, order, family, or genus. Moreover, assignment into species and sub-species generally requires whole metagenomic sequencing

[23]. However, up to now, biliary microbiota characterization remains fragmentary. We have thus planned to investigate, in an Asian medical center within a high CCA incidence area, a series of 30 extrahepatic CCA patients who underwent ERCP, in an effort to identify the biliary microbiota signature.

Accordingly, consecutive patients being referred for *endoscopic retrograde cholangiopancreatography* (ERCP) and exhibiting stigmata of CCAe were considered for analysis, under the condition that CCAe was proven using cytological or histological exams. Results were compared to those of a series of patients affected with benign biliary diseases (PBBs), who were referred to the same endoscopic unit for ERCP during the same period. These patients were considered as controls. Overall, 16S RNA sequencing demonstrated significant differences in the biliary microbiota composition between the two populations, which could implicate CCA-associated dysbiosis playing a role in biliary carcinogenesis.

Population, materials, and methods

Patients & materials. Between 2014 and 2016, biliary fluid was collected during ERCP from 75 consecutive individuals with biliary obstruction, who were referred to tertiary centers.

In line with the Declaration of Helsinki, the research protocol of surveillance and of obtaining blood and bile samples of patients suspected of having either CCA or PBBs (obviously biliary duct lithiasis) was approved by the Ethic Committee of Iran University of medical Sciences under ID: IR.IUMS.REC.1397.115.

Following full explanation of the study's aim and procedures by a physician, the patients signed a formal consent document, which is to be held by the Iranian partner for 15 years. All participants were adults with high-normal cognition. The inclusion criteria were as follows: adults of 21 years or more; suspected of biliary obstruction due to either cholangiocarcinoma or lithiasis based on elevated liver enzyme and total bilirubin levels; presence of stricture on endosonography or magnetic resonance cholangiopancreatography (MRCP). The exclusion criteria were as follows: history of viral hepatitis, metabolic hepatitis, autoimmune hepatitis, alcoholic hepatitis, non-alcoholic steatohepatitis (NASH), medication-induced hepatitis, and chemotherapy. The patients underwent ERCP and brushing. To avoid contact and contamination with the duodenal mucosa upon ERCP, once the endoscope canal exit was positioned to the biliary duct entry, a biliary catheter was used for bile duct canalization and a 1–2mL of bile collected before brushing for cytology; both samples were used for microbiology and pathology analyses and were transferred to the Gastrointestinal and liver research center (GILDRC) Lab and conserved at -80°C until analysis. Those patients with cytology or biopsies suggestive of CCAe were enrolled until the lesions were histologically confirmed based on biopsy or surgical (if applicable) samples. During the study period that did not exceed 15 months, the whole study population comprised 30 CCAe patients and 50 patients with a lithiasis, the latter being considered as controls, due to the final diagnosis of benign biliary pathology. Five patients were excluded from analysis (two in the CCA and three in the control groups) because of missing sample or disease confirmation. The frozen samples were transferred to the EC2M laboratory in France for deoxyribonucleic acid (DNA) extraction and sequencing. Briefly, 28 CCAe patients were compared to 47 controls. Patients were categorized into two additional subgroups: those with associated diseases, such as diabetes, inflammatory bowel disease (IBD), primary sclerosing cholangitis (PSC), and pancreatitis, as well as those without any associated diseases.

Methods

DNA extraction. Biliary juices were immediately frozen after ERCP until DNA extraction. An unbiased DNA extraction procedure was applied to all samples, before targeted

metagenomics was performed. Essentially, pre-extraction by homogenization of the beads, which is associated with cell rupture, was followed by extraction using QiaSymphony (Qiagen, Hilden, Germany), as described by commercial instructions. A negative control was tested in each series, with positive controls used to evaluate the performance of metagenomic techniques for detecting bacteria Zymobiomics[®], Ozyme, Montigny le Bretonneux, France).

Targeted metagenomics. Targeted metagenomics (TM) comprised the study of amplicon libraries through the V3-V4 (16S-V3V4) domains of the 16S rRNA bacterial gene [24]. The amplicon was prepared from 5mL of extracts, according to the 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Protocol that was provided by the manufacturer (Illumina, San Diego, California, USA). Quality control was assessed using a D1000 ScreenTape on a TapeStation (Agilent, Santa Clara, California, USA), and quantity was determined via the Quant-it dsDNA Assay kit (ThermoFischer, Waltham, MA, USA) on a Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany).

All libraries were normalized to nM, pooled, and denatured before end-of-pair sequencing (v3-v4, 2 x 300 bp) on a MiSeq device (Illumina, San Diego, California, USA). The targeted bacterial regions were sequenced according to the manufacturer's instructions [25]. The 16S rRNA amplicon sequencing data are available from the European Nucleotide Archive (ENA) database (<http://www.ebi.ac.uk/ena>) under the accession number PRJEB43183.

Overall, 10,483,756 paired-reads were sequenced (137,944.16 +/- 41,883.18 reads/sample, length: 25-251bp). After quality checking with the FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>, v0.11.9) software, reads were filtered for quality that was less than Q20 (using a sliding window of 5pb) and minimal length of 100bp (using trimmomatic, v0.39) [26]. Remaining quality paired-end reads were merged using the FLASH2 software (v2.2.0, <https://github.com/dstreeet/FLASH2/blob/master/README>) [27], yielding 120,716.70 +/- 38,924.65 (87.4 +/- 5.6%) combined paired per sample. We then employed MALT (v0.4.1, <https://software-ab.informatik.uni-tuebingen.de/download/malt/welcome.html>) and Megan6 (v6.17.0) [28] software with the rRNA SILVA database (v132) [29] for taxonomical assignment, using parameters for 16S ("SemiGlobal" / "mif" / "LCA"). Abundances were exported as a Biological Observation Matrix (BIOM) for further analyses (S1 File).

Data analysis. Gender, associated diseases, and diabetes differences were assessed using Chi-squared testing (GraphPrism 8), while age and body mass index (BMI) differences were assessed via t-testing (normal distribution was assessed using the D'Agostino-Pearson test). Analyses were performed including age and BMI of patients as co variable. Values were considered statistically significant when $p < 0.05$. PCoA, figures, and differential microbiota analysis were performed using the Shiny Application for Metagenomic Analysis (Shaman), from *Institut Pasteur de Paris* (<http://shaman.pasteur.fr/>) [30]. For the differential abundance analysis, we used the BIOM Table and the "target" File that associates each sample with its explanatory variables (see suppl data: S1 File and S3 Table). Abundances of bacteria were summarized at the Phylum and Genus levels. The statistical analysis in SHAMAN is based on the DESeq2/R package which model abundance counts with a negative binomial distribution. For the experimental design, we selected the variables of gender, BMI, age, diagnosis (Control/CCA), and associated diseases. We also included the interaction between diagnosis and associated diseases in the model. We used defaults parameters, such as the "weighted non-null normalization," which was introduced by Volant et al [30] and accounts more accurately for matrix sparsity. SHAMAN/DESeq2 yields baseMean and FoldChange (and log2FoldChange) and an adjusted p-value. Outputs were analyzed using Benjamini-Hochberg adjustment method. To be retained as differentially abundant, a taxon (phylum or genus) had to fulfill the following criteria: p value adjusted < 0.05 and baseMean > 100 .

Results

Patient characteristics

Overall, 75 patients with biliary obstruction were included in the analysis (n = 28 CCA and n = 47 controls). The characteristics of the patients are summarized in Table 1.

There was no significant difference between these two groups in terms of age, gender, or BMI. However, the number of associated diseases (diabetes, IBD, PSC, and chronic pancreatitis) differed between both groups, amounting to 22% in controls and 32% in CCA cases with at least one associated disease, «without reaching statistical significance». Consequently, these patients were reclassified into two subgroups for deeper analysis: those with associated diseases versus those without.

Comparison of the most abundant genera and phyla

As the most abundant genera in the whole population (cases and controls), *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, and *Pyramidobacter* were identified. Furthermore, a trend towards higher abundances of *Streptococcus*, *Bacteroides*, and *Pyramidobacter* in CCA cases contrasted with a trend towards higher abundances of *Clostridium*, *Klebsiella*, *Fusobacterium*, and *Enterococcus* in controls (Fig 1A).

Four genera, namely *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, and *Pyramidobacter*, were more abundant in CCA cases with associated diseases (n = 9), compared to those without (n = 19). The *Enterococcus* genus was most abundant in controls with associated diseases (n = 10), compared to those without (n = 37) (Fig 1B).

At the phylum level, *Proteobacteria* was the most abundant, in both cases and controls. In addition, *Firmicutes* were more abundant in controls (particularly in those with associated comorbidities), while *Bacteroidetes* were more abundant in CCA cases (Fig 2A and 2B).

Comparison using principal coordinate analysis (PCoA)

Analysis of the entire biliary microbiota failed to show any significant differences between cases and controls, but there was a trend towards between-group differences (p=0.058,

Table 1. Characteristics of patients with cholangiocarcinoma (CCA) and controls.

	Control N = 47	CCA N = 28	p value
Female, n (%)	24 (51)	9 (32)	0.15
Male, n (%)	23 (49)	19 (68)	0.15
Body mass index (BMI), mean (SD)	27 (4)	25 (5)	0.18
Age, mean (SD) Yr	57 (17)	64 (12)	0.07
Associated diseases, n (%)	10 (22)	9 (32)	0.2
Diabetes, n (%)	9 (90)	6 (67)	0.2
Pancreatitis, n (%)	1 (10)	0	ND
Inflammatory bowel disease (IBD), n (%)	0	2 (22)	ND
Primary sclerosing cholangitis (PSC), n (%)	0	1 (8)	ND
Tumor differentiation, n (%)	-	28 (100)	ND
Grade 1*, n (%)	-	2 (7)	ND
Grade 2*, n (%)	-	8 (29)	ND
Grade 3*, n (%)	-	6 (21)	ND
Grade 4*, n (%)	-	12 (43)	ND

Comparisons were performed by using Chi-squared tests for qualitative parameters and t-test for quantitative parameters. ND: not determined.

* according to the International TNM classification.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247798.t001>

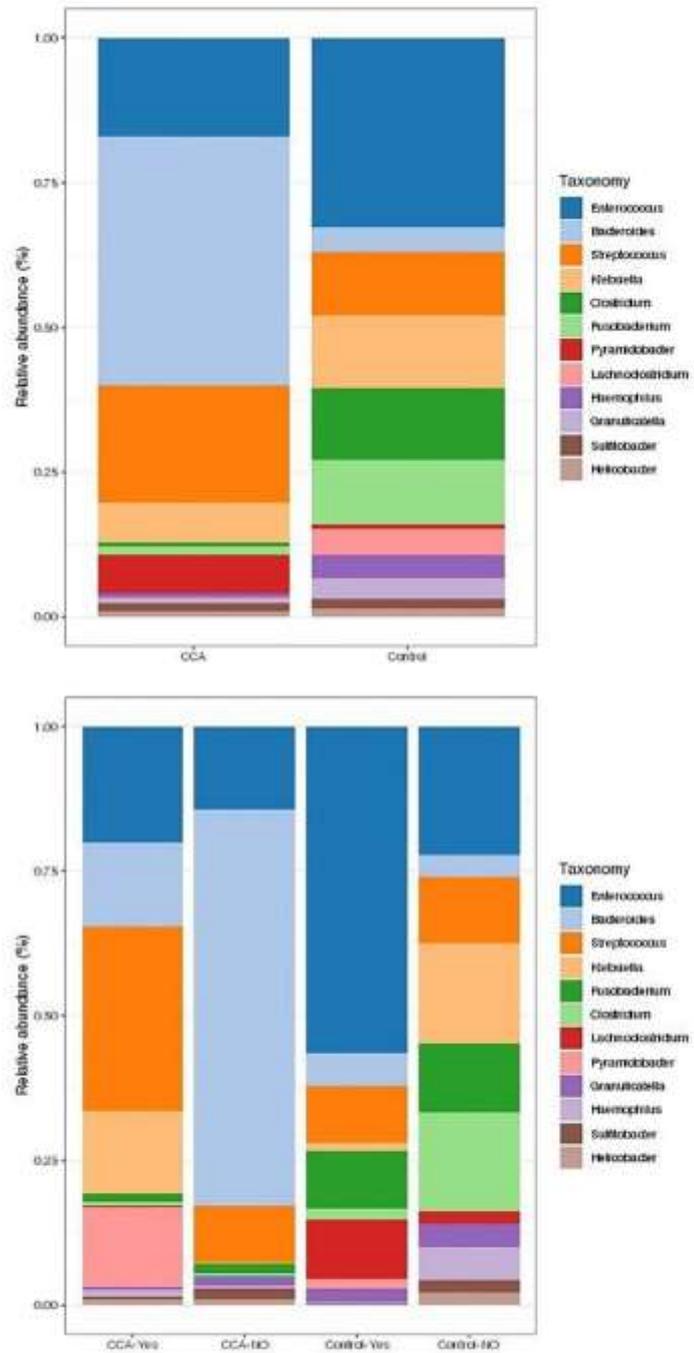


Fig 1. Relative abundances (%) of genera in patients and controls. The 12 most abundant genera are illustrated in the cases and controls. **A)** CCA (n = 28) and controls (n = 47), regardless of associated diseases. **B)** CCA and controls, with (Yes) or without (NO) associated diseases.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247798.g001>

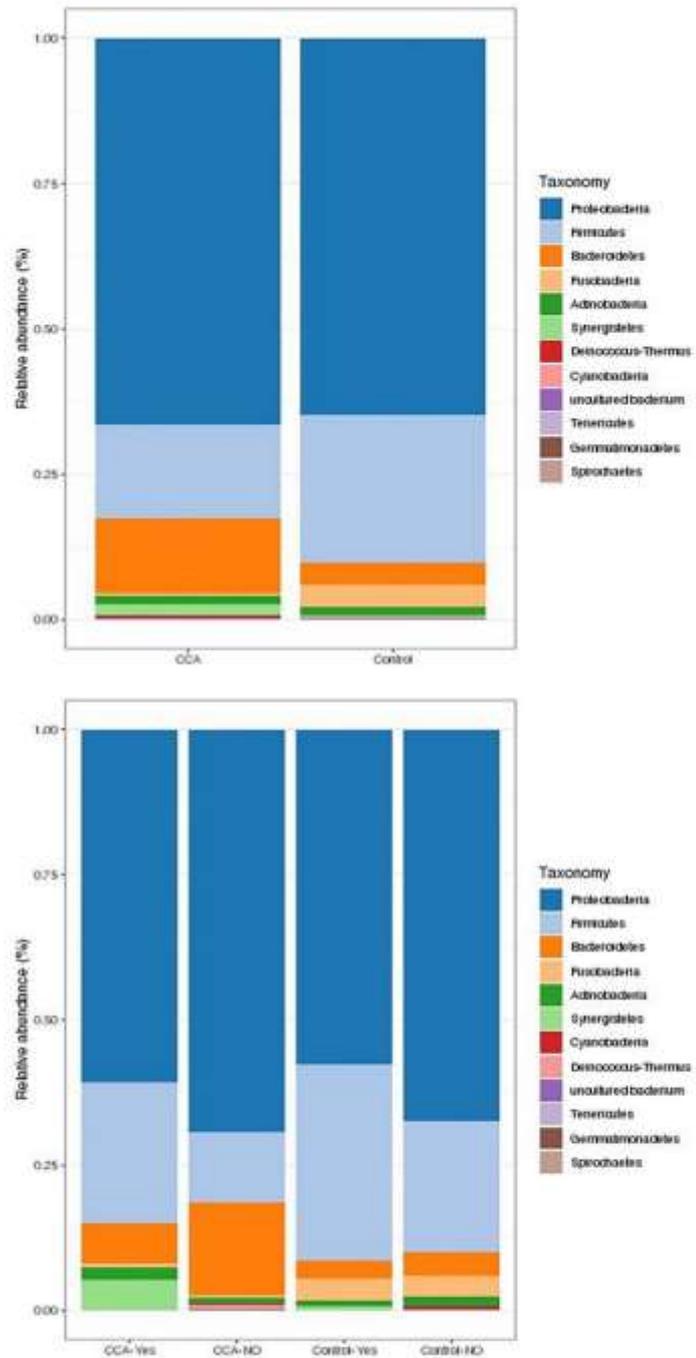


Fig 2. Relative abundances (%) of phyla in patients and controls. The 12 most abundant phyla in all individuals. A) CCA (n = 28) and controls (n = 47), regardless of associated diseases. B) CCA and controls, with (Yes) or without (NO) associated diseases.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247798.g002>

Permanova test) (Fig 3A). However, when these analyses were limited to associated disease-free cases and controls, a significant separation was observed ($p < 0.01$, permanova test) (Fig 3B). This difference was unaffected by age, gender, or BMI.

Differential bacteria in biliary microbiota (CCA cases versus controls)

The composition of biliary microbiota significantly differed between cases and controls. Several genera were significantly different between both groups (Table 2A; S1A Table). At phyla level, we observed that *Firmicutes*, *Fusobacteria*, and *Cyanobacteria* levels were significantly lower in CCA cases than controls (Table 2B and S1B Table).

When analysis was limited to those individuals without associated diseases (19 CCA cases versus 37 controls), we identified 11 bacterial genera that significantly differed between cases and controls (Table 3A). The genera levels of *Bacteroides*, *Geobacillus*, *Meiothermus*, and *Anoxybacillus* were significantly higher in cases versus controls (Table 3A and S2A Table). Similarly, at the phylum levels, the levels of *Deinococcus-Thermus* were higher and those of *Firmicutes*, *Fusobacteria*, and *Actinobacteria* were all lower in CCA cases than controls (Table 3B and S2B Table).

Discussion

Environmental factors play a role in biliary carcinogenesis [6]. To better understand this role, we characterized biliary microbiota in a group of patients that were suffering from CCA. By using a targeted amplicon sequencing approach for 16S rRNA, we could thereby show that the bacteria composition significantly differed in CCA, compared to individuals without CCA that had undergone ERCP for bile collection. Some of the subjects, in either controls or cases, suffered from associated diseases, such as diabetes, pancreatitis, PSC, and IBD, too. All these diseases are known influencing the gut microbiota composition. Thus, we analyzed a subgroup of CCAe cases in whom biliary juice could be obtained through endoscopy exam in comparison with controls, none of which exhibited inflammatory or neoplastic associated diseases. Consequently, we could identify various genera, the abundances of which were shown to vary in cases as compared to controls, strongly suggesting CCAe being linked to dysbiosis.

To the best of our knowledge, previous studies that have demonstrated an association between biliary microbiota dysbiosis and human diseases have mainly concerned the process of cholesterol gallstone formation [22, 23]. These data suggested human gallbladder microbiome possibly playing a physiological role and influencing biliary metabolic profile. In a recent study conducted in patients with cholesterol gallstones [22], the connection of bile bacteria population and gut microbiota has been analyzed. In this paper, the authors argue high microbial diversity in the bile duct being impacted by intestinal microbiota diversity. Whether the differential bacteria panel we found in the biliary fluid is specifically linked with biliary carcinogenesis should be further discussed.

In this pilot study, our aim was to verify that biliary microbiota dysbiosis may be a key contributor to biliary neoplasia. Previous studies have shown that bile fluid dysbiosis could be linked to various diseases, including biliary lithiasis [21, 31–33]. This latter condition induces partial or total obstruction of biliary flux. The point that PCoA analysis revealed a significant separation between CCAe and lithiasis subgroups may suggest that biliary microbiota changes could be favored by reduced biliary flow. However, this hypothesis seems unlikely, although bacteria may find a more favorable environment to growth in obstructed bile ducts. By collecting bile fluids above the occlusion using the ERCP approach, we found that patients referred for lithiasis and CCAe can be considered comparable with respect to this bias. Furthermore, consistent with previous studies [21, 34–38], we found that phyla (Table 2B and S1B Table)

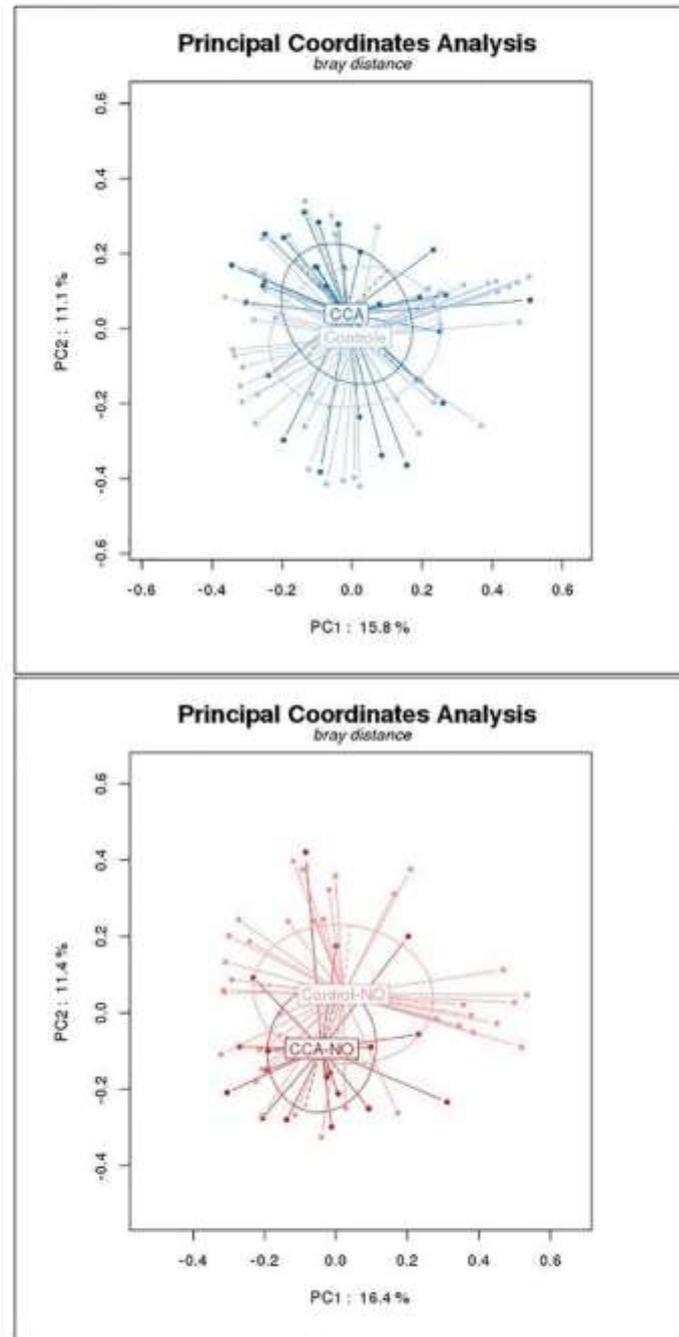


Fig 3. Principal coordinate analysis (P CoA) of biliary microbiota in patients and controls. A) PCoA according to the diagnosis, in all individuals (permanova test; $p = 0.058$). B) PCoA according to the diagnosis, limited to patients without associated diseases (permanova test = 0.01).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247798.g003>

Table 2. Significant differential abundances, according to the diagnosis (CCA vs. controls).

A.			
Genus	Base mean	Fold Change	p value_adjusted
<i>Clostridium</i>	2597.72	0.10	0.0031
<i>Fusobacterium</i>	2455.33	0.06	0.0005
<i>Granulicatella</i>	800.17	0.12	0.0027
<i>Pseudomonas</i>	715.27	0.12	0.0018
<i>Bacillus</i>	468.05	0.26	0.0488
<i>Actinomyces</i>	252.48	0.18	0.0276
<i>Citrobacter</i>	129.8	0.05	0.0005
<i>Campylobacter</i>	104.23	0.20	0.047
B.			
Phyla	Base mean	FoldChange	pvalue_adjusted
<i>Firmicutes</i>	22438.7	0.48	0.0491
<i>Fusobacteria</i>	2713.32	0.10	3.37E-05
<i>Cyanobacteria</i>	272.55	0.17	0.0111

The list of bacteria include those genera at the mean base >100 (mean base of the whole cohort). Comparisons (CCA versus controls) yielded fold changes that are expressed in the values of ratios of the cases/controls; Statistical analysis using the DESeq2 R package. A) Genus level. B) Phylum level.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247798.t002>

Proteobacteria, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, and *Actinobacteria* dominated the bile microbiota in our population. Some genera or species, such as *Helicobacter pylori*, have been found to be present at higher levels in CCA [15] than in controls. Yet, this was not confirmed in our series, suggesting that *Helicobacter pylori* presence may suggest stomach juice-induced

Table 3. Significant differential abundances according to the diagnosis (CCA vs. controls).

A.			
Genus	Base mean	Fold Change	p value_adjusted
<i>Bacteroides</i>	4388.85	7.06	0.0304
<i>Klebsiella</i>	3125.04	0.02	8.95E-08
<i>Clostridium</i>	2597.72	0.01	1.17E-09
<i>Fusobacterium</i>	2455.33	0.06	0.0007
<i>Haemophilus</i>	892.5	0.05	7.61E-06
<i>Enterobacter</i>	569.44	0.06	0.0009
<i>Geobacillus</i>	530.19	7.95	0.0067
<i>Actinomyces</i>	252.48	0.20	0.0377
<i>Meiothermus</i>	199.74	52.05	5.19E-06
<i>Anoxybacillus</i>	190.83	10.66	0.0378
<i>Citrobacter</i>	129.8	0.03	6.16E-05
B.			
Phyla	Base Mean	Fold Change	p value_adjusted
<i>Firmicutes</i>	22438.7	0.38	0.0054
<i>Fusobacteria</i>	2713.32	0.08	9.98E-05
<i>Actinobacteria</i>	1505.03	0.38	0.0490
<i>Deinococcus-Thermus</i>	202.1	19.53	2.10E-07

The list of significantly differential bacteria between cases and controls include the mean base >100. Comparisons (n = 19 cases versus n = 37 controls, without associated co-morbidities) yielded fold changes that are expressed in values of case/control ratios. Statistical analysis using the DESeq2 R package. A) Genus. B) Phylum.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247798.t003>

contamination. In addition, *Proteobacteria* is presumed to represent about 30% of stomach phyla and 60% of bile duct phyla [39]. Notably, the levels of *Proteobacteria* found in our series seems to be close to the values described in the small intestine by other authors [40]. These discrepancies in biliary microbiota composition may be accounted for by various conditions including gastric or duodenal contamination. It must be mentioned that although we took specific precaution in collecting biliary fluid (see methods) in the current study to prevent biliary tract juice from being contaminated by gastric or duodenal juices, it is not possible to rule out this bias, as additional effluent samples from stomach, duodenum and intestines have not been cross checked in our series. Amongst other potential factors that may affect bacteria colonization and survival within the biliary tract, the sphincter of Oddi function close to the tumour location could have been altered leading to increased inner pressure of the proximal duct. Alternatively, the pipelines used for taxonomic assignment that are known to vary from study to study could have impacted bacteria assignment. Nevertheless, despite all these biases, it can be assumed that differences in either intestinal or biliary microbiota composition of CCA patients do illustrate different bacteria environments that are associated with neoplasia, in comparison with individuals without tumors. According to this hypothesis, Jia *et al* [16] analyzed fecal microbiota in a series of intra hepatic CCAi, presumably without any contact with intestinal microbiota. These authors revealed that bacteria communities including *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcaceae* and *Alloscardovia* were found to be more abundant in gut microbiota from cases than controls. Thus, if involved in carcinogenesis, bacteria could act not only as adherent cells to the biliary tissue but also through the enterohepatic metabolic cycle of microbiota, such as biliary acid metabolism. This pathway has also been suggested to explain tumor growth and outcomes through host immune response to CCA [41]. Further studies including large series of both CCAe and CCAi patients are now required to more deeply characterize biliary cancer-associated dysbiosis as co carcinogenic and prognostic marker.

The dysbiosis we currently identified as being significantly linked to CCAe comprised genera, such as *Bacteroides*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, and *Meiothermus*, which were found more abundant in cases than in controls.

Bacteroides are Gram-negative, strict anaerobic, non-spore-forming bacilli, which are intestinal microbiota bacteria. Several studies have demonstrated associations between *Bacteroides* and colon cancer [42, 43]. In addition, elevated *Bacteroides* have been found in various other diseases and conditions, including arthritis in transgenic rats HLA-B27 [44, 45]. Studies in germ-free mice have shown that the *Bacteroides* antigen contributes to the recruitment and proliferation of low-avidity CD8⁺ T lymphocytes; these cells may be similar to thymic CD4⁺ Tregs, as well as to the response to chronic antigenic exposure in intestinal lymphoid tissues [46]. The enrichment of *Bacteroides* in arthritis patients likely indicates that this condition may contribute to disease progression. The expansion of *Bacteroides* has been hypothesized to be a compensatory mechanism for regulating autoimmune reactions. Moreover, higher abundance of *Bacteroides* in the bile has been linked to cholelithiasis through metabolomic changes [47]. Its role via auto-immune disease mechanisms cannot yet be ruled out. Whether these bacteria are involved in primary cholangitis and constitute a marker of auto-immune disease has been investigated. Controversial results on PSC-associated biliary microbiota have been published: Pereira *et al* [48] failed to find any significant association between PSC and biliary microbiota changes, whereas a specific gut microbiota dysbiosis was characterized [42]. We were not in the position to verify this specific point, because only one of our CCA patients suffered from PSC. Regarding the potential association of bile bacteria and biliary CCA, two other studies have similarly employed 16S rRNA sequencing to characterize biliary tract

bacteria [15, 49]. The impact of biliary bacteria composition on patients' outcome has not been demonstrated. Despite a trend towards biliary dysbiosis variations according to stages and one-year survival rates, in our series, we were unable to identify any significant microbial predictive markers able to assess CCA patients with bad prognosis (data not shown). This is most likely due to the small size of our series.

To our knowledge, *Geobacillus*, *Meiothermus*, and *Anoxybacillus* levels, which were found to be more abundant in CCAe, have not previously been linked to CCA. The genus *Geobacillus* comprises a group of Gram-positive thermophilic bacteria, which are able to grow in an anaerobic milieu above the range of 45–75°C [50]. The genus *Meiothermus* is a thermophilic environmental bacteria, which is isolated upon a hot spring [51]. The genus *Anoxybacillus* is a rod-shaped bacterium from the *Bacillaceae* family, which forms spores that are likely to resist the geothermal spring milieu [52]. Whether these associations illustrate an accompanied bacteria community rather than a causative core cannot be addressed by our study. Interestingly, a recent study has reported an increase in *Anoxybacillus* and *Geobacillus* genera in bladder cancer patients [53]. Further, two genera (*Lactobacillus* and *Alloscardovia*), have been shown to be associated with CCAi, suggesting that a possible metabolic pathway alteration could possibly favor biliary carcinogenesis [16].

Our study has some limitations. The biliary microbiota characterization has not yet been carried out in healthy subjects, owing to ethical and technical difficulties. We could not verify whether the bacteria we found within the biliary lumen were similar to those that are adherent to tumoral tissues. Indeed, many patients did not undergo surgical tumor resection. Although all precautions were taken to avoid intestinal milieu contamination during ERCP collection, we cannot rule that bacteria originating from the duodenum were included in the collected fluids, since separated milieus were not screened.

Conclusion

We have characterized the biliary microbiota in CCAe patients and compared it with controls. To avoid confounding factors of associated diseases, we considered CCA patients and controls that were both free of co-morbidities. By doing so, we revealed significant changes in biliary microbial components. This suggests a significant CCA-associated biliary dysbiosis may enable us to distinguish these patients from non-cancerous controls. Although our results showed that the associated diseases do modify the composition of the biliary microbiota, we suggest that some of these bacteria may still be involved in CCA development.

Supporting information

S1 Table. Significant differential abundances, according to diagnosis (CCA versus controls). The total lists of all bacteria including genera (CCA versus controls) after comparisons. These yielded fold changes that are expressed in the log values of ratios of the cases/controls. A) Genus level. B) Phylum level. Statistical analysis were based on the DESeq2 R package. (XLSX)

S2 Table. Significant differential abundances, according to diagnosis. (CCA versus controls). The total lists of all bacteria including genera (CCA versus controls) after comparisons between CCA cases (n = 19) and controls (n = 37), without associated co-morbidities. These yielded fold changes that are expressed in the log values of ratios of the cases/controls. A) Genus level. B) Phylum level. Statistical analysis were based on the DESeq2 R package. (XLSX)

S3 Table. Target file. Characteristics of the patients with cholangiocarcinoma and the controls.

(CSV)

S1 File. Abundance table (BIOM format). Number of reads associated with each taxon for each patient and taxonomy.

(XLSX)

Acknowledgments

The authors would like to thank all the patients for accepting to contribute to the current research, in addition the employees of the Henri Mondor (Créteil, France) and Firouzgar (Tehran, Iran) hospitals, who were involved in the study. They also wish to thank the department Dean, Prof. Farhad Zamani, for supporting the study without any financial support from Iran to the French lab EC2M3. Finally, many thanks go to Vanessa Demontant for her technical help.

Author Contributions

Conceptualization: Massa Saab.

Formal analysis: Denis Mestivier.

Methodology: Massa Saab, Christophe Rodriguez.

Project administration: Iradj Sobhani.

Supervision: Massa Saab, Iradj Sobhani.

Validation: Massa Saab, Denis Mestivier, Masoudreza Sohrabi, Mahmood Reza Khonsari, Amirhossein Faraji, Iradj Sobhani.

Visualization: Massa Saab, Denis Mestivier, Masoudreza Sohrabi, Christophe Rodriguez, Mahmood Reza Khonsari, Amirhossein Faraji, Iradj Sobhani.

Writing – original draft: Massa Saab, Denis Mestivier, Masoudreza Sohrabi, Christophe Rodriguez, Mahmood Reza Khonsari, Amirhossein Faraji, Iradj Sobhani.

Writing – review & editing: Massa Saab, Denis Mestivier, Masoudreza Sohrabi, Christophe Rodriguez, Mahmood Reza Khonsari, Amirhossein Faraji, Iradj Sobhani.

References

1. Bouvier AM, Remontet L, Jouglu E et al. Incidence of gastro-intestinal cancers in France. *Gastroenterol Clin Biol* 2004; 28: 877–881 [https://doi.org/10.1016/s0399-8320\(04\)95152-4](https://doi.org/10.1016/s0399-8320(04)95152-4) PMID: 15523225
2. Shin RH, Jin-Kyoung O, Masuyer E, Curado MP, Bouvard V, Fang Y, et al. Comparison of Incidence of Intrahepatic and Extrahepatic Cholangiocarcinoma—Focus on East and South-eastern Asia. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2010; 11, 1159–1166. PMID: 21198257
3. Kawarada Y, Yamagiwa K, Das BC. Analysis of the relationships between clinicopathologic factors and survival time in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am J Surg*. 2002; 183: 679–85. [https://doi.org/10.1016/s0002-9610\(02\)00853-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9610(02)00853-x) PMID: 12095601
4. Nathan H, Pawlik TM, Wolfgang CL, Choti MA, Cameron JL, Schulick RD. Trends in survival after surgery for cholangiocarcinoma: a 30-year population-based SEER database analysis. *J Gastrointest Surg*. 2007; 11: 1488–1496. <https://doi.org/10.1007/s11605-007-0282-0> PMID: 17805937
5. Vogel A, Wege H, Caca K, Nashan B, Neumann U: The diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma. *Dtsch Arztebl Int* 2014; 111: 748–54. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.0748> PMID: 25412632

6. Khan SA, Tavolari S, Brandi G. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Liver Int.* 2019; 39 Suppl 1: 19–31. <https://doi.org/10.1111/liv.14095> PMID: 30851228
7. Callea F, Sergi C, Fabbretti G, Brisigotti M, Cozzutto C, Medicina D. Precancerous lesions of the biliary tree. *J Surg Oncol Suppl.* 1993; 3: 131–3. <https://doi.org/10.1002/jso.2930530535> PMID: 8389160
8. Welzel TM, Mellekjær L, Gloria GCP, Sakoda LC, Hsing AW, Ghormli LE, et al. Risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma in a low-risk population: a nationwide case-control study. *International journal of cancer.* 2007; 120: 638–41. <https://doi.org/10.1002/ijc.22283> PMID: 17109384
9. Pflughoeft KJ, Versalovic J. Human microbiome in health and disease. *Annu Rev Pathol.* 2012; 7: 99–122. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132421> PMID: 21910623
10. Hosgood HD, Sapkota AR, Rothman N, Rohan T, Hu W, Xu J, et al. The potential role of lung microbiota in lung cancer attributed to household coal burning exposures. *Environ Mol Mutagen.* 2014; 55: 643–51. <https://doi.org/10.1002/em.21878> PMID: 24895247
11. Schmidt BL, Kuczynski J, Bhattacharya A, Huey B, Corby PM, Queiroz ELS, et al. Changes in abundance of oral microbiota associated with oral cancer. *PLoS ONE.* 2014; 9: e98741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098741> PMID: 24887397
12. Wu N, Yang X, Zhang R, Li J, Xiao X, Hu Y, et al. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microb Ecol.* 2013; 66: 462–70. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0245-9> PMID: 23733170
13. Marschall HU, Backhed F. Could gut microbiota protect against sclerosing cholangitis? *Hepatology* 2016; 63:26–27. <https://doi.org/10.1002/hep.28135> PMID: 26315989
14. Tan J, Mckenzie C, Potamitis M, Thorburn A, Mackay C, Macia L. The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. *Advances in immunology.* 2014; 121: 91–119. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9> PMID: 24388214
15. Avilés-Jiménez F., Guitron A., Segura-López F. et al., "Microbiota studies in the bile duct strongly suggest a role for *Helicobacter pylori* in extrahepatic cholangiocarcinoma," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 22, no. 2, pp. 178. e11–178. e22, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.10.008> PMID: 26493848
16. Jia X.; Lu S.; Zeng Z.; Liu Q.; Dong Z.; Chen Y.; et al. Characterization of Gut Microbiota, Bile Acid Metabolism, and Cytokines in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2020, 71, 893–906. <https://doi.org/10.1002/hep.30852> PMID: 31298745
17. Chen C., Song X., Wei W., et al., "e microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterinerelated diseases Nature," *Communications*, vol. 8, no. 1, 875 pages, 2017.
18. Wu P., Zhang G., Zhao J., et al., "Profiling the urinary microbiota in male patients with bladder cancer in China *Frontiers in Cellular and Infection, Microbiology*, vol. 8, 167 pages, 2018.
19. Merritt ME, Donaldson JR. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *J Med Microbiol.* 2009; 58: 1533–41. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.014092-0> PMID: 19762477
20. Verdier J, Luedde T, Sellge G. Biliary Mucosal Barrier and Microbiome. *Viszeralmedizin.* 2015; 31: 156–61. <https://doi.org/10.1159/000431071> PMID: 26468308
21. Tao W, Zhang, Liu B., et al. Gut microbiota dysbiosis and bacterial community assembly associated with cholesterol gallstones in large-scale study. *BMC Genomics* 2013; 14: 669 <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-669> PMID: 24083370
22. Jiménez E, Sánchez B, Farina A, Margolles A, Rodríguez JM. Characterization of the bile and gall bladder microbiota of healthy pigs. *MicrobiologyOpen.* 2014; 3: 937–949. <https://doi.org/10.1002/mbo3.218> PMID: 25336405
23. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65: 4799–4807. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.11.4799-4807.1999> PMID: 10543789
24. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research.* 2013; 7; 41: e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808> PMID: 22933715
25. Illumina. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation 2015. <https://web.uri.edu/gsc/files/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf>.
26. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014; 30: 2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170> PMID: 24695404
27. Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics.* 2011; 27: 2957–63. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507> PMID: 21903629

28. Bağcı C, Beier S, Górska A, Huson DH. Introduction to the Analysis of Environmental Sequences: Metagenomics with MEGAN. *Methods Mol Biol.* 2019; 1910: 591–604. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9074-0_19 PMID: 31278678
29. Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Priesse E, Quast C, et al. The SILVA and All-species Living Tree Project (LTP) taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(Database issue): D643–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209> PMID: 24293649
30. Volant S, Lechat P, Wöringer P, Motreff L, Campagne P, Malabat C, et al. *BMC Bioinformatics* 2020 Aug 10; 21(1):345. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03666-4> PMID: 32778056
31. Shen H, Ye F, Xie L, Yang J, Li Z, Xu P, et al. Metagenomic sequencing of bile from gallstone patients to identify different microbial community patterns and novel biliary bacteria. *Scientific Reports.* 2015; 5: 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep17450> PMID: 26625708
32. Ye F, Shen H, Li Z, Meng F, Li L, Yang J, et al. Influence of the Biliary System on Biliary Bacteria Revealed by Bacterial Communities of the Human Biliary and Upper Digestive Tracts. *PLOS ONE.* 2016; 11: e0150519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150519> PMID: 26930491
33. Hiramatsu K, Harada K, Tsuneyama K, Sasaki M, Fujita S, Hashimoto T, et al. Amplification and sequence analysis of partial bacterial 16S ribosomal RNA gene in gallbladder bile from patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 2000; 33: 9–18. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(00\)80153-1](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(00)80153-1) PMID: 10905580
34. Guaglianone E, Cardines R, Vuotto C, Di Rosa R, Babini V, Mastrantonio P, et al. Microbial biofilms associated with biliary stent clogging. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010; 59: 410–420. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00686.x> PMID: 20482630
35. Brook I. Aerobic and anaerobic microbiology of biliary tract disease. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 2373–2375. <https://doi.org/10.1128/JCM.27.10.2373-2375.1989> PMID: 2584384
36. Leung JW, Liu YL, Lau GC, Chan RC, Lai AC, Ling TK, et al. Bacteriologic analyses of bile and brown pigment stones in patients with acute cholangitis. *Gastrointest Endosc.* 2001; 54: 340–5. <https://doi.org/10.1067/mge.2001.117547> PMID: 11522975
37. Sakaguchi Y, Murata K, Kimura M. *Clostridium perfringens* and other anaerobes isolated from bile. *J Clin Pathol.* 1983; 36: 345–349. <https://doi.org/10.1136/jcp.36.3.345> PMID: 6298284
38. Lu Y, Xiang TH, Shi JS, Zhang BY. Bile anaerobic bacteria detection and antibiotic susceptibility in patients with gallstone. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International: Hbpd INT.* 2003; 2:431–434. PMID: 1459954
39. Aviles-Jimenez F, Vazquez-Jimenez F, Medrano-Guzman R, Mantilla A, Torres J. Stomach microbiota composition varies between patients with non-atrophic gastritis and patients with intestinal type of gastric cancer. *Sci Rep.* 2014; 4: 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep04202> PMID: 24569566
40. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G. Control of Pathogens and Pathobionts by the Gut Microbiota. *Nat Immunol.* 2013; 14: 685–690. <https://doi.org/10.1038/ni.2608> PMID: 23778796
41. Shah A, et al. Targeting the Gut Microbiome as a Treatment for Primary Sclerosing Cholangitis: A Conceptual Framework. *Am J Gastroenterol* 2020 Jun; 115(6):814–822. <https://doi.org/10.14309/ajg.000000000000604> PMID: 32250997
42. Gupta A, Dhakan DB, Maji A, Saxena R, P V, Mahajan S, et al. Association of Flavonifractor plautii, a Flavonoid-Degrading Bacterium, with the Gut Microbiome of Colorectal Cancer Patients in India. *mSystems.* 2019; 4: e00438–19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00438-19> PMID: 31719139
43. Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, et al. Microbial Dysbiosis in Colorectal Cancer (CRC) Patients. *PLOS ONE.* 2011; 6: e16393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016393> PMID: 21297998
44. Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, Grenther WB, Hamm TE, Balish E, et al. Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest.* 1996; 98: 945–53. <https://doi.org/10.1172/JCI118878> PMID: 8770866
45. Crook PR, Gray J. *Bacteroides* causing osteomyelitis in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1982; 41: 645–6. <https://doi.org/10.1136/ard.41.6.645> PMID: 7149806
46. Hebbandi Nanjundappa R, Ronchi F, Wang J, Clemente-Casares X, Yamanouchi J, Sokke Umeshappa C, et al. A Gut Microbial Mimic that Hijacks Diabetogenic Autoreactivity to Suppress Colitis. *Cell.* 2017; 171: 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.022> PMID: 29053971
47. Molinero N., Ruiz L., Milani C. et al., “The human gallbladder microbiome is related to the physiological state and the biliary metabolic profile,” *Microbiome*, vol. 7, no. 1, p. 100, 2019. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0712-8> PMID: 31272480
48. Pereira P, Aho V, Arola J, Boyd S, Jokelainen K, Paulin L, et al. Bile microbiota in primary sclerosing cholangitis: Impact on disease progression and development of biliary dysplasia. *PLoS ONE.* 2017; 12: e0182924. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182924> PMID: 28796833

49. Chen B.; Fu S.W.; Lu L.; Zhao H. A Preliminary Study of Biliary Microbiota in Patients with Bile Duct Stones or Distal Cholangiocarcinoma. *BioMed Res. Int.* 2019; 2019:1–12. <https://doi.org/10.1155/2019/1092563> PMID: 31662965
50. Hussein AH, Lisowska BK, Leak DJ. Chapter One—The genus *Geobacillus* and their biotechnological potential. *Advances in Applied Microbiology*. 2015; 92: 1–48. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.03.001> PMID: 26003932
51. Ming H, Duan Y-Y, Guo Q-Q, Yin Y-R, Zhou E-M, Liu L, et al. *Meiothermus roseus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a geothermal area. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015; 108: 897–905. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0544-x> PMID: 26219565
52. Goh KM, Gan HM, Chan K-G, Chan GF, Shahar S, et al. Analysis of *Anoxybacillus* Genomes from the Aspects of Lifestyle Adaptations, Prophage Diversity, and Carbohydrate Metabolism. *PLoS ONE* 2014; 9: e90549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090549> PMID: 24603481
53. Liu F, Liu A, Lu X, Zhang Z, Xue Y, Xu J, et al. Dysbiosis signatures of the microbial profile in tissue from bladder cancer. *Cancer Med.* 2019; 8: 6904–6914. <https://doi.org/10.1002/cam4.2419> PMID: 31568654

Etude 2 : La méthylation de l'ADN un biomarqueur pour le cholangiocarcinome par analyse bio-informatique et immunohistochimique (Projet du manuscrit 2 en cours de soumission).

Les cholangiocarcinomes (CCA) ou cancers des voies biliaires représentent 3 % de tous les cancers digestifs. Ils sont classés en sous-groupes intrahépatiques (CCAI) et extrahépatiques (CCAE) en fonction de leur localisation anatomique. Leur incidence est en augmentation ces dernières années. Cependant, la carcinogenèse biliaire reste mal caractérisée bien que le rôle de l'environnement soit considéré comme le principal facteur contribuant à l'apparition et à la croissance de la tumeur. Les mécanismes épigénétiques ont été suggérés comme une voie cruciale par laquelle les facteurs environnementaux affectent les maladies. Afin d'évaluer l'importance de ce mécanisme, nous avons comparé ici les profils de méthylation des gènes entre les CCAE et les contrôles en analysant les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) et les effluents biliaires, en utilisant des puces de méthylation provenant des patients et des contrôles. Au total, 9 gènes dont le statut de méthylation s'est avéré similaire (hyper- ou hypo-méthylés) dans les deux effluents (sang et bile) et dont les fonctions potentielles impliquent la carcinogenèse, ont été identifiés. L'expression de la transcription pour deux des neuf gènes a été évaluée dans CCAE, en utilisant l'immunohistochimie sur les tissus, et comparant les données à celles obtenues dans une série de CCAI et au cancer du pancréas comme deux compartiments néoplasiques supplémentaires. Une signature épigénétique liée à la CCA avec des impacts diagnostiques et/ou thérapeutiques potentiels est caractérisée et devrait pouvoir être mise en relation avec la signature du microbiote que nous avons précédemment identifiée.

The DNA Methylation Biomarkers for Cholangiocarcinoma Using Bioinformatics Analysis and immunohistochemistry

Massa Saab^{1*}, Denis Mestivier¹⁻², Jérémy Augustin³; Massoudreza Sohrabi⁴, Jean Baptiste Bachet⁵, and Iradj Sobhani^{1-6*}

- 1- Early detection of colon cancer using molecular and microbial markers (EC2M3) -EA 7375 Team, University Paris-Est Creteil (UPEC), France.
- 2- Bioinformatic core facility, IMRB UMR 955 – INSERM – UPEC 94010 Créteil Cedex-France.
- 3- Department of pathology, CHU Henri Mondor-APHP -Creteil, France.
- 4- GastroIntestinal and Liver Diseases Recherche Center (GILDRC), Iran University of Medical and Firouzgar hospital (Prof. F. Zaman), Tehran Iran.
- 5- Department of Gastroenterology & GIT Oncology; Pitie Salpetrière Hospital APHP
- 6- Department of Gastroenterology & GIT Oncology CHU Henri Mondor-APHP - Creteil, France.

Subtitle: ADN methylation in cholangiocarcinoma

*Corresponding authors:

Email: massa.saab93@gmail.com (SM)

iradj.sobhani@aphp.fr (SI)

Funding for analyses: UFR Sante-Paris12; UPEC Creteil-France

Abstract

Cholangiocarcinomas (CCAs) or biliary tract cancers represent 3% of all digestive cancers. They are classified as intrahepatic (CCAi) and extrahepatic (CCAe) subgroups according to the anatomic location. Their incidence is increasing over these past recent years. However, the biliary carcinogenesis remains poorly characterized although the role of the environment is considered as the main contributor to the tumour occurrence and growth. Epigenetic mechanisms have been suggested as a crucial pathway through which environmental factors affect emerging diseases. To evaluate importance of this mechanism, herein we compared gene methylation profiles between CCAe, and controls by analyzing peripheral blood mononuclear cells (PBMC), bile effluents, tumours tissues using methylation chips from patients and controls. Overall, 9 genes methylation status of which was found similar (hyper- or hypo methylated) in two (blood and bile) effluents with potential functions involving carcinogenesis, were identified. Transcription expression for two out of 9 genes was evaluated in CCAe, by using immunohistochemistry on tissues and compared to CCAi and pancreatic cancer as two additional neoplastic comparative compartments. Consequently, a CCA-related epigenetic signature with potential diagnostic and/or therapeutic impacts is characterized and should be putted in link with microbiota signature we have previously identified.

Keywords: CCA, methylation, Bioinformatics, epigenetic, genes.

Introduction

Cholangiocarcinomas (CCA) are relatively rare malignant tumors of the bile ducts, representing around 3% of all neoplasia in the digestive system (1). They are anatomically classified as intrahepatic (roughly designed as CCAi that arise proximal up to the second order bile ducts), perihilar (arising between the second order bile ducts and the insertion of the cystic duct into the common bile duct) and distal extrahepatic (arising between the insertion of the cystic duct and the ampulla of Vater) (2); these two latter having been classified as extra hepatic CCA (CCAe).

The circumstances of discovering a CCA differ according to the anatomic location. The diagnosis is delayed, and most often performed at an advanced disease stage (3,4) making surgery, the standard of curative therapy non-feasible and the prognosis poor with high cumulative cholangiocarcinoma mortality and the 5-year survival rate close only to 5% (2).

Mechanisms involved in the CCA carcinogenesis remain poorly investigated although CCAi and CCAe subgroups are considered according to their resemblances to hepatocarcinoma and pancreatic cancers, respectively in terms of biological phenotypes (5). However, the biliary carcinogenesis, per se, remains poorly characterized although the role of the environment appears pivotal as the main contributor to the tumor occurrence and growth (6). Numbers of recent studies in various emerging diseases have outlined epigenetic mechanisms, particularly through the methylation of the gene structure, as a crucial pathway through which environmental factors affect emerging diseases (7,8)

DNA methylation is an important part of epigenetics and regulation of genomic function affecting cellular processes, genome regulation, organism development, and diseases (9) .

Accordingly, specific DNA methylation patterns have been described as pivotal events during the initiation (alternatively, late stages) of oncogenesis in various cancers including colon

cancer (10) . In several of these studies the role of microbiota dysbiosis and inflammatory or immune system alteration are linked to the carcinogenesis (9,11,12)

In CCAe patients, hypermethylated CpG islands in the promoter part of numbers of genes have been shown associated with tumour growth (11–13) . We have shown that CCAe is associated with a biliary dysbiosis (14) . However, there is no evidence whether methylated genes in the CCAs are associated with the environment or it does result from somatic DNA changes. Therefore, we compared the methylation profile between CCAe, and controls by analyzing peripheral blood mononuclear cells (PBMC), bile effluents by using methylation chips. Overall, nine out of all genes with potential involvement in the carcinogenesis have been found with similar methylation status (hyper- or hypo methylated) as identified in either blood or bile effluents. Then transcription expressions for two out of these genes were evaluated by using immunohistochemistry on tissues including CCAe, CCAi and pancreatic cancer; these latter having been considered as comparator for tumor disease specificity.

Patients and methods

Patients

A total cohort of 68 individuals' samples and effluents were used for methylation pattern analysis including blood, bile, or tissues.

Bile fluid as direct milieu in contact with CCAe from 30 patients (n= 6 CCA, n=12 Lithiasis and n=12 pancreatic cancer) were submitted to bile methylation chips (characteristics of the patients are summarized in [Table 1 A](#). Blood samples from 8 patients (n = 4 CCA and N=4 controls), were submitted to PBMC chips analysis characteristics of the patients are summarized in [Table 1 A](#). There was no significant difference between these two groups in terms of age, gender, or BMI.

Protein expressions of those genes with both blood and bile methylation pattern as obtained after methylation chips analyses, were evaluated in 30 patients (10 with pancreatic adenocarcinomas, 10 with CCAe and 10 with CCAi) by using IHC (characteristics of the patients are summarized in [Table 1 A](#). There was no significant difference between these groups in terms of age, gender, or BMI.

Samples were obtained between 2014 and 2016 in University Henri Mondor (Creteil-APHP, University Hospitals - Charles Foix (Paris-APHP) in France and Firouzgre (Teheran-Iran) hospitals, three tertiary centers. They consisted in whole blood (5 mL) and bile (1-2mL) collection in 75 consecutive individuals under ERCP (details described elsewhere (14) which was performed for biliary obstruction diagnosis and therapy; Briefly, biliary juice methylation pattern in 6 CCAe patients were compared to those of 12 individuals with bile lithiasis and 12 patients with pancreatic adenocarcinoma and PBMC methylation pattern in 4 CCAe patients was compared to PBMC in 4 control individuals with biliary lithiasis, by using dedicated methylation chips array. . In line with the Declaration of Helsinki, the research protocols and

surveillance were explained to the patients and informed consent was obtained for obtaining blood and bile samples as described elsewhere (14). In France, according to the French law the study was approved by the ethics committee of Paris Ile de France according to “no opposition of patient for using samples obtained for diagnosis into intention for research under Assistance Publique hopitaux de Paris-APHP regulatory unit (URC).

Methods

Surgical tissue samples including homologous normal components from CCAe (n=10), CCAi (n=10), and pancreatic adenocarcinoma (n=10) patients and from Pitié Salpêtrière University Hospitals - Charles Foix (Paris-APHP). The investigative study was submitted according to no opposition of patient’s declaration for using samples obtained for diagnosis into intention for research. Available data from the clinical files were obtained.

Patient and tumor characteristics of the patients are summarized in [Table 1 B](#). None of recruited patients had received radiotherapy, hormone therapy or other related anti-tumor therapies before surgery. There was no significant difference between different groups in terms of gender, or BMI but there was a significant difference in age between the two groups Intrahepatic CCA and Pancreatic Adenocarcinoma ($p= 0.0029$).

A-

	Number	Gender N Female: male	Body mass index (BMI) mean (SD)	Age, mean (SD)
Control	16	9:7	25 (5)	66.5 (10)
CCAe	20	8:12	25.5 (5)	66.3 (9)
CCAi	10	5:5	22 (4)	65 (7)
Pancreatic cancer	22	10:12	21 (3)	71.5 (5)
Total	68	68		

B-

Characteristic	Pancreatic adenocarcinoma (N=10)	CCA extrahepatic (N=10)	CCA intrahepatic (N=10)
TNM Staging	T3 N1 = 5 T2 N1 = 1 T3 N0 = 3 T3 N1b = 1	T3 N0 = 1 T3 N1 = 3 T2 N0 = 1 T2a N1 = 1 Not identified = 4	T2 N0 = 1 T2 N1x = 1 T1 N0 = 1 T2b N0 M0 = 1 Not identified = 6
Received Chemotherapy	Yes = 7 No = 1 Not identified = 2	Yes = 3 No = 3 Not identified = 4	No = 3 Not identified = 7

Table 1: Characteristics of patients. A. For PBMC and bile methylation chip and for IHC. B. Tumor characteristics for IHC.

Fisher test for Gender comparison and Wilcoxon test or Kruskal-Wallis for BMI and Age comparisons. No significant difference according to p-value < 0.05.

DNA extraction and Detection of methylation using chip device.

Peripheral blood samples were obtained from CCAe patients and controls before circulatory lymphocytes were isolated according to Ficoll method. This consisted first, in the centrifugation for plasma to be separated; then Phosphate Buffered Saline (PBS) was added to the Buffy Coat and resuspended for obtaining PBMCs based on the Ficoll density gradient. The final product was conserved at -80 °c until the analysis.

Genomic DNA was isolated from PBMC and bile juice, by using QIAamp DNA Blood MiniKit (Qiagen, Hilden, Germany) and QIAamp DNA MiniKit (Qiagen, Hilden, Germany) respectively.

Quality of DNAs was checked using agarose gel electrophoresis.

DNAs were modified using bisulfite protocol according to the manufacturer's instructions and as described (10) before incubation with two dedicated Illumina methylation (INTEGRAGEN, France) chips according to manufacturer's recommendation: Illumina Infinium `HumanMethylation27` (v1.27K) (27578 probes) and Infinium Methylation Epic BeadChip (MethEpic v1.0) 85K (865918 probes) for bile and PBMC, respectively. R. Details can be found at (15). The whole process from bisulfite conversion of template DNA to array scanning takes four working days. Bisulfite convert the genomic DNA samples using the Zymo EZ DNA Methylation Kit. Bisulfite-treated samples were processed using dedicated chips. After the treatment, unmethylated cytosines convert to uracil, though methylated cytosines remain unchanged. The methylation status of each probe was determined by calculating the ratio of fluorescent signals and values expressed as 0 (unmethylated) to 1 totally methylated.

Row data are shown in Supplementary [Files S1](#) and [S2](#).

Probe Status Classification

We defined a status for each probe as hypo-, none- or hyper-methylated in the group has follows according to the methylation level from 0=unmethylated up to 1=fully methylated: 1) we compute the median value (M) of the beta-values of a group (probes associated with a *p-value* > 0.05 were set as 'NA' (Not Available), 2) at least 75% of samples of a group with a beta-value less (resp. greater) than 0.2 (resp. 0.6). Thus, status of each probe was set as hypomethylated if $M < 0.2$ or hypermethylated if $M > 0.6$ according to a visual inspection of the distribution of all beta-values for each each chip ([Figure S1](#)). The status was set to none-methylated otherwise.

Probes displaying differences between two groups were then kept as candidate probes for further analysis; for example, a probe found unmethylated in the control group with $M < 0.2$

and hypermethylated ($M > 0.6$) in CCA group was considered. These candidate probes were considered as “differential” probes. Then, for all differential probes corresponding genes were identified and used for further analysis.

Validation for gene expression

All tissue specimens were fixed with 10% formalin and embedded in paraffin. One representative block containing tumor and non-tumor tissues was selected for each tumor and stained using HE to select tissue areas for performing immunohistochemistry analysis.

Immunohistochemistry staining

Immunohistochemistry was performed on 4 μ m-deparaffinized tissue slides. For antigen retrieval, we used a CC1 unmasking. IHC against SFN and again WISP1 were carried out on a Ventana autostainer (Benchmark GX, Tucson, AZ, USA) using polyclonal anti-Rabbit antibody for WISP1 (PA5-29150) and monoclonal anti-mouse antibody (1433S01) for SFN utilizing OptiView Amplification Kit and OptiView DAB IHC Detection Kit as a detection system .

Detailed information on used antibodies and staining protocols are given in the online supplementary [Table S1](#). Malpighian tissue (skin tissue) and stomach tissue were used as a positive control for SFN and WISP1 specific Cytoplasmic staining antibodies, respectively.

Semi quantification of immune stained cells

To evaluate the expression of SFN and WISP1 a semi quantitative score was assessed using a four-tier system: no staining (0), weak (1+), moderate (2+) and strong (3+). Cases with no or weak staining (0 and 1+) were considered as “negative”. Cases with moderate and strong staining (2+ and 3+) were considered as “positive”.

Statistical analysis

Comparisons were performed using no-parametric tests such as the Fisher test for Gender, the Kruskal-Wallis test between three groups (and if significant, we performed a pairwise Wilcoxon comparisons with Holm correction for multiple tests) and the Wilcoxon test between two groups for age and body mass index (BMI) (R v3.6.3). We used Fisher's test (GraphPrism 8) to analyze the difference between SFN and WISP1 expression in various tumor tissue subgroups.

Differences were considered as significant for p-value <0.05.

Results

1. Identification of methylation gene pattern in Bile and Blood Effluents

In blood, 1419 out of 865918 probes were identified as differential between CCAe and Controls when 3061 out of 27587 probes in the bile effluents were observed to be differential (Table S2 and S3).

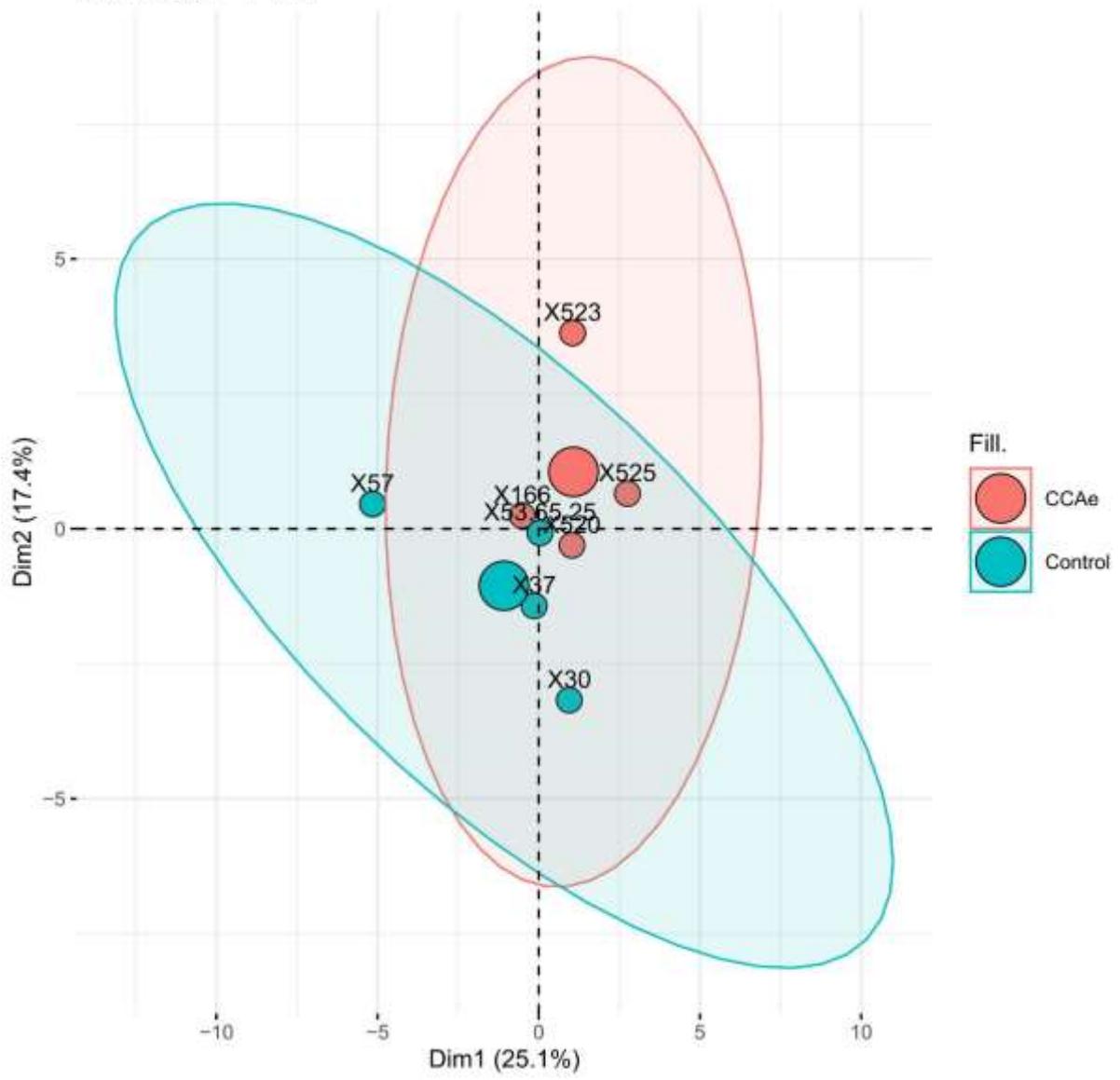
Based on PCA (Principal Component analysis) analysis including 1419 differential probes in blood, a significant difference in methylation between CCAe and controls (Figure 1A) was obtained whereas 3061 probes in the bile fluid did not show a difference in methylation levels between two groups (Figure 1 B)

The differential probes were identified as follow. In blood, 790 probes were hypermethylated (>0.6) in CCAe but normo-methylated ($0.2 \leq M \leq 0.6$) in controls and 138 probes were hypomethylated (<0.2) in CCAe but normo-methylated in controls ($0.2 \leq M \leq 0.6$) Table 2.

In the bile fluid, 152 probes were hypermethylated (>0.6) in CCA but normo-methylated in controls ($0.2 \leq M \leq 0.6$) and 326 probes were hypomethylated (<0.2) in CCA but normo-methylated ($0.2 \leq M \leq 0.6$) in controls Table 2.

A-

Individuals - PCA



B-

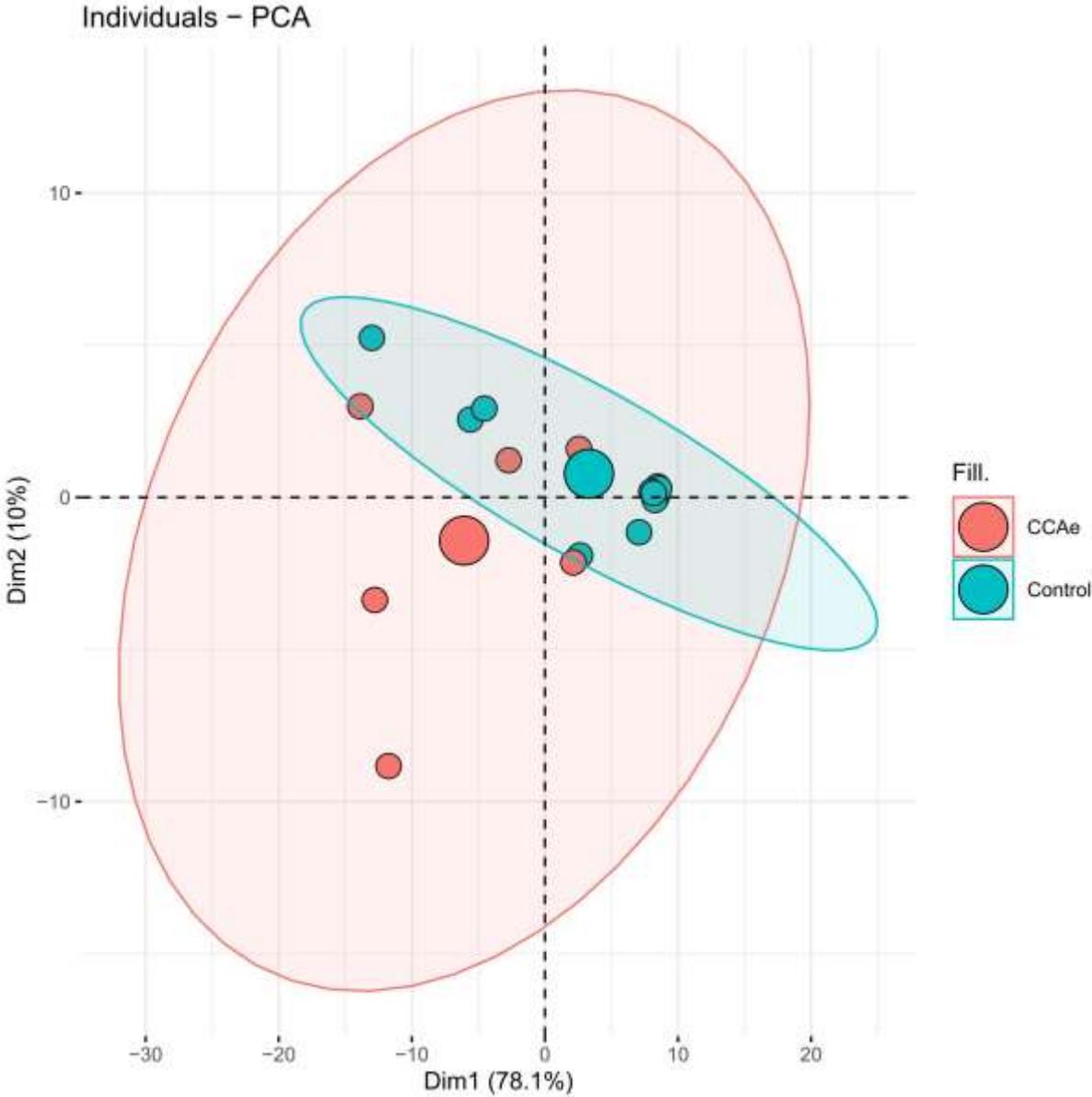


Figure 1: Principal Component analysis of differential probes. A) PCA in PBMC chips between CCA and controls. B) PCA in BILE chips between cancers and controls.

		Total number of probes	M<0.2	0.2≤M≤0.6	M>0.6
Blood	CCAe	1182	138	254	790
	Control	237	1	235	1
Bile	CCAe	1545	326	1067	152
	Control	1516	0	1516	0
Total CCAe/Control	Blood	1419	139	489	791
	Bile	3061	326	2583	152

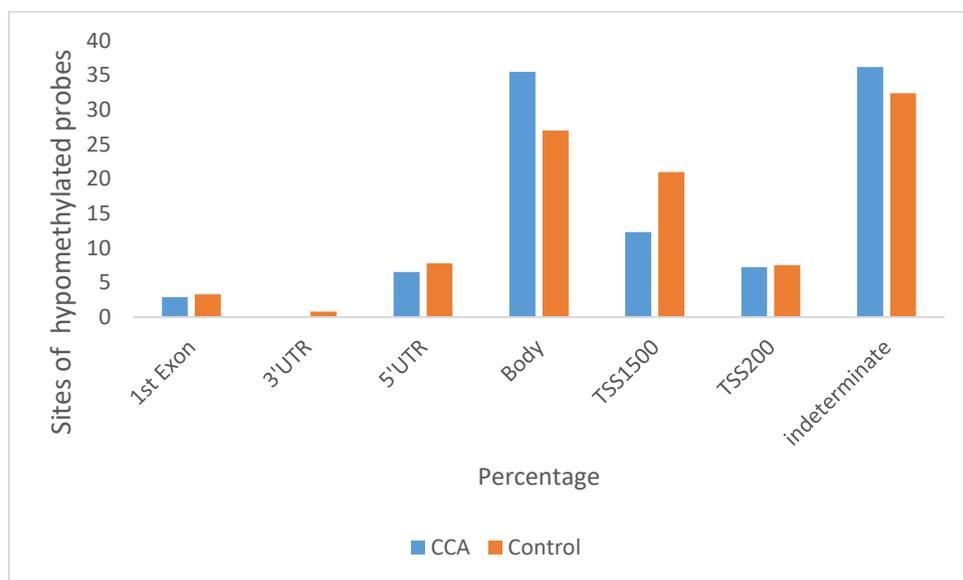
Table 2: The occurrence table of the status of probes methylation for the BILE and PBMC dataset. Hypermethylated (>0.6); Hypomethylated (<0.2); Normo-methylated (0.2≤M≤0.6)

The 3061 differential probes of the BILE dataset corresponded to 2608 different genes, whereas the 1419 differential probes of the PBMC dataset corresponded to 882 different genes. Of which, 2607 genes are specific to the BILE dataset, 881 genes are specific to the PBMC dataset (Table S4) and 114 genes are common (Table S5).

The distribution and location of the hypo- and hyper- methylated of probes segments are shown in Figure 2. Overall, 19.57% of the hypomethylated in CCAe vs 28.5 % in Controls (Figure

2A) and 11.9 % of hypermethylated in CCAe vs 10 % in Controls gene locations sites (Figure 2B) were close to the promoter regions, including TSS200 and TSS1500. High levels of methylated gene segments were clustered within the gene body, 5'UTR, 3'UTR and first exon when 36.23% in CCAe vs 71.5 % in Controls of the hypomethylated and 40.13 % in CCAe vs 90 % in Controls of hypermethylated segments concerned unspecified gene regions. (Figure 2).

A- Hypomethylated probes sites



B-Hypermethylated probes sites

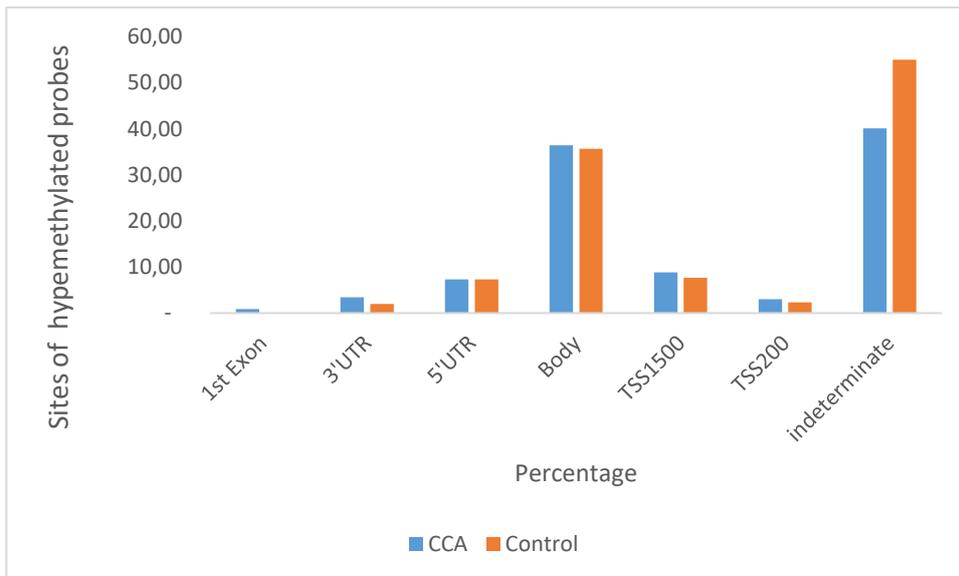


Figure 2: Distribution of differential probes on gene sites CCAe vs Control.

A. Hypomethylated probes sites; B. Hypermethylated probes sites.

2- Similar methylation gene patterns in bile and blood effluents

Attempting to identify same epigenetic pattern in the blood and through bile effluent, we considered 114 differential genes (table 5S) which were similarly classified in both Bile and PBMC methylation chips. Nine out of them, displayed the same (hypo or hyper) methylation levels in the CCAe patients: five genes were hypermethylated and four were hypomethylated. (Table3).

Gene symbole	Methylation levels in Bile and PBMC chips
CHML	Hypermethylated
FGR	Hypermethylated
MVP	Hypermethylated
RHD	Hypermethylated
ZIM2	Hypermethylated
CR2	Hypomethylated
FAM84A	Hypomethylated
HCN2	Hypomethylated
SLC13A3	Hypomethylated

Table 3: Lists of common genes between the two-methylation chips with the same methylation levels in bile and blood.

These genes are involved in post -translational protein modification, cell differentiation, regulation of cell population proliferation, mRNA transport, and regulation of transcription, DNA-templated, cell-cell signaling, and anion transmembrane transport as described by GO annotation. The related proteins may act in the cytoplasm, cytosol, nucleoplasm, nucleus, extracellular exosome, extracellular region, and plasma membrane with specific function of protein kinase binding, GTPase activator, DNA-binding transcription factor, and citrate transmembrane transporter activities ([Table S6](#)).

3- WISP-1 and SFN two differential genes between control and cancerous groups

From the data, we have selected 20 genes ([Table S7](#)) whose methylation levels were different between control and CCAe (hypermethylated in controls and normo-methylated in CCAe). These candidate genes were classified according to their functions. Amongst them, two (WISP-

1 and SFN) known for their role in the tumorigenesis, and cell proliferation and metastasis (16,17) have been selected for validation in tissues using immunohistochemistry.

SFN expression was detected in 10 out of 10 CCAe tissues (100%) (Figure 3A; Table 4C), 9 out of 10 cancer pancreatic tissues (90%) (Figure 3B; Table 4C) and 3 out of 10 (30%) CCAi tissues (Table 4A and C). Whereas SFN was moderately expressed in 1 out of 30 homologous normal tissues (liver, pancreas).

A semi quantitative evaluation of expressions showed strong pattern of SFN (3+) in 8/10 and in 5/9 of CCAe and of pancreatic cancer tissues, respectively, and moderate pattern (2+) in 2/10, 4/9 and 3/10 of CCAe, pancreatic cancer and CCAi tissues, respectively (Table 4A). The expression rate of SFN protein was significantly higher in CCAe ($P<0.001$) and pancreatic cancer ($P<0.001$) than in CCAi (Table 4C).

Wisp-1 expression was detected in 2/10 CCAe tissues, 2/10 cancer pancreatic tissues and 6 out 10 CCAi tissues (Figure 3C; Table 4C). Whereas WISP1 staining was moderately expressed in 3 out of 30 normal homologous (liver, pancreas) tissues. The semi quantitative evaluation of WISP1 expression showed strong (3+) pattern in 3/6 of CCAi tissues, moderate pattern (2+) in 2/2 of CCAe and 2/2 cancer pancreatic tissues and 3/6 of remaining CCAi tissues (Table 4C)

Thus, WISP1 appeared as a specific marker for CCAi diagnosis with significantly higher expression in CCAi ($P<0.001$) than in CCAe or in cancer pancreatic tissues ($P<0.001$) (Table 4C).

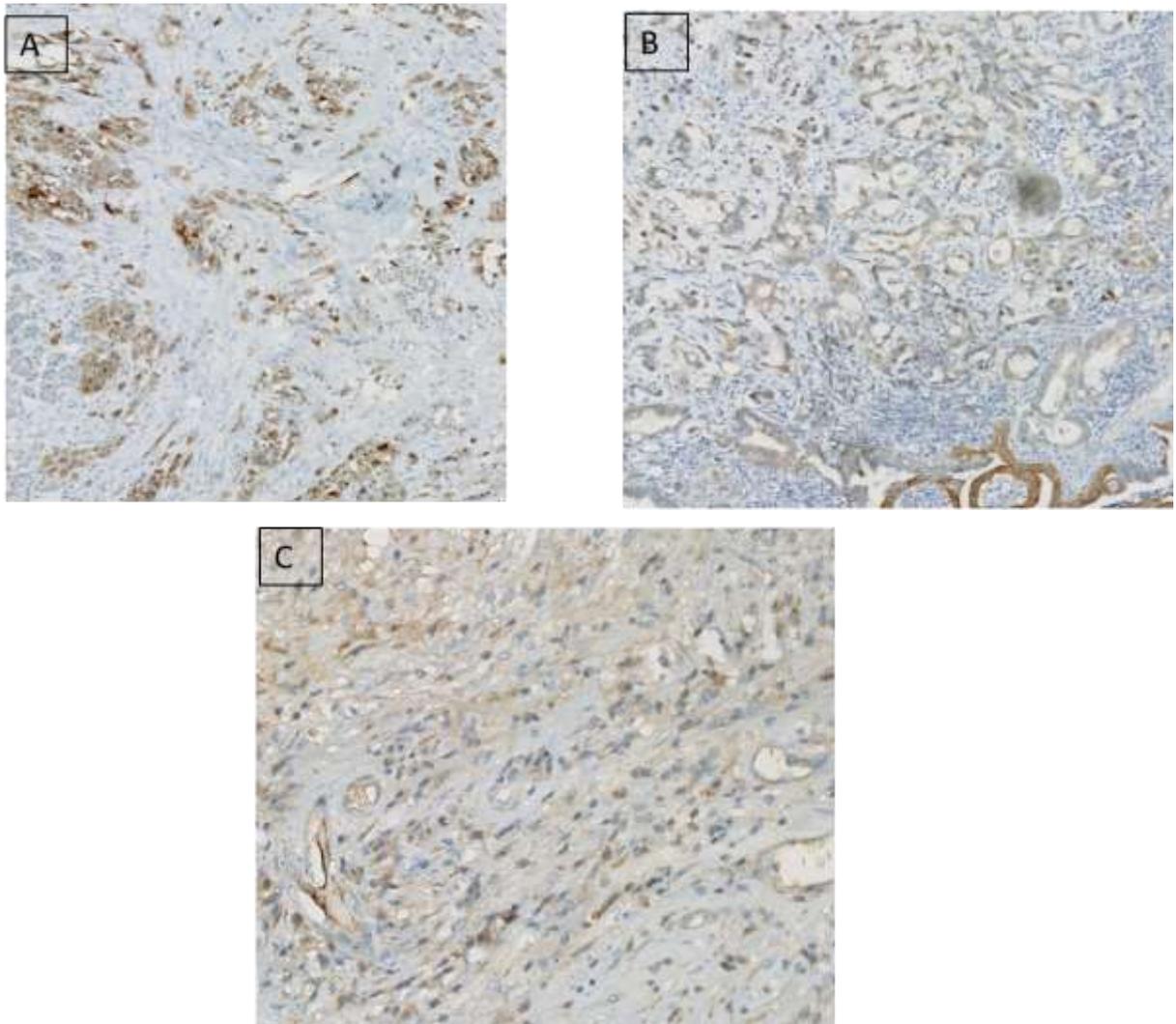


Figure 3: Expression of SFN and WISP1 in CCAe, CCAi and pancreatic adenocarcinoma tissues A. Representative images of SNF expression in pancreatic adenocarcinoma tissues; B. CCAe; C. Representative Images of WISP1 expression in CCAi tissue.

A.

SFN staining	Pancreatic adenocarcinoma	Extra-hepatic CCA	Intra-hepatic CCA
Strong (3+)	5	8	0
Moderate (2+)	4	2	3
No or weak (0-1+)	1	0	7

B.

WISP1 staining	Pancreatic adenocarcinoma	Extra-hepatic CCA	Intra-hepatic CCA
Strong (3+)	0	0	3
Moderate (2+)	2	2	3
No or weak (0-1+)	8	8	4

C.

Genes	Pancreatic adenocarcinoma	Extra-hepatic CCA	Intra-hepatic CCA	p value
SFN	9	10	3	< 0.0001
WISP1	2	2	6	< 0.0001

Table 4: Semi quantitative evaluation of SFN (A) and WISP1 (B) staining in Pancreatic adenocarcinoma, extra-hepatic CCA and intra-hepatic CCA. A. with numbers of positive cases for each protein indicated (C).

Discussion

In the present study, we used Human Methylation chips to detect the methylated genes in CCA tissues, blood, and bile effluents. Among genes, expression of which could be different between cancer patients and control individuals due to the methylation rate, 114 genes were common between the blood and bile arrays amongst them 9 displayed similar methylation pattern and 20 were differential between CCAe and controls. Protein expressions of two out of these genes were then evaluated by using IHC in CCAi, CCAe and in pancreatic adenocarcinoma. SFN gene is hypermethylated in CCAe and pancreatic cancer tissues when no detected in the normal tissues.

Epigenetics is the main factor, which causes the reduction of tumor suppressor gene expression in tumor, and DNA methylation plays an important role in the epigenetic modification. These genes may be the potential DNA methylation biomarkers and therapy targets for CCA. DNA methylation is a central epigenetic modification that plays a key role in cellular processes such as genome regulation, organism development and various GIT diseases including cancers (9,18). To date, numerous studies have demonstrated the role of hypermethylation of tumor suppressor genes and overall hypomethylation of oncogenes in cancer development and progression, including CCAs (11,18).

However, there is no evidence that methylated genes in CCAs are associated with the tumor environment or result from the systemic hypermethylation pathway.

Thanks to methylation chips, we observed different methylation profiles between cancer patients and controls in the bile and blood.

Overall, 19.57% of the hypomethylated sites and 11.9% of the hypermethylated sites were close to promoter regions, including TSS200 and TSS1500. This suggest strongly impact on gene transcription. Several types of methylation, such as promoter methylation and CpG

island methylation, are strongly associated with CCAs (13,19). Chen and al. (11) showed that the O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene promoter was highly methylated and positively correlated with the overall survival rates in a series of CCAs. Similarly, aberrant methylation of GATA Binding Protein 5 (GATA-5), was shown to participate in the initiation and progression of this disease (12).

The initiation and progression of CCAs is a complex, multi-step process regulated by both genetic and epigenetic modifications. Significant differences in the methylation levels of OPCML and HOXD9 conducted to the serum cell-free DNA detection of CCA patients, for distinguishing CCA from other biliary diseased patients (20).

Our results are in agreement with other studies that have investigated DNA methylation and gene expression profiles in cholangiocarcinoma (19,21) showing all together a specific methylation profile for CCAs.

Among nine common genes we identified, with the same methylation (hypo or hyper) levels in CCAs patients, five were hypermethylated and four hypomethylated suggesting reduced and enrichment in post-translational modification of proteins, respectively. These might affect cell differentiation, regulation of cell population proliferation, mRNA transport, regulation of transcription, DNA modeling was noticed according to Gene Ontology base data. Amongst 20 genes with different methylation levels between controls and CCAs, two (WISP-1 and SFN) could be deeply investigated regarding their expressions in tissues by using Immunohistochemistry (IHC).

Stratifin (SFN, also known as 14-3-3 sigma) belongs to the 14-3-3 family of abundant and widely expressed 28-33 kDa acidic polypeptides that spontaneously self-assemble as homodimers or heterodimers. They can bind to more than 100 functionally diverse cellular proteins and alter various cellular processes such as signal transduction, cell cycle regulation,

apoptosis, cytoskeletal organization and malignant transformation (22). They also may induce p53 protein and impeding DNA damage repair such as those induced by microbes and other factors from the environment (23). Increased levels of SFN was reported in the hepatocellular carcinoma (24) and lung carcinoma (25,26) and by cholaniocarcinoma culture organoids (27). As far as we could know, our study is the first showing intense expression of SFN in CCAe tissue. This is also the case in the pancreatic cancer as reported by others (28,29), but all these results contrast with Bertram et al (30) who showed higher expression of SFN in intrahepatic CCA tissues. That its diagnostic and prognostic values could be documented in lung adenocarcinoma (25,26) and in colon cancers would suggest microbes may be in link with hypomethylation of this gene as we could discuss elsewhere (9) and may be considered as argument for discrepancies between CCAe and CCAi due to different related dysbiosis.

By contrast, WISP1, involved in Wnt and β -catenin (31) showed currently higher rate of expression in CCAi (60%) than in CCAe and pancreatic adenocarcinoma (20%). This suggests that in CCAs, low expression of SFN and high expression of WISP1 could be a marker of CCAi compared to CCAe. The expression of WISP1 in different cancers remains unknown. High expression of WISP1 is expressed in human breast and colon cancers and is therefore associated with increased tumor growth (32,33). But WISP-1 deregulation can lead to various pathologies, including osteoarthritis, fibrosis and cancer, but the exact role of WISP-1 in tumor genesis remains controversial (34,35). More interestingly, Wisp1 is stimulated by virulent bacteria and is hypothesized regulating mucosal repair due to microbial injuries (36). Also, WISP1 is known as a downstream target of WNT1, and the transcription factor β -catenin mediates transcriptional regulation and chromatin interactions (31,35). It may exert prognostic effect in CCAi (37) with WISP1 overexpression promoting metastasis and poor prognosis in hepatocellular carcinoma (38).

In conclusion, we identified differentially expressed methylated probes between cancer patients and controls. Two gene candidate genes which were analysis using IHC showed hypomethylated SFN and WISP1 could be involved in CCA carcinogenesis. These results can be putted in link with our previous published study that showed biliary dysbiosis in CCA. Further studies are then needed to confirm our data in a larger cohort. Both methylated genes and microbiota may be considered as target point for diagnosis and therapies.

References

1. Van Dyke AL, Shiels MS, Jones GS, Pfeiffer RM, Petrick JL, Beebe-Dimmer JL, et al. Biliary tract cancer incidence and trends in the United States by demographic group, 1999-2013. *Cancer*. 1 mai 2019;125(9):1489-98.
2. Razumilava N, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Lancet*. 21 juin 2014;383(9935):2168-79.
3. Kawarada Y, Yamagiwa K, Das BC. Analysis of the relationships between clinicopathologic factors and survival time in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am J Surg*. juin 2002;183(6):679-85.
4. Nathan H, Pawlik TM, Wolfgang CL, Choti MA, Cameron JL, Schulick RD. Trends in survival after surgery for cholangiocarcinoma: a 30-year population-based SEER database analysis. *J Gastrointest Surg*. nov 2007;11(11):1488-96; discussion 1496-1497.
5. Palmer WC, Patel T. Are common factors involved in the pathogenesis of primary liver cancers? A meta-analysis of risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol*. juill 2012;57(1):69-76.
6. Khan SA, Tavolari S, Brandi G. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Liver Int*. mai 2019;39 Suppl 1:19-31.
7. Liang G, Weisenberger DJ. DNA methylation aberrancies as a guide for surveillance and treatment of human cancers. *Epigenetics*. 3 juin 2017;12(6):416-32.
8. Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, Cedar H. DNA Methylation in Cancer and Aging. *Cancer Res*. 15 juin 2016;76(12):3446-50.
9. Sobhani I, Rotkopf H, Khazaie K. Bacteria-related changes in host DNA methylation and the risk for CRC. *Gut Microbes*. 9 nov 2020;12(1):1800898.
10. Sobhani I, Bergsten E, Couffin S, Amiot A, Nebbad B, Barau C, et al. Colorectal cancer-associated microbiota contributes to oncogenic epigenetic signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 nov 2019;116(48):24285-95.

11. Chen J, Li Z, Chen J, Du Y, Song W, Xuan Z, et al. Downregulation of MGMT promotes proliferation of intrahepatic cholangiocarcinoma by regulating p21. *Clin Transl Oncol.* mars 2020;22(3):392-400.
12. Liu P, Zhou T-F, Qiu B-A, Yang Y-X, Zhu Y-J, An Y, et al. Methylation-Mediated Silencing of GATA5 Gene Suppresses Cholangiocarcinoma Cell Proliferation and Metastasis. *Transl Oncol.* juin 2018;11(3):585-92.
13. Andresen K, Boberg KM, Vedeld HM, Honne H, Jepsen P, Hektoen M, et al. Four DNA methylation biomarkers in biliary brush samples accurately identify the presence of cholangiocarcinoma. *Hepatology.* mai 2015;61(5):1651-9.
14. Saab M, Mestivier D, Sohrabi M, Rodriguez C, Khonsari MR, Faraji A, et al. Characterization of biliary microbiota dysbiosis in extrahepatic cholangiocarcinoma. *PLoS One.* 2021;16(3):e0247798.
15. Infinium MethylationEPIC BeadChip Support [Internet]. [cité 13 mai 2021]. Disponible sur: https://support.illumina.com/array/array_kits/infinium-methylationepic-beadchip-kit.html
16. Hu Y, Zeng Q, Li C, Xie Y. Expression profile and prognostic value of SFN in human ovarian cancer. *Biosci Rep.* 31 mai 2019;39(5).
17. Liao X, Bu Y, Xu Z, Jia F, Chang F, Liang J, et al. WISP1 Predicts Clinical Prognosis and Is Associated With Tumor Purity, Immunocyte Infiltration, and Macrophage M2 Polarization in Pan-Cancer. *Front Genet.* 2020;11:502.
18. Emmett RA, Davidson KL, Gould NJ, Arasaradnam RP. DNA methylation patterns in ulcerative colitis-associated cancer: a systematic review. *Epigenomics.* juill 2017;9(7):1029-42.
19. Zhang C, Zhang B, Meng D, Ge C. Comprehensive analysis of DNA methylation and gene expression profiles in cholangiocarcinoma. *Cancer Cell Int.* 2019;19:352.
20. Thirlwell C, Eymard M, Feber A, Teschendorff A, Pearce K, Lechner M, et al. Genome-wide DNA methylation analysis of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue using the Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip. *Methods.* nov 2010;52(3):248-54.
21. Chen D, Wu H, He B, Lu Y, Wu W, Liu H, et al. Five Hub Genes Can Be The Potential DNA Methylation Biomarkers For Cholangiocarcinoma Using Bioinformatics Analysis. *Onco Targets Ther.* 2019;12:8355-65.

22. Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:617-47.
23. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, et al. 14-3-3sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell.* déc 1997;1(1):3-11.
24. Reis H, Pütter C, Megger DA, Bracht T, Weber F, Hoffmann A-C, et al. A structured proteomic approach identifies 14-3-3Sigma as a novel and reliable protein biomarker in panel based differential diagnostics of liver tumors. *Biochim Biophys Acta.* juin 2015;1854(6):641-50.
25. Shiba-Ishii A, Kim Y, Shiozawa T, Iyama S, Satomi K, Kano J, et al. Stratifin accelerates progression of lung adenocarcinoma at an early stage. *Mol Cancer.* 30 juill 2015;14:142.
26. Shiba-Ishii A, Kano J, Morishita Y, Sato Y, Minami Y, Noguchi M. High expression of stratifin is a universal abnormality during the course of malignant progression of early-stage lung adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 15 nov 2011;129(10):2445-53.
27. Tit-Oon P, Chokchaichamnankit D, Khongmanee A, Sawangareetrakul P, Svasti J, Srisomsap C. Comparative secretome analysis of cholangiocarcinoma cell line in three-dimensional culture. *Int J Oncol.* nov 2014;45(5):2108-16.
28. Robin F, Angenard G, Cano L, Courtin-Tanguy L, Gaignard E, Khene Z-E, et al. Molecular profiling of stroma highlights stratifin as a novel biomarker of poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer.* juill 2020;123(1):72-80.
29. Rodriguez JA, Li M, Yao Q, Chen C, Fisher WE. Gene overexpression in pancreatic adenocarcinoma: diagnostic and therapeutic implications. *World J Surg.* mars 2005;29(3):297-305.
30. Bertram S, Padden J, Kälsch J, Ahrens M, Pott L, Canbay A, et al. Novel immunohistochemical markers differentiate intrahepatic cholangiocarcinoma from benign bile duct lesions. *J Clin Pathol.* juill 2016;69(7):619-26.
31. Xu L, Corcoran RB, Welsh JW, Pennica D, Levine AJ. WISP-1 is a Wnt-1- and beta-catenin-responsive oncogene. *Genes Dev.* 1 mars 2000;14(5):585-95.
32. Pennica D, Swanson TA, Welsh JW, Roy MA, Lawrence DA, Lee J, et al. WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells

- and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 déc 1998;95(25):14717-22.
33. Xie D, Nakachi K, Wang H, Elashoff R, Koeffler HP. Elevated levels of connective tissue growth factor, WISP-1, and CYR61 in primary breast cancers associated with more advanced features. *Cancer Res*. 15 déc 2001;61(24):8917-23.
 34. Stephens S, Palmer J, Konstantinova I, Pearce A, Jarai G, Day E. A functional analysis of Wnt inducible signalling pathway protein -1 (WISP-1/CCN4). *J Cell Commun Signal*. mars 2015;9(1):63-72.
 35. Gurbuz I, Chiquet-Ehrismann R. CCN4/WISP1 (WNT1 inducible signaling pathway protein 1): a focus on its role in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. mai 2015; 62:142-6.
 36. Quiros M, Nishio H, Neumann PA, Siuda D, Brazil JC, Azcutia V, et al. Macrophage-derived IL-10 mediates mucosal repair by epithelial WISP-1 signaling. *J Clin Invest*. 1 sept 2017;127(9):3510-20.
 37. Tanaka S, Sugimachi K, Kameyama T, Maehara S-I, Shirabe K, Shimada M, et al. Human WISP1v, a member of the CCN family, is associated with invasive cholangiocarcinoma. *Hepatology*. mai 2003;37(5):1122-9.
 38. Wang Q-Y, Feng Y-J, Ji R. High expression of WISP1 promotes metastasis and predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. oct 2020;24(20):10445-51.

Supporting information

File S1: Sample methylation profile Bile. Bile sample methylation profile in CCAs, pancreatic adenocarcinomas and controls (CVS).

File S2: Sample methylation profile PBMC. PBMC sample methylation profile in CCAs, and controls (CVS).

Figure S1: Methylation thresholds. The distribution of the beta-values for all probes of the PBMC methylation dataset.

Table S1: Immunohistochemistry. Detailed information on the antibodies used and the staining protocols.

Table S2: Significant differential probes. Differential probes between CCA and controls in PBMC chips

Table S3: Significant differential probes. Differential probes between CCA, pancreatic adenocarcinoma and controls in Bile chips.

Table S4: Specific genes for each chip. The correspondence of the probes with their specific genes in the two chips.

Table S5: Common genes. Lists of common genes between the two chips PBMC and bile with their methylation level.

Table S6: Gene ontology. Gene ontology of common gene between two methylation chips.

Table S7: Lists of genes. Genes whose methylation levels were different between control and CCAe (hypermethylated in controls and normo-methylated in CCAe).

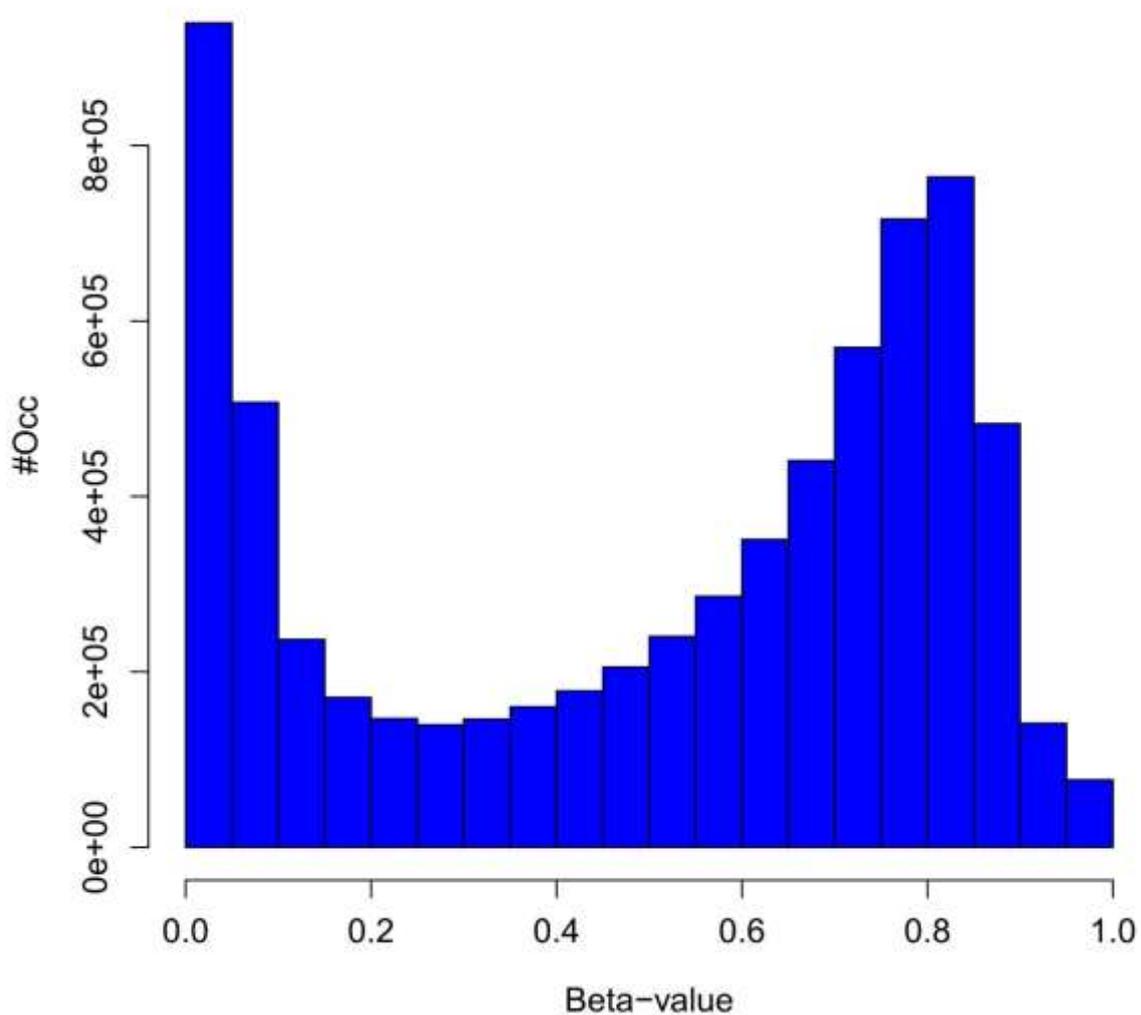


Figure S1: Methylation thresholds. The distribution of the beta-values for all probes of the PBMC methylation dataset.

Antibody	Company	Clone	Clonality	Dilution	Incubation	Antigen retrieval	Detection
SNF (14-3-3 sigma)	Thermo Fisher	1433S01	Mono Mouse	1/200	30 min. RT	20min. 99°C PH 9.0	OptiView DAB
WISP1	Thermo Fisher		Poly Rabbit	1/300	60 min. RT	32min. 95°C PH 8.2	OptiView DAB

Table S1 : Immunohistochemistry. Detailed information on the antibodies used and the staining protocols.

V. Discussion, Conclusions générales

Le cancer est la première cause de mortalité en France. Le CCA est une tumeur peu fréquente dont la cancérogénèse est complexe. Son diagnostic tardif amène peu de patients vers une résection chirurgicale. La carcinogenèse biliaire est mal connue, les antécédents génétiques et environnementaux (14) y jouent un rôle indiscutable. Pour mieux comprendre ce rôle nous avons dans d'une part caractérisée le microbiote biliaire dans un groupe de patients avec CCA en utilisant une approche de séquençage par amplicon ciblé de l'ARNr 16s bactérien. D'autre part nous avons choisi d'étudier la méthylation d'ADN comme marqueur des altérations épigénétiques associées aux CCAs.

1- Signature microbienne dans CCA

Dans cette étude, nous avons caractérisé le microbiote biliaire associées aux CCAs en comparaison avec des contrôles (calculs biliaires).

Dans l'ensemble, 32 % des cas des CCAs et 22 % des cas de contrôle présentaient une autre maladie associée, telle que le diabète, la pancréatite, la maladie inflammatoire de l'intestin ou une cholangite sclérosante primaire. Ces maladies associées ont été prises en compte dans les comparaisons qui ont été faites. Des sous-groupes avec ou sans maladies associées ont été créé pour les CCAs et les contrôles.

Des études antérieures ont mis en évidence une association entre la dysbiose du microbiote biliaire et des maladies humaines principalement le processus de formation de calculs biliaires de cholestérol (61,168). Ces données suggèrent que le microbiome de la vésicule biliaire humaine pourrait jouer un rôle physi-pathologique en influençant le profil métabolique biliaire.

Dans notre étude, notre objectif était de rechercher un lien significatif entre la dysbiose du microbiote biliaire et la cause néoplasique responsable de sténose biliaire. Nous avons pu d'abord, montrer à l'aide d'analyse en coordonnées principales (PCoA), une séparation significative de la composition microbienne biliaire entre les deux sous-groupes (CCAs et contrôles) sans maladies associées.

Nous avons montré également que le phylum *Protéobactéries* prédominait le microbiote biliaire des populations CCAs et des contrôles, alors que le phylum *Firmicutes* étaient moins représenté et le phylum *Bacteroidetes* était plus représenté dans le microbiote biliaire des CCAs par rapport aux contrôles.

Compte tenu du fait que les *Protéobactéries* représentent environ 60 % des phylum du canal biliaire contre seulement 30 % des phylums de l'estomac (78), on peut supposer les niveaux de *Proteobacteria* trouvés dans notre série est proches des valeurs intestinales que gastriques (313).

Au niveau de genre, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Klebsiella*, et *Pyramidobacter*, étaient les plus abondants dans le microbiote biliaire des CCAs avec une surreprésentation de *Bacteroides*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, et *Meiothermus* chez les CCAs. Par l'analyse différentielle de la composition de microbiote, une dysbiose bactérienne associées aux CCAs est ainsi définie.

Les *Bacteroides* sont des bacilles Gram-négatifs, anaérobies stricts, non sporulés, qui sont des bactéries du microbiote intestinal. Plusieurs études ont démontré des associations entre les *Bacteroides* et le cancer du côlon(72,314). En outre, des taux élevés de *Bacteroides* ont été trouvés dans diverses autres maladies et conditions pathologiques telle arthrite chez les rats transgéniques HLA-B27 (315,316). De plus, une plus grande abondance de *Bacteroides* dans la bile a été liée à la lithiase par des changements métabolomiques (172).

Des résultats controversés sur le microbiote biliaire associé à la CSP ont été publiés : Pereira et al (177) n'ont pas trouvé d'association significative entre la CSP et les modifications du microbiote biliaire, alors qu'une dysbiose spécifique du microbiote intestinal a été caractérisée (314). Nous n'avons pas été en mesure de vérifier ce point spécifique, car un seul de nos patients atteints de CCA souffrait de CSP.

À notre connaissance, les niveaux de *Geobacillus*, *Meiothermus* et *Anoxybacillus*, dont on a constaté qu'ils étaient plus abondants dans les CCAe, n'avaient pas encore été associés aux CCA. Le genre *Geobacillus* comprend un groupe de bactéries thermophiles Gram-positives, qui sont capables de se développer dans un milieu anaérobie même à des températures très élevées pouvant atteindre 75°C (317). Le genre *Meiothermus* est une bactérie environnementale thermophile, qui a été isolée à partir de source chaude (318). Le genre *Anoxybacillus* est une bactérie en forme de tige de la famille des *Bacillaceae*, qui forme des spores susceptibles de résister au milieu des sources géothermiques (319). Notre étude ne

permet pas de déterminer si ces associations illustrent une communauté de bactéries d'accompagnement plutôt qu'un noyau causal. Il est intéressant de noter qu'une étude récente a signalé une augmentation des genres *Anoxybacillus* et *Geobacillus* chez les patients atteints de cancer de la vessie dans des tissus de la muqueuse de la vessie cancéreuse (320). De plus, il a été démontré que deux genres (*Lactobacillus* et *Alloscardovia*) sont associés au CCAi (321).

2- Signature épigénétique

Dans la présente étude, nous avons utilisé des puces à méthylation humaines pour détecter les gènes méthylés dans le sang (PBMC) et les effluents biliaires. Parmi les gènes dont l'expression pourrait être différente entre les patients atteints de cancer et les contrôles avec des taux de méthylation différents, 114 gènes étaient communs entre les puces appliquées aux cellules circulantes sanguines et à l'effluent biliaire. Nos résultats montrent grâce aux deux puces de méthylation, des différents profils de méthylation différents entre les patients atteints de cancer et les contrôles ; parmi eux, 20 étaient différentiels entre les CCAe et les contrôles. Les expressions protéiques de deux de ces gènes ont ensuite été évaluée par IHC dans le CCAi, le CCAe et l'adénocarcinome pancréatique. Le gène SFN est hypométhylé dans les tissus de CCAe et du cancer pancréatique alors qu'il n'est pas détecté dans les tissus normaux.

Dans l'ensemble, 19,57 % des sites géniques hypométhylés et 11,9 % des sites géniques hyperméthylés étaient proches des régions promotrices, notamment des TSS200 et TSS1500. Cela suggère un fort impact sur la transcription des gènes. Plusieurs types de méthylation, comme la méthylation des promoteurs et la méthylation des îlots CpG, sont fortement associés aux CCAs (230,281).

Parmi les gènes communs, neuf d'entre eux présentaient le même sens de méthylation (hypo ou hyper) chez les patients atteints de CCAs : cinq gènes étaient hyperméthylés et quatre étaient hypométhylés. L'analyse fonctionnelle de ces gènes a montré qu'ils sont enrichis dans des processus cellulaires suivant modification post-traductionnelle des protéines, différenciation cellulaire, régulation de la prolifération de la population cellulaire, transport de l'ARNm, régulation de la transcription, modélisation de l'ADN.

Ces résultats sont concordants entre les cellules circulantes (PBMC) sanguines et non circulantes biliaires. Parmi les 20 gènes présentant des niveaux de méthylation différents entre les témoins et les CCA, deux ont été sélectionnés. Ces gènes candidats sont classés selon leurs fonctions. Nous avons sélectionné deux gènes (WISP-1 et SFN) dont l'expression a été évaluée en immunohistochimie (IHC).

La stratifine (SFN, également connue sous le nom de 14-3-3 sigma) appartient à la famille des 14-3-3, des polypeptides acides de 28-33 kDa abondants et largement exprimés qui s'auto-assemblent spontanément sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères. Ils peuvent se lier à plus de 100 protéines cellulaires fonctionnellement diverses et jouent ainsi des rôles importants dans divers processus cellulaires tels que la transduction des signaux, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, l'organisation du cytosquelette et la transformation maligne (322). Ils peuvent également induire la protéine p53 et entraver la réparation des dommages à l'ADN tels que ceux induits par les microbes et d'autres facteurs de l'environnement (323). Des niveaux élevés de SFN ont été signalés dans le carcinome hépatocellulaire (324) et le carcinome pulmonaire (325,326) et dans des organoïdes de culture de cholaniocarcinome (327).

A notre connaissance, la présente étude est la première à montrer une expression forte de SFN dans le tissu de CCAe. C'est également le cas dans le cancer du pancréas comme l'ont rapporté d'autres (328,329). Toutefois, tous ces résultats contrastent avec ceux de Bertram et al (330) qui ont montré une plus forte expression de SFN dans les tissus de CCAi. Néanmoins, le fait que SFN ait pu être considéré pour ses valeurs diagnostiques et pronostiques dans des cancers en première ligne d'exposition aux microbes, tels l'adénocarcinome pulmonaire (325,326) et le cancer du côlon, suggère que les microbes pourraient être associés à l'expression du gène via la dysméthylation comme nous avons pu le discuter ailleurs (331). Ceci peut être considéré également comme un argument pour mieux comprendre les divergences de l'expression de ce gène entre le CCAe et la CCAi.

En revanche, WISP1, impliqué en amont de la voie Wnt et de β -caténine (332) a montré dans notre étude un taux d'expression plus élevé dans les CCAi (60%) que dans les CCAe et les adénocarcinomes pancréatiques (20%). Cela suggère que dans les CCAs, une faible expression de SFN et une forte expression de WISP1 pouvant être devenir un marqueur de différenciation

de CCAi par rapport aux CCAe. L'expression de WISP1 dans différents cancers reste peu documentée. Ainsi dans les cancers humains du sein et du côlon une expression élevée de WISP1 semble associée à une croissance tumorale accrue (333,334) est faire de ce marqueur un bio indicateur pronostique. La dérégulation de WISP-1 est également rapportée dans diverses pathologies, incluant l'atteinte ostéo-articulaire, la réaction fibrosante à l'inflammation et les processus réactionnels au cancer (335,336). Plus intéressant encore, WISP1 est stimulé par des bactéries virulentes et on suppose qu'il régule la réparation des muqueuses due à des blessures microbiennes (337). WISP1 est connu comme la voie biologique d'aval par rapport à la voie WNT1- β -caténine, impliquée dans le cancer du colon. Le facteur de transcription β -caténine assure la régulation transcriptionnelle et les interactions chromatinienne de la voie WNT, l'ensemble interagissant avec le système de cohésion épithéliale assuré par les intégrines (332,336). Dans le domaine de néoplasies hépatiques, on peut supposer un effet pronostique de WISP1 dans le CCAi (338), et du potentiel métastatique et donc un indicateur de mauvais pronostic dans le carcinome hépatocellulaire (339).

3- Synthèse et perspective

Les deux études que nous avons menées ont permis de définir une dysbiose biliaire associée aux CCAs d'une part et une signature épigénétique caractéristique de CCA d'autre part. Elles ont permis l'identification de deux gènes dont l'expression n'avait pas été rapportée dans CCAe.

Grâce à la technique de séquençage de l'ARNr 16S nous avons caractérisé le microbiote dans la bile des CCAe en comparaison à des contrôles et nous avons identifié une dysbiose biliaire associée aux CCAs. Nous avons noté une différence significative dans les composants microbiens biliaires. Cela suggère qu'une dysbiose biliaire est associée au CCA et pourrait nous permettre de distinguer les deux sous types anatomiques des cancers de voies biliaires et rendre la distinction entre CCA et les situations non néoplasiques plus aisée. Nous suggérons

que certaines de ces bactéries pourraient être aussi impliquées dans le développement de CCA.

Désormais, de grandes séries de patients atteints de CCAe et CCAi doivent être étudiées pour caractériser en profondeur la dysbiose associée au cancer biliaire comme co-marqueur cancérogène et pronostique. De plus, le lien éventuel avec la méthylation des gènes de cellules hôtes méritent d'être intégré dans de telles études.

En 2003, Klump et ses collègues (340) ont analysé le CDKN2A (p16) et CDKN2A (p14) dans 21 et 23 échantillons de CCA, respectivement, et dans 32 échantillons provenant de patients atteints de troubles biliaires bénins. La méthylation de CDKN2A (p16) et CDKN2A (p14) avait respectivement une sensibilité de 52 % et 48 %, et une spécificité de 94 % et 97 %, (340).

Dans une autre étude, les niveaux de méthylation de l'ADN de 19 marqueurs ont été analysés dans la bile, montrant des sensibilités entre 3 et 93 % et des spécificités entre 14-100% de détection de CCA (341).

Enfin, en analysant 77 échantillons de CCA et 48 échantillons provenant de patients souffrant de troubles biliaires, Shin et al. ont signalé que la méthylation des marqueurs CCND2, CDH13, GRIN2B, RUNX3 et TWIST1 dans la bile avait une sensibilité de 76 % et une spécificité de 100 % pour le CCA (342).

Une source alternative et peu invasive pour la découverte de biomarqueurs est le sang. Cependant, comme pour la bile, peu d'études ont été réalisées sur les marqueurs de méthylation de l'ADN. La combinaison de l'hyperméthylation des promoteurs de SHOX2 et de SEPT9 dans le plasma de 20 patients atteints de CCA et de 100 témoins présentait une sensibilité de 45 % et une spécificité de 99 % pour les CCAs (343).

Dans notre deuxième étude deux gènes candidats SFN et WISP1 ont été identifiés et pourraient devenir le support d'un test sanguin dans le domaine des tumeurs de carrefour bilio-pancréatique. Une étude de notre laboratoire a permis, dans une démarche identique, la validation d'un test sanguin basé sur la mesure de méthylation d'un panel de gènes a pu ainsi être validé chez plus de 1000 patients (344).

En conclusion, nos résultats, illustrés à travers deux manuscrits indépendants, peuvent être mis en lien montrant une dysbiose biliaire dans le CCAe et des anomalies d'expression géniques via des troubles de méthylation. D'autres études sont alors nécessaires pour confirmer nos données dans une plus grande cohorte. Les gènes méthylés et le microbiote peuvent être considérés comme un point cible pour le diagnostic et les thérapies.

VI. Références

1. Bragazzi MC, Ridola L, Safarikia S, Matteo SD, Costantini D, Nevi L, et al. New insights into cholangiocarcinoma: multiple stems and related cell lineages of origin. *Ann Gastroenterol.* févr 2018;31(1):42-55.
2. Komuta M, Govaere O, Vandecaveye V, Akiba J, Van Steenberghe W, Verslype C, et al. Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. *Hepatology.* juin 2012;55(6):1876-88.
3. Banales JM, Cardinale V, Carpino G, Marzioni M, Andersen JB, Invernizzi P, et al. Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* mai 2016;13(5):261-80.
4. Rizvi S, Khan SA, Hallemeier CL, Kelley RK, Gores GJ. Cholangiocarcinoma - evolving concepts and therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol.* févr 2018;15(2):95-111.
5. Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, Llovet JM, Park J-W, Patel T, et al. Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol.* juin 2014;60(6):1268-89.
6. DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL, Kamangar F, Winter JM, Lillemoe KD, et al. Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann Surg.* mai 2007;245(5):755-62.
7. Nakeeb A, Pitt HA, Sohn TA, Coleman J, Abrams RA, Piantadosi S, et al. Cholangiocarcinoma. A spectrum of intrahepatic, perihilar, and distal tumors. *Ann Surg.* oct 1996;224(4):463-73; discussion 473-475.
8. Valle JW, Borbath I, Khan SA, Huguet F, Gruenberger T, Arnold D, et al. Biliary cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* sept 2016;27(suppl 5):v28-37.

9. Banales JM, Marin JJG, Lamarca A, Rodrigues PM, Khan SA, Roberts LR, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* sept 2020;17(9):557-88.
10. Strijker M, Belkouz A, van der Geest LG, van Gulik TM, van Hooft JE, de Meijer VE, et al. Treatment and survival of resected and unresected distal cholangiocarcinoma: a nationwide study. *Acta Oncol.* juill 2019;58(7):1048-55.
11. Bragazzi MC, Cardinale V, Carpino G, Venere R, Semeraro R, Gentile R, et al. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Translational Gastrointestinal Cancer.* mars 2012;1(1):212-32.
12. Bertuccio P, Malvezzi M, Carioli G, Hashim D, Boffetta P, El-Serag HB, et al. Global trends in mortality from intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol.* juill 2019;71(1):104-14.
13. Yao KJ, Jabbour S, Parekh N, Lin Y, Moss RA. Increasing mortality in the United States from cholangiocarcinoma: an analysis of the National Center for Health Statistics Database. *BMC Gastroenterol.* 21 sept 2016;16(1):117.
14. Khan SA, Tavolari S, Brandi G. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Liver Int.* mai 2019;39 Suppl 1:19-31.
15. Clements O, Eliahoo J, Kim JU, Taylor-Robinson SD, Khan SA. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* janv 2020;72(1):95-103.
16. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *Lancet.* 8 oct 2005;366(9493):1303-14.
17. Callea F, Sergi C, Fabbretti G, Brisigotti M, Cozzutto C, Medicina D. Precancerous lesions of the biliary tree. *J Surg Oncol Suppl.* 1993;3:131-3.
18. Welzel TM, Mellekjær L, Gloria G, Sakoda LC, Hsing AW, El Ghormli L, et al. Risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma in a low-risk population: a nationwide case-control study. *Int J Cancer.* 1 févr 2007;120(3):638-41.

19. Palmer WC, Patel T. Are common factors involved in the pathogenesis of primary liver cancers? A meta-analysis of risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol.* juill 2012;57(1):69-76.
20. Shaib YH, El-Serag HB, Davila JA, Morgan R, McGlynn KA. Risk factors of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a case-control study. *Gastroenterology.* mars 2005;128(3):620-6.
21. de Vries JS, de Vries S, Aronson DC, Bosman DK, Rauws E a. J, Bosma A, et al. Choledochal cysts: age of presentation, symptoms, and late complications related to Todani's classification. *J Pediatr Surg.* nov 2002;37(11):1568-73.
22. Chapman RW. Risk factors for biliary tract carcinogenesis. *Ann Oncol.* 1999;10 Suppl 4:308-11.
23. Petrick JL, Yang B, Altekruse SF, Van Dyke AL, Koshiol J, Graubard BI, et al. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: A population-based study in SEER-Medicare. *PLoS One.* 2017;12(10):e0186643.
24. Shin H-R, Oh J-K, Masuyer E, Curado M-P, Bouvard V, Fang Y-Y, et al. Epidemiology of cholangiocarcinoma: an update focusing on risk factors. *Cancer Sci.* mars 2010;101(3):579-85.
25. Jing W, Jin G, Zhou X, Zhou Y, Zhang Y, Shao C, et al. Diabetes mellitus and increased risk of cholangiocarcinoma: a meta-analysis. *Eur J Cancer Prev.* janv 2012;21(1):24-31.
26. Wongjarupong N, Assavapongpaiboon B, Susantitaphong P, Cheungpasitporn W, Treeprasertsuk S, Rerknimitr R, et al. Non-alcoholic fatty liver disease as a risk factor for cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* 8 déc 2017;17(1):149.
27. Alvaro D, Bragazzi MC, Benedetti A, Fabris L, Fava G, Invernizzi P, et al. Cholangiocarcinoma in Italy: A national survey on clinical characteristics, diagnostic modalities and treatment. Results from the « Cholangiocarcinoma » committee of the Italian Association for the Study of Liver disease. *Dig Liver Dis.* janv 2011;43(1):60-5.

28. Macias RIR, Banales JM, Sangro B, Muntané J, Avila MA, Lozano E, et al. The search for novel diagnostic and prognostic biomarkers in cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* avr 2018;1864(4 Pt B):1468-77.
29. Lazaridis KN, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology.* mai 2005;128(6):1655-67.
30. Wildner D, Bernatik T, Greis C, Seitz K, Neurath MF, Strobel D. CEUS in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocellular carcinoma in 320 patients - early or late washout matters: a subanalysis of the DEGUM multicenter trial. *Ultraschall Med.* avr 2015;36(2):132-9.
31. Charatchoenwitthaya P, Enders FB, Halling KC, Lindor KD. Utility of serum tumor markers, imaging, and biliary cytology for detecting cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology.* oct 2008;48(4):1106-17.
32. Levy C, Lymp J, Angulo P, Gores GJ, Larusso N, Lindor KD. The value of serum CA 19-9 in predicting cholangiocarcinomas in patients with primary sclerosing cholangitis. *Dig Dis Sci.* sept 2005;50(9):1734-40.
33. Patel AH, Harnois DM, Klee GG, LaRusso NF, Gores GJ. The utility of CA 19-9 in the diagnoses of cholangiocarcinoma in patients without primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol.* janv 2000;95(1):204-7.
34. Heimbach JK, Sanchez W, Rosen CB, Gores GJ. Trans-peritoneal fine needle aspiration biopsy of hilar cholangiocarcinoma is associated with disease dissemination. *HPB (Oxford).* mai 2011;13(5):356-60.
35. Shimada M, Sugimoto K, Iwahashi S, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, et al. CD133 expression is a potential prognostic indicator in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol.* août 2010;45(8):896-902.
36. Gardini A, Corti B, Fiorentino M, Altimari A, Ercolani G, Grazi GL, et al. Expression of connective tissue growth factor is a prognostic marker for patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Dig Liver Dis.* avr 2005;37(4):269-74.

37. Mao X, Chen D, Wu J, Li J, Zhou H, Wu Y, et al. Differential expression of fascin, E-cadherin and vimentin: Proteins associated with survival of cholangiocarcinoma patients. *Am J Med Sci.* oct 2013;346(4):261-8.
38. Gu MJ, Jang BI. Clinicopathologic significance of Sox2, CD44 and CD44v6 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Pathol Oncol Res.* juill 2014;20(3):655-60.
39. Hemming AW, Mekeel K, Khanna A, Baquerizo A, Kim RD. Portal vein resection in management of hilar cholangiocarcinoma. *J Am Coll Surg.* avr 2011;212(4):604-13; discussion 613-616.
40. Hong YK, Choi SB, Lee KH, Park SW, Park YN, Choi JS, et al. The efficacy of portal vein embolization prior to right extended hemihepatectomy for hilar cholangiocellular carcinoma: a retrospective cohort study. *Eur J Surg Oncol.* mars 2011;37(3):237-44.
41. Schnitzbauer AA, Lang SA, Goessmann H, Nadalin S, Baumgart J, Farkas SA, et al. Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended right hepatic resection in small-for-size settings. *Ann Surg.* mars 2012;255(3):405-14.
42. Tschuor C, Croome KP, Sergeant G, Cano V, Schadde E, Ardiles V, et al. Salvage parenchymal liver transection for patients with insufficient volume increase after portal vein occlusion -- an extension of the ALPPS approach. *Eur J Surg Oncol.* nov 2013;39(11):1230-5.
43. Rosen CB, Heimbach JK, Gores GJ. Liver transplantation for cholangiocarcinoma. *Transpl Int.* juill 2010;23(7):692-7.
44. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthony A, Maraveyas A, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med.* 8 avr 2010;362(14):1273-81.
45. Martin-Liberal J, Ochoa de Olza M, Hierro C, Gros A, Rodon J, Tabernero J. The expanding role of immunotherapy. *Cancer Treat Rev.* mars 2017;54:74-86.

46. Feldman SA, Assadipour Y, Kriley I, Goff SL, Rosenberg SA. Adoptive Cell Therapy--Tumor-Infiltrating Lymphocytes, T-Cell Receptors, and Chimeric Antigen Receptors. *Semin Oncol.* août 2015;42(4):626-39.
47. Crane CH, Koay EJ. Solutions that enable ablative radiotherapy for large liver tumors: Fractionated dose painting, simultaneous integrated protection, motion management, and computed tomography image guidance. *Cancer.* 1 juill 2016;122(13):1974-86.
48. Kavanagh BD, Pan CC, Dawson LA, Das SK, Li XA, Ten Haken RK, et al. Radiation dose-volume effects in the stomach and small bowel. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 mars 2010;76(3 Suppl):S101-107.
49. Pan CC, Kavanagh BD, Dawson LA, Li XA, Das SK, Miften M, et al. Radiation-associated liver injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 mars 2010;76(3 Suppl):S94-100.
50. Patel S, Ragab O, Kamrava M. Another solution that enables ablative radiotherapy for large liver tumors: Percutaneous interstitial high-dose rate brachytherapy. *Cancer.* 1 sept 2016;122(17):2766.
51. Mukewar S, Gupta A, Baron TH, Gores G, Furutani K, Haddock MG, et al. Endoscopically inserted nasobiliary catheters for high dose-rate brachytherapy as part of neoadjuvant therapy for perihilar cholangiocarcinoma. *Endoscopy.* oct 2015;47(10):878-83.
52. Tabrizian P, Jibara G, Hechtman JF, Franssen B, Labow DM, Schwartz ME, et al. Outcomes following resection of intrahepatic cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford).* avr 2015;17(4):344-51.
53. Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut.* déc 2012;61(12):1657-69.
54. Microbiote intestinal (flore intestinale) [Internet]. Inserm - La science pour la santé. [cité 18 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/microbiote-intestinal-flore-intestinale>

55. Huse SM, Ye Y, Zhou Y, Fodor AA. A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. *PLoS One*. 2012;7(6):e34242.
56. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*. juin 2004;4(6):478-85.
57. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*. 13 sept 2012;489(7415):231-41.
58. Le Lay, Christophe. 2015. « Lactococcus lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis UL719 et la nisine : une nouvelle approche dans le traitement des infections à Clostridium difficile ». Disponible sur : <https://corpus.ulaval.ca/jspui/handle/20.500.11794/26552>.
59. Barbut F, Joly F. Le microbiote intestinal : équilibre et dysbiose. *Hépatogastro & Oncologie Digestive*. 1 nov 2010;17(6):511-20.
60. Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 9 mai 2012;486(7402):222-7.
61. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol*. nov 1999;65(11):4799-807.
62. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol*. juin 2012;13(6):607-15.
63. Sears CL, Garrett WS. Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host Microbe*. 12 mars 2014;15(3):317-28.
64. Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol*. oct 2014;12(10):661-72.
65. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer*. nov 2013;13(11):800-12.

66. Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer*. nov 2013;13(11):759-71.
67. Irrazábal T, Belcheva A, Girardin SE, Martin A, Philpott DJ. The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer. *Mol Cell*. 24 avr 2014;54(2):309-20.
68. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 21 déc 2011;480(7378):480-9.
69. Kallmeyer J, Pockalny R, Adhikari RR, Smith DC, D'Hondt S. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2 oct 2012;109(40):16213-6.
70. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 24 févr 1956;123(3191):309-14.
71. Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov*. 31 août 2011;10(9):671-84.
72. Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, et al. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One*. 27 janv 2011;6(1):e16393.
73. Doorackers E, Lagergren J, Engstrand L, Brusselaers N. Eradication of *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis of Cohort Studies. *J Natl Cancer Inst*. sept 2016;108(9).
74. Maldonado-Contreras A, Goldfarb KC, Godoy-Vitorino F, Karaoz U, Contreras M, Blaser MJ, et al. Structure of the human gastric bacterial community in relation to *Helicobacter pylori* status. *ISME J*. avr 2011;5(4):574-9.
75. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 janv 2006;103(3):732-7.
76. Iizasa H, Ishihara S, Richardo T, Kanehiro Y, Yoshiyama H. Dysbiotic infection in the stomach. *World J Gastroenterol*. 28 oct 2015;21(40):11450-7.

77. Wang J, Zhao L, Yan H, Che J, Huihui L, Jun W, et al. A Meta-Analysis and Systematic Review on the Association between Human Papillomavirus (Types 16 and 18) Infection and Esophageal Cancer Worldwide. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159140.
78. Aviles-Jimenez F, Vazquez-Jimenez F, Medrano-Guzman R, Mantilla A, Torres J. Stomach microbiota composition varies between patients with non-atrophic gastritis and patients with intestinal type of gastric cancer. *Sci Rep*. 26 févr 2014;4:4202.
79. Dias-Jácome E, Libânio D, Borges-Canha M, Galaghar A, Pimentel-Nunes P. Gastric microbiota and carcinogenesis: the role of non-*Helicobacter pylori* bacteria - A systematic review. *Rev Esp Enferm Dig*. sept 2016;108(9):530-40.
80. Nasrollahzadeh D, Malekzadeh R, Ploner A, Shakeri R, Sotoudeh M, Fahimi S, et al. Variations of gastric corpus microbiota are associated with early esophageal squamous cell carcinoma and squamous dysplasia. *Sci Rep*. 6 mars 2015;5:8820.
81. Xu W, Liu Z, Bao Q, Qian Z. Viruses, Other Pathogenic Microorganisms and Esophageal Cancer. *Gastrointest Tumors*. mai 2015;2(1):2-13.
82. Patel T, Bhattacharya P, Das S. Gut microbiota: an Indicator to Gastrointestinal Tract Diseases. *J Gastrointest Cancer*. sept 2016;47(3):232-8.
83. Ohtani N. Microbiome and cancer. *Semin Immunopathol*. janv 2015;37(1):65-72.
84. Yu J, Marsh S, Hu J, Feng W, Wu C. The Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Genetic Background. *Gastroenterol Res Pract*. 2016;2016:2862173.
85. Aqel B, DiBaise JK. Role of the Gut Microbiome in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nutr Clin Pract*. déc 2015;30(6):780-6.
86. Grąt M, Wronka KM, Krasnodębski M, Masior Ł, Lewandowski Z, Kosińska I, et al. Profile of Gut Microbiota Associated With the Presence of Hepatocellular Cancer in Patients With Liver Cirrhosis. *Transplant Proc*. juin 2016;48(5):1687-91.

87. Wang C, Li J. Pathogenic Microorganisms and Pancreatic Cancer. *Gastrointest Tumors*. mai 2015;2(1):41-7.
88. Michaud DS, Izard J. Microbiota, oral microbiome, and pancreatic cancer. *Cancer J*. juin 2014;20(3):203-6.
89. Zambirinis CP, Pushalkar S, Saxena D, Miller G. Pancreatic cancer, inflammation, and microbiome. *Cancer J*. juin 2014;20(3):195-202.
90. Gollwitzer ES, Saglani S, Trompette A, Yadava K, Sherburn R, McCoy KD, et al. Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nat Med*. juin 2014;20(6):642-7.
91. O'Dwyer DN, Dickson RP, Moore BB. The Lung Microbiome, Immunity, and the Pathogenesis of Chronic Lung Disease. *J Immunol*. 15 juin 2016;196(12):4839-47.
92. Yan X, Yang M, Liu J, Gao R, Hu J, Li J, et al. Discovery and validation of potential bacterial biomarkers for lung cancer. *Am J Cancer Res*. 2015;5(10):3111-22.
93. Liu H-X, Tao L-L, Zhang J, Zhu Y-G, Zheng Y, Liu D, et al. Difference of lower airway microbiome in bilateral protected specimen brush between lung cancer patients with unilateral lobar masses and control subjects. *Int J Cancer*. 15 févr 2018;142(4):769-78.
94. Bard J-M, Luu HT, Dravet F, Michel C, Moyon T, Pagniez A, et al. Relationship Between Intestinal Microbiota and Clinical Characteristics of Patients with Early Stage Breast Cancer. *The FASEB Journal*. 2015;29(S1):914.2.
95. Luu TH, Michel C, Bard J-M, Dravet F, Nazih H, Bobin-Dubigeon C. Intestinal Proportion of *Blautia* sp. is Associated with Clinical Stage and Histoprognostic Grade in Patients with Early-Stage Breast Cancer. *Nutr Cancer*. mars 2017;69(2):267-75.
96. Strazzabosco M, Fabris L. Functional anatomy of normal bile ducts. *Anat Rec (Hoboken)*. juin 2008;291(6):653-60.
97. Boyer JL. Bile formation and secretion. *Compr Physiol*. juill 2013;3(3):1035-78.

98. Nicolaou M, Andress EJ, Zolnerciks JK, Dixon PH, Williamson C, Linton KJ. Canalicular ABC transporters and liver disease. *J Pathol.* janv 2012;226(2):300-15.
99. Anderson JM, Van Itallie CM. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol.* oct 1995;269(4 Pt 1):G467-475.
100. Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology.* juin 2004;39(6):1739-45.
101. Ludwig J. New concepts in biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis.* nov 1987;7(4):293-301.
102. Housset C, Chrétien Y, Debray D, Chignard N. Functions of the Gallbladder. *Compr Physiol.* 13 juin 2016;6(3):1549-77.
103. Prajapati DN, Hogan WJ. Sphincter of Oddi dysfunction and other functional biliary disorders: evaluation and treatment. *Gastroenterol Clin North Am.* juin 2003;32(2):601-18.
104. Alpini G, McGill JM, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Hepatology.* mai 2002;35(5):1256-68.
105. Begley M, Gahan CGM, Hill C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev.* sept 2005;29(4):625-51.
106. Monte MJ, Marin JJG, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol.* 21 févr 2009;15(7):804-16.
107. Wells JE, Williams KB, Whitehead TR, Heuman DM, Hylemon PB. Development and application of a polymerase chain reaction assay for the detection and enumeration of bile acid 7 α -dehydroxylating bacteria in human feces. *Clin Chim Acta.* mai 2003;331(1-2):127-34.
108. Hofmann AF. Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol Sci.* févr 1999;14:24-9.

109. Elkins CA, Moser SA, Savage DC. Genes encoding bile salt hydrolases and conjugated bile salt transporters in *Lactobacillus johnsonii* 100-100 and other *Lactobacillus* species. *Microbiology (Reading)*. déc 2001;147(Pt 12):3403-12.
110. Ren J, Sun K, Wu Z, Yao J, Guo B. All 4 bile salt hydrolase proteins are responsible for the hydrolysis activity in *Lactobacillus plantarum* ST-III. *J Food Sci*. déc 2011;76(9):M622-628.
111. Chae JP, Valeriano VD, Kim G-B, Kang D-K. Molecular cloning, characterization and comparison of bile salt hydrolases from *Lactobacillus johnsonii* PF01. *J Appl Microbiol*. janv 2013;114(1):121-33.
112. Xiang-Chao Gu, Xue-Gang Luo, Chong-Xi Wang, De-Yun Ma, Ying-Ying He, Wen Li, Hao Zhou, Tong-Cun Zhang. Cloning and analysis of bile salt hydrolase genes from *Lactobacillus plantarum* CGMCC No. 8198. *Biotechnol Lett*. May 2014; 36(5): 875-83.
113. Jayashree S, Pooja S, Pushpanathan M, Rajendhran J, Gunasekaran P. Identification and characterization of bile salt hydrolase genes from the genome of *Lactobacillus fermentum* MTCC 8711. *Appl Biochem Biotechnol*. sept 2014;174(2):855-66.
114. Franz CM, Specht I, Haberer P, Holzapfel WH. Bile salt hydrolase activity of Enterococci isolated from food: screening and quantitative determination. *J Food Prot*. mai 2001;64(5):725-9.
115. Wijaya A, Hermann A, Abriouel H, Specht I, Yousif NMK, Holzapfel WH, et al. Cloning of the bile salt hydrolase (bsh) gene from *Enterococcus faecium* FAIR-E 345 and chromosomal location of bsh genes in food enterococci. *J Food Prot*. déc 2004;67(12):2772-8.
116. Grill J, Schneider F, Crociani J, Ballongue J. Purification and Characterization of Conjugated Bile Salt Hydrolase from *Bifidobacterium longum* BB536. *Appl Environ Microbiol*. juill 1995;61(7):2577-82.
117. Kim G-B, Yi S-H, Lee BH. Purification and characterization of three different types of bile salt hydrolases from *Bifidobacterium* strains. *J Dairy Sci*. févr 2004;87(2):258-66.

118. Tanaka H, Hashiba H, Kok J, Mierau I. Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*-biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol.* juin 2000;66(6):2502-12.
119. Rossocha M, Schultz-Heienbrok R, von Moeller H, Coleman JP, Saenger W. Conjugated bile acid hydrolase is a tetrameric N-terminal thiol hydrolase with specific recognition of its cholyl but not of its tauryl product. *Biochemistry.* 19 avr 2005;44(15):5739-48.
120. Jones BV, Begley M, Hill C, Gahan CGM, Marchesi JR. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9 sept 2008;105(36):13580-5.
121. Urdaneta V, Casadesús J. Interactions between Bacteria and Bile Salts in the Gastrointestinal and Hepatobiliary Tracts. *Front Med (Lausanne).* 2017;4:163.
122. Carulli N, Bertolotti M, Carubbi F, Concari M, Martella P, Carulli L, et al. Review article: effect of bile salt pool composition on hepatic and biliary functions. *Aliment Pharmacol Ther.* mai 2000;14 Suppl 2:14-8.
123. Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature.* 26 janv 2006;439(7075):484-9.
124. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, et al. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab.* sept 2009;10(3):167-77.
125. Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorakova K, Garewal H. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat Res.* janv 2005;589(1):47-65.
126. Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorak K. Bile acids as endogenous etiologic agents in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol.* 21 juill 2009;15(27):3329-40.
127. Duboc H, Rajca S, Rainteau D, Benarous D, Maubert M-A, Quervain E, et al. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut.* avr 2013;62(4):531-9.

128. Li Y, Tang R, Leung PSC, Gershwin ME, Ma X. Bile acids and intestinal microbiota in autoimmune cholestatic liver diseases. *Autoimmun Rev.* sept 2017;16(9):885-96.
129. Schubert K, Olde Damink SWM, von Bergen M, Schaap FG. Interactions between bile salts, gut microbiota, and hepatic innate immunity. *Immunol Rev.* sept 2017;279(1):23-35.
130. Högenauer K, Arista L, Schmiedeberg N, Werner G, Jaksche H, Bouhelal R, et al. G-protein-coupled bile acid receptor 1 (GPBAR1, TGR5) agonists reduce the production of proinflammatory cytokines and stabilize the alternative macrophage phenotype. *J Med Chem.* 26 déc 2014;57(24):10343-54.
131. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* juill 2006;7(7):688-93.
132. Pazzi P, Puviani AC, Dalla Libera M, Guerra G, Ricci D, Gullini S, et al. Bile salt-induced cytotoxicity and ursodeoxycholate cytoprotection: in-vitro study in perfused rat hepatocytes. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* juill 1997;9(7):703-9.
133. Albalak A, Zeidel ML, Zucker SD, Jackson AA, Donovan JM. Effects of submicellar bile salt concentrations on biological membrane permeability to low molecular weight non-ionic solutes. *Biochemistry.* 18 juin 1996;35(24):7936-45.
134. Coleman R, Lowe PJ, Billington D. Membrane lipid composition and susceptibility to bile salt damage. *Biochim Biophys Acta.* 20 juin 1980;599(1):294-300.
135. Bernstein H, Payne CM, Bernstein C, Schneider J, Beard SE, Crowley CL. Activation of the promoters of genes associated with DNA damage, oxidative stress, ER stress and protein malfolding by the bile salt, deoxycholate. *Toxicol Lett.* 30 juill 1999;108(1):37-46.
136. Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Beard SE, Schneider J. Bile salt activation of stress response promoters in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol.* août 1999;39(2):68-72.
137. De Smet I, Van Hoorde L, Vande Woestyne M, Christiaens H, Verstraete W. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *J Appl Bacteriol.* sept 1995;79(3):292-301.

138. Sutherland DB, Suzuki K, Fagarasan S. Fostering of advanced mutualism with gut microbiota by Immunoglobulin A. *Immunol Rev.* mars 2016;270(1):20-31.
139. Richter L, Hesselbarth N, Eitner K, Schubert K, Bosseckert H, Krell H. Increased biliary secretion of cysteinyl-leukotrienes in human bile duct obstruction. *J Hepatol.* nov 1996;25(5):725-32.
140. Rosen HR, Winkle PJ, Kendall BJ, Diehl DL. Biliary interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in patients undergoing endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Dig Dis Sci.* juin 1997;42(6):1290-4.
141. Inagaki T, Moschetta A, Lee Y-K, Peng L, Zhao G, Downes M, et al. Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 mars 2006;103(10):3920-5.
142. Nielsen ML, Justesen T. Anaerobic and aerobic bacteriological studies in biliary tract disease. *Scand J Gastroenterol.* 1976;11(5):437-46.
143. Scott AJ. Bacteria and disease of the biliary tract. *Gut.* juin 1971;12(6):487-92.
144. Edlund YA, Mollstedt BO, Ouchterlony O. Bacteriological investigation of the biliary system and liver in biliary tract disease correlated to clinical data and microstructure of the gallbladder and liver. *Acta Chir Scand.* 15 mai 1959;116(5-6):461-76.
145. Csendes A, Fernandez M, Uribe P. Bacteriology of the gallbladder bile in normal subjects. *Am J Surg.* juin 1975;129(6):629-31.
146. Swidsinski A, Ludwig W, Pahlig H, Priem F. Molecular genetic evidence of bacterial colonization of cholesterol gallstones. *Gastroenterology.* mars 1995;108(3):860-4.
147. Sung JY, Costerton JW, Shaffer EA. Defense system in the biliary tract against bacterial infection. *Dig Dis Sci.* mai 1992;37(5):689-96.
148. Chen X-M, O'Hara SP, Nelson JB, Splinter PL, Small AJ, Tietz PS, et al. Multiple TLRs are expressed in human cholangiocytes and mediate host epithelial defense responses to

- Cryptosporidium parvum via activation of NF-kappaB. J Immunol. 1 déc 2005;175(11):7447-56.
149. Yokoyama T, Komori A, Nakamura M, Takii Y, Kamihira T, Shimoda S, et al. Human intrahepatic biliary epithelial cells function in innate immunity by producing IL-6 and IL-8 via the TLR4-NF-kappaB and -MAPK signaling pathways. Liver Int. mai 2006;26(4):467-76.
 150. Harada K, Ohba K, Ozaki S, Isse K, Hirayama T, Wada A, et al. Peptide antibiotic human beta-defensin-1 and -2 contribute to antimicrobial defense of the intrahepatic biliary tree. Hepatology. oct 2004;40(4):925-32.
 151. van Velkinburgh JC, Gunn JS. PhoP-PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in Salmonella spp. Infect Immun. avr 1999;67(4):1614-22.
 152. Brook I. Aerobic and anaerobic microbiology of biliary tract disease. J Clin Microbiol. oct 1989;27(10):2373-5.
 153. de Martel C, Plummer M, Parsonnet J, van Doorn L-J, Franceschi S. Helicobacter species in cancers of the gallbladder and extrahepatic biliary tract. Br J Cancer. 13 janv 2009;100(1):194-9.
 154. Hardy J, Francis KP, DeBoer M, Chu P, Gibbs K, Contag CH. Extracellular replication of Listeria monocytogenes in the murine gall bladder. Science. 6 févr 2004;303(5659):851-3.
 155. Flores C, Maguilnik I, Hadlich E, Goldani LZ. Microbiology of choledochal bile in patients with choledocholithiasis admitted to a tertiary hospital. J Gastroenterol Hepatol. mars 2003;18(3):333-6.
 156. Sakaguchi Y, Murata K, Kimura M. Clostridium perfringens and other anaerobes isolated from bile. J Clin Pathol. mars 1983;36(3):345-9.
 157. Liang T-B, Liu Y, Bai X-L, Yu J, Chen W. Sphincter of Oddi laxity: an important factor in hepatolithiasis. World J Gastroenterol. 28 févr 2010;16(8):1014-8.

158. Flemma RJ, Flint LM, Osterhout S, Shingleton WW. Bacteriologic studies of biliary tract infection. *Ann Surg.* oct 1967;166(4):563-72.
159. Goldman LD, Steer ML, Silen W. Recurrent cholangitis after biliary surgery. *Am J Surg.* avr 1983;145(4):450-4.
160. Kardon RH, Kessel RG. Three-dimensional organization of the hepatic microcirculation in the rodent as observed by scanning electron microscopy of corrosion casts. *Gastroenterology.* juill 1980;79(1):72-81.
161. Nath G, Gulati AK, Shukla VK. Role of bacteria in carcinogenesis, with special reference to carcinoma of the gallbladder. *World J Gastroenterol.* 21 nov 2010;16(43):5395-404.
162. Schatten WE, Desprez JD, Holden WD. A bacteriologic study of portal-vein blood in man. *AMA Arch Surg.* sept 1955;71(3):404-9.
163. Sung JY, Shaffer EA, Olson ME, Leung JW, Lam K, Costerton JW. Bacterial invasion of the biliary system by way of the portal-venous system. *Hepatology.* août 1991;14(2):313-7.
164. Nicoletti A, Ponziani FR, Biolato M, Valenza V, Marrone G, Sganga G, et al. Intestinal permeability in the pathogenesis of liver damage: From non-alcoholic fatty liver disease to liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 7 sept 2019;25(33):4814-34.
165. Chen C, Song X, Wei W, Zhong H, Dai J, Lan Z, et al. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat Commun.* 17 oct 2017;8(1):875.
166. Wu P, Zhang G, Zhao J, Chen J, Chen Y, Huang W, et al. Profiling the Urinary Microbiota in Male Patients With Bladder Cancer in China. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:167.
167. Wu T, Zhang Z, Liu B, Hou D, Liang Y, Zhang J, et al. Gut microbiota dysbiosis and bacterial community assembly associated with cholesterol gallstones in large-scale study. *BMC Genomics.* 1 oct 2013;14:669.
168. Jiménez E, Sánchez B, Farina A, Margolles A, Rodríguez JM. Characterization of the bile and gall bladder microbiota of healthy pigs. *Microbiologyopen.* déc 2014;3(6):937-49.

169. Verdier J, Luedde T, Sellge G. Biliary Mucosal Barrier and Microbiome. *Viszeralmedizin*. juin 2015;31(3):156-61.
170. Plieskatt JL, Deenonpoe R, Mulvenna JP, Krause L, Sripa B, Bethony JM, et al. Infection with the carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* modifies intestinal and biliary microbiome. *FASEB J*. nov 2013;27(11):4572-84.
171. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*. oct 2014;14(10):667-85.
172. Molinero N, Ruiz L, Milani C, Gutiérrez-Díaz I, Sánchez B, Mangifesta M, et al. The human gallbladder microbiome is related to the physiological state and the biliary metabolic profile. *Microbiome*. 4 juill 2019;7(1):100.
173. Saltykova IV, Petrov VA, Logacheva MD, Ivanova PG, Merzlikin NV, Sazonov AE, et al. Biliary Microbiota, Gallstone Disease and Infection with *Opisthorchis felinus*. *PLoS Negl Trop Dis*. juill 2016;10(7):e0004809.
174. Ye F, Shen H, Li Z, Meng F, Li L, Yang J, et al. Influence of the Biliary System on Biliary Bacteria Revealed by Bacterial Communities of the Human Biliary and Upper Digestive Tracts. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150519.
175. Nardone G, Compare D, Rocco A. A microbiota-centric view of diseases of the upper gastrointestinal tract. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. avr 2017;2(4):298-312.
176. Hiramatsu K, Harada K, Tsuneyama K, Sasaki M, Fujita S, Hashimoto T, et al. Amplification and sequence analysis of partial bacterial 16S ribosomal RNA gene in gallbladder bile from patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. juill 2000;33(1):9-18.
177. Pereira P, Aho V, Arola J, Boyd S, Jokelainen K, Paulin L, et al. Bile microbiota in primary sclerosing cholangitis: Impact on disease progression and development of biliary dysplasia. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182924.
178. Avilés-Jiménez F, Guitron A, Segura-López F, Méndez-Tenorio A, Iwai S, Hernández-Guerrero A, et al. Microbiota studies in the bile duct strongly suggest a role for

- Helicobacter pylori* in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Microbiol Infect.* févr 2016;22(2):178.e11-178.e22.
179. Wu X-T, Xiao L-J, Li X-Q, Li J-S. Detection of bacterial DNA from cholesterol gallstones by nested primers polymerase chain reaction. *World J Gastroenterol.* juin 1998;4(3):234-7.
 180. Swidsinski A, Khilkin M, Pahlig H, Swidsinski S, Priem F. Time dependent changes in the concentration and type of bacterial sequences found in cholesterol gallstones. *Hepatology.* mars 1998;27(3):662-5.
 181. Lee DK, Tarr PI, Haigh WG, Lee SP. Bacterial DNA in mixed cholesterol gallstones. *Am J Gastroenterol.* déc 1999;94(12):3502-6.
 182. Shen H, Ye F, Xie L, Yang J, Li Z, Xu P, et al. Metagenomic sequencing of bile from gallstone patients to identify different microbial community patterns and novel biliary bacteria. *Sci Rep.* 2 déc 2015;5:17450.
 183. Gutiérrez-Díaz I, Molinero N, Cabrera A, Rodríguez JI, Margolles A, Delgado S, et al. Diet: Cause or Consequence of the Microbial Profile of Cholelithiasis Disease? *Nutrients.* 14 sept 2018;10(9).
 184. Kose SH, Grice K, Orsi WD, Ballal M, Coolen MJL. Metagenomics of pigmented and cholesterol gallstones: the putative role of bacteria. *Sci Rep.* 25 juill 2018;8(1):11218.
 185. Folseraas T, Melum E, Rausch P, Juran BD, Ellinghaus E, Shiryayev A, et al. Extended analysis of a genome-wide association study in primary sclerosing cholangitis detects multiple novel risk loci. *J Hepatol.* août 2012;57(2):366-75.
 186. Chng KR, Chan SH, Ng AHQ, Li C, Jusakul A, Bertrand D, et al. Tissue Microbiome Profiling Identifies an Enrichment of Specific Enteric Bacteria in *Opisthorchis viverrini* Associated Cholangiocarcinoma. *EBioMedicine.* juin 2016;8:195-202.
 187. Scheufele F, Aichinger L, Jäger C, Demir IE, Schorn S, Sargut M, et al. Effect of preoperative biliary drainage on bacterial flora in bile of patients with periampullary cancer. *Br J Surg.* janv 2017;104(2):e182-8.

188. Tsuchiya Y, Loza E, Villa-Gomez G, Trujillo CC, Baez S, Asai T, et al. Metagenomics of Microbial Communities in Gallbladder Bile from Patients with Gallbladder Cancer or Cholelithiasis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 25 avr 2018;19(4):961-7.
189. Chen B, Fu SW, Lu L, Zhao H. A Preliminary Study of Biliary Microbiota in Patients with Bile Duct Stones or Distal Cholangiocarcinoma. *Biomed Res Int.* 2019;2019:1092563.
190. Liu J, Yan Q, Luo F, Shang D, Wu D, Zhang H, et al. Acute cholecystitis associated with infection of Enterobacteriaceae from gut microbiota. *Clin Microbiol Infect.* sept 2015;21(9):851.e1-9.
191. Yun SP, Seo H-I. Clinical aspects of bile culture in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy. *Medicine (Baltimore).* juin 2018;97(26):e11234.
192. Liang T, Su W, Zhang Q, Li G, Gao S, Lou J, et al. Roles of Sphincter of Oddi Laxity in Bile Duct Microenvironment in Patients with Cholangiolithiasis: From the Perspective of the Microbiome and Metabolome. *J Am Coll Surg.* mars 2016;222(3):269-280.e10.
193. Itthitaetrakool U, Pinlaor P, Pinlaor S, Chomvarin C, Dangtakot R, Chaidee A, et al. Chronic *Opisthorchis viverrini* Infection Changes the Liver Microbiome and Promotes *Helicobacter* Growth. *PLoS One.* 2016;11(11):e0165798.
194. Vaishnavi C, Samanta J, Kochhar R. Characterization of biofilms in biliary stents and potential factors involved in occlusion. *World J Gastroenterol.* 7 janv 2018;24(1):112-23.
195. Kabar I, Hüsing A, Cicinnati VR, Heitschmidt L, Beckebaum S, Thölking G, et al. Analysis of bile colonization and intestinal flora may improve management in liver transplant recipients undergoing ERCP. *Ann Transplant.* 4 mai 2015;20:249-55.
196. Liu Y, Jia J-D, Sun L-Y, Zhu Z-J, Zhang J-R, Wei L, et al. Characteristics of bile microbiota in liver transplant recipients with biliary injury. *Int J Clin Exp Pathol.* 2018;11(2):481-9.
197. Toraño EG, García MG, Fernández-Morera JL, Niño-García P, Fernández AF. The Impact of External Factors on the Epigenome: In Utero and over Lifetime. *Biomed Res Int.* 2016;2016:2568635.

198. Chen Z, Zhang Y. Role of Mammalian DNA Methyltransferases in Development. *Annu Rev Biochem.* 20 juin 2020;89:135-58.
199. Epsztejn-Litman S, Feldman N, Abu-Remaileh M, Shufaro Y, Gerson A, Ueda J, et al. De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. *Nat Struct Mol Biol.* nov 2008;15(11):1176-83.
200. Feldman N, Gerson A, Fang J, Li E, Zhang Y, Shinkai Y, et al. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat Cell Biol.* févr 2006;8(2):188-94.
201. Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet.* sept 2017;18(9):517-34.
202. Cogné M. Activation-induced deaminase in B lymphocyte maturation and beyond. *Biomed J.* déc 2013;36(6):259-68.
203. Dominguez PM, Shaknovich R. Epigenetic function of activation-induced cytidine deaminase and its link to lymphomagenesis. *Front Immunol.* 2014;5:642.
204. Orlanski S, Labi V, Reizel Y, Spiro A, Lichtenstein M, Levin-Klein R, et al. Tissue-specific DNA demethylation is required for proper B-cell differentiation and function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 mai 2016;113(18):5018-23.
205. Lu F, Liu Y, Jiang L, Yamaguchi S, Zhang Y. Role of Tet proteins in enhancer activity and telomere elongation. *Genes Dev.* 1 oct 2014;28(19):2103-19.
206. Yang X, Han H, De Carvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell.* 13 oct 2014;26(4):577-90.
207. Breiling A, Lyko F. Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. *Epigenetics Chromatin.* 2015;8:24.
208. Shi D-Q, Ali I, Tang J, Yang W-C. New Insights into 5hmC DNA Modification: Generation, Distribution and Function. *Front Genet.* 2017;8:100.

209. Liang G, Weisenberger DJ. DNA methylation aberrancies as a guide for surveillance and treatment of human cancers. *Epigenetics*. 3 juin 2017;12(6):416-32.
210. Zhang W, Xu J. DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. *Biomark Res*. 2017;5:1.
211. Rasmussen KD, Helin K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev*. 1 avr 2016;30(7):733-50.
212. Gurard-Levin ZA, Almouzni G. Histone modifications and a choice of variant: a language that helps the genome express itself. *F1000Prime Rep*. 2014;6:76.
213. Henikoff S, Smith MM. Histone variants and epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 5 janv 2015;7(1):a019364.
214. Buschbeck M, Hake SB. Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mai 2017;18(5):299-314.
215. Zhao Y, Garcia BA. Comprehensive Catalog of Currently Documented Histone Modifications. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1 sept 2015;7(9):a025064.
216. Zhang X, Huang Y, Shi X. Emerging roles of lysine methylation on non-histone proteins. *Cell Mol Life Sci*. nov 2015;72(22):4257-72.
217. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 6 janv 2000;403(6765):41-5.
218. Prakash K, Fournier D. Evidence for the implication of the histone code in building the genome structure. *Biosystems*. févr 2018;164:49-59.
219. Cayrou C, Ballester B, Peiffer I, Fenouil R, Coulombe P, Andrau J-C, et al. The chromatin environment shapes DNA replication origin organization and defines origin classes. *Genome Res*. déc 2015;25(12):1873-85.
220. Ebert MS, Sharp PA. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*. 27 avr 2012;149(3):515-24.

221. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 23 févr 2007;128(4):635-8.
222. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 4 mars 2011;144(5):646-74.
223. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2016;1:15004.
224. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. *Mol Oncol*. déc 2012;6(6):567-78.
225. Ramassone A, Pagotto S, Veronese A, Visone R. Epigenetics and MicroRNAs in Cancer. *Int J Mol Sci*. 3 févr 2018;19(2).
226. Abdolmaleky HM, Zhou J-R, Thiagalingam S, Smith CL. Epigenetic and pharmacoepigenomic studies of major psychoses and potentials for therapeutics. *Pharmacogenomics*. déc 2008;9(12):1809-23.
227. Kim Y-I. Nutritional epigenetics: impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility. *J Nutr*. nov 2005;135(11):2703-9.
228. Lu H, Liu X, Deng Y, Qing H. DNA methylation, a hand behind neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci*. 5 déc 2013;5:85.
229. Ling C, Groop L. Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes*. déc 2009;58(12):2718-25.
230. Lu C, Thompson CB. Metabolic regulation of epigenetics. *Cell Metab*. 3 juill 2012;16(1):9-17.
231. Ardekani AM, Naeini MM. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *Avicenna J Med Biotechnol*. oct 2010;2(4):161-79.
232. Moosavi A, Motevalizadeh Ardekani A. Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases. *Iran Biomed J*. nov 2016;20(5):246-58.

233. Monks SA, Leonardson A, Zhu H, Cundiff P, Pietrusiak P, Edwards S, et al. Genetic inheritance of gene expression in human cell lines. *Am J Hum Genet.* déc 2004;75(6):1094-105.
234. Boks MP, Derks EM, Weisenberger DJ, Strengman E, Janson E, Sommer IE, et al. The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. *PLoS One.* 26 août 2009;4(8):e6767.
235. Bali P, Im H-I, Kenny PJ. Methylation, memory and addiction. *Epigenetics.* juin 2011;6(6):671-4.
236. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013;14(10):R115.
237. Gidekel S, Bergman Y. A unique developmental pattern of Oct-3/4 DNA methylation is controlled by a cis-demodification element. *J Biol Chem.* 13 sept 2002;277(37):34521-30.
238. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, et al. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell.* 24 janv 2013;49(2):359-67.
239. Levine ME, Lu AT, Quach A, Chen BH, Assimes TL, Bandinelli S, et al. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging (Albany NY).* 18 avr 2018;10(4):573-91.
240. Murabito JM, Rong J, Lunetta KL, Huan T, Lin H, Zhao Q, et al. Cross-sectional relations of whole-blood miRNA expression levels and hand grip strength in a community sample. *Aging Cell.* août 2017;16(4):888-94.
241. Mills JA, Beach SRH, Dogan M, Simons RL, Gibbons FX, Long JD, et al. A Direct Comparison of the Relationship of Epigenetic Aging and Epigenetic Substance Consumption Markers to Mortality in the Framingham Heart Study. *Genes (Basel).* 15 janv 2019;10(1).

242. Philibert RA, Dogan MV, Mills JA, Long JD. AHRR Methylation is a Significant Predictor of Mortality Risk in Framingham Heart Study. *J Insur Med.* 2019;48(1):79-89.
243. Dhingra R, Nwanaji-Enwerem JC, Samet M, Ward-Caviness CK. DNA Methylation Age-Environmental Influences, Health Impacts, and Its Role in Environmental Epidemiology. *Curr Environ Health Rep.* sept 2018;5(3):317-27.
244. Dugué P-A, Bassett JK, Joo JE, Jung C-H, Ming Wong E, Moreno-Betancur M, et al. DNA methylation-based biological aging and cancer risk and survival: Pooled analysis of seven prospective studies. *Int J Cancer.* 15 avr 2018;142(8):1611-9.
245. Zheng Y, Joyce BT, Colicino E, Liu L, Zhang W, Dai Q, et al. Blood Epigenetic Age may Predict Cancer Incidence and Mortality. *EBioMedicine.* mars 2016;5:68-73.
246. Papait R, Cattaneo P, Kunderfranco P, Greco C, Carullo P, Guffanti A, et al. Genome-wide analysis of histone marks identifying an epigenetic signature of promoters and enhancers underlying cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 10 déc 2013;110(50):20164-9.
247. Papait R, Corrado N, Rusconi F, Serio S, V G Latronico M. It's Time for An Epigenomics Roadmap of Heart Failure. *Curr Genomics.* août 2015;16(4):237-44.
248. Papait R, Kunderfranco P, Stirparo GG, Latronico MVG, Condorelli G. Long noncoding RNA: a new player of heart failure? *J Cardiovasc Transl Res.* déc 2013;6(6):876-83.
249. Pagiatakis C, Musolino E, Gornati R, Bernardini G, Papait R. Epigenetics of aging and disease: a brief overview. *Aging Clin Exp Res.* 6 déc 2019;
250. Cao Q, Guo Z, Yan Y, Wu J, Song C. Exosomal long noncoding RNAs in aging and age-related diseases. *IUBMB Life.* déc 2019;71(12):1846-56.
251. Naylor RM, Baker DJ, van Deursen JM. Senescent cells: a novel therapeutic target for aging and age-related diseases. *Clin Pharmacol Ther.* janv 2013;93(1):105-16.
252. Sartor MA, Dolinoy DC, Jones TR, Colacino JA, Prince MEP, Carey TE, et al. Genome-wide methylation and expression differences in HPV(+) and HPV(-) squamous cell carcinoma

- cell lines are consistent with divergent mechanisms of carcinogenesis. *Epigenetics*. juin 2011;6(6):777-87.
253. Zheng Y, Joyce BT, Liu L, Zhang Z, Kibbe WA, Zhang W, et al. Prediction of genome-wide DNA methylation in repetitive elements. *Nucleic Acids Res*. 6 sept 2017;45(15):8697-711.
254. Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science*. 8 févr 2002;295(5557):1079-82.
255. Coyle YM, Xie X-J, Lewis CM, Bu D, Milchgrub S, Euhus DM. Role of physical activity in modulating breast cancer risk as defined by APC and RASSF1A promoter hypermethylation in nonmalignant breast tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. févr 2007;16(2):192-6.
256. Sanchis-Gomar F, Garcia-Gimenez JL, Perez-Quilis C, Gomez-Cabrera MC, Pallardo FV, Lippi G. Physical exercise as an epigenetic modulator: Eustress, the « positive stress » as an effector of gene expression. *J Strength Cond Res*. déc 2012;26(12):3469-72.
257. Naeini MM, Ardekani AM. Noncoding RNAs and Cancer. *Avicenna J Med Biotechnol*. juill 2009;1(2):55-70.
258. Gharibiyani A, Hashemi SA, Hadi M, Abdolghafoorian H, Ardekani AM. Serum/plasma DNA methylation pattern and early detection of breast cancer. *Clinical Cancer Investigation Journal*. 3 janv 2015;4(2):120.
259. Markowitz S. DNA repair defects inactivate tumor suppressor genes and induce hereditary and sporadic colon cancers. *J Clin Oncol*. 1 nov 2000;18(21 Suppl):75S-80S.
260. Brim H, Abu-Asab MS, Nouraie M, Salazar J, Deleo J, Razjouyan H, et al. An integrative CGH, MSI and candidate genes methylation analysis of colorectal tumors. *PLoS One*. 2014;9(1):e82185.
261. Mokarram P, Zamani M, Kavousipour S, Naghibalhossaini F, Irajie C, Moradi Sarabi M, et al. Different patterns of DNA methylation of the two distinct O6-methylguanine-DNA

- methyltransferase (O6-MGMT) promoter regions in colorectal cancer. *Mol Biol Rep.* mai 2013;40(5):3851-7.
262. Warton K, Mahon KL, Samimi G. Methylated circulating tumor DNA in blood: power in cancer prognosis and response. *Endocr Relat Cancer.* mars 2016;23(3):R157-171.
263. Mokarram P, Shakiba-Jam F, Kavousipour S, Sarabi MM, Seghatoleslam A. Promoter Methylation Status of Two Novel Human Genes, UBE2Q1 and UBE2Q2, in Colorectal Cancer: a New Finding in Iranian Patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(18):8247-52.
264. Ng JM-K, Yu J. Promoter hypermethylation of tumour suppressor genes as potential biomarkers in colorectal cancer. *Int J Mol Sci.* 22 janv 2015;16(2):2472-96.
265. Albertus DL, Seder CW, Chen G, Wang X, Hartojo W, Lin L, et al. AZGP1 autoantibody predicts survival and histone deacetylase inhibitors increase expression in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* nov 2008;3(11):1236-44.
266. Gery S, Komatsu N, Kawamata N, Miller CW, Desmond J, Virk RK, et al. Epigenetic silencing of the candidate tumor suppressor gene Per1 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 1 mars 2007;13(5):1399-404.
267. Park YS, Jin MY, Kim YJ, Yook JH, Kim BS, Jang SJ. The global histone modification pattern correlates with cancer recurrence and overall survival in gastric adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* juill 2008;15(7):1968-76.
268. Lee SH, Kim J, Kim W-H, Lee YM. Hypoxic silencing of tumor suppressor RUNX3 by histone modification in gastric cancer cells. *Oncogene.* 15 janv 2009;28(2):184-94.
269. Cooper CS, Foster CS. Concepts of epigenetics in prostate cancer development. *Br J Cancer.* 27 janv 2009;100(2):240-5.
270. Kikuno N, Shiina H, Urakami S, Kawamoto K, Hirata H, Tanaka Y, et al. Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells. *Int J Cancer.* 1 août 2008;123(3):552-60.

271. Liu Y, Hong Y, Zhao Y, Ismail TM, Wong Y, Eu KW. Histone H3 (lys-9) deacetylation is associated with transcriptional silencing of E-cadherin in colorectal cancer cell lines. *Cancer Invest.* juill 2008;26(6):575-82.
272. Kumagai T, Akagi T, Desmond JC, Kawamata N, Gery S, Imai Y, et al. Epigenetic regulation and molecular characterization of C/EBPalpha in pancreatic cancer cells. *Int J Cancer.* 15 févr 2009;124(4):827-33.
273. Halusková J. Epigenetic studies in human diseases. *Folia Biol (Praha).* 2010;56(3):83-96.
274. O'Rourke CJ, Lafuente-Barquero J, Andersen JB. Epigenome Remodeling in Cholangiocarcinoma. *Trends Cancer.* juin 2019;5(6):335-50.
275. Wang P, Dong Q, Zhang C, Kuan P-F, Liu Y, Jeck WR, et al. Mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and 2 occur frequently in intrahepatic cholangiocarcinomas and share hypermethylation targets with glioblastomas. *Oncogene.* 20 juin 2013;32(25):3091-100.
276. Borger DR, Tanabe KK, Fan KC, Lopez HU, Fantin VR, Straley KS, et al. Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. *Oncologist.* 2012;17(1):72-9.
277. Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature.* 15 févr 2012;483(7390):479-83.
278. Saha SK, Parachoniak CA, Ghanta KS, Fitamant J, Ross KN, Najem MS, et al. Mutant IDH inhibits HNF-4 α to block hepatocyte differentiation and promote biliary cancer. *Nature.* 4 sept 2014;513(7516):110-4.
279. Goeppert B, Konermann C, Schmidt CR, Bogatyrova O, Geiselhart L, Ernst C, et al. Global alterations of DNA methylation in cholangiocarcinoma target the Wnt signaling pathway. *Hepatology.* févr 2014;59(2):544-54.
280. Chiang N-J, Shan Y-S, Hung W-C, Chen L-T. Epigenetic regulation in the carcinogenesis of cholangiocarcinoma. *Int J Biochem Cell Biol.* oct 2015;67:110-4.

281. Andresen K, Boberg KM, Vedeld HM, Honne H, Jebesen P, Hektoen M, et al. Four DNA methylation biomarkers in biliary brush samples accurately identify the presence of cholangiocarcinoma. *Hepatology*. mai 2015;61(5):1651-9.
282. Gradilone SA, Radtke BN, Bogert PS, Huang BQ, Gajdos GB, LaRusso NF. HDAC6 inhibition restores ciliary expression and decreases tumor growth. *Cancer Res*. 1 avr 2013;73(7):2259-70.
283. Merino-Azpitarte M, Lozano E, Perugorria MJ, Esparza-Baquer A, Erice O, Santos-Laso Á, et al. SOX17 regulates cholangiocyte differentiation and acts as a tumor suppressor in cholangiocarcinoma. *J Hepatol*. juill 2017;67(1):72-83.
284. Jusakul A, Cutcutache I, Yong CH, Lim JQ, Huang MN, Padmanabhan N, et al. Whole-Genome and Epigenomic Landscapes of Etiologically Distinct Subtypes of Cholangiocarcinoma. *Cancer Discov*. oct 2017;7(10):1116-35.
285. Fan B, Malato Y, Calvisi DF, Naqvi S, Razumilava N, Ribback S, et al. Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. *J Clin Invest*. août 2012;122(8):2911-5.
286. Easwaran H, Johnstone SE, Van Neste L, Ohm J, Mosbrugger T, Wang Q, et al. A DNA hypermethylation module for the stem/progenitor cell signature of cancer. *Genome Res*. mai 2012;22(5):837-49.
287. Bernhart SH, Kretzmer H, Holdt LM, Jühling F, Ammerpohl O, Bergmann AK, et al. Changes of bivalent chromatin coincide with increased expression of developmental genes in cancer. *Sci Rep*. 23 nov 2016;6:37393.
288. Goepfert B, Toth R, Singer S, Albrecht T, Lipka DB, Lutsik P, et al. Integrative Analysis Defines Distinct Prognostic Subgroups of Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Hepatology*. mai 2019;69(5):2091-106.
289. Morine Y, Shimada M, Iwahashi S, Utsunomiya T, Imura S, Ikemoto T, et al. Role of histone deacetylase expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surgery*. mars 2012;151(3):412-9.

290. Saha SK, Gordan JD, Kleinstiver BP, Vu P, Najem MS, Yeo J-C, et al. Isocitrate Dehydrogenase Mutations Confer Dasatinib Hypersensitivity and SRC Dependence in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Cancer Discov.* juill 2016;6(7):727-39.
291. Lampis A, Carotenuto P, Vlachogiannis G, Cascione L, Hedayat S, Burke R, et al. MIR21 Drives Resistance to Heat Shock Protein 90 Inhibition in Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology.* mars 2018;154(4):1066-1079.e5.
292. Salati M, Braconi C. Noncoding RNA in Cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis.* févr 2019;39(1):13-25.
293. Gradilone SA, O'Hara SP, Masyuk TV, Pisarello MJL, LaRusso NF. MicroRNAs and benign biliary tract diseases. *Semin Liver Dis.* févr 2015;35(1):26-35.
294. Erice O, Labiano I, Arbelaiz A, Santos-Laso A, Munoz-Garrido P, Jimenez-Agüero R, et al. Differential effects of FXR or TGR5 activation in cholangiocarcinoma progression. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* avr 2018;1864(4 Pt B):1335-44.
295. Mansini AP, Lorenzo Pisarello MJ, Thelen KM, Cruz-Reyes M, Peixoto E, Jin S, et al. MicroRNA (miR)-433 and miR-22 dysregulations induce histone-deacetylase-6 overexpression and ciliary loss in cholangiocarcinoma. *Hepatology.* août 2018;68(2):561-73.
296. Carotenuto P, Fassan M, Pandolfo R, Lampis A, Vicentini C, Cascione L, et al. Wnt signalling modulates transcribed-ultraconserved regions in hepatobiliary cancers. *Gut.* juill 2017;66(7):1268-77.
297. Chan-On W, Nairismägi M-L, Ong CK, Lim WK, Dima S, Pairojkul C, et al. Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection-related bile duct cancers. *Nat Genet.* déc 2013;45(12):1474-8.
298. Fujimoto A, Furuta M, Shiraishi Y, Gotoh K, Kawakami Y, Arihiro K, et al. Whole-genome mutational landscape of liver cancers displaying biliary phenotype reveals hepatitis impact and molecular diversity. *Nat Commun.* 30 janv 2015;6:6120.

299. Jiao Y, Pawlik TM, Anders RA, Selaru FM, Streppel MM, Lucas DJ, et al. Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Nat Genet.* déc 2013;45(12):1470-3.
300. Sia D, Losic B, Moeini A, Cabellos L, Hao K, Revill K, et al. Massive parallel sequencing uncovers actionable FGFR2-PPHLN1 fusion and ARAF mutations in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun.* 22 janv 2015;6:6087.
301. Zou S, Li J, Zhou H, Frech C, Jiang X, Chu JSC, et al. Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun.* 15 déc 2014;5:5696.
302. Ong CK, Subimerb C, Pairojkul C, Wongkham S, Cutcutache I, Yu W, et al. Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Nat Genet.* 6 mai 2012;44(6):690-3.
303. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 7 janv 2013;41(1):e1.
304. Illumina. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation 2015.
<https://web.uri.edu/gsc/files/16smetagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf>
305. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 1 août 2014;30(15):2114-20.
306. Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics.* 1 nov 2011;27(21):2957-63.
307. Bağcı C, Beier S, Górska A, Huson DH. Introduction to the Analysis of Environmental Sequences: Metagenomics with MEGAN. *Methods Mol Biol.* 2019;1910:591-604.
308. Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, et al. The SILVA and « All-species Living Tree Project (LTP) » taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.* janv 2014;42(Database issue):D643-648.

309. Volant S, Lechat P, Woringer P, Motreff L, Campagne P, Malabat C, et al. SHAMAN: a user-friendly website for metataxonomic analysis from raw reads to statistical analysis. *BMC Bioinformatics*. 10 août 2020;21(1):345.
310. Volant S, Lechat P, Woringer P, Motreff L, Campagne P, Malabat C, et al. SHAMAN: a user-friendly website for metataxonomic analysis from raw reads to statistical analysis. *BMC Bioinformatics*. 10 août 2020;21(1):345.
311. Saab M, Mestivier D, Sohrabi M, Rodriguez C, Khonsari MR, Faraji A, et al. Characterization of biliary microbiota dysbiosis in extrahepatic cholangiocarcinoma. *PLoS One*. 2021;16(3):e0247798.
312. Infinium MethylationEPIC Kit | Methylation profiling array for EWAS [Internet]. [cité 14 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/infinium-methylation-epic.html>
313. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol*. juill 2013;14(7):685-90.
314. Gupta A, Dhakan DB, Maji A, Saxena R, P.k VP, Mahajan S, et al. Association of *Flavonifractor plautii*, a Flavonoid-Degrading Bacterium, with the Gut Microbiome of Colorectal Cancer Patients in India. *mSystems* [Internet]. 17 déc 2019 [cité 22 janv 2020];4(6). Disponible sur: <https://msystems.asm.org/content/4/6/e00438-19>
315. Crook PR, Gray J. *Bacteroides* causing osteomyelitis in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. déc 1982;41(6):645-6.
316. Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, Grenther WB, Hamm TE, Balish E, et al. Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest*. 15 août 1996;98(4):945-53.
317. Hussein AH, Lisowska BK, Leak DJ. The genus *Geobacillus* and their biotechnological potential. *Adv Appl Microbiol*. 2015;92:1-48.

318. Ming H, Duan Y-Y, Guo Q-Q, Yin Y-R, Zhou E-M, Liu L, et al. *Meiothermus roseus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a geothermal area. *Antonie Van Leeuwenhoek*. oct 2015;108(4):897-905.
319. Goh KM, Gan HM, Chan K-G, Chan GF, Shahar S, Chong CS, et al. Analysis of anoxybacillus genomes from the aspects of lifestyle adaptations, prophage diversity, and carbohydrate metabolism. *PLoS One*. 2014;9(6):e90549.
320. Liu F, Liu A, Lu X, Zhang Z, Xue Y, Xu J, et al. Dysbiosis signatures of the microbial profile in tissue from bladder cancer. *Cancer Med*. nov 2019;8(16):6904-14.
321. Jia X, Lu S, Zeng Z, Liu Q, Dong Z, Chen Y, et al. Characterization of Gut Microbiota, Bile Acid Metabolism, and Cytokines in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Hepatology*. mars 2020;71(3):893-906.
322. Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000;40:617-47.
323. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, et al. 14-3-3sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell*. déc 1997;1(1):3-11.
324. Reis H, Pütter C, Megger DA, Bracht T, Weber F, Hoffmann A-C, et al. A structured proteomic approach identifies 14-3-3Sigma as a novel and reliable protein biomarker in panel based differential diagnostics of liver tumors. *Biochim Biophys Acta*. juin 2015;1854(6):641-50.
325. Shiba-Ishii A, Kim Y, Shiozawa T, Iyama S, Satomi K, Kano J, et al. Stratifin accelerates progression of lung adenocarcinoma at an early stage. *Mol Cancer*. 30 juill 2015;14:142.
326. Shiba-Ishii A, Kano J, Morishita Y, Sato Y, Minami Y, Noguchi M. High expression of stratifin is a universal abnormality during the course of malignant progression of early-stage lung adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 15 nov 2011;129(10):2445-53.
327. Tit-Oon P, Chokchaichamnankit D, Khongmanee A, Sawangareetrakul P, Svasti J, Srisomsap C. Comparative secretome analysis of cholangiocarcinoma cell line in three-dimensional culture. *Int J Oncol*. nov 2014;45(5):2108-16.

328. Robin F, Angenard G, Cano L, Courtin-Tanguy L, Gaignard E, Khene Z-E, et al. Molecular profiling of stroma highlights stratifin as a novel biomarker of poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer*. juill 2020;123(1):72-80.
329. Rodriguez JA, Li M, Yao Q, Chen C, Fisher WE. Gene overexpression in pancreatic adenocarcinoma: diagnostic and therapeutic implications. *World J Surg*. mars 2005;29(3):297-305.
330. Bertram S, Padden J, Kälsch J, Ahrens M, Pott L, Canbay A, et al. Novel immunohistochemical markers differentiate intrahepatic cholangiocarcinoma from benign bile duct lesions. *J Clin Pathol*. juill 2016;69(7):619-26.
331. Sobhani I, Rotkopf H, Khazaie K. Bacteria-related changes in host DNA methylation and the risk for CRC. *Gut Microbes*. 9 nov 2020;12(1):1800898.
332. Xu L, Corcoran RB, Welsh JW, Pennica D, Levine AJ. WISP-1 is a Wnt-1- and beta-catenin-responsive oncogene. *Genes Dev*. 1 mars 2000;14(5):585-95.
333. Pennica D, Swanson TA, Welsh JW, Roy MA, Lawrence DA, Lee J, et al. WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 déc 1998;95(25):14717-22.
334. Xie D, Nakachi K, Wang H, Elashoff R, Koeffler HP. Elevated levels of connective tissue growth factor, WISP-1, and CYR61 in primary breast cancers associated with more advanced features. *Cancer Res*. 15 déc 2001;61(24):8917-23.
335. Stephens S, Palmer J, Konstantinova I, Pearce A, Jarai G, Day E. A functional analysis of Wnt inducible signalling pathway protein -1 (WISP-1/CCN4). *J Cell Commun Signal*. mars 2015;9(1):63-72.
336. Gurbuz I, Chiquet-Ehrismann R. CCN4/WISP1 (WNT1 inducible signaling pathway protein 1): a focus on its role in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. mai 2015;62:142-6.

337. Quiros M, Nishio H, Neumann PA, Siuda D, Brazil JC, Azcutia V, et al. Macrophage-derived IL-10 mediates mucosal repair by epithelial WISP-1 signaling. *J Clin Invest.* 1 sept 2017;127(9):3510-20.
338. Tanaka S, Sugimachi K, Kameyama T, Maehara S-I, Shirabe K, Shimada M, et al. Human WISP1v, a member of the CCN family, is associated with invasive cholangiocarcinoma. *Hepatology.* mai 2003;37(5):1122-9.
339. Wang Q-Y, Feng Y-J, Ji R. High expression of WISP1 promotes metastasis and predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* oct 2020;24(20):10445-51.
340. Klump B, Hsieh C-J, Dette S, Holzmann K, Kiebetalich R, Jung M, et al. Promoter methylation of INK4a/ARF as detected in bile-significance for the differential diagnosis in biliary disease. *Clin Cancer Res.* mai 2003;9(5):1773-8.
341. Zhang Y, Yang B, Du Z, Gao Y-T, Wang Y-J, Jing X, et al. Identification and validation of specific methylation profile in bile for differential diagnosis of malignant biliary stricture. *Clin Biochem.* nov 2010;43(16-17):1340-4.
342. Shin S-H, Lee K, Kim B-H, Cho N-Y, Jang J-Y, Kim Y-T, et al. Bile-based detection of extrahepatic cholangiocarcinoma with quantitative DNA methylation markers and its high sensitivity. *J Mol Diagn.* juin 2012;14(3):256-63.
343. Branchi V, Schaefer P, Semaan A, Kania A, Lingohr P, Kalff JC, et al. Promoter hypermethylation of SHOX2 and SEPT9 is a potential biomarker for minimally invasive diagnosis in adenocarcinomas of the biliary tract. *Clin Epigenetics.* 2016;8:133.
344. Sobhani I, Bergsten E, Couffin S, Amiot A, Nebbad B, Barau C, et al. Colorectal cancer-associated microbiota contributes to oncogenic epigenetic signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 nov 2019;116(48):24285-95.