



HAL
open science

Piste infectieuse et carcinogénèse colique : implication des *Escherichia coli* associés à la muqueuse

Emmanuel Buc

► **To cite this version:**

Emmanuel Buc. Piste infectieuse et carcinogénèse colique : implication des *Escherichia coli* associés à la muqueuse. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2012. Français. NNT : 2012CLF1MM01 . tel-01165190

HAL Id: tel-01165190

<https://theses.hal.science/tel-01165190>

Submitted on 26 Jan 2016

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

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

Ecole Doctorale
des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université
Spécialité : Cancérologie

Soutenue le 20 mars 2012
par

Emmanuel Buc

**Piste infectieuse et carcinogène colique :
Implication des *Escherichia coli* associés à la muqueuse**

Composition du Jury :

Rapporteurs : **Hofman Paul**, Professeur, Anatomie Pathologique, Université de Nice

Beaugerie Laurent, Professeur, Gastroentérologie, Université Paris VI

Examineurs : **Darfeuille-Michaud Arlette**, Professeur, Microbiologie, Université d'Auvergne

Michot Francis, Professeur, Chirurgie digestive, Université de Rouen

Directeur de Thèse : **Pezet Denis**, Professeur, Chirurgie digestive, Université d'Auvergne

Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte « M2ISH »

UMR 1071 Inserm/Université d'Auvergne

Remerciements

à **Hans**,

mon grand petit frère,

parce que tout ça, c'est à cause (grâce ?) de toi ...

au Docteur **Marcel Buc**,

parce qu'un peu d'hérédité ne fait pas de mal.

au Professeur **Denis Pezet**,

mon maître, mon guide, et en plus mon voisin.

à **Antonin, Pierre-Louis et Jeanne,**
mes 3 petits clones uniques,
parfois très adhérents mais jamais trop invasifs

à **Marlène,**
mon récepteur de très haute affinité

à mes parents, **Christian et Eliane,**
vous avez su activer en moi la bonne voie de signalisation

à mon frère, **David,**
pour avoir rouvert mes optiques

Je remercie très sincèrement Messieurs les Professeurs **Paul Hofman** et **Laurent Beaugerie**
d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et d'avoir consacré du temps à la lecture,
l'analyse et la critique de ce mémoire.

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur **Arlette Darfeuille-Michaud**.

Sa rigueur scientifique, son enthousiasme et sa chaleur humaine
resteront toujours pour moi des modèles.

Je remercie également Monsieur le Professeur **Francis Michot**

d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse,
et d'avoir pris mon retard avec beaucoup de patience

Je tiens à remercier Madame le Docteur **Mathilde Bonnet** qui a co-encadré cette thèse,
et pour tout ce qu'elle m'a apporté tant professionnellement que humainement.

Le travail présenté dans ce manuscrit est aussi le sien.

Enfin, je remercie Monsieur le Professeur **Richard Bonnet**,

pour son accueil à mes débuts de thèse,
et pour son travail dans la rédaction de la 1^{ère} publication.

à toute ma famille, à tous mes amis,

à toute l'équipe de chirurgie du CHU Estaing,

notamment les infirmières de chirurgie B ...

à l'équipe d'anatomie pathologique du CHU Estaing du Pr. Déchelotte,

et Mme le Docteur Claude Darcha,

à toute l'équipe de M2ISH,

Valérie Livrelli-mots-fléchés, Nico Barnich-toujours-pépère, Zab-one-touch-double-touch,

Guillaume-my-binome, Hang-rouleau-compresseur, Lucie-la-classe, Jenny-la-casse, Jerem-

CEACAM6, Benoit-bonjour-les-gens, Jessica (chuuut!), Nico Dreux-ha-ha-ha, Emilie-

western-blot, Pédro (tais-toi), Adeline-gros-mots, Amélie-il-est-beau-mon-chateau, Julien-

comètes, Anthony-change-de-Tshirt, et Marga ...

à Maurice Der Vartanian,

avec qui j'aurais tant aimé travailler un peu plus,

à mes collègues chirurgiens,

Aurélien, Olivier, Renaud, d'avoir assumé mon absence pendant la rédaction de ce manuscrit,

(allez, ça va, vous vous êtes gavés d'hépatectomies)

à Madame Rita Bouzaboune

pour son accueil et sa patience

à tous ceux que j'ai oubliés !...

Sommaire

Résumé	1
---------------	----------

Introduction bibliographique	3
-------------------------------------	----------

I - Généralités sur le cancer colorectal	4
---	----------

1. L'appareil digestif	4
1.1. Structure générale et physiologie intestinale	4
1.2. Spécificités de la muqueuse colique	7
1.3. Différences entre côlon proximal et côlon distal	8
2. Epidémiologie du cancer colorectal	9
2.1. Définition du risque	10
2.2. Diagnostic et bilan d'extension	11
2.3. Dépistage	12
3. Histoire naturelle du cancer colorectal	13
3.1. Foyer de cryptes aberrantes	13
3.2. Adénome et adénocarcinome non invasif	14
3.3. Adénocarcinome invasif	16
3.4. Métastases ganglionnaires et viscérales	17
4. Facteurs de risque de cancer colorectal	17
4.1. Facteurs endogènes	18
4.1.1. Risques génétiques	18
4.1.2. Pathologies coliques prédisposantes	22
4.2. Facteurs exogènes	24
5. Facteurs pronostiques	25
5.1. Cliniques	25
5.1.1. Age	25
5.1.2. Sexe	26
5.1.3. Cancer perforé et cancer en occlusion	26
5.2. Chirurgicaux	27

5.2.1.	<i>Marges de résection et maladie résiduelle</i>	27
5.2.2.	<i>Complications postopératoires locales</i>	28
5.3.	Histopathologiques.....	28
5.3.1.	<i>Stade TNM</i>	28
5.3.2.	<i>Invasion lymphatique, veineuse et péri-neurale</i>	30
5.3.3.	<i>Bourgeonnement tumoral (tumor budding)</i>	30
5.3.4.	<i>Grade tumoral</i>	31
5.4.	Moléculaires et cellulaires.....	31
5.4.1.	<i>Phénotype MSI</i>	31
5.4.2.	<i>Mutations LOH18q et p53</i>	32
5.4.3.	<i>Immunité tumorale</i>	32
5.4.4.	<i>Albumine sérique</i>	33
5.4.5.	<i>ACE ou CEACAM5</i>	33
5.4.6.	<i>CEACAM6</i>	34
5.4.7.	<i>Protéine C-réactive (CRP)</i>	35
6.	Traitement du cancer colorectal.....	35
6.1.	Moyens thérapeutiques.....	36
6.1.1.	<i>Chirurgie</i>	36
6.1.2.	<i>Chimiothérapie</i>	38
6.2.	Indications en fonction du stade.....	39
6.2.1.	<i>Stades I et II</i>	39
6.2.2.	<i>Stade III</i>	40
6.2.3.	<i>Stade IV</i>	40
6.3.	Surveillance.....	42

II - Carcinogénèse colorectale..... 44

1.	La séquence adénome cancer.....	44
2.	les voies impliquées dans la carcinogénèse.....	47
2.1.	Voie Wnt/APC/ β caténine.....	47
2.2.	Voie Ras/MAPK.....	49
2.3.	Voie TP53.....	51
2.4.	Voie Ras/PI3K/AKT.....	52
2.5.	Voie TGF β /SMAD.....	52
2.6.	Autres voies de signalisation.....	54

3. Voies génétiques de la carcinogenèse colique.....	56
3.1. L'instabilité chromosomique.....	56
3.2. L'instabilité microsatellitaire.....	57
3.2.1. Phénotype MSI-H.....	58
3.2.2. Phénotype MSI-L.....	59
3.2.3. Phénotype MSS.....	60
3.3. L'instabilité épigénétique.....	60
III - Microbiote et cancer.....	62
1. La flore microbienne intestinale chez l'homme.....	62
1.1. L'être humain, un "super-organisme".....	62
1.2. Phylogénèse du microbiote intestinal.....	63
1.3. Microbiote intestinal individuel	64
1.4. Microbiote et hôte : une inflammation constitutive physiologique.....	65
1.5. Facteurs influençant la composition du microbiote.....	68
2. Microbiote et cancer colorectal.....	70
2.1. Alimentation, microbiote et carcinogenèse.....	70
2.2. Microbiote intestinal, inflammation et cancer.....	73
2.3. Facteurs de virulence bactérienne dans l'inflammation et le cancer.....	75
2.3.1. <i>Helicobacter pylori</i>	75
2.3.2. <i>Bacteroides fragilis</i>	76
2.3.3. <i>Escherichia coli</i>	77
2.4. Microbiote intestinal et protection contre le risque de CCR.....	81
IV - Cancer colorectal, AIEC et maladie de Crohn.....	84
1. Cancer colorectal et <i>E. coli</i>	84
2. AIEC, CEACAM6 et maladie de crohn.....	87
2.1. Propriétés d'adhésion des souches AIEC.....	88
2.2. Propriétés d'invasion des souches AIEC.....	89
2.3. Propriétés de survie et multiplication en macrophages des souches AIEC.....	90
2.4. Rôle du récepteur CEACAM6.....	91
2.4.1. Dans la maladie de Crohn.....	91
2.4.2. Dans le cancer colorectal.....	92

1. Patients.....	99
1.1. Base de données.....	99
1.2. Intervention chirurgicale.....	99
1.3. Traitement des prélèvements coliques.....	100
1.4. Anatomie pathologique.....	100
2. Etude microbiologique.....	102
2.1. Analyse des populations de Gammaproteobacteria et de <i>E. coli</i> associées à la muqueuse.....	102
2.1.1. <i>Quantification et sélection des Gammaproteobacteria associées à la muqueuse</i>	102
2.1.2. <i>Quantification et sélection des Gammaproteobacteria internalisées dans la muqueuse.</i>	102
2.2. Typage moléculaire et groupage phylogénique des souches de <i>E. coli</i>	103
2.3. Détection et identification des gènes codant les cyclomodulines.....	104
2.4. Etude du pouvoir cytopathogène des cyclomodulines.....	105
2.5. Gel d'électrophorèse « single-cell »	106
2.6. Recherche du phénotype AIEC chez les souches <i>E. coli</i> isolées des patients.....	107
2.6.1. <i>Choix des souches bactériennes</i>	107
2.6.2. <i>Cultures cellulaires</i>	107
2.6.3. <i>Tests d'adhésion et d'invasion en cellules épithéliales I-407 et Caco-2</i>	108
2.6.4. <i>Entrée et survie en macrophages murins J774</i>	109
2.7. Entrée et survie en cellules épithéliales intestinales Caco-2.....	110
3. Test d'induction du CEACAM6 par les souches de <i>E. coli</i> après infection de cellules Caco-2 in vitro.....	110
3.1. Analyse de l'expression de CEACAM6 par Western Blot après infection de cellules épithéliales Caco-2 par une souche de <i>E. coli</i> (CCR20)	111
3.1.1. <i>Infection des cellules Caco-2</i>	111
3.1.2. <i>Extraction protéique et Western blot</i>	111

3.2.	Analyse de l'expression de CEACAM6 par ELISA après infection de cellules Caco-2 par les souches de clones uniques de <i>E. coli</i>	112
3.2.1.	<i>Infections de cellules Caco2/TC7</i>	112
3.2.2.	<i>Elisa sandwich</i>	112
4.	Étude de la persistance des souches de <i>E. coli</i> isolées de tissus coliques humains dans des modèles murins exprimant le récepteur CEACAM6.....	113
4.1.	Infection de souris transgéniques CEABAC10 : étude de la colonisation.....	113
4.1.1.	<i>Souris</i>	113
4.1.2.	<i>Génotypage des souris</i>	114
4.1.3.	<i>Infection des souris</i>	115
4.1.4.	<i>Estimation de la colonisation</i>	115
4.1.5.	<i>Expression des résultats</i>	115
4.2.	Analyse histologique du colon et du cæcum des souris CEABAC10.....	116
4.3.	Recherche de bactéries dans les cryptes coliques par hybridation in situ en fluorescence	116
4.4.	Etude de l'expression du marqueur de prolifération PCNA par RT-PCR quantitative.....	117
4.4.1.	<i>Extraction des ARNs totaux</i>	117
4.4.2.	<i>Transcription inverse</i>	117
4.4.3.	<i>PCR quantitative en temps réel</i>	118
5.	Analyse statistique.....	118

Résultats --- **120**

I - Étude de la colonisation bactérienne colique dans la cohorte de patients..... 121

1.	Description de la cohorte.....	121
1.1.	Données cliniques.....	121
1.2.	Données anatomopathologiques.....	122
1.3.	Données immunohistochimiques : analyse de l'expression tissulaire des protéines CEACAM5 et CEACAM6	123
1.3.1.	<i>Marquage de la protéine CEACAM5</i>	123
1.3.2.	<i>Marquage de la protéine CEACAM6</i>	125
2.	Analyse de la flore bactérienne associée à la muqueuse.....	126
2.1.	Bactéries associées à la muqueuse.....	126

2.2.	Bactéries internalisées dans la muqueuse.....	128
2.3.	Cas particulier des bactéries <i>E. coli</i>	129
3.	Corrélation entre colonisation et données cliniques.....	130
3.1.	Colonisation & sexe.....	130
3.2.	Colonisation & âge.....	130
3.3.	Colonisation & stade T.....	131
3.4.	Colonisation & stade N.....	132
3.5.	Colonisation & stade M.....	132
3.6.	Autres données anatomopathologiques.....	133
3.7.	Colonisation et localisation tumorale.....	133
3.8.	Colonisation et expression de CEACAM5.....	135
3.9.	Colonisation et expression de CEACAM6.....	135
3.10.	Conclusion sur la colonisation et les données cliniques.....	136
3.10.1.	<i>Gammaproteobacteria associées</i>	136
3.10.2.	<i>Gammaproteobacteria internalisées</i>	137

II - Caractérisation *in vitro* du phénotype des souches de *E. coli*

isolées de tissus coliques humains..... 138

1.	Analyse des souches de <i>E. coli</i> associées et internalisées à la muqueuse colique	138
1.1.	Typage des souches de <i>E. coli</i> et détermination du nombre de clones de <i>E. coli</i> dans les échantillons CCR et DIV.....	138
1.1.1.	Analyse de la totalité des clones de <i>E. coli</i>	139
1.1.2.	Cas particulier des clones uniques de <i>E. coli</i>	141
1.2.	Distribution des gènes codant pour les cyclomodulines (CM)	142
1.2.1.	Ilot <i>pks</i>	142
1.2.2.	Gènes <i>cnf</i>	142
1.2.3.	Gène <i>cdtB</i>	143
1.2.4.	Gène <i>cif</i>	144
1.3.	Détection phénotypique des CM.....	144
1.4.	Distribution des gènes codant pour une cyclomoduline.....	145
1.4.1.	En fonction du contexte clinique.....	145
1.4.2.	En fonction de la colonisation.....	146
1.5.	Recherche d'effets cytopathiques en l'absence de gènes codant une cyclo-moduline connue.....	146

1.6.	Conclusion sur le phénotype des souches <i>E. coli</i> associées à la muqueuse.....	147
2.	Analyse des clones uniques de <i>E. coli</i> selon le phénotype AIEC.....	148
2.1.	Analyse de l'adhésion/invasion en cellules épithéliales intestinales Caco-2 et de survie en macrophages THP1.....	149
2.2.	Capacités de survie en cellules épithéliales intestinales Caco-2.....	150
2.2.1.	<i>Survie en cellules épithéliales intestinales</i>	150
2.2.2.	<i>Evaluation de la cytotoxicité</i>	151
2.3.	Relations entre phénotype des <i>E. coli</i> et cyclomodulines.....	152
2.4.	Conclusion.....	152
3.	Capacité des clones de <i>E. coli</i> à induire l'expression de CEACAM6.....	153
3.1.	Etude de l'expression de CEACAM6 en fonction des clones de <i>E. coli</i>	153
3.1.1.	<i>Niveau d'expression de CEACAM6 et phylogroupe de E.coli</i>	154
3.1.2.	<i>Niveau d'expression de CEACAM6 et nombre de clones E. coli</i>	156
3.2.	Etude <i>in vitro</i> de l'induction de CEACAM6 par les clones uniques de <i>E. coli</i>	156
3.2.1.	<i>Analyse par ELISA de l'induction de CEACAM6 par les clones uniques</i>	157
3.2.2.	<i>Analyse par Western Blot de l'induction de CEACAM6 par le clone CCR20</i>	157

III - Pouvoir de colonisation de la souche *E. coli* CCR20

dans le modèle murin exprimant le récepteur CEACAM6..... 159

1.	Etude de la colonisation bactérienne dans les souris CEABAC10.....	159
2.	Analyse des effets de la colonisation sur le côlon des souris.....	150
2.1.	Etude histologique.....	161
2.2.	Etude de la localisation bactérienne par FISH.....	162
2.3.	Etude de la prolifération cellulaire.....	163
3.	Conclusion sur le modèle murin.....	163

Discussion / perspectives ————— 165

Références ————— 184

Annexes ————— 235

Résumé

Le cancer colorectal est un des cancers les plus fréquents en France. Les patients présentant une inflammation chronique de l'intestin sont à haut risque de développer un cancer colorectal. Il a récemment été démontré que certaines bactéries de l'espèce *Escherichia coli* pouvaient être impliquées dans la genèse de maladies inflammatoires intestinales, par des mécanismes d'adhésion et d'invasion aux cellules épithéliales intestinales faisant intervenir le récepteur CEACAM6, marqueur tumoral reconnu dans le cancer colorectal.

Nous avons montré que certaines bactéries de l'espèce *E. coli* colonisaient la muqueuse colique de patients atteints de cancer colorectal et possédaient des propriétés d'adhésion et d'invasion dans les cellules épithéliales intestinales. Ces souches synthétisent des cyclomodulines variées susceptibles de jouer un rôle dans la carcinogenèse colique, et colonisent davantage les tumeurs les plus évoluées.

Une corrélation a été observée entre la colonisation de la muqueuse colique par un clone unique de ces *E. coli* et l'expression du récepteur CEACAM6. Nous avons montré *in vitro* que certains clones de pouvaient induire l'expression de CEACAM6 par des cellules épithéliales intestinales en culture. Enfin, sur modèle animal transgénique exprimant le récepteur humain CEACAM6, ces mêmes clones ont montré des capacités de colonisation très supérieures à des *E. coli* non pathogènes, et l'induction d'une surexpression de marqueurs de prolifération au niveau de la muqueuse colique.

Les *E. coli* associés à la muqueuse colique pourraient ainsi participer à la promotion du cancer colorectal via l'induction d'une surexpression du récepteur CEACAM6 et d'une hyperprolifération des cellules épithéliales.

Introduction

Bibliographique

I - Généralités sur le cancer colorectal

1. L'appareil digestif

1.1. Structure générale et physiologie intestinale

L'intestin est la partie du tube digestif qui fait suite à l'estomac et se termine au niveau de l'anus (fig.1). L'intestin comprend 2 parties : l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et le gros intestin (côlon et rectum), qui répondent sensiblement aux mêmes exigences d'où découlent leurs composantes physico-chimiques :

- l'absorption intestinale : la paroi est constituée d'une muqueuse et d'une sous-muqueuse dont les caractéristiques morphologiques se prêtent à l'absorption (fig.2) : nombreux replis muqueux (valvules conniventes et villosités intestinales) et invaginations (cryptes de Lieberkühn) pour augmenter la surface d'absorption, nombreuses cellules d'absorption intestinale possédant des microvillosités (les entérocytes).
- la progression du bol alimentaire : les couches externes de la paroi intestinale sont composées de deux tuniques musculaires, l'une circulaire interne, l'autre longitudinale externe (fig.2). Leurs contractions séquentielles produisent un péristaltisme qui entraîne une progression du bol alimentaire vers l'aval.
- la barrière anti-infectieuse : la surface absorptive de l'intestin – environ 5000 m² – l'expose aux micro-organismes du milieu extérieur. L'épithélium intestinal est donc composé d'un épithélium monostratifié de cellules épithéliales différenciées et

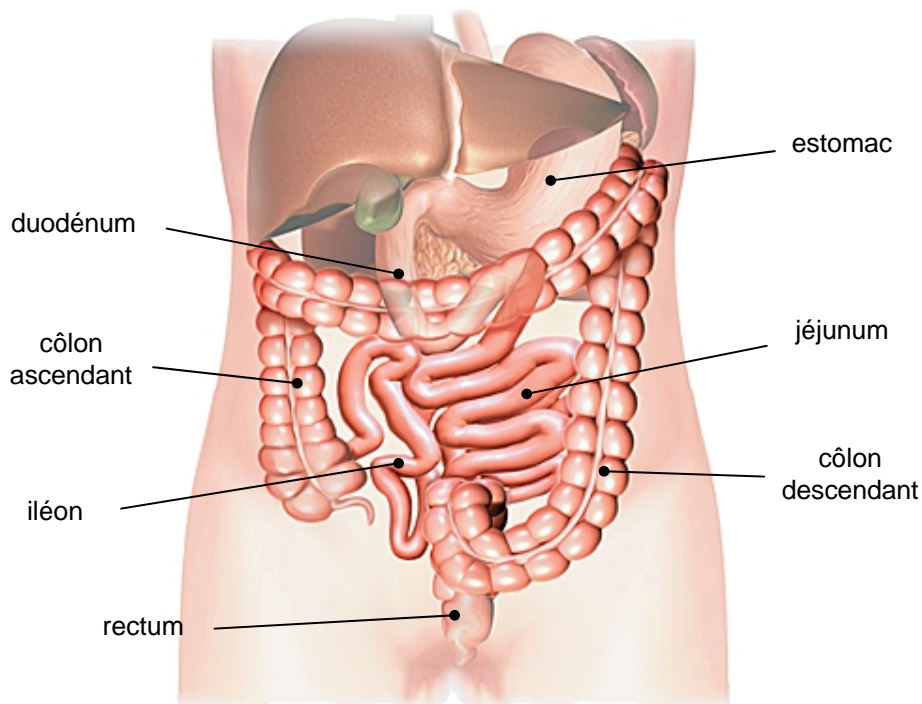


Figure 1 : Anatomie générale de l'intestin. L'intestin est un organe qui fait partie du tube digestif. Il fait suite à l'estomac et se termine au niveau de l'anus, et comprend 2 parties : l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et le gros intestin (cœlon et rectum).
 Source : Larousse encyclopédie

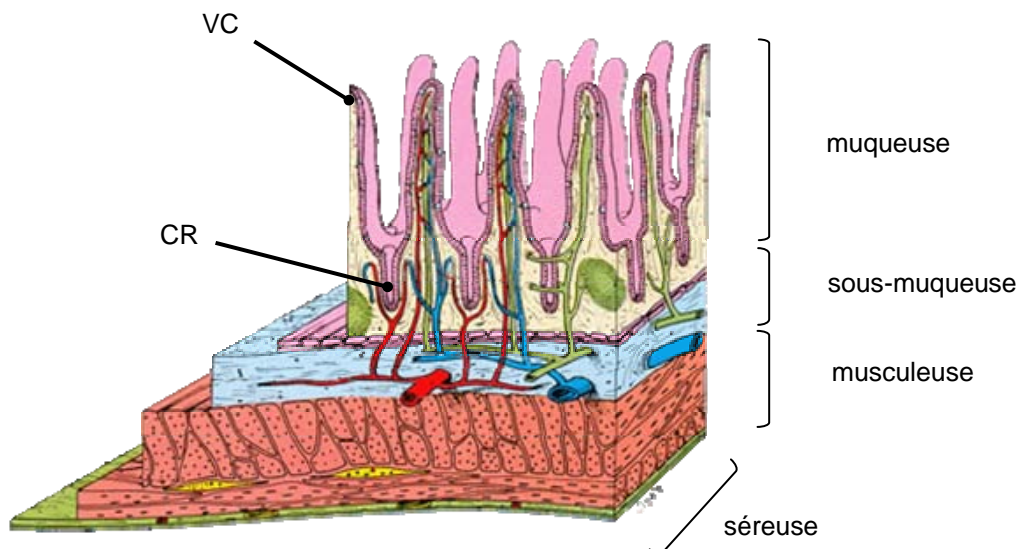


Figure 2 : Schéma de la paroi intestinale. La paroi intestinale est composée de 4 couches, de l'intérieur vers l'extérieur : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculieuse et la séreuse péritonéale. VC = valvules conniventes ; CR = cryptes. Source : Tortora et Grabowski, 1994

polarisées unies par des jonctions serrées qui lui confèrent une étanchéité physique aux micro-organismes provenant du milieu extérieur (fig.2, page précédente).

La muqueuse est la tunique la plus complexe et la plus importante de l'intestin, car, d'une part, elle est responsable de ses propriétés physiologiques d'absorption, et, d'autre part, elle constitue un véritable biotope, équilibre entre flore polymicrobienne du milieu extérieur et épithélium intestinal. Cette complexité se retrouve dans sa structure histologique : la muqueuse intestinale est composée de 4 couches, de la surface vers la profondeur : un épithélium monostratifié qui repose sur une lame basale, un chorion (ou *lamina propria*) riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques, et une fine couche musculaire de soutien appelée *muscularis mucosae* (fig.3). L'épithélium de la muqueuse est un épithélium cylindrique monostratifié composé de 4 types cellulaires, dont les proportions varient selon le segment digestif concerné (fig.4) (pour revue, cf. (1)) :

- les entérocytes : ce sont les cellules chargées de l'absorption intestinale, elles présentent à leur pôle apical des microvillosités appelées bordure en brosse, qui augmentent encore davantage la surface d'absorption.
- les cellules caliciformes à mucus : sécrètent du mucus et des glycoprotéines qui jouent un rôle cytoprotecteur pour l'épithélium intestinal en réponse à l'acidité gastrique mais aussi aux agressions bactériennes (entérotoxines).
- les cellules endocrines : sécrètent le glucagon, la gastrine, la β -endorphine ou encore la sécrétine. Ces hormones sont déversées dans le sang pour pouvoir agir sur des organes distants de l'intestin (effet endocrine) mais elles sont aussi libérées dans la muqueuse intestinale pour agir aussi sur l'intestin lui-même (effet paracrine).

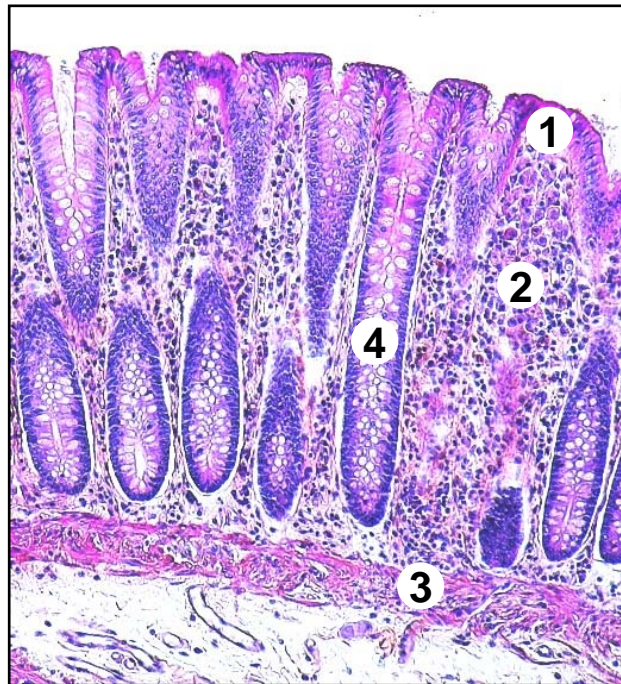


Figure 3 : Coupe histologique de muqueuse colique normale au microscope optique x 100 après coloration à l'HES. (1) épithélium monostratifié polarisé reposant sur une lame basale ; (2) chorion (ou lamina propria) fait de tissu conjonctif et riche en éléments immunitaires mononucléés ; (3) musculaire muqueuse ; (4) crypte colique. *Source : le laboratoire d'anatomie pathologique du CHU Clermont-Fd*

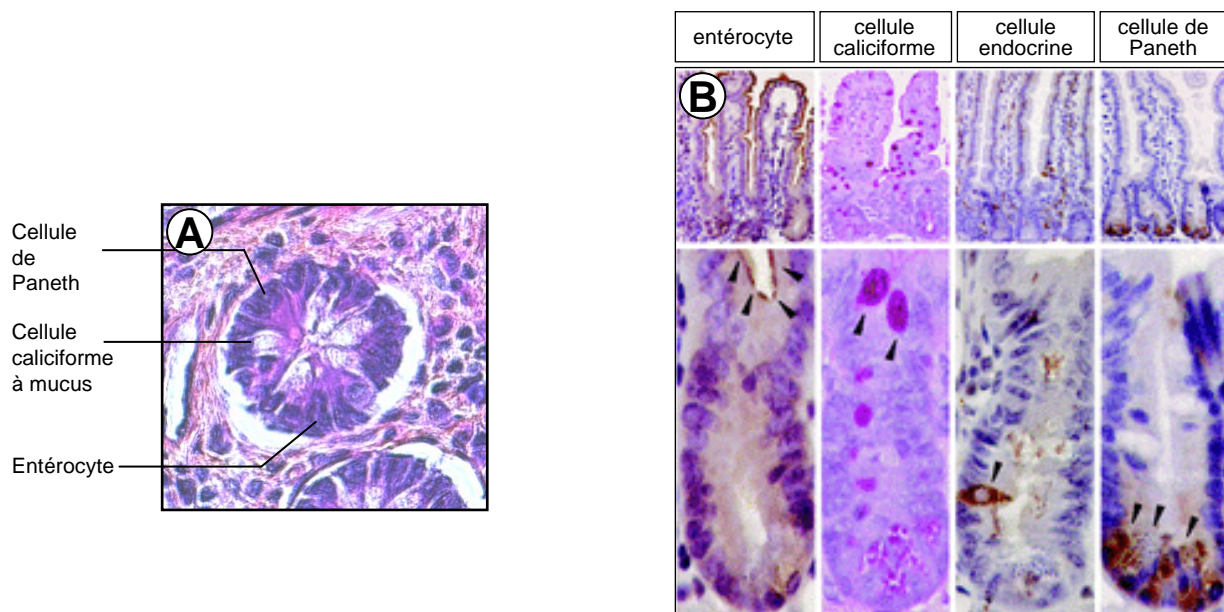


Figure 4 : Histologie de la muqueuse colique normale : détails. (A) détail d'une crypte en coupe frontale après coloration à l'HES. (B) Détection chimique et immunohistochemie des 4 principales lignées cellulaires de l'intestin (flèches) : entérocyte (phosphatase alcaline), cellules caliciformes (PAS), cellules endocriniennes (synaptophysine) et cellule de Paneth (lysozyme). La rangée supérieure représente l'axe crypte – villosité dans son ensemble, la rangée inférieure le détail de la crypte. *Source : Pinto et al., 2003.*

- les cellules de Paneth : elles interviennent dans les processus de bactériostase, sécrètent des peptides (défensines) et un lysozyme intestinal qui possèdent une activité antimicrobienne.

La muqueuse de l'intestin n'est pas une structure plane mais est pourvue de nombreux replis que l'on peut regrouper en 2 catégories :

- les évaginations : les valvules conniventes, sortes de replis muqueux, et les villosités intestinales augmentent la surface muqueuse et favorisent ainsi l'absorption intestinale (fig.1, page précédente) ;
- les invaginations : ce sont les cryptes ou glandes de Lieberkühn, qui sont des invaginations étroites en doigt de gant dans le chorion (ou *lamina propria*) sous jacent. Ces cryptes intestinales ont un rôle essentiel dans le fonctionnement de l'homéostasie cellulaire et du renouvellement de l'épithélium muqueux : elles sont le compartiment de prolifération cellulaire (fig.5) (1). La base des cryptes est une zone qui comprend des cellules progénitrices (« *stem cells* ») bordées de cellules mésenchymateuses appelées myofibroblastes péri-cryptiques (1). Au cours du renouvellement cellulaire, les cellules progénitrices se divisent, se différencient en cellule épithéliales (entérocytes, cellules caliciformes, cellules de Paneth) et montent progressivement à la surface des cryptes au fur et à mesure de leur différenciation : c'est le gradient de différenciation intra cryptique. Les myofibroblastes péri cryptiques produisent des ligands de la voie de signalisation Wnt qui est impliquée dans la différenciation et la prolifération des entérocytes (2). Elles participent ainsi à la régulation, la migration et la différenciation cellulaire. Cette organisation en cryptes étroites permet de limiter l'accès à ces cellules « fragiles » par divers agents pathogènes.

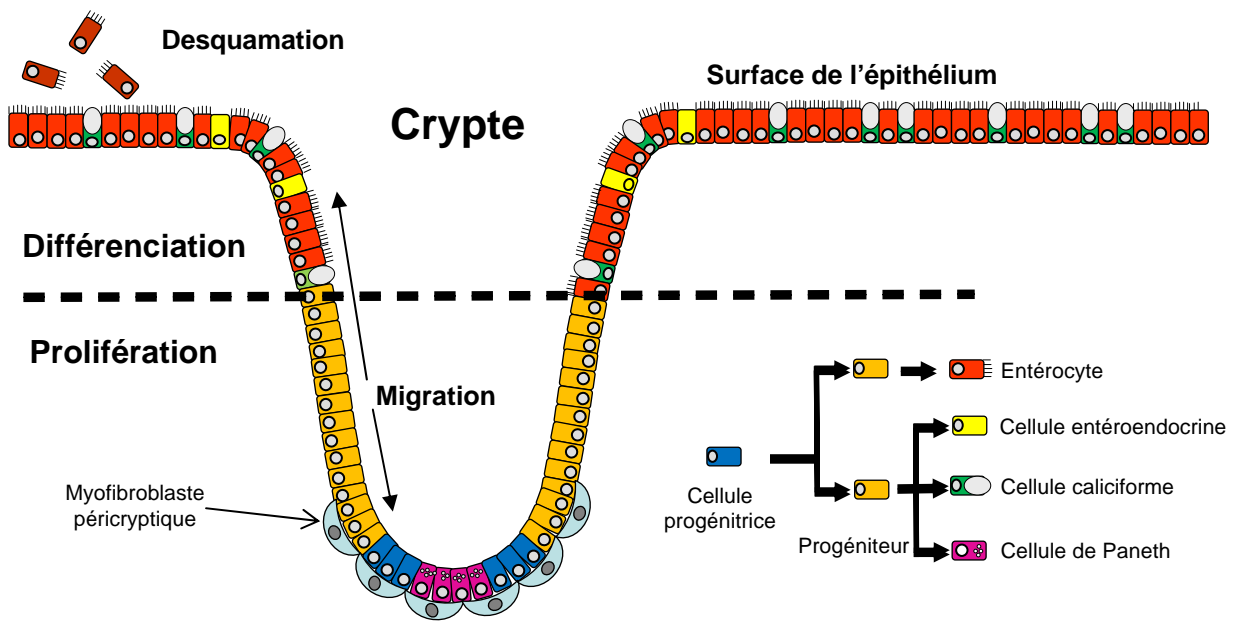


Figure 5 : Schéma d'un crypte intestinale et homéostasie cellulaire. Les cellules progénitrices pluripotentes sont situées au bas de la crypte. Elles se multiplient (zone de prolifération) et se différencient en l'un des 4 types cellulaires de la muqueuse colique au fur et à mesure de leur migration vers le haut des cryptes (zone de différenciation), pour atteindre un état mature à la surface de l'épithélium. Les myofibroblastes péri-cryptiques produisent des ligands de la voie de signalisation Wnt qui est impliquée dans la différenciation et la prolifération des entérocytes. Elles participent ainsi à la régulation, la migration et la différenciation cellulaire. *Source : Wang et al, 2012*

A côté de ces exigences communes, les différentes parties de l'intestin ont des rôles sensiblement différents, qui rendent compte de particularités anatomiques et histologiques différentes dans chaque segment, principalement au niveau de la couche muqueuse.

1.2. Spécificités de la muqueuse colique

Le côlon est la partie la plus distale du tube digestif, situé après l'intestin grêle et se terminant par le rectum qui est l'organe de la défécation. Le rôle spécifique du côlon est la réabsorption hydro-électrolytique, la dégradation des composés non digestibles et le stockage des selles avant la défécation. De ces impératifs physiologiques découlent les particularités de la muqueuse colique par rapport au reste de l'intestin :

- un nombre moins important d'entérocytes : la muqueuse colique n'absorbe pas de nutriments, uniquement de l'eau et des électrolytes ;
- un nombre plus important de cellules caliciformes : ces cellules produisent du mucus qui sert à la lubrification du tube digestif, et participe à la constitution de la barrière muqueuse protectrice limitant le contact avec la flore bactérienne, très dense dans le côlon (de 10^{11} à 10^{12} bactéries / grammes de selles, (3)) ;
- un nombre moins important de cellules de Paneth, cellules spécialisées dans la défense de l'hôte contre les agents microbiens du milieu extérieur. Ces cellules ne sont présentes qu'au fond des cryptes, adjacentes aux cellules souches qu'elles protègent afin d'assurer un renouvellement cellulaire pérenne (4).

De même, l'organisation macroscopique de la muqueuse colique diffère de celle du reste de l'intestin. En effet, la muqueuse colique est dépourvue de valvules conniventes et de villosités intestinales, et présente un nombre important de cryptes de Lieberkühn.

1.3. Différences entre côlon proximal et côlon distal

Le côlon est un organe qui ne présente pas les mêmes caractéristiques anatomiques et fonctionnelles en fonction des segments considérés. En effet, le côlon peut être schématiquement divisé en 2 parties, bien distinctes sur de nombreux plans : le côlon proximal (ou côlon droit qui va du cæcum à l'angle splénique) et le côlon distal (ou côlon gauche qui va de l'angle splénique au rectum) (fig.6).

Sur le plan embryologique, le colon proximal dérive de l'intestin moyen alors que le colon distal provient de l'intestin postérieur. La conséquence de cette origine différente est un apport vasculaire provenant de vaisseaux différents (respectivement vaisseaux mésentériques supérieurs et vaisseaux mésentériques inférieurs), et une innervation sous le contrôle de systèmes différents (respectivement parasymphatique crânien et parasymphatique sacré).

A cette dualité d'origine s'ajoute des fonctions physiologiques différentes. En effet, le côlon a pour fonction d'absorber de l'eau, du sodium et des ions chlorures, et de sécréter du potassium et des bicarbonates. L'enzyme responsable de ces échanges est l'anhydride carbonique, présente en forte concentration dans le colon proximal mais pas dans le côlon distal (5). Le côlon absorbe également des acides gras à chaînes courtes, qui sont la ressource énergétique principale de l'épithélium colique, et dont le métabolisme est dépendant du butyrate dans le côlon proximal et de l'acétate dans le côlon distal (5). Enfin, la concentration en sels biliaires est plus haute dans le côlon proximal, alors que la concentration bactérienne s'accroît en allant vers le côlon distal (6). Sur le plan fonctionnel, le côlon distal – et surtout la portion sigmoïde – est un organe de stockage soumis à des contraintes motrices tout à fait différentes du côlon proximal.

Enfin, sur le plan carcinologique, les voies moléculaires d'instabilité génomique diffèrent entre ces 2 organes. Les tumeurs du côlon proximal répondent plus souvent à une

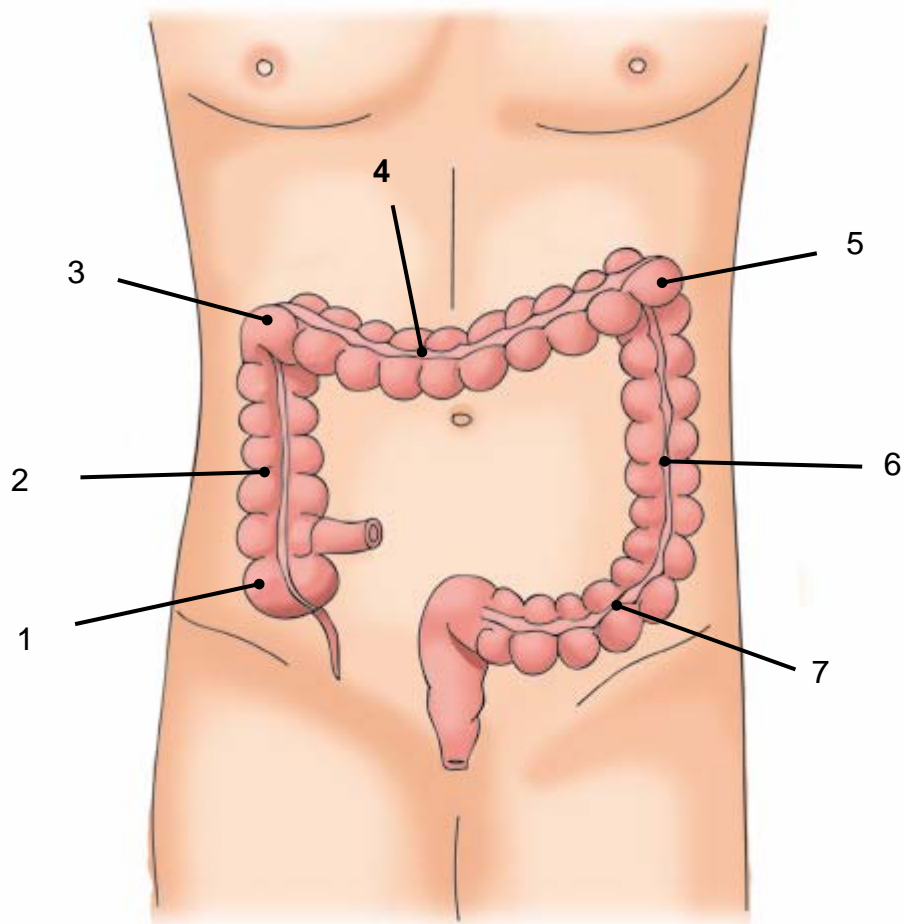


Figure 6 : Anatomie du côlon. Le côlon proximal fait suite à l'intestin grêle, et s'étend du cæcum à l'angle splénique. Le côlon distal (ou gauche) s'étend de l'angle splénique au rectum. (1) cæcum ; (2) côlon ascendant ; (3) angle hépatique ; (4) côlon transverse ; (5) angle splénique ; (6) côlon descendant ; (7) côlon sigmoïde. Source : Dr. M. Kracht, *Chirurgie Digestive*, Le Havre

instabilité des séquences microsatellites, alors que les tumeurs du côlon distal sont sous l'influence d'une instabilité chromosomique (7). Il en découle un pronostic différent lié à une évolution tumorale et à des capacités métastatiques différentes (8).

2. Epidémiologie du cancer colorectal

Le cancer colorectal est le 3^{ème} cancer le plus fréquent en France (après les cancers de la prostate et du sein), avec 37400 nouveaux cas par an (9) (fig.7). Il est responsable de 16800 décès annuels. Dans le monde, la répartition géographique est variable et fonction du niveau d'industrialisation. Le taux de CCR pour 100000 habitant peut varier d'un facteur 20 à 30 en fonction du lieu et du sexe (10). Par exemple chez l'homme, le taux d'incidence se situe entre 2,1 / 100 000 à Dakar (Sénégal) et 50 / 100 000 dans le Connecticut (USA). En ce qui concerne les femmes, ils varient de 1,7 / 100 000 à Dakar à 37,5 / 100 000 dans le Connecticut. Les taux d'incidence les plus élevés sont rapportés par les registres d'Amérique du Nord, d'Europe Occidentale et d'Australie. Des taux intermédiaires sont retrouvés en Europe de l'Est, des taux faibles en Asie et en Amérique Latine. Les taux les plus bas sont signalés en Afrique. De telles comparaisons sont à l'origine de plusieurs hypothèses concernant les facteurs étiologiques du cancer colorectal.

Son incidence est identique chez l'homme et la femme jusqu'à 50 ans et devient plus importante chez l'homme après 50 ans (11). Le sex-ratio est de 1.5. La survie à 5 ans est de 43% chez l'homme et de 46% chez la femme tous stades de gravité confondus (11). Depuis les années 1980, il y a eu un glissement progressif des cancers du côlon gauche vers le côlon droit (11). Les cancers du cæcum, du côlon ascendant et du transverse concernent plus

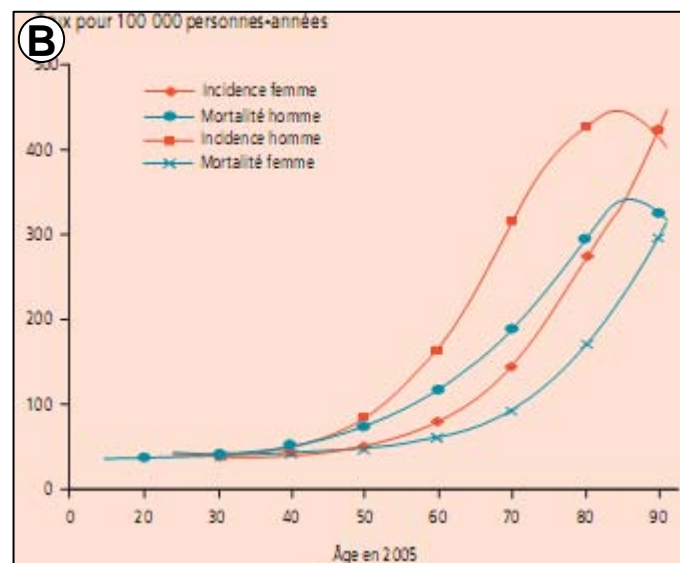
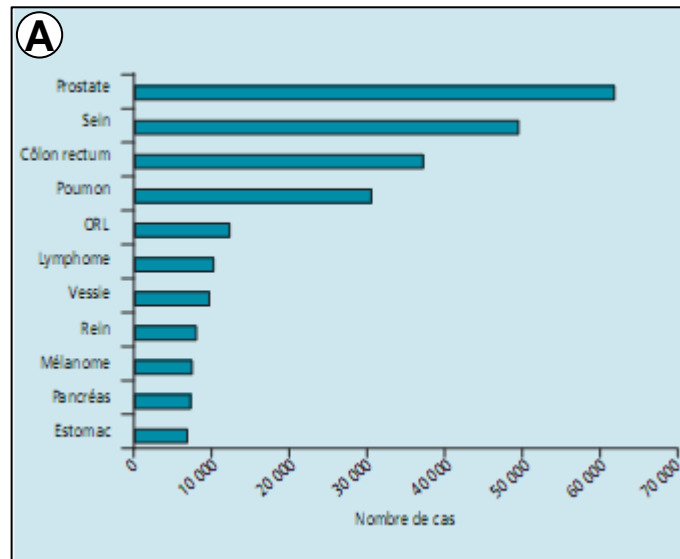


Figure 7 : Incidence et mortalité du CCR en France. (A) incidence comparée aux autres cancers dans la population française (période 1980-2005). Le cancer colorectal est le 3^{ème} cancer en fréquence, avec 37400 nouveaux cas par an. (B) incidence et mortalité du CCR en France selon le sexe. Le cancer colorectal est plus fréquent chez l'homme, avec un pic d'incidence décalé d'environ 10 ans. Cette différence est due essentiellement à une fréquence accrue de cancers du rectum chez l'homme. *Source : Belot et al., 2008*

souvent les femmes, tandis que les cancers situés à partir de l'angle gauche (côlon descendant, sigmoïde et rectum) se caractérisent par une prédominance masculine.

2.1. Définition du risque

Actuellement, trois niveaux de risque de CCR peuvent être identifiés (tableau 1) : les sujets à risque moyen, à risque élevé et à risque très élevé (12). Les sujets à risque moyen sont les individus de plus de 50 ans des deux sexes. Les sujets à risque élevé se répartissent selon leurs antécédents personnels ou familiaux. Les apparentés au 1^{er} degré de sujets atteints d'un CCR et les sujets ayant des antécédents familiaux d'adénome colorectal font partie de ce second groupe. Il est désormais établi que les apparentés au 1^{er} degré de patients présentant un gros adénome (> 1cm) doivent bénéficier de la même prise en charge que les apparentés du 1^{er} degré de patients atteints d'un CCR. Les sujets ayant des antécédents personnels de CCR ou d'adénome sont également à risque élevé. Chez les sujets atteints d'adénomes colorectaux, le risque de CCR dépend des caractéristiques des adénomes découverts initialement. Le risque est multiplié par près de 4 chez les sujets atteints d'un adénome avec structures villosités ou de plus d'un centimètre de diamètre et multiplié par 7 si ces adénomes sont multiples. Les sujets déjà traités pour un CCR constituent également un groupe à risque élevé de présenter un autre CCR (appelé CCR métachrone). Le risque est significativement plus élevé dans les cinq premières années suivant le diagnostic, ce qui confirme l'intérêt d'une surveillance régulière des patients. Les patients porteurs d'une maladie inflammatoire (rectocolite ulcéro-hémorragique, maladie de Crohn) ont un risque élevé de cancer colorectal, fonction de l'étendue et de l'évolution de la maladie. Enfin, les sujets à risque très élevé présentent des syndromes héréditaires bien définis dont les deux principales formes sont la polypose adénomateuse familiale (PAF) et le syndrome de Lynch, encore appelé syndrome HNPCC

Tableau 1 : Définition du risque de CCR en fonction du type de population

Risque de développer un CCR	Type de population
Moyen	Sujet de 50 ans et plus
Élevé	<ul style="list-style-type: none">- Sujet ayant un parent au 1^{er} degré de moins de 60 ans ou plusieurs parents au 1^{er} degré, atteints d'un CCR ou d'un adénome avancé- Sujets atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin, en cas de pancolite d'évolution prolongée- Sujets atteints d'acromégalie
Très élevé	Sujets appartenant à une famille atteinte de cancer à transmission héréditaire

(« *Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer* »). On estime que 15% des cancers colorectaux sont liés à une origine génétique (13). Les présentations familiales non syndromiques, définies par plus de 2 apparentés au 1^{er} degré touchés par une CCR, comptent pour 20% des cas (14).

2.2. Diagnostic et bilan d'extension

Le **diagnostic clinique** est très difficile. Le CCR reste très longtemps asymptomatique, et peut se révéler par différents symptômes : douleurs abdominales, troubles du transit intestinal d'apparition récente, modification récente de troubles anciens du transit intestinal, anémie, pertes de sang par l'anus (méléna lorsqu'il s'agit de sang digéré, rectorragies lorsqu'il s'agit de sang frais), altération de l'état général, palpation d'une masse abdominale. Parfois, le CCR peut se révéler par une complication (occlusion intestinale ou perforation). Il est à noter que les symptômes sont peu représentatifs de la gravité et de la localisation de la tumeur, en dehors des formes compliquées

Le **diagnostic paraclinique** du CCR repose sur l'endoscopie colique (coloscopie) qui permet de visualiser la tumeur et de réaliser des biopsies. Après examen anatomopathologique des biopsies, le diagnostic de certitude sera établi, duquel découle le bilan d'extension de la maladie cancéreuse, et son traitement.

Le **bilan d'extension** du CCR comporte, après un examen clinique complet, la recherche :

- de lésions synchrones du reste du côlon par une coloscopie ou, en cas de sténose, par une opacification colique avec du produit de contraste (gastrograffine) ;

- de métastases viscérales par un scanner thoraco-abdomino-pelvien avec injection de produit de contraste veineux. En cas de contre indication à cet examen, une radiographie pulmonaire et une échographie hépatique seront réalisés.

Le traitement sera abordé en détail dans le chapitre I-6.

2.3. Dépistage

En fonction du niveau de risque, des programmes de dépistage ont été élaborés au niveau national. Les informations relatives à ce dépistage, ainsi que les données épidémiologiques récentes sont disponibles sur le site de l'Institut National du Cancer (INCa) à l'adresse <http://www.e-cancer.fr/>.

- sujets à risque moyen : un test Hémocult II pratiqué chez les sujets âgés de 45 à 74 ans, tous les 2 ans, avec un suivi par coloscopie en cas de positivité, permet de diminuer la mortalité de 15 à 18%, 8 à 10 ans après le début du protocole, à condition que la participation de la population concernée soit d'au moins 50%.

- sujets à risque élevé (antécédents familiaux de cancer sporadique) une coloscopie doit être réalisée dès l'âge de 45 ans, ou 5 ans avant l'âge de diagnostic du cas le plus précoce de la famille. Cet examen est ensuite répété tous les 5 ans.

- sujets à risque très élevé : en cas de PAF, un examen endoscopique du rectum (rectoscopie) annuel doit être réalisée à partir de la puberté, afin de suivre l'évolution de la polypose et de définir l'âge de la colectomie totale prophylactique. En cas de HNPCC, une coloscopie doit être réalisée tous les deux ans, dès l'âge de 25 ans ou 5 ans avant l'âge de diagnostic du cas le plus précoce de la famille. Chez la femme, un examen gynécologique annuel après l'âge de 30 ans est recommandé, en raison du risque de cancer de l'endomètre.

3. Histoire naturelle du cancer colorectal

La carcinogenèse colique débute à partir d'une cellule épithéliale intestinale qui, sous l'effet de différents évènements, acquiert des atypies cyto-nucléaires (adénome dysplasique), puis échappe progressivement aux mécanismes de contrôle de la prolifération cellulaire et devient une cellule cancéreuse. Cette longue séquence, depuis la première cellule dysplasique jusqu'au cancer invasif, a été baptisée **séquence adénome-cancer** par Fearon et Vogelstein, et s'étend sur 10 à 15 ans d'évolution (15) (fig.8). La prolifération tumorale cancéreuse reste d'abord confinée à l'épithélium (carcinome *in situ*), puis s'organise progressivement et acquiert une néo-vascularisation qui lui permet de s'étendre en profondeur dans la paroi colique (fig.9). Lorsqu'elle atteint la sous-muqueuse riche en vaisseaux lymphatiques, elle peut s'étendre vers les ganglions lymphatiques régionaux le long des axes de drainage vasculaire. Au fur et à mesure de son évolution, des cellules tumorales peuvent se détacher, migrer dans la circulation générale, et être le point de départ de métastases viscérales.

3.1. Foyer de cryptes aberrantes

Le foyer de crypte aberrante (FCA) est la première anomalie décelable au sein de la muqueuse colique (16). Elle n'est pas repérable en coloscopie conventionnelle, et seule la chromoendoscopie au bleu de méthylène permet d'objectiver un aspect élargi des cryptes avec une augmentation de l'espace intercryptique (fig.10, page suivante) (17). Cette lésion ne comporte pas d'atypies cellulaires dans 95% des cas et reste donc bénigne (18). Cependant,

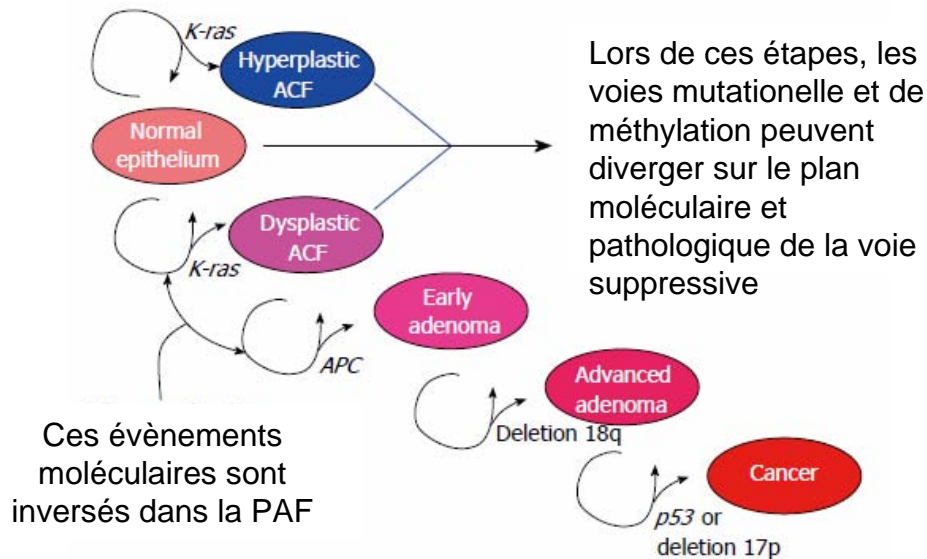


Figure 8 : séquence adénome-cancer du CCR et altérations génétiques impliquées dans cette séquence. À chaque étape intervient une mutation qui s'ajoute à la précédente et induit une modification phénotypique : mutation du gène APC (5q21), du gène Kras (12p12), des gènes SMAD4 ou DCC (18q21) et du gène TP53 (17p13). Dans la séquence adénome – cancer du CCR sporadique, la mutation du gène APC intervient après celle du gène K-ras. Dans la Polypose Adénomateuse Familiale, la mutation d'APC est le premier évènement. Dans les étapes initiales de cette séquence, les voies mutationnelles (instabilité microsatellitaire, MSI) et de méthylation peuvent remplacer la voie suppressive (instabilité chromosomique, CIN). *Source : Worthley et al., 2007.*

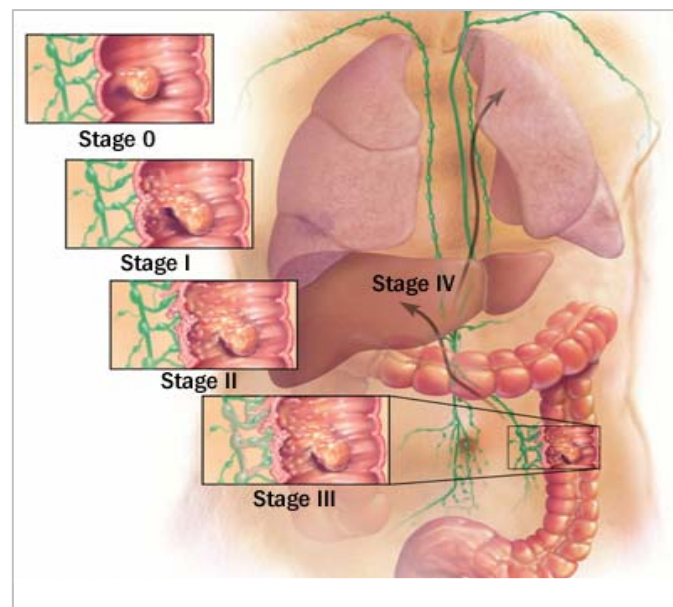


Figure 9 : schéma d'extension en profondeur du CCR dans la paroi colique. Au fur et à mesure de sa progression, la tumeur s'étend en profondeur dans la paroi colique (classe T de la classification TNM), envahit les ganglions lymphatiques (classe N de la classification TNM) et donne des cellules qui passent dans la circulation sanguine pour constituer des métastases viscérales (classe M de la classification TNM). On définit ainsi des stades en fonction de l'évolution de la tumeur. Stade 0 : adénome, lésion limitée à la muqueuse ; stade I : carcinome, envahissant les couches superficielles de la paroi colique ; stade II : carcinome envahissant les couches profondes de la paroi colique ; stade III : carcinome envahissant les ganglions lymphatiques régionaux ; stade IV : métastases à d'autres organes. *Source : Mayo foundation for medical research.*

lorsqu'un contingent d'atypies cellulaires est présent, le FCA devient alors dysplasique et définit ainsi le micro-adénome, lésion initiale de la séquence adénome-cancer.

Du point de vue histologique, les FCA sont une simple hyperplasie de l'épithélium colique, c'est-à-dire sans atypie nucléocytoplasmique, responsable d'un élargissement des cryptes et d'une augmentation de la distance inter-cryptes. Bénins dans 95% des cas, ils peuvent cependant s'associer à des phénomènes dysplasiques, avec une stratification des noyaux, des mitoses dans les deux tiers supérieurs des cryptes et une raréfaction des cellules caliciformes. Le FCA peut devenir dans 5% des cas un micro-adénome, 1^{er} stade de la séquence adénome cancer. La prolifération cellulaire anormale tend à l'accumulation des cellules dans la muqueuse et aboutit à la formation d'un polype qui va devenir macroscopiquement détectable, l'adénome.

3.2. Adénome et adénocarcinome non invasif

Les adénomes coliques sont des proliférations intra-épithéliales de cellules néoplasiques, ce qui signifie que tout adénome comporte de la dysplasie. La prévalence des adénomes augmente avec l'âge et atteint 30% chez des sujets de plus de 60 ans (19). Les adénomes se présentent dans plus de 90% des cas sous forme de polypes, c'est-à-dire d'une excroissance de la muqueuse, dont la taille et la forme peuvent varier (20). En effet, on parle de polype pédiculé lorsque la taille de la base d'implantation du polype est inférieure à celle du polype, et de polype sessile lorsque la taille de la base d'implantation du polype est supérieure à celle du polype (fig.11). Lorsqu'ils ne sont pas polypoïdes, les adénomes sont plans ; cette distinction macroscopique est importante pour l'évaluation des critères pronostiques des adénomes de haut grade.

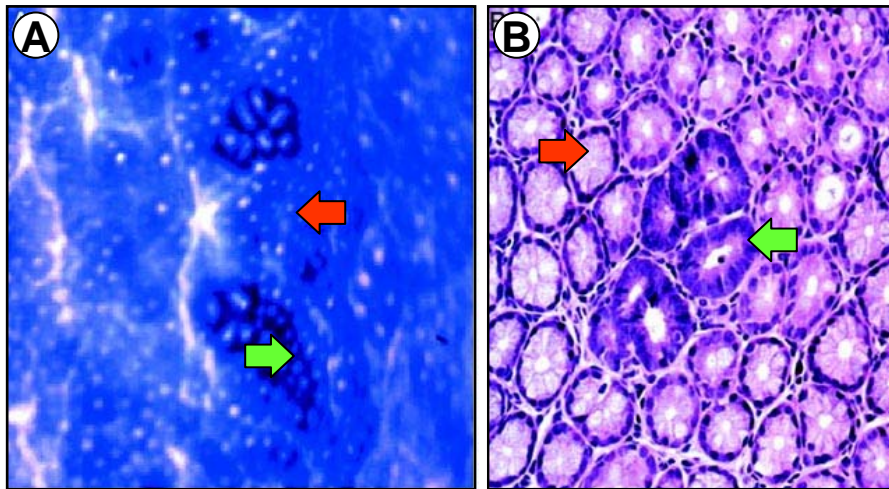


Figure 10 : Foyer de cryptes aberrantes. (A) en chromoendoscopie après coloration au bleu de méthylène. Flèche verte : foyer de cryptes aberrantes, flèche rouge : cryptes normales ; (B) coupe histologique au microscope optique X 100 après coloration HES. Flèche verte : foyer de crypte aberrante, flèche rouge : cryptes normales . *Source : Redston, 2001*

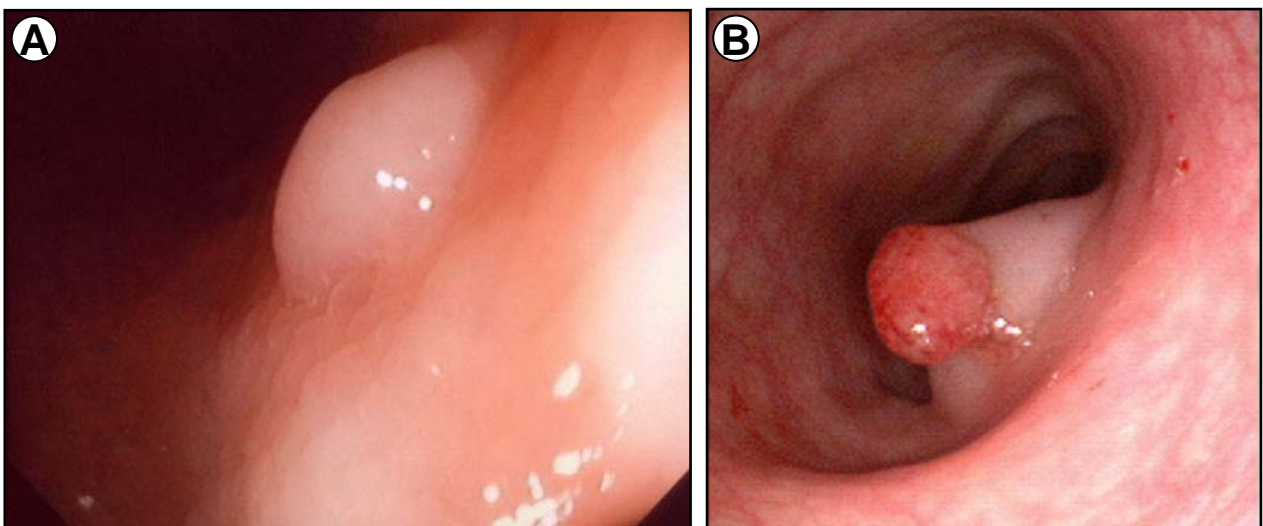


Figure 11 : Vue endoscopique d'un polype adénomateux. (A) polype plan, non pédiculé, qui s'apparente à une sur-élévation de la muqueuse. (B) polype pédiculé « en battant de cloche » définit par une extrémité renflée reliée à la muqueuse par un axe conjonctif effilé appelé « pied du polype ». *Source : [HTTP://www.nitisurgical.com/colon_cancer_pictures.htm](http://www.nitisurgical.com/colon_cancer_pictures.htm)*

D'un point de vue histologique, l'organisation Mondiale de la Santé individualise trois types de lésions adénomateuses avec un risque croissant de transformation tumorale : le type tubuleux, le type vilieux et le type mixte tubulo-vilieux. L'adénome tubuleux est le plus fréquent, observé dans 65 à 87% des cas (fig.12). L'adénome vilieux est plus rare (8 à 25% des cas) et la forme mixte tubulo-villeuse associant les deux formes précédentes n'est retrouvée que dans 5 à 10% des cas. A ces trois aspects classiques d'adénomes, s'ajoute un quatrième type histologique : l'adénome festonné (« *serrated adenoma* »). Décrit en 1990 par Longacre et Fenoglio (21), ce type d'adénome n'a vraiment été reconnu qu'à partir de 2002 (22). Cette entité, découverte à l'occasion d'études génomiques, est caractérisée par des atteintes des voies cellulaires différentes et comprend trois sous-types histologiques : le polype hyperplasique, l'adénome festonné sessile et l'adénome festonné traditionnel (fig.13). Ces trois lésions ont en commun l'architecture festonnée du revêtement des glandes mais diffèrent par les contours des glandes et par leur revêtement plus ou moins adénomateux et prolifératif.

Il existe différents types d'adénomes, selon leur histologie et leur degré de dysplasie. La dysplasie comprend des anomalies cellulaires (augmentation du rapport nucléocytoplasmique, hyperchromatisme, apparition d'un nucléole) et architecturales (pluri-stratification, perte de polarité, fusion des glandes). Ces anomalies sont classées en grade de dysplasie (bas grade ou haut grade). Le risque d'évoluer vers un cancer est d'autant plus grand que la dysplasie est importante. Ainsi selon le degré de dysplasie on distinguera des adénomes précancéreux dits de bas grade et des adénomes cancéreux dits de haut grade, qui sont l'équivalent de l'adénocarcinome *in situ*. Ce dernier est morphologiquement divisé en deux sous-types : l'adénocarcinome intra-épithélial (pas de franchissement de la lame basale) et l'adénocarcinome intra-muqueux (franchissement de la lame basale).

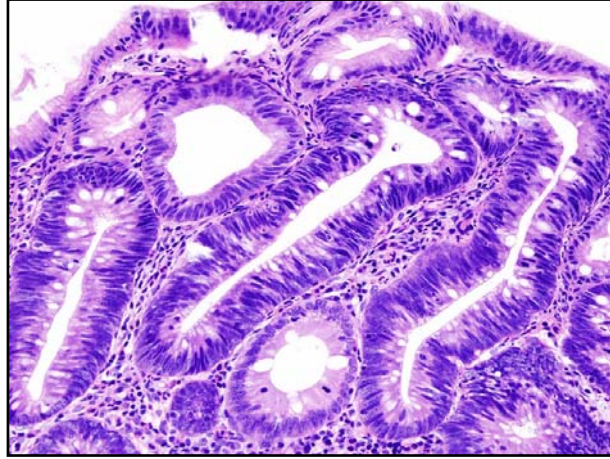


Figure 12 : Coupe histologique d'un adénome colique tubuleux au microscope optique x 100 après coloration HES. On note un aspect irrégulier des cryptes, entourées de chorion, avec un début de stratification des noyaux qui témoigne du caractère dysplasique de la lésion. Source : <http://www.it.wikipedia.org/>

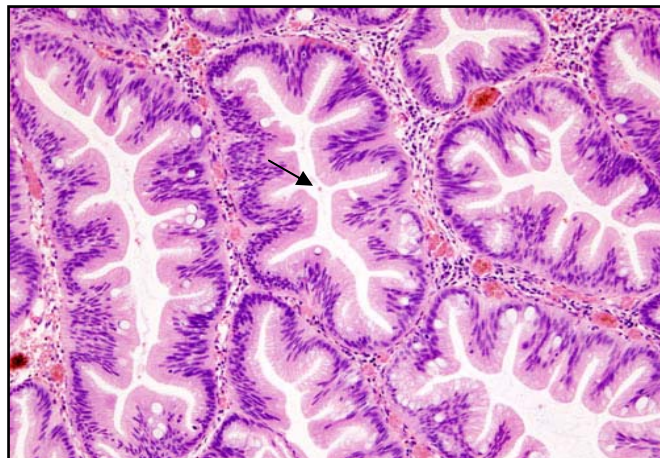


Figure 13 : Coupe histologique d'un adénome colique festonné au microscope optique x 100 après coloration à l'HES. L'aspect des cryptes (flèche) est irrégulier, mais conserve une organisation cylindrique monostratifiées glandulaire, sans anomalie cyto-nucléaire. Source : <http://www.en.wikipedia.org/>

Sur 1000 adénomes, 100 deviennent supérieurs à 1 cm et 25 deviendront cancéreux dans un délai de 10 à 20 ans (23).

3.3. Adénocarcinome invasif

L'adénocarcinome (ADK) sporadique est le type histologique le plus fréquent du CCR et fait suite à l'évolution d'un adénome de haut grade ou cancer intra-épithélial (fig.14). L'ADK est d'abord limité à l'épithélium colique (ADK intramuqueux ou *in situ*), puis s'étend progressivement en profondeur, franchit la *lamina propria* de la muqueuse colique et devient ADK invasif (fig.9, pages précédentes). A ce stade de l'évolution, l'ADK colique infiltre la paroi colique riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques. Il peut ainsi s'étendre aux ganglions et aux organes de voisinage, constituant ainsi des métastases.

Histologiquement, il s'agit d'adénocarcinomes (dans 98% des cas), que l'on qualifie de «Lieberkühn » pour les singulariser des autres adénocarcinomes du tube digestif. Le degré de différenciation tumorale est variable selon les cas, ils peuvent être:

- bien différenciés (lieberkühniens) dans 70 à 75% des cas, où ils gardent une structure glandulaire comparable au tissu sain ;
- moyennement différenciés (10%) où les structures glandulaires alternent avec des massifs cellulaires pleins sans architecture spécifique ;
- peu ou indifférenciés (5%) où prédominent les massifs cellulaires pleins ;
- colloïdes (10 à 15 %) lorsque les cellules dégénérées possèdent une composante mucineuse.

Dans de 2% des cas les tumeurs du colon sont de types sarcomes: lymphosarcomes, leiomyosarcomes.

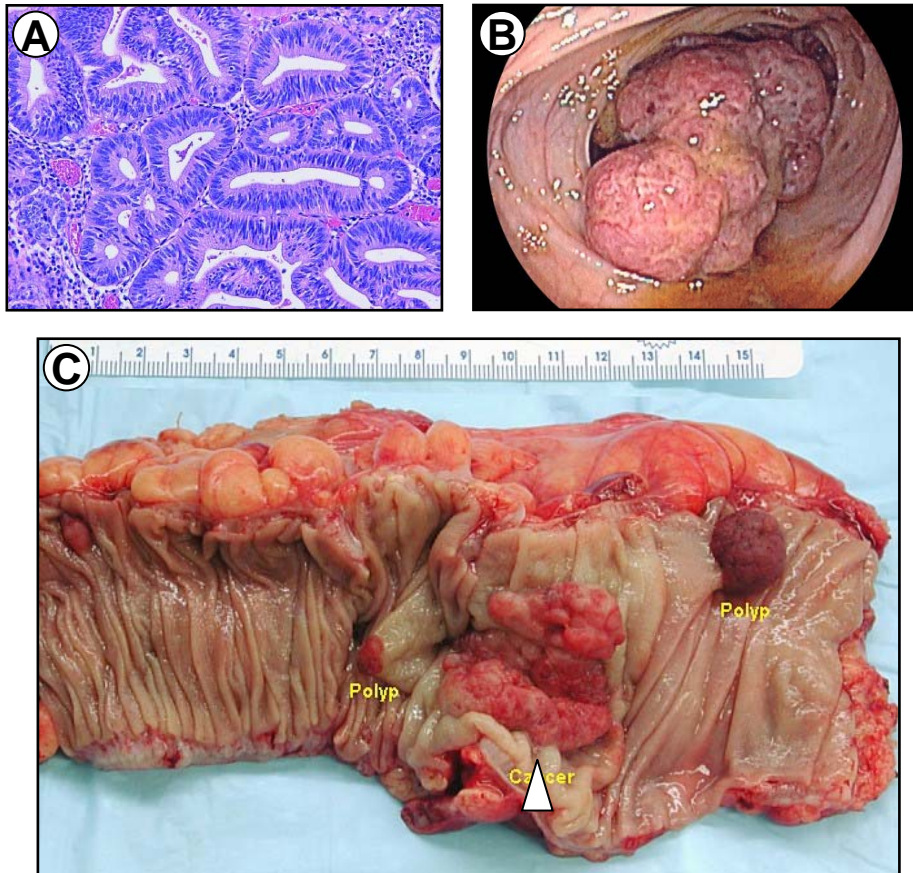


Figure 14 : adénocarcinome du côlon.

(A) vue d'une coupe histologique au microscope optique x 100 d'un adénocarcinome colique après coloration HES. Il s'agit d'un adénocarcinome bien différencié infiltrant, avec une perte de l'architecture cryptique remplacée par des glandes infiltrant le chorion, et une perte de la polarité cellulaire. *D'après le laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Clermont-Ferrand.*

(B) vue endoscopique : la tumeur colique apparaît comme un bourgeon muqueux obstruant la lumière colique. *D'après Dr. David M. Martin, Science Photo Library.*

(C) vue d'une pièce opératoire : aspect bourgeonnant et nécrotique de la tumeur, occupant l'hémicirconférence de la lumière colique (flèche). Deux autres lésions polypoïdes non dégénérées bordent le cancer. *Source : <http://commons.wikimedia.org/>*

3.4. Métastases ganglionnaires et viscérales

L'extension ganglionnaire est possible dès que le cancer atteint les couches de la paroi colique riches en lymphatiques, c'est-à-dire lorsqu'il dépasse la *lamina propria* (24). C'est un facteur pronostique péjoratif du CCR, qui signifie non plus une évolution strictement locale du CCR mais la diffusion à tout ou partie d'un segment colique.

L'extension métastatique aux autres viscères de proximité se fait par voie sanguine. Les métastases sont hépatiques dans 75% des cas, pulmonaires dans 15%, osseuses dans 5% et cérébrales dans 5%. Elles peuvent être synchrones (découvertes en même temps que le cancer colique) ou métachrones (apparaissant de façon retardée, soit plus d'un an après l'exérèse de la tumeur primitive). Elles signent une maladie généralisée dont l'évolution spontanée est très péjorative, avec une survie à 5 ans proche de 0% (25).

4. Facteurs de risque de cancer colorectal

Le développement d'une séquence adénome-cancer nécessite des milliers d'évènements mutationnels avant que l'un d'entre eux n'échappe aux mécanismes de détection et de défense cellulaires, ce qui rend compte du nombre important de facteurs endogènes et exogènes susceptibles d'intervenir dans le CCR. Bien qu'encore mal connus, ils sont essentiellement de deux types : liés au contact du sujet avec le milieu extérieur, indépendamment de sa prédisposition génétique (facteurs exogènes), et liés au sujet lui-même (facteurs endogènes).

4.1. Facteurs endogènes

Il s'agit de facteurs de risques génétiques, congénitaux ou acquis, liés à une affection ou un terrain prédisposant, indépendamment à *priori* de l'influence du milieu extérieur.

4.1.1. Risques génétiques

On estime que 5 à 6 % des CCR sont d'origine génétique (26). Ils sont rencontrés essentiellement dans 3 affections :

La polypose adénomateuse familiale (PAF) – La PAF représente environ 1 % des cancers colorectaux, soit une prévalence de 1 pour 5000-10000 (27). Cette affection se caractérise par l'existence de centaines, voire de milliers de polypes adénomateux au niveau du côlon et du rectum (fig.15). Leur aspect en coloscopie ou en anatomo-pathologie les rend indiscernables des adénomes sporadiques non héréditaires. Le risque de développer un cancer à partir de ces adénomes est de 100 %, sur une période de 10 à 20 ans, s'ils ne sont pas traités. La PAF peut apparaître chez un patient atteint de cette maladie dès l'âge de 10 ans, 80 % des individus présentent cette polypose à l'âge de 25 ans. Des manifestations extracoliques peuvent s'associer à la PAF : tumeurs desmoïdes, ostéomes, malformations dentaires, hypertrophie congénitale de l'épithélium pigmentaire rétinien, lipomes, kystes dermoïdes et polypes du tube digestif haut. De même, les cancers de la thyroïde, du système nerveux central et des voies biliaires sont plus fréquemment associées à la PAF (28). La PAF comprend 2 formes, la PAF classique (plusieurs centaines de polypes, 90% des PAF) et la PAF atténuée (< 100 polypes, 10% des PAF) (29). Deux gènes ont été identifiés comme pouvant être responsables de la PAF : le gène suppresseur de tumeurs *APC* (*adenomatous polyposis coli*) localisé chez

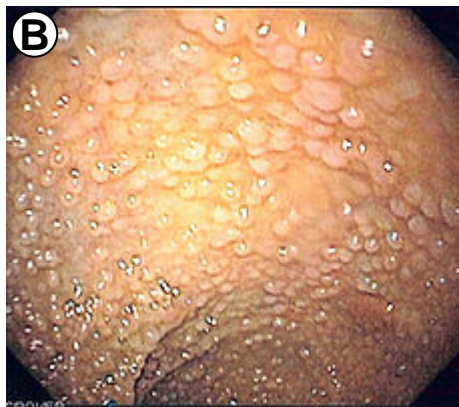
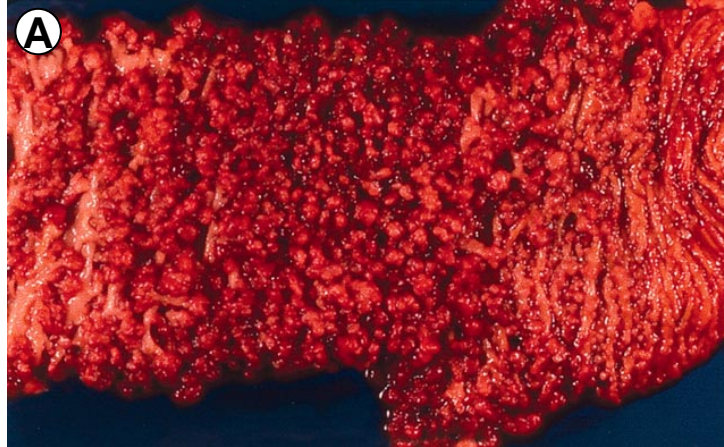


Figure 15 : Polypose adénomateuse familiale (PAF).

(A) détail macroscopique d'une pièce opératoire : des milliers de polypes de tailles différentes occupent la surface muqueuse. Il s'agit d'une forme classique de PAF, par opposition à la forme atténuée qui donne moins de polype (une centaine). *Source : Bronner, 2002.*

(B) vue endoscopique. *Source : <http://www.en.wikipedia.org/>*

l'homme en 5q21-22 à transmission autosomique dominante, et le gène *MYH* à transmission autosomique récessive. Le gène *APC* code la protéine APC qui intervient dans la voie Wnt/béta-caténine. L'inactivation du gène *APC* par une mutation conduit à l'activation permanente de cette voie et favorise ainsi une prolifération cellulaire incontrôlée (30). A ce jour 825 mutations germinales d'APC ont été rapportées (31). Ce gène est responsable de PAF classiques et de certaines formes atténuées. Le gène *MYH* code une protéine appartenant au système de réparation des bases de l'ADN, il s'agit d'une adénine glycosylase qui permet la réparation des lésions de l'ADN induites par les espèces réactives de l'oxygène présentes dans la cellule, plus particulièrement dans des conditions de stress. Ce gène est en général responsable de PAF atténuées. La PAF justifie une consultation génétique pour la recherche de la mutation constitutionnelle du gène responsable de cette maladie. Il est recommandé, chez toutes les personnes dont la mutation a été mise en évidence, ou chez les apparentés au 1er degré si la mutation n'est pas identifiée, de réaliser une coloscopie annuelle, au plus tard dès la puberté. En cas de polypose avérée, l'indication chirurgicale (exérèse du côlon et du rectum) se discute en fonction du nombre de polypes et de l'évolution de la maladie pour prévenir une dégénérescence néoplasique. L'âge pour réaliser cette chirurgie n'est pas fixé, mais le risque de cancérisation augmente avec le temps.

Le syndrome HNPCC (pour *hereditary non polyposis colorectal cancer*) est la forme la plus fréquente des cancers colorectaux familiaux : 3 à 5 % des CCR (26). Il s'agit d'une maladie génétique, autosomique dominante liée à la mutation de différents gènes de systèmes de réparation de l'ADN. Elle se manifeste par des tumeurs dont les caractéristiques ressemblent fortement au CCR sporadique, à tel point que ce syndrome est souvent méconnu. Mais contrairement à la PAF, dont les polypes n'affectent que le tube digestif, et au CCR

sporadique qui ne touche que le côlon, le syndrome HNPCC prédispose à d'autres cancers du spectre HNPCC :

- Restreint : endomètre, grêle, voies urinaires
- Élargi : estomac, pancréas, voies biliaires, système nerveux central (glioblastome), peau (adénome sébacé), œil (kératoacanthome).

Le diagnostic est évoqué lorsque les antécédents familiaux comportent 3 apparentés du premier degré atteints d'une pathologie du spectre des HNPCC à un âge inférieur à 60 ans (32) et sur 2 générations. Le syndrome HNPCC est caractérisé par l'anomalie du système de réparation de l'ADN (protéines MMR pour *MisMatch Repair*) dont les principaux gènes en cause sont *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*. Ce défaut de réparation de l'ADN s'exprime sur des séquences courtes répétées de 1 à 5 nucléotides appelées séquences microsatellites. Ces séquences étant répétées un grand nombre de fois, leur réplication comporte un risque d'erreur important : c'est l'instabilité microsatellitaire (MSI). Dans le CCR, 5 séquences microsatellites sont majoritairement susceptibles d'être mutées : 2 séquences mono-nucléotidiques BAT25 et BAT26 et 3 séquences di-nucléotidiques D5S346, D2S123, D17S250. Lorsque aucune de ces séquences n'est mutée, il s'agit du phénotype MSI-stable (ou MSS, il n'y a donc pas d'instabilité microsatellite). Lorsqu'une seule séquence est mutée, il s'agit d'un phénotype MSI-low (MSI-L) retrouvé fréquemment dans le CCR sporadique (10 à 15% des CCR sporadiques) ; lorsque 2 ou plus sont mutées, il s'agit du phénotype MSI-high (MSI-H) dont l'expression clinique est le syndrome HNPCC. On estime que le risque global de développer un CCR est de 80% à 80 ans en cas de syndrome HNPCC (33). En France, les indications de recherche d'un phénotype tumoral MSI ont été élargies afin d'optimiser la stratégie diagnostique du syndrome HNPCC/Lynch : elle est recommandée pour tout cancer colorectal ou du « spectre HNPCC » (endomètre, intestin grêle, urothélium, voies biliaires, estomac, ovaire) diagnostiqué à un âge inférieur à 60 ans ou quel que soit l'âge au diagnostic

chez un individu dont un apparenté au premier degré a été atteint d'un cancer colorectal ou du spectre de l'affection (32). En cas de phénotype MSI une orientation en consultation d'oncogénétique est proposée (pour recherche d'une mutation des gènes MMR sur l'ADN des lymphocytes circulants et dépistage familial éventuel en cas de positivité). Ces examens ne sont toutefois pas spécifiques car 15% des CCR sporadiques ont un phénotype MSI acquis dû à une mutation somatique au niveau tumoral de la protéine hMLH1.

La polypose juvénile familiale, affection à transmission autosomique dominante, est caractérisée par la présence de 50 à 200 polypes non adénomateux dits hamartomateux, c'est-à-dire constitués de cellules normales mais de proportion et de disposition anormales. Ces polypes siègent majoritairement dans le côlon et le rectum (98 %), plus rarement dans l'estomac, le duodénum et l'intestin grêle (34). S'y associent d'autres anomalies extra-digestives : cutanées (télangiectasie, nævus, alopecie), osseuses (hypertélorisme, kystes osseux), cérébrales (hydrocéphalie), cardio-vasculaires (communication interventriculaire ou malformation artério-veineuse). Les polypes ont un aspect macroscopique et histologique qui correspond habituellement à celui des polypes juvéniles solitaires (35). Ces polypes peuvent être siège de foyers de dysplasie et, dans quelques cas, de véritables adénomes ont été décrits à leur côté. Cette variante, appelée polypose héréditaire mixte est considérée actuellement comme une maladie distincte de la polypose juvénile (36).

La polypose juvénile présente une hétérogénéité génétique, c'est-à-dire qu'elle peut résulter de l'altération de différents gènes. Les mutations germinales du gène suppresseur de tumeur *SMAD4/MADH4*, localisé sur le chromosome 18q21, rapportées pour la première fois en 1998, ont été retrouvées dans environ 20 à 50 % des familles atteintes de polypose juvénile (37). D'autres gènes (*PTEN*, *BMPRIA/ALK3*) ont été suggérés dans la polypose juvénile familiale, mais leur implication reste controversée (38).

Le risque de dégénérescence carcinomateuse de ces polypes est d'environ 50% pour le colon et le rectum (39) et justifie le dépistage génétique des apparentés lorsque la mutation *SMAD4* a été identifiée chez un sujet index.

4.1.2. Pathologies coliques prédisposantes

Il s'agit essentiellement des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) telles que la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. L'agression permanente de l'épithélium intestinal prédispose à la survenue d'un cancer colorectal, par des mécanismes encore mal connus.

La maladie de Crohn (MC) est une affection inflammatoire chronique d'étiologie multifactorielle qui peut atteindre tous les segments du tube digestif, mais possède un tropisme particulier pour l'iléon, le côlon et l'anus. Les lésions sont habituellement segmentaires, asymétriques, et les localisations séparées par des zones saines (fig.16). Les localisations iléales, coliques ou iléocoliques et anopérinéales représentent 95 % des cas.

Le risque de cancer colorectal chez les patients atteints de MC est multiplié par 3.7 par rapport à la population normale (40). Environ 5% des patients MC développeront un CCR 20 ans après le diagnostic de leur maladie inflammatoire (41). Contrairement à la rectocolite hémorragique, l'âge de début de la maladie semble davantage rentrer en jeu que la durée d'évolution (42). Le sur-risque de cancer colorectal dans la MC est en général expliqué par l'existence d'une inflammation chronique, responsable de dysplasie, et dont le potentiel dégénératif est clairement établi. Cette caractéristique implique la nécessité d'une surveillance endoscopique spécifique pour le dépistage du cancer colorectal, qui, selon les recommandations de l'ANAES (2004), doivent avoir lieu tous les 3 ans après 10 ans

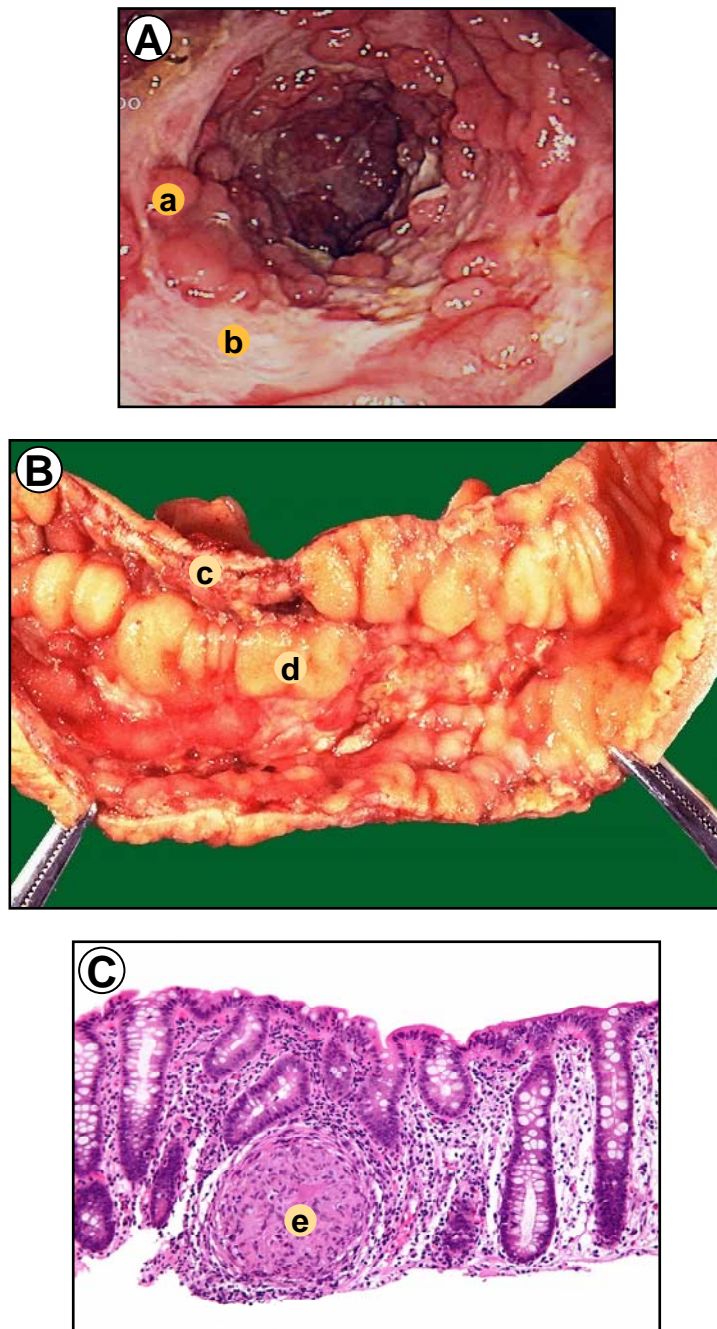


Figure 16 : Maladie de Crohn.

(A) aspect endoscopique au niveau de l'iléon terminal : pseudopolypes inflammatoires (a) alternant avec des plages ulcérées tapissées de fausses membranes (b).

(B) vue macroscopique d'une pièce de résection iléale : les multiples poussées inflammatoires et leur cicatrisation fibreuse donnent une paroi colique épaissie (c) avec des pseudopolypes inflammatoires (d)

(C) aspect histologique de la muqueuse au microscope optique x 100 après coloration en HES: le chorion est le siège d'un granulome inflammatoire typique de la maladie de Crohn (e).

Source : <http://en.wikipedia.org/>

d'évolution de la maladie, et de façon plus rapprochée en cas de facteurs de risques supplémentaires (antécédents familiaux de cancer colorectal, antécédents personnels d'adénomes dysplasiques).

La rectocolite hémorragique (RCH) est une affection inflammatoire qui touche exclusivement la muqueuse du côlon et du rectum, d'étiologie inconnue, évoluant par poussées. Elle atteint constamment le rectum et s'étend de manière continue plus ou moins haut vers le cæcum, respectant l'intestin grêle (fig.17).

Le risque de CCR dans la RCH dépend de l'âge de début de la maladie, de l'ancienneté des lésions, de l'étendue de la maladie, de l'association à d'autres troubles dys-immunitaires (cholangite sclérosante notamment) et des antécédents personnels ou familiaux d'adénomes ou de CCR (pour revue, (43)). Le risque de CCR est évalué à 2% après 10 ans d'évolution, 8% après 20 ans et 18% après 30 ans (40). Ce risque est multiplié par 2.8 en cas d'atteinte du colon distal, et de 14.8 en cas d'atteinte de tout le côlon. De façon similaire à la MC, la surveillance endoscopique se justifie donc, au rythme de 1 coloscopie tous les 2 à 3 ans après 10 ans d'évolution, à adapter en fonction de l'existence d'autres facteurs de risque.

Les polypes non adénomateux :

- Le polype juvénile est une lésion hamartomateuse constituée de glandes tortueuses au revêtement hyperplasique associées à un chorion inflammatoire (pour revue, (44)). Sa localisation préférentielle est le rectum, chez le sujet jeune. Le plus souvent sporadique, il n'a alors pas de potentiel de transformation cancéreuse. Ce potentiel est par contre élevé lorsqu'il est associé à une polypose juvénile (cf. chapitre 4.1.1).
- Le polype de Peutz-Jeghers est un polype hamartomateux et siège le plus souvent au niveau de l'intestin grêle et de l'estomac, mais peut être retrouvé dans le côlon (45).

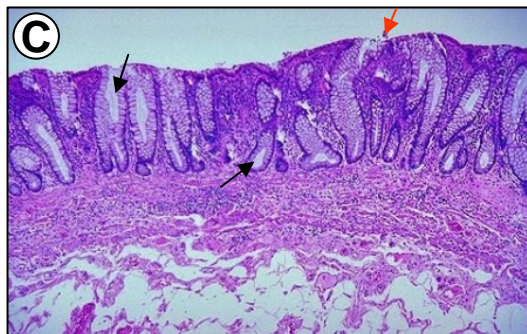
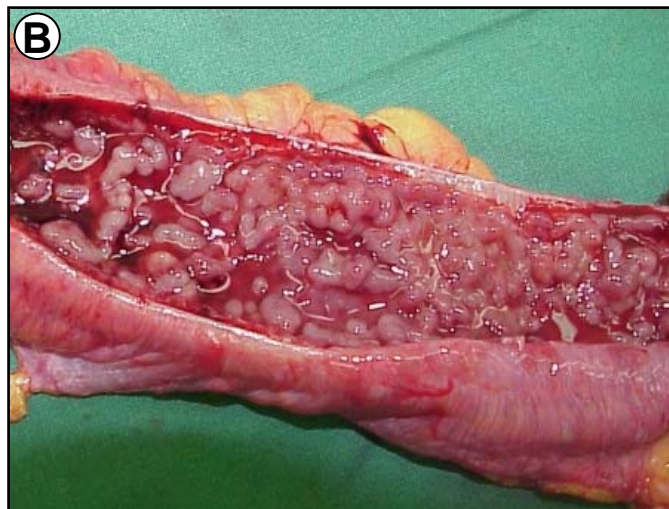


Figure 17 : Rectocolite hémorragique.

(A) vue endoscopique d'un patient en poussée : muqueuse simplement odématisée et granitée masquant les vaisseaux sous-muqueux et saignant au contact ou en nappe. Les lésions sont diffuses, sans intervalle de muqueuse saine. Il n'y a habituellement pas de pseudopolype ni de sténose comme dans la maladie de crohn, car seule la muqueuse est touchée dans cette affection.

(B) vue macroscopique d'une pièce opératoire : aspect œdématisé et saignant en nappe. La paroi colique n'est pas épaissie car l'atteinte n'est pas transmurale.

(C) aspect histologique de la muqueuse au microscope optique x 25 : aspect inflammatoire de la muqueuse, avec des érosions muqueuses superficielles (flèche rouge) et des abcès cryptiques (flèches noires).

Source : Dr. David Lockwood, Princess Alexandra Hospital, Brisbane

Ce polype sessile ou pédiculé a une architecture caractéristique en arbre (aussi dénommé « *christmas tree* »), avec un revêtement mucipare de type hyperplasique et un chorion parfois occupé par des fibres musculaires lisses perpendiculaires à la lumière intestinale. Le revêtement est parfois mixte hyperplasique et adénomateux, d'où le risque de transformation cancéreuse.

4.2. Facteurs exogènes

Ce sont essentiellement les facteurs alimentaires et ceux liés au mode de vie. Ils sont suggérés par les différences d'incidence entre pays occidentaux et pays d'Afrique, et par le fait que les migrants de pays de faible incidence récupèrent le même niveau de risque du pays d'accueil dès la première génération (46). En outre, on observe dans un même pays des différences d'incidence entre différents groupes religieux ou ethniques, dues probablement à des habitudes de vie différentes (Etats Unis, Inde, Israël et Singapour) (47).

La consommation excessive de viande rouge et de charcuterie constitue un facteur de risque ($> 160\text{g} / \text{jour}$ vs $< 20\text{g}/\text{j}$) (48). Les fruits auraient un rôle protecteur non retrouvé dans toutes les études. La consommation de légumes, de poissons et de volailles n'a aucun effet sur le cancer du côlon (49).

Le tabac, la consommation excessive d'alcool sont des facteurs de risque. Une activité physique régulière est au contraire un facteur protecteur (49).

L'obésité (indice de masse corporelle $\text{IMC} > 30 \text{ kg}/\text{m}^2$) augmente le risque de CCR de 20% par rapport à des sujets normaux ($\text{IMC} < 25 \text{ kg}/\text{m}^2$) et jusqu'à 45% en fonction de l'importance de l'obésité (50). Le risque est supérieur chez les hommes par rapport aux femmes (41% vs 8%). Pour une augmentation de l'IMC de $2 \text{ kg}/\text{m}^2$, le risque de CCR augmente de 7% (4-10%). Pour une augmentation du périmètre abdominal de 2 cm le risqué

de CCR augmente de 4% (2-5%). Le risque lié à l'obésité est plutôt valable pour les cancers du côlon que du rectum, et s'associe plus souvent au phénotype MSI (50).

Le diabète de type 2 est un facteur de risque, surtout pour les cancers du colon gauche (49, 51). A contrario, la lithiase vésiculaire est un facteur de risque plutôt pour les cancers droits (51).

La prise prolongée d'aspirine (ou d'anti-inflammatoires non stéroïdiens) réduit le risque de cancer colorectal. Mais ce bénéfice de l'aspirine ne devient significatif que pour des durées de prise supérieures à 10 ans et pour des doses de plus de 14 comprimés (de 325 mg) par semaine (52).

5. Facteurs pronostiques

5.1. Cliniques

5.1.1. Age

L'âge est un facteur pronostique dans le CCR, mais probablement davantage relié à l'état de santé du patient qu'à l'agressivité du CCR. L'âge élevé est associé avec une forte prévalence des maladies cardiovasculaires (53), et avec un score ASA (*American Society of Anesthesiologists* – score permettant d'évaluer le risque opératoire) significativement supérieur (54). Ainsi, l'âge des patients a un impact décisif dans la survie à court terme des patients candidats à une chirurgie pour CCR, et est couramment pris en compte avant toute chirurgie (55).

5.1.2. Sexe

Les hommes ont un pronostic défavorable par rapport aux femmes après chirurgie d'exérèse du CCR (56, 57). Plusieurs hypothèses expliquent ce phénomène. Wichmann et collaborateurs ont suggéré que ces différences étaient liées à l'effet protecteur des stéroïdes chez la femme et/ou aux effets néfastes de la testostérone sur la fonction immunitaire chez l'homme (58). En effet, après la ménopause, cette différence disparaît et le risque devient équivalent chez l'homme et la femme (59). Une autre hypothèse est la réaction inflammatoire systémique chronique due au cancer, plus importante chez l'homme que chez la femme (60). Il a été démontré que cette réaction ou réponse inflammatoire chronique était associée à une augmentation du taux de récurrence et une diminution de la survie des patients atteints de CCR (61, 62). De plus cette réaction inflammatoire s'associe à une augmentation du risque de décès par maladie cardiovasculaire indépendamment du risque lié au CCR (63-65). Enfin, il a été démontré que la carcinogenèse était dépendante du sexe, et que les femmes étaient plus propices à développer des tumeurs du côlon proximal avec un phénotype d'instabilité microsatellitaire (MSI) au meilleur pronostic (66, 67).

5.1.3. Cancer perforé et cancer en occlusion

Environ 15% des CCR se présentent sous forme compliquée d'une occlusion ou d'une perforation (68, 69). Cette présentation clinique augmente la morbidité et la mortalité postopératoires, et diminue la survie à 5 ans d'environ 20% par rapport aux formes non compliquées (70). Le pronostic de ces malades est influencé par l'état général souvent très détérioré, qui explique la proportion plus faible de patients ayant recours à la chirurgie curatrice par rapport à des patients non compliqués (71). De plus, beaucoup de patients – notamment en cas de perforation – présentent une infection généralisée lors de l'admission (péritonite ou septicémie) qui grève le pronostic vital et engendre une immunodépression,

facteur de récurrence néoplasique (72). Cependant, la majorité des décès et complications postopératoires semblent être davantage liées au patient qu'à la tumeur elle-même. En effet, il n'est pas évident que l'existence d'une perforation tumorale soit associée à un risque de récurrence supérieur (73, 74). De plus, les tumeurs perforées et/ou en occlusion ont souvent un stade TNM avancé : après alignement sur ces facteurs de mauvais pronostic, il ne ressort pas de différence évidente entre les tumeurs de présentation compliquée ou non compliquée (75, 76). D'ailleurs une étude récente a montré que les tumeurs de stade II de la classification de l'UICC/AJCC diagnostiquées à un stade de complication ne bénéficiaient pas du traitement adjuvant par chimiothérapie qui est pourtant classiquement administré chez ces malades (77).

5.2. Chirurgicaux

5.2.1. Marges de résection et maladie résiduelle

L'évaluation de la maladie résiduelle (R) établit le statut de la maladie après traitement (curatif ou palliatif) quel que soit son type (chirurgie seule, radiothérapie seule, chimiothérapie seule ou traitements combinés). La qualité de l'exérèse est évaluée selon le schéma de Hermanek (78) : absence de résidu tumoral microscopique (R0), présence d'un résidu tumoral microscopique (R1), présence d'un résidu tumoral macroscopique (R2). Les limites d'exérèse considérées sont les limites *longitudinales* (proximale et distale) mesurées le long du tube digestif et la limite *circonférentielle* (ou latérale) mesurée entre la zone d'extension maximum de la tumeur et la section chirurgicale (uniquement pour la chirurgie du rectum).

La qualité de l'exérèse (R) est un facteur pronostic indépendant dans le cancer colorectal, mais quasi-exclusivement étudiée au niveau du rectum. En effet, le côlon étant un organe libre et mobile dans la cavité abdominale, le risque de résection incomplète (R1 ou

R2) de la tumeur primitive est très faible de l'ordre de 1% (78), et ce n'est qu'avec les lésions très avancées envahissant les organes de voisinage (tumeur T4) que ce taux s'élève à 13% (79). Pour ces lésions, le pronostic est davantage lié à la taille de la tumeur qu'à un éventuel résidu microscopique, d'autant que ces patients sont candidats à une chimiothérapie postopératoire qui efface encore davantage le facteur pronostic R.

5.2.2. Complications postopératoires locales

Ce sont essentiellement les perforations et abcès postopératoires survenant sur les sutures digestives de rétablissement de la continuité. Outre le risque vital encouru représenté par la péritonite postopératoire indépendante du cancer, les complications locales après chirurgie d'exérèse d'un cancer colique ou rectal péjorent le pronostic à long terme du CCR (80-83). Ce phénomène s'explique par une augmentation du risque de récurrence liée à l'existence d'une immunodépression relative liée au sepsis qui accompagne en général ces complications (72).

5.3. Histopathologiques

Ce sont des facteurs pronostiques identifiés sur la tumeur elle-même, le plus souvent après résection chirurgicale de la tumeur.

5.3.1. Stade TNM

La classification TNM est la classification internationale histopronostique de référence, sur laquelle repose le traitement du cancer colorectal. Elle distingue de façon indépendante cinq niveaux d'envahissement pariétal (Tis, T1, T2, T3 et T4), trois degrés d'extension ganglionnaire (N0, N1 et N2) et la présence ou non de métastases (M0 et M1)

(Tableau 2). Quatre stades sont ainsi individualisés (Tableau 3, page suivante) avec une survie à 5 ans et un risque de récurrence définis pour chacun de ces stades (84). C'est d'ailleurs cette classification histopronostique qui définit la réalisation d'un traitement adjuvant postopératoire. En fonction de l'envahissement local (T), la survie à 5 ans est de l'ordre de 100% pour les tumeurs Tis, 90 à 95% pour les tumeurs T1 et T2, 85% pour les T3 et 72% pour les T4 (85).

Il est difficile de chiffrer l'impact sur la survie qu'implique la présence de métastase ganglionnaire, notamment parce que tout patient N+ reçoit une chimiothérapie adjuvante, ce qui n'est pas forcément le cas des patients N- (86-88). On peut cependant estimer que les taux de survie à 5 ans chutent de 70-85% pour les patients N- à 27-42% pour les patients N+, et que le risque de récurrence double en cas d'envahissement ganglionnaire (84, 85, 89). Le nombre de ganglions envahis constitue également un facteur pronostic, puisque l'envahissement N2 fait chuter de 20% la survie à 5 ans, indépendamment du stade T. L'extension ganglionnaire est corrélée à d'autres critères anatomopathologiques qui sont également des facteurs de pronostic : l'extension en profondeur de la lésion primitive (le risque de développer des métastases ganglionnaires est de 10% pour les cancers limités à la sous-muqueuse, et de 74% pour ceux dépassant la musculature) et le degré de différenciation histologique de la lésion primitive (le risque de développer des métastases ganglionnaires est de 25% pour les cancers bien différenciés, et de 80% pour les cancers indifférenciés).

Les métastases viscérales, et notamment hépatiques, ne sont accessibles à la résection chirurgicale complète que dans 20% des cas : la survie à 5 ans s'améliore alors considérablement, avec un taux d'environ 30% (90). Elles signent une maladie généralisée dont l'évolution spontanée est très péjorative, avec une survie à 5 ans proche de 0% en l'absence de résection chirurgicale (25).

Tableau 2 : Classification histopronostique TNM selon l'UICC/AJCC. Description des critères recherchés pour l'évaluation de l'extension locale de la tumeur (T), l'extension ganglionnaire (N) et l'extension métastatique viscérale (M).

T (*Tumor*) – Tumeur primitive

T X T 0	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
	Pas de signe de tumeur primitive
	Carcinome <i>in situ</i> : intra-épithélial ou envahissant la lamina propria (chorion de la muqueuse)
	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
	Tumeur envahissant la musculature
T 1	Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péri-coliques ou péri-rectaux non péritonisés
	Tumeur envahissant directement d'autres organes ou d'autres structures et/ou perforant le péritoine viscéral
T 2	T4a : tumeur perforant le péritoine viscéral
	T4b : tumeur envahissant directement d'autres organes ou d'autres structures

N (*Nodes*) – Adénopathies régionales

N X N 0	Renseignements insuffisants pour classer les ganglions lymphatiques régionaux
	Pas de métastase ganglionnaire régionale
	Métastases dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
N 1	N1a Métastases dans 1 seul ganglion régional
	N1b Métastases dans 2-3 ganglions lymphatiques régionaux
	N1c Nodules tumoraux (c'est-à-dire satellites) dans la sous-séreuse ou dans les tissus mous non péritonéalisés péri-coliques ou péri-rectaux <u>sans</u> atteinte ganglionnaire lymphatique
N 2	Métastases dans ≥ 4 ganglions lymphatiques régionaux
	N2a Métastases dans 4 à 6 ganglions lymphatiques régionaux
	N2b Métastases dans 7 ou plus ganglions lymphatiques régionaux.

M (*Metastasis*) – Métastases à distance

M 0	Pas de métastase à distance
	Présence de métastases à distance
M 1	M1a Métastases dans un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s) non régional(aux))
	M1b Métastases dans plus d'un organe ou dans le péritoine.

Tableau 3 : Définition des différents stades du CCR à partir de la classification TNM

STADE	TNM		
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade I	T1, T2	N0	M0
Stade II	T3, T4	N0	M0
Stade IIA	T3	N0	M0
Stade IIB	T4a	N0	M0
Stade IIC	T4b	N0	M0
Stade III	Quel que soit T	N1, N2	M0
Stade IIIA	T1, T2	N1	M0
	T1	N2a	
Stade IIIB	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
Stade IIIC	T4a	N2a	M0
	T3, T4a	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stade IV A	Quel que soit T	Quel que soit N	M1a
Stade IVB	Quel que soit T	Quel que soit N	M1b

5.3.2. Invasion lymphatique, veineuse et péri-neurale

A côté de la classification TNM, d'autres caractéristiques tumorales ont été identifiées comme facteurs prédictifs de récurrence du CCR. Au cours de la progression tumorale, l'invasion veineuse et l'invasion lymphatique représentent des étapes cruciales dans la formation de micro-métastases et la croissance macroscopique de tumeurs dans des sites secondaires. Plusieurs études ont identifié ces deux caractéristiques histopathologiques comme facteurs pronostiques défavorables indépendants (91, 92). Cependant, aucun consensus n'est à l'heure actuelle validé concernant l'évaluation standardisée de l'invasion vasculaire (93).

L'invasion néoplasique périnerveuse est un mode d'extension néoplasique le long des gaines nerveuses péri-tumorales. Elle est associée à un risque augmenté d'envahissement ganglionnaire dans les tumeurs T1 et T2 de la classification TNM (94). Elle est également un facteur pronostique indépendant et semblerait intéressante pour la décision de chimiothérapie postopératoire (95, 96).

5.3.3. Bourgeoisement tumoral (tumor budding)

Le "Tumour budding" correspond au bourgeoisement des structures glandulaires en groupes de 1 à 4 cellules au niveau de la marge d'invasion du CCR (97). Ces petits bourgeois tumoraux ont les propriétés de cellules malignes pluripotentes, et peuvent se redifférencier localement ou dans un site métastatique (98). Le phénomène de « budding » refoule le tissu sous-jacent, et doit être différencié de la bordure tumorale qui l'infiltré (98). Plusieurs études ont montré que ce bourgeoisement tumoral était un facteur de risque indépendant d'infiltration locale, de métastases ganglionnaires et viscérales, de récurrence et mauvaise survie après chirurgie curative (99-103). L'absence de bourgeoisements tumoraux est aussi corrélée à la présence de lymphocytes intra- et péri-tumoraux, qui relatent une réaction immunitaire

sein de la tumeur responsable d'une destruction de ces bourgeons, et donc un pronostic meilleur (103).

5.3.4. Grade tumoral

Le grade (ou degré) de différenciation tumorale est basé sur le pourcentage de glandes en formation au sein de la tumeur (104). Plusieurs études ont montré le caractère péjoratif des tumeurs peu différenciées, mais souvent de par leur relation avec le risque d'envahissement ganglionnaire et d'extension en profondeur dans la paroi colique (105, 106). Une seule étude a montré qu'il s'agissait d'un facteur pronostique indépendant, et uniquement si l'on considère la fraction tumorale la moins différenciée (107).

5.4. Moléculaires et cellulaires

5.4.1. Phénotype MSI

Le CCR répond à 2 grandes voies métaboliques : la voie de l'instabilité chromosomique (CIN, 75 à 85% des CCR) et la voie de l'instabilité des séquences microsatellites (MSI, 15 à 20% des CCR). Parmi ces derniers, la plupart sont de phénotype MSI-L et se localisent plutôt dans le côlon proximal, avec une mucosécrétion abondante, un stroma riche en lymphocytes souvent disposés en follicules. Ils sont fréquemment multiples et, en dépit de leur multiplicité et de leur indifférenciation, ont un pronostic meilleur que les tumeurs sans instabilité génomique (108-110). Cependant, bien que les tumeurs MSI soient de meilleur pronostic, elles semblent être plus résistantes aux traitements chimiothérapeutiques à base de 5-fluoro-uracile (111-115).

5.4.2. Mutations LOH18q et p53

La perte de matériel génétique sur le bras long du chromosome 18 a été rapportée dans plus de 70% des CCR (116). Le gène *DCC* qui se situe en 18q21 est reconnu comme un acteur clé dans la carcinogenèse colorectale. Les patients atteints de CCR ont démontré un pronostic significativement moins bon lorsqu'il y avait une perte allélique en 18q (117-120).

Le gène *p53* localisé en 17p13 code une protéine intervenant dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la différenciation, de la réparation des lésions de l'ADN et dans l'apoptose. P53 influence la phase d'initiation, puis de progression du processus néoplasique dans les tumeurs solides et en particulier dans les cancers colorectaux (cf. chapitre II-2). Bien que de nombreuses études aient montré que le gène *p53* était fréquemment muté dans les cancers colorectaux (50 à 70 % des cas), la signification pronostique du statut *p53* demeure un sujet très controversé. De nombreuses études montrent que *p53* a une valeur pronostique péjorative indépendante, d'autres en font un critère évolutif péjoratif dépendant du stade et d'autres enfin ne l'associe pas à un mauvais pronostic (121).

5.4.3. Immunité tumorale

L'impact du pronostic des lymphocytes intra-tumoraux (TILs) et de la réponse immunitaire contre la tumeur est de plus en plus reconnue (122). Baker et collaborateurs ont récemment démontré sur plus de 1000 CCR que l'accroissement du nombre de TILs était étroitement relié aux stades précoces de la tumeur, et à l'amélioration de la survie chez les patients de phénotype MSI-S (123). Les lymphocytes CD8+ intra-tumoraux expriment des médiateurs cytotoxiques, ce qui rend compte du meilleur pronostic de ces tumeurs (124, 125). Cependant, cette association positive avec le pronostic n'est pas généralisable aux tumeurs de phénotype MSI qui ont elles-mêmes une colonisation abondante naturelle par des TILs (126). Le rôle de la réponse immune adaptative dans le CCR a été également exploré par Galon et

collaborateurs, dont les résultats soulignent l'importante valeur pronostique du type, de la densité et de la localisation des cellules immunitaires, indépendamment de la classification TNM (127).

5.4.4. Albumine sérique

L'albumine est une protéine plasmatique sécrétée par les hépatocytes. Elle représente la fraction la plus importante (55%) des protéines du plasma sanguin chez l'homme, son taux plasmatique est d'environ 40 g/L. La mesure de l'albumine sérique fait partie des tests de la fonction hépatique et est effectuée chez la plupart des patients avant le diagnostic de cancer ou tout programme thérapeutique. Un taux bas d'albumine sérique est un indicateur vital et un facteur de pronostic du CCR (128-130). Le taux d'albumine est classiquement employé comme marqueur biologique pour évaluer le statut nutritionnel des patients. L'hypoalbuminémie est associée avec la présence d'une réponse systémique inflammatoire, d'une perte de poids et du volume métastatique (131, 132). L'explication possible de l'impact pronostic de l'albumine réside d'une part, dans son association avec la cachexie qui est un facteur de risque de complications postopératoires et donc de diminution de la survie, et, d'autre part, dans la réponse systémique inflammatoire à laquelle elle est associée (128, 130).

5.4.5. ACE ou CEACAM5

L'ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) ou CEACAM5 (*carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 5*) est une glycoprotéine de haut poids moléculaire (200 kDa) décrite pour la première fois par Gold et Freedman en 1965 (133). Elle appartient à la famille des CEACAM, glycoprotéines de membranes jouant un rôle clé dans les phénomènes biologiques d'adhésion cellulaire, d'immunité et d'apoptose (134, 135). L'ACE est synthétisé par le fœtus durant les premiers mois de la gestation. Il est présent à la surface de l'intestin grêle, du colon,

du rectum, du pancréas, du poumon et du sein. Des variations physiologiques sont observées avec le sexe, avec l'âge (concentration plus élevée chez le sujet âgé) et avec la grossesse (concentration élevée au cours des deux premiers trimestres).

Le taux d'ACE sérique est associé à de nombreuses pathologies tumorales et n'est pas spécifique du CCR. Cependant, un taux d'ACE préopératoire élevé est un facteur de mauvais pronostic chez un patient présentant un CCR, en relation avec l'augmentation du volume tumoral et le risque métastatique qui lui est associé (128, 136-140). L'analyse de l'expression tissulaire de l'ACE n'est quasiment pas employée en pratique quotidienne dans l'évaluation pronostique du CCR. Une seule étude a évalué ce critère et retrouvait une valeur pronostique supérieure à l'ACE sanguin, mais ces données nécessitent d'être confirmées par d'autres études (141).

5.4.6. CEACAM6

CEACAM6 appartient à la même famille de molécules que l'ACE. Moins connu et moins étudié car de découverte plus récente, CEACAM6 reprend cependant beaucoup des propriétés et caractéristiques de l'ACE : localisé à la partie apicale des entérocytes tout au long du développement y compris fœtal, il intervient dans les mécanismes d'adhésion, d'invasion et de migration cellulaire (142).

CEACAM6 est surexprimé dans de nombreux cancers dont le CCR, avec une spécificité meilleur que l'ACE pour ce cancer (134, 143-145). Cependant, son dosage sérique n'est pas utilisé en pratique courante et ce n'est qu'à l'échelle tissulaire que son expression est évaluée actuellement. C'est un facteur pronostique indépendant plus fort que l'ACE lorsque ces 2 marqueurs sont comparés dans les mêmes populations (146).

5.4.7. Protéine C-réactive (CRP)

Il s'agit d'une protéine de l'inflammation synthétisée par les hépatocytes sous l'action de l'interleukine 6 et du TNF- α (147). Son rôle est d'activer le système du complément, et de stimuler l'opsonisation et la phagocytose. Sa demi-vie sérique de 20 heures et sa grande sensibilité en font un marqueur biologique utilisé couramment en pratique clinique courante pour la mesure de la phase aiguë de la réaction inflammatoire.

Il a été démontré qu'une élévation de la CRP était un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de CCR (60, 61, 148-153). Il est tout à fait concevable que l'existence d'une réaction inflammatoire tumorale puisse jouer un rôle péjoratif dans le pronostic du CCR, étant donné que l'IL 6 – qui stimule la synthèse de la CRP – peut agir comme facteur de croissance tumorale (154). De plus, il semble évident d'après des études basées sur des grandes populations que même une augmentation peu importante de la concentration sérique en CRP est associée avec un risque augmenté de maladies cardiovasculaires et donc affecte le pronostic du CCR indépendamment du phénotype tumoral (63-65).

6. Traitement du cancer colorectal

Les principes du traitement du cancer colorectal seront abordés dans ce chapitre. En revanche, notre travail ne concernant que les cancers coliques, seuls seront détaillés les traitements relatifs à ce dernier.

6.1. Moyens thérapeutiques

6.1.1. Chirurgie

La chirurgie de résection du cancer colorectal est le seul traitement curatif. Elle consiste à enlever la tumeur primitive tout en obéissant aux principes de la chirurgie carcinologique :

- résection en bloc de toute la tumeur, sans effraction tumorale et passant à distance suffisante des berges tumorales,
- résection simultanée de tout le territoire de drainage lymphatique de la tumeur et/ou de l'organe auquel elle se rattache.

Dans le cancer colique, il faut donc faire l'exérèse du segment colique intéressé par la tumeur – appelée colectomie – ainsi que des ganglions de drainage lymphatique, dont le territoire est strictement superposable à celui des vaisseaux sanguins. Il n'y a dans le côlon que 2 territoires vasculaires : celui du colon proximal et celui du côlon distal. Il n'y a donc que 2 types de geste chirurgical à envisager, la colectomie proximale (ou hémicolectomie droite) et la colectomie distale (ou hémicolectomie gauche), quelle que soit la localisation de la tumeur dans ces 2 parties (fig.18). Une fois la pièce opératoire retirée, le rétablissement de la continuité digestive – appelé anastomose – est effectué par la connexion chirurgicale des 2 extrémités du côlon restant : on parle d'anastomose colo-colique (entre colon et colon), iléo-colique (entre iléon et côlon) ou colorectale (entre colon et rectum) en fonction du type de colectomie.

Extension locale : le côlon est en rapport étroit avec d'autres organes ou tissus, tels le duodénum, les reins, la vessie, l'utérus, ou la paroi musculaire. En cas d'envahissement de ces organes par la tumeur colique (stade T4 de la classification TNM) il peut être nécessaire de

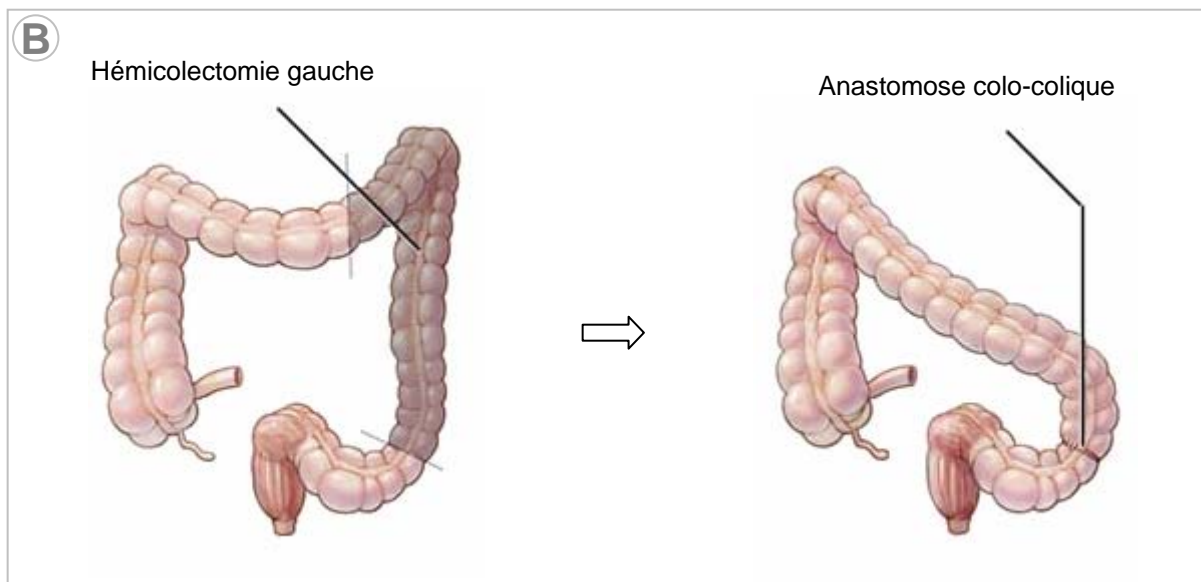
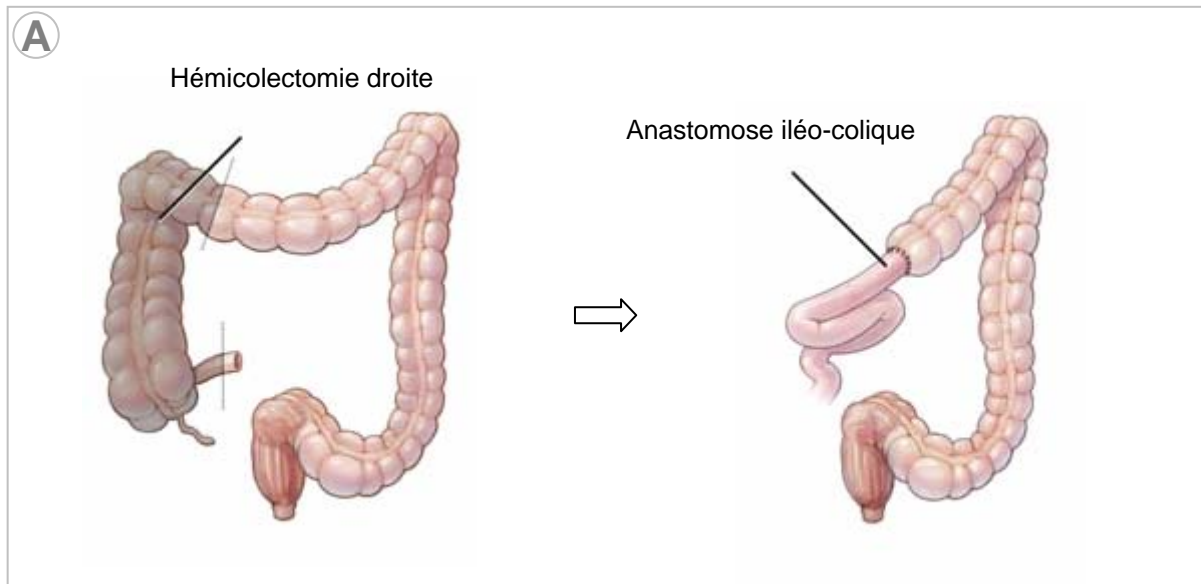


Figure 18 : Principes d'exérèse des tumeurs coliques.

(A) hémi-colectomie droite : la résection intéresse tout le colon proximal (ou côlon droit) et son territoire de drainage lymphatique. Le rétablissement de la continuité digestive est effectué par anastomose iléo-colique (entre l'iléon terminal et le colon distal).

(B) hémi-colectomie gauche : la résection intéresse tout le colon distal (ou côlon gauche) et son territoire de drainage lymphatique. Le rétablissement de la continuité digestive est effectué par anastomose colo-colique ou colo-rectale, en fonction de l'étendue de la résection vers le rectum. *Source : Mayo foundation for medical research*

faire l'exérèse partielle ou totale de ces organes ou tissus afin de respecter les règles carcinologiques citées ci-dessus.

Extension régionale : la tumeur colique peut s'étendre dans d'autres compartiments de la cavité abdominale lorsqu'elle atteint le péritoine, tissus entourant tous les organes de la cavité abdominale dont le côlon, et ultime rempart à la progression tumorale. Lorsque l'extension en profondeur dans la paroi colique atteint et dépasse le péritoine, des parties de la tumeur peuvent se détacher et se déposer sur le péritoine d'autres organes ou tissus, évoluant ainsi pour leur propre compte. On parle de carcinose péritonéale. La chirurgie peut être nécessaire pour enlever ces tumeurs, au cours de la colectomie ou lors d'une 2nde intervention, et souvent en complément d'un autre traitement non chirurgical mais réalisé pendant l'intervention, la chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale (CHIP) (155).

Extension générale : la dissémination de la tumeur colique par voie vasculaire donne lieu à des métastases dites viscérales, qui se localisent préférentiellement dans le foie et à un moindre degré dans le poumon. En cas de maladie cancéreuse stable car contrôlée par la chimiothérapie systémique, l'exérèse de ces métastases doit être envisagée. Ainsi, en cas de métastases hépatiques, on peut réaliser l'exérèse d'une partie plus ou moins importante du foie emportant les métastases (hépatectomie) ou juste les métastases s'il y en a peu (tumorectomie ou hépatectomie atypique ou « *wedge resections* »). De même, en cas de métastases pulmonaires, on peut réaliser l'exérèse d'une partie plus ou moins importante d'un lobe pulmonaire ou d'un poumon intéressé par des métastases (lobectomie pulmonaire ou pneumonectomie) ou juste les métastases s'il y en a peu (tumorectomie ou « *wedge resections* »). Ces interventions souvent lourdes sont généralement réalisées de façon séquentielle et différée par rapport à la colectomie.

6.1.2. Chimiothérapie

La chimiothérapie désigne un traitement pharmacologique qui consiste à provoquer la destruction des cellules cancéreuses par des mécanismes variés et non spécifiques. Une chimiothérapie peut comporter un seul produit (monochimiothérapie) ou plusieurs (polychimiothérapie). La fréquence et la durée d'administration dépendent du (des) produits(s) utilisé(s), et de l'état général du patient et de la place de la chimiothérapie dans le projet thérapeutique du patient. Dans le cancer colorectal, l'administration d'une chimiothérapie peut se faire selon différentes modalités : par voie orale ou veineuse, le but est une diffusion dans tout l'organisme sans tropisme pour un organe particulier : on parle de chimiothérapie systémique ; par voie artérielle ou par contact local, on parle de chimiothérapie locale ou régionale, dont le but est à la fois de cibler sur un organe ou un tissu particulier et de diminuer la toxicité générale du produit.

Les effets secondaires sont multiples mais en général bien maîtrisés par les médicaments dits « de support ». Parmi les plus fréquents on cite les nausées, vomissements, inflammations de la bouche (mucite), diarrhée, constipation, chute de cheveux, modification de la peau et des ongles, toxicité hématologique (baisse des globules blancs, des globules rouges et des plaquettes) et toxicité neurologique (fourmillements, sensations de froid).

Dans le cancer colorectal, il existe trois types de traitement par chimiothérapie :

- La chimiothérapie adjuvante à la chirurgie : il s'agit de protocoles de chimiothérapie administrés après chirurgie d'exérèse complète de la tumeur, mais lorsque le risque de récurrence est important, liée soit à un stade tumoral avancé (T4 et/ou N+ de la classification TNM), soit du fait de conditions cliniques particulières (tumeur en occlusion, tumeur perforée). Elle est administrée en général un mois après la chirurgie. Le but est d'éliminer les cellules tumorales résiduelles (micrométastases) après chirurgie d'exérèse R0.

- La chimiothérapie néo-adjuvante : le but est de stopper la progression de la maladie cancéreuse voire de la faire régresser, dans le but de proposer un traitement chirurgical lourd (chirurgie en plusieurs temps, chirurgie avec sacrifice d'organes importants). Le rôle de cette chimiothérapie est double : permettre une résection d'organes ou de tissus plus limitée, voire rendre possible la résection (en cas de métastases hépatiques par exemple), et éviter de proposer ce traitement alors que la maladie cancéreuse progresse ce qui risquerait de la faire flamber en postopératoire (du fait de l'immunodépression relative) et serait délétère pour le patient.
- La chimiothérapie palliative est administrée lorsque aucune chirurgie n'est envisageable, du fait d'une tumeur trop avancée ou de l'état général du patient trop précaire pour envisager une chirurgie. Les modalités d'administration, la fréquence et la durée sont discutées au cas par cas en fonction de l'état général du patient, de sa tolérance au traitement et de ses symptômes.

6.2. Indications en fonction du stade

Elles sont résumées dans le tableau n°4.

6.2.1. Stades I et II

Le traitement de référence est la chirurgie (hémicolectomie droite ou gauche en fonction de la localisation tumorale, avec curage ganglionnaire). Il n'y a aucun bénéfice à réaliser une chimiothérapie néo-adjuvante pour ces stades.

Après résection chirurgicale, les tumeurs de stade I (T1 ou T2 N-) ont une survie à 5 ans > 90%, il n'y a donc aucun bénéfice prouvé à la réalisation d'une chimiothérapie adjuvante à la chirurgie. Pour les tumeurs de stade II (T3 et T4 N-) il existe un bénéfice

Tableau 4 : Principe du traitement du cancer colique en fonction de la classification histopronostique TNM

STADE	TNM			TRAITEMENT	
Stade 0	Tis	N0	M0	Résection endoscopique	surveillance
Stade I	T1, T2	N0	M0	Chirurgie	
Stade II	T3, T4	N0	M0		
Stade IIA	T3	N0	M0		
Stade IIB	T4a	N0	M0		
Stade IIC	T4b	N0	M0		
Stade III	Quel que soit T	N1, N2	M0		Chirurgie
Stade IIIA	T1, T2	N1	M0		
	T1	N2a			
Stade IIIB	T3, T4a	N1	M0		
	T2, T3	N2a	M0		
	T1, T2	N2b	M0		
Stade IIIC	T4a	N2a	M0		
	T3, T4a	N2b	M0		
	T4b	N1, N2	M0		
Stade IV A	Quel que soit T	Quel que soit N	M1a	Chirurgie si réponse à la chimiothérapie	
Stade IVB	Quel que soit T	Quel que soit N	M1b		

modéré mais significatif de la chimiothérapie adjuvante de type 5-fluorouracile + acide folinique (156). La mise au point d'outils pour évaluer le rapport bénéfice / risques d'un tel traitement reste un challenge majeur. Globalement, les tumeurs T3N- sans facteur de mauvais pronostic ne nécessitent pas de chimiothérapie adjuvante. En revanche, les tumeurs T4N- ou T3N- avec facteur(s) de mauvais pronostic ont un pronostic proche des stades III et constituent habituellement une indication à la chimiothérapie adjuvante (protocole FOLFOX 4 à base de 5-fluorouracile, acide folinique et eloxatine), bien qu'il ne soit pas prouvé qu'elle soit efficace (77). La survie à 5 ans des stades II est comprise entre 72 et 100% selon l'envahissement local T (85).

6.2.2. Stade III

Comme pour les stades I et II, la base du traitement des cancers colorectaux de stade III est la chirurgie d'exérèse avec curage ganglionnaire (hémicolectomie droite ou gauche). Il n'y a aucun argument pour réaliser une chimiothérapie néo-adjuvante à la chirurgie.

Une chimiothérapie adjuvante est indiquée chez les patients présentant un cancer colorectal de stade III car elle apporte un bénéfice de 25 à 33% sur la survie à 5 ans (86, 157). Le protocole de référence est une tri-chimiothérapie à base de 5-fluorouracile, acide folinique et eloxatine connu sous le nom de FOLFOX4 (158).

6.2.3. Stade IV

La tumeur colorectale est au stade métastatique, il s'agit donc d'une maladie générale dont le traitement de base n'est plus la chirurgie mais la chimiothérapie. La chirurgie ne s'impose qu'en cas d'urgence (tumeur primitive en occlusion ou perforée) ou de tumeur symptomatique (hémorragie, douleurs, syndrome septique).

La chimiothérapie a pour but de ralentir la progression tumorale, voire de faire régresser les lésions afin d'envisager une exérèse de la maladie résiduelle. Plusieurs schémas thérapeutiques sont envisagés :

- en cas de lésions résécables : une chimiothérapie néo-adjuvante est réalisée dans un premier temps afin d'éliminer les micrométastases invisibles. Il est recommandé d'effectuer ce traitement sur une période relativement courte (4 à 6 cycles soit 2 à 3 mois) afin de juger rapidement de l'efficacité du traitement (jugée sur la diminution de taille des métastases visibles), et d'avoir la possibilité de le modifier en cas d'inefficacité et/ou d'intolérance. En effet, il s'agit souvent de polychimiothérapie associant des produits variés dans le but d'obtenir une efficacité optimale, mais au prix d'une toxicité parfois importante. L'administration prolongée d'un tel traitement n'est généralement pas utile même s'il est efficace, car il augmente le risque de toxicité (notamment hépatique) sans toutefois apporter de bénéfice sur la survie par rapport à un traitement court (159). En cas de réponse à la chimiothérapie, les lésions tumorales (tumeur primitive et métastases) vont être réséquées par voie chirurgicale, en 1 ou plusieurs temps en fonction de l'importance des lésions et de la tolérance du patient, et encadré par des lignes de chimiothérapie (chimiothérapie d'intervalle) de façon à éliminer la maladie résiduelle micrométastatique et à pallier à l'immunodépression qui fait suite à tout geste chirurgical. La survie à 5 ans est de l'ordre de 40% (160).
- En cas de lésions non résécables, une chimiothérapie palliative est administrée, dont la fréquence et la durée d'administration sont déterminées par l'équipe d'oncologie en relation étroite avec le patient (décision médicale partagée). Cependant, en fonction de l'âge du patient, de son état général et de l'importance des lésions, il peut être décidé de réaliser un protocole de chimiothérapie intensif, afin de rendre les lésions tumorales résécables, et de revenir au cas précédent.

6.3. Surveillance

Les objectifs de la surveillance après traitement curatif du cancer colorectal sont :

- Déceler les récurrences locales ou à distance ;
- Évaluer et prendre en charge les séquelles ;
- Rechercher et prendre en charge les complications tardives liées aux traitements ;
- Organiser les soins de support nécessaires ;
- Faciliter la réinsertion socioprofessionnelle.

Le rôle du médecin traitant est essentiel, en coordination avec les autres intervenants : médecin généraliste, gastro-entérologue, oncologue médical, oncologue radiothérapeute, chirurgien, radiologue, médecin du travail, gynécologue, médecin compétent en sexologie, paramédicaux (infirmiers stomathérapeutes notamment), psychologue, assistant socioéducatif. Le schéma de surveillance est le suivant (d'après la Haute Autorité de Santé, février 2008, www.has-sante.fr) (tableau 5):

- examen clinique tous les 3 mois les deux premières années, puis tous les 6 mois pendant 3 ans ;
- scanner thoraco-abdomino-pelvien tous les 3 à 6 mois pendant les trois premières années, puis annuelle pendant 2 ans ; en cas de contre-indication à cet examen, un cliché pulmonaire et une échographie abdominale peuvent être réalisés ;
- dosage de l'ACE sanguin pour les stades II et III, tous les 3 mois durant les 2 premières années puis tous les 6 mois la 3^{ème} année ;
- coloscopie à 3 ans, puis tous les 5 ans si elle est normale. Si la coloscopie initiale a découvert 3 adénomes ou plus, dont l'un de plus d'un centimètre ou présentant un contingent villositaire, la surveillance sera effectuée à 1 an. Après 75 ans, et en cas de

Tableau 5 : Schéma de surveillance d'un patient opéré d'un cancer colorectal à visée curative

Examen clinique	Tous les 3 mois pendant 3 ans puis tous les 6 mois pendant 2 ans
Coloscopie	Contrôle à 2 ou 3 ans puis tous les 5 ans Cas particuliers : coloscopie initiale incomplète
Tomodensitométrie thoracoabdomino-pelvienne (TDM)	Tous les 3 à 6 mois pendant 2 ans puis annuellement pendant 3 ans
Échographie abdomino-pelvienne Radiographie pulmonaire	En cas d'impossibilité de réaliser une TDM
Antigène carcinoembryonnaire (ACE)	pour les stades II et III, tous les 3 mois durant les 2 premières années puis tous les 6 mois la 3e année
Imagerie par résonance magnétique (IRM) hépatique	En cas de difficultés de surveillance du parenchyme hépatique en TDM
Tomographie par Emission de Positons au 18-FluoroDesoxyGlucose, corps entier	En cas d'élévation de l'ACE et négativité du bilan par ailleurs

coloscopie normale, l'arrêt de la surveillance endoscopique peut être décidé, cette notion devant être nuancée en fonction de l'état clinique et de l'espérance de vie.

Il est fortement recommandé d'inclure des patients dans des études prospectives randomisées évaluant l'efficacité de la surveillance en termes de réduction de mortalité, de qualité de vie et de coût-efficacité.

II - Carcinogénèse colorectale

1. La séquence adénome cancer

La carcinogénèse regroupe l'ensemble des mécanismes qui conduisent une cellule normale à devenir cancéreuse. Cette séquence requiert, pour une cellule donnée, l'acquisition de 6 à 10 événements clonaux (161). Dans le côlon, cette évolution d'une cellule normale vers une cellule cancéreuse a été modélisée d'un point de vue moléculaire par Fearon et Vogelstein et baptisée « **la séquence adénome – cancer** » (15) (fig.8, pages précédentes). Cette séquence retrace les différents événements mutationnels qui font progresser la cellule normale vers sa transformation néoplasique. Les mutations germinales ou somatiques qui aboutissent à la séquence adénome-cancer intéressent des gènes différents (**oncogènes, gènes suppresseurs de tumeur, gènes mutateurs**) selon des mécanismes variables. La mutation de ces gènes conduit à des modifications de **voies de signalisation** qui, impliquées dans les mécanismes cellulaires fondamentaux (cycle cellulaire, réplication et réparation de l'ADN), provoquent l'instabilité génomique, favorisant à leur tour la survenue d'autres mutations. Trois **voies génétiques** sont associées à cette instabilité génomique : l'instabilité chromosomique (CIN), l'instabilité microsatellitaire (MSI ou MIN) et l'instabilité épigénétique. La séquence adénome-cancer est valable pour toutes les formes de CCR – sporadiques, associées aux MICI et génétiques – mais diffère par la chronologie des événements mutationnels impliqués (fig.19) (162).

C'est au niveau des niches de cellules progénitrices (CP) que débute la séquence adénome-cancer. En effet, une CP peut acquérir une mutation sous l'effet d'un stimulus quelconque. En l'absence de mise en jeu des mécanismes de régulation cellulaire (apoptose,

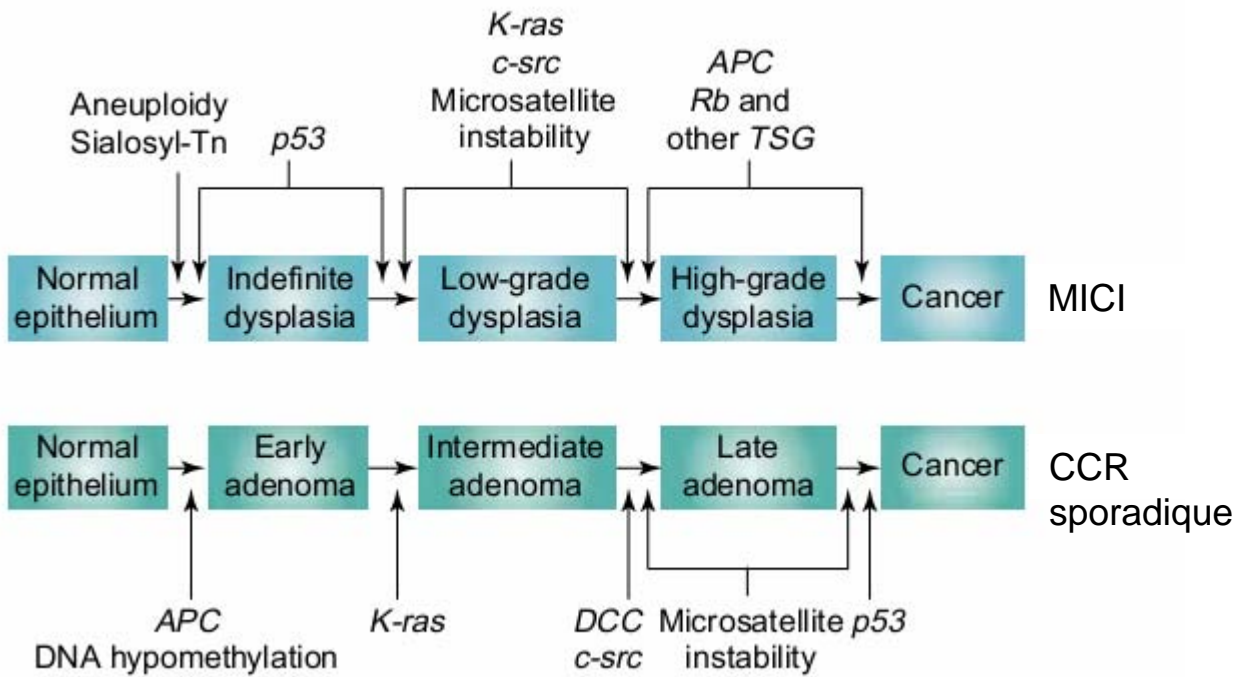


Figure 19 : Séquence adénome – cancer dans le CCR sporadique et le CCR associé aux maladies inflammatoires chroniques de l’intestin (MICI). Le développement de ces 2 formes de cancer répond à une séquence avec des évènements mutationnels à chacune des étapes. La différence la plus évidente réside dans la position différente qu’occupent les mutations d’APC et de p53.
 Source : Rhodes & Campbell, 2002

autophagie, etc.), cette CP peut se diviser pour donner soit 2 cellules différenciées (entérocyte, cellule caliciforme, cellule endocrinienne ou cellule de Paneth), soit une CP mutée et une cellule différenciée, soit 2 CP mutée. C'est la **division asymétrique** des CP (fig.20A). Si cette division donne au moins une CP mutée et que le mécanisme se pérennise, les CP mutées vont prendre progressivement la place des cellules non mutées et coloniser la base de la crypte : c'est le **remplacement de la niche** (fig.20B). Ce phénomène s'étend ensuite au reste de la crypte, il se produit alors une **conversion monoclonale** de la crypte (163) (fig.20C).

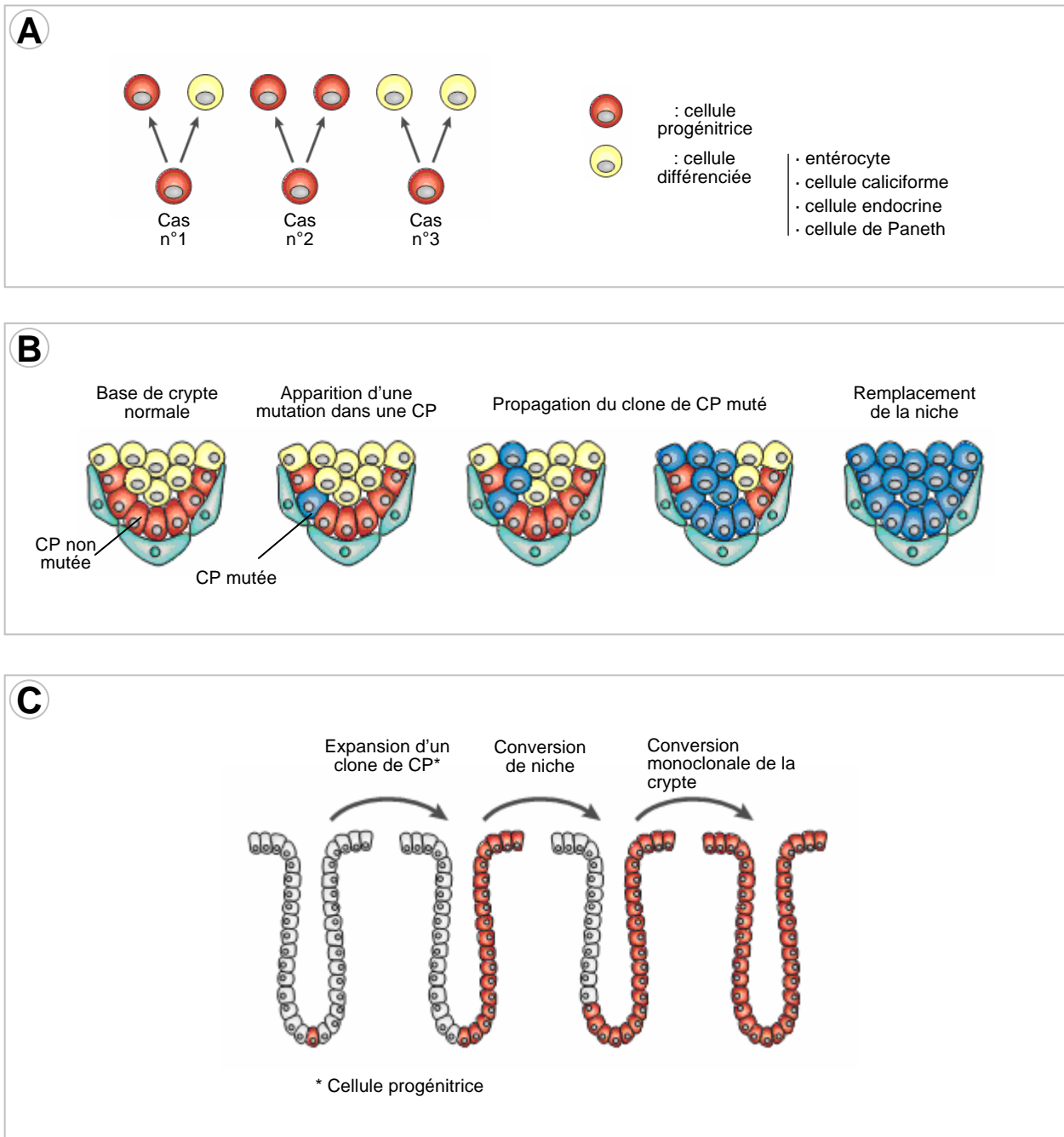


Figure 20 : Mécanisme de formation de l'adénome monocryptique

(A) Division asymétrique des cellules progénitrices (CP). Chaque division d'une CP donne naissance soit à 2 CP, soit à 2 cellules différenciées, soit à chacun des 2 types cellulaires.

(B) Remplacement de la niche cryptique par les cellules mutées. Au fur et à mesure des divisions, les CP mutées vont prendre progressivement la place des cellules non mutées et coloniser la base de la crypte .

(C) Conversion monoclonale d'une crypte colique. Les cellules mutées se reproduisant plus rapidement que les non-mutées, leur exposition à d'autres mutations leur permet de migrer vers le reste de la crypte, où elles perdent l'influence régulatrice du microenvironnement de la crypte. Elle peuvent ainsi continuer à proliférer, entourées de tissu de soutien normal : c'est l'adénome monocryptique.

Source : Humphries et al., 2008

La mutation la plus fréquente à ce stade est la mutation APC ^{+/-}. Cette mutation induit une augmentation du cycle de fission cryptique, mécanisme impliqué dans le renouvellement des cryptes, qui touche toute la crypte y compris les CP (164, 165). Les cryptes APC ^{+/-} se reproduisent donc plus vite que les cryptes sauvages, ce qui les expose davantage à d'autres mutations. La perte du 2^{ème} allèle du gène APC permet aux cellules de la niche cryptique de migrer dans la zone proliférative, où elles sortent de l'influence régulatrice du microenvironnement des CP de la niche cellulaire, et peuvent ainsi proliférer, entourées d'un tissu de morphologie normale : c'est l'adénome monocryptique ou adénome monoclonal (fig.21a) (166). L'étape suivante fait intervenir des mécanismes d'altérations de signaux cellulaires des niches cryptiques. D'autres mutations sont alors induites dans les cryptes adjacentes via les réseaux de signalisation présents dans la *lamina propria* située autour des cryptes, donnant ainsi naissance à d'autres clones dans d'autres cryptes. De nouveaux cycles de conversion monoclonale ont alors lieu dans ces cryptes, mais avec des clones différents : ce sont les foyers de cryptes aberrantes (ou adénome polycryptique ou adénome polyclonal) (fig.21b). L'expansion d'un clone dominant donne naissance à un large polype adénomateux (fig.21c).

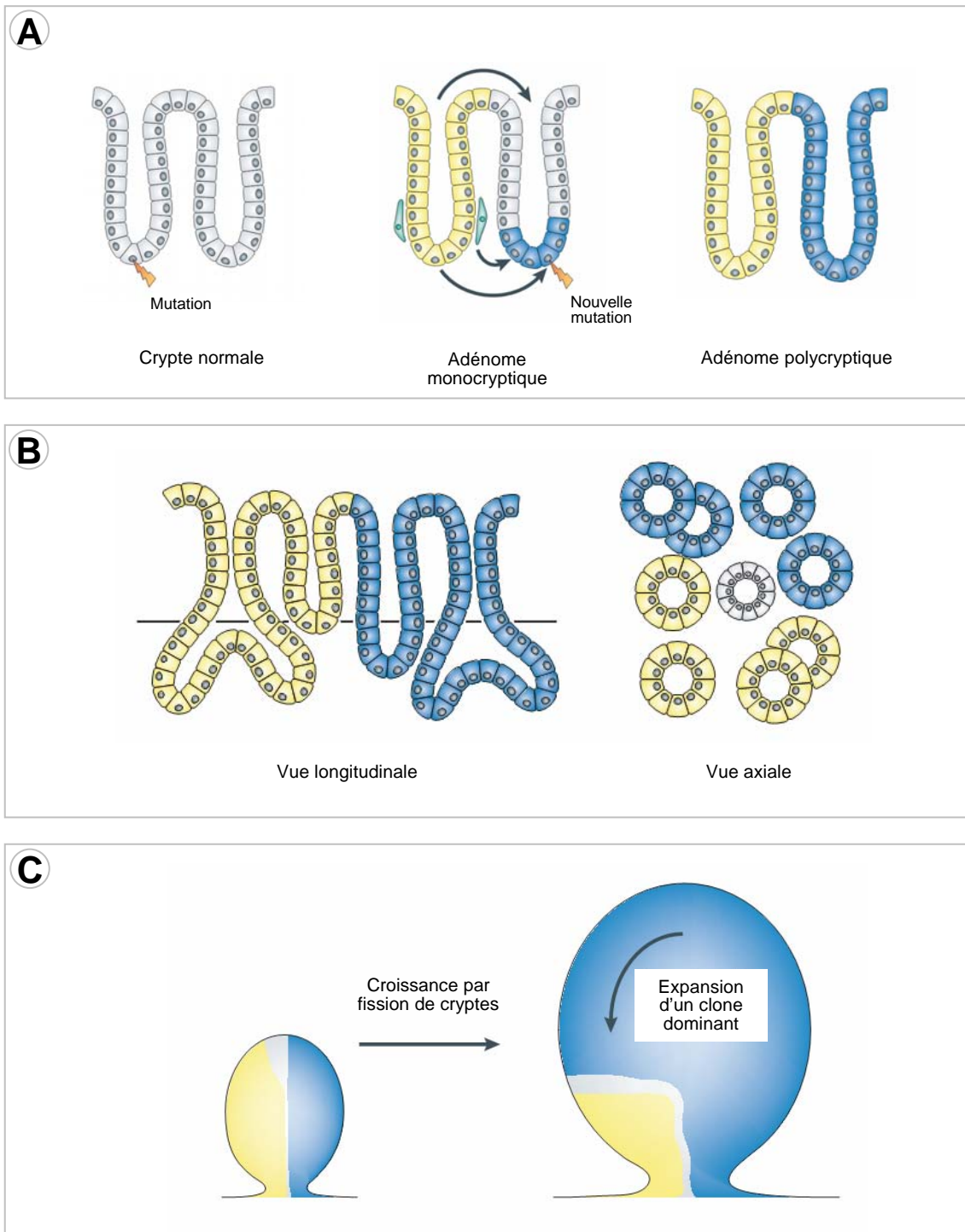


Figure 21 : Séquence adénome polycryptique – foyer de cryptes aberrantes – polype adénomateux.

(A) Mécanisme de formation d'un adénome polycryptique. Lorsqu'a eu lieu la conversion monoclonale d'une crypte, de nouvelles mutations sont induites dans les cryptes adjacentes via les réseaux de signalisation situés autour des cryptes, donnant naissance à d'autres clones dans d'autres cryptes

(B) Formation des cryptes aberrantes. De nouveaux cycles de conversion monoclonale ont lieu dans ces cryptes, mais avec des clones différents. La fission des cryptes de clonalités différentes donne naissance à des foyers de cryptes aberrantes.

(C) Constitution d'un large polype adénomateux par expansion d'un clone dominant.

Source : Humphries et al., 2008

2. les voies impliquées dans la carcinogénèse

2.1. Voie Wnt/APC/ β caténine (fig.22)

La voie de signalisation Wnt/wingless joue un rôle important au cours du développement embryonnaire en modulant l'expression de signaux intercellulaires qui contrôlent la croissance, la migration, le déterminisme et la polarisation cellulaires (167, 168). Dans les tissus adultes, elle participe au contrôle de la prolifération cellulaire. Que ce soit au cours du développement ou de la carcinogénèse, la clé de voûte de cette voie est la β -caténine : lorsque la voie est inactive, celle-ci est dégradée, et lorsque la voie est active, elle est libérée dans le cytoplasme où elle exerce ses fonctions (169).

Dans le cas du processus normal de développement et en l'absence de stimulation de la voie Wnt (position « OFF »), la β -caténine cytosolique est phosphorylée par un complexe multiprotéique constitué par l'axine, le suppresseur de tumeur APC (« *adenomatous polyposis coli* »), la protéine phosphatase PP2A et la GSK3 β (glycogène synthase kinase 3 β). Elle est alors ensuite rapidement dégradée par le système d'ubiquitination du protéasome. La position «ON» est obtenue par l'activation des récepteurs Fz (*frizzled*) par la fixation du ligand Wnt conduit à la phosphorylation de la protéine Dvl (*dishevelled*) qui, par son association à l'axine, empêche la GSK3 β de phosphoryler ses substrats parmi lesquels se trouve la β -caténine. Il existe deux fractions de β -caténine aux rôles différents :

- une fraction libre de passer dans le noyau où elle forme des hétérodimères avec les facteurs de fixation à l'ADN de la famille TCF/LEF (« *T-cell factors* ») en venant exercer le rôle de coactivateur de la transcription de gènes cibles impliqués dans la

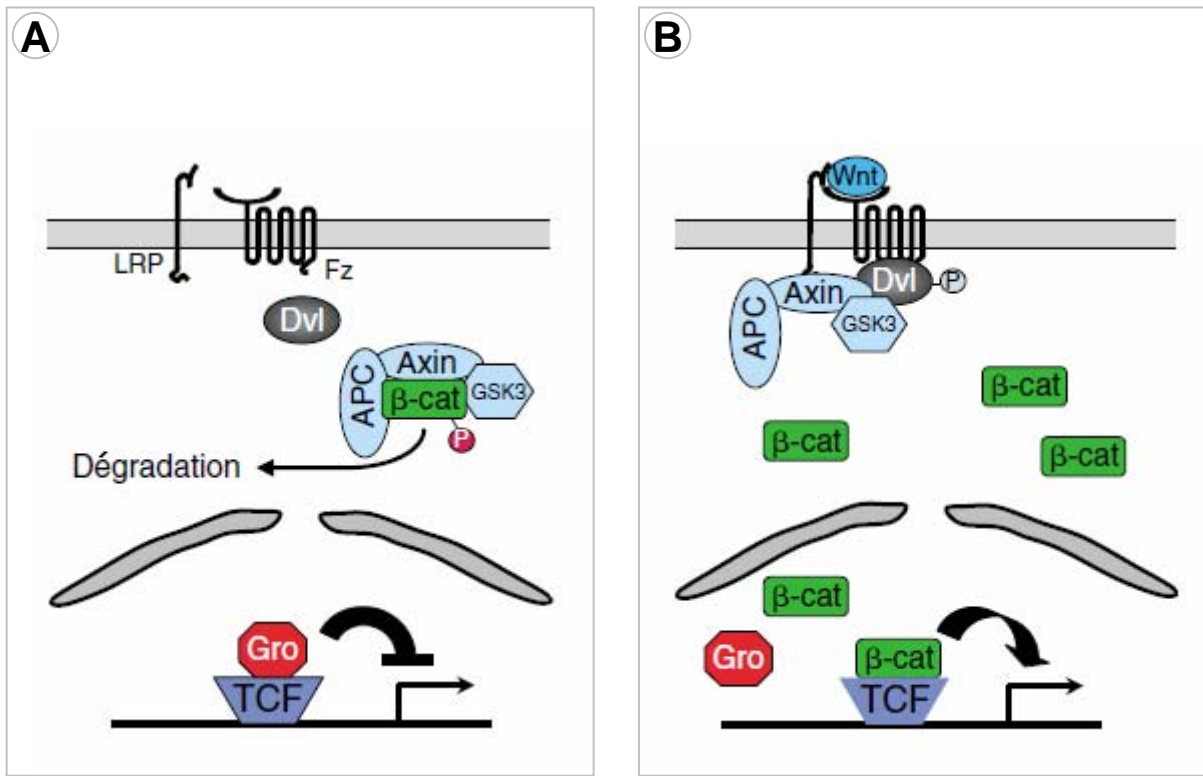


Figure 22 : Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt/APC/β-caténine.

(A) en l'absence de ligand, la β-caténine cytosolique est phosphorylée par le complexe multiprotéique axine-APC-GSK3β et rapidement dégradée par le système d'ubiquitination du protéasome ;

(B) après activation en présence d'un ligand Wnt reconnu par le récepteur Fzd, la phosphorylation de la protéine Dsh et son association à l'Axine empêche la GSK3β de phosphoryler ses substrats parmi lesquels se trouve la β-caténine. Celle-ci, après translocation dans le noyau, forme des hétérodimères avec les facteurs de fixation à l'ADN de la famille TCF/LEF (T-cell factors) en venant exercer le rôle de coactivateur de la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération, la survie et le cycle cellulaire (c-myc, Cycline D1, c-jun, MMP7 (ou matrilysine), PPARδ). Dans le CCR, la voie Wnt est activée le plus souvent par des mutations de APC induisant la synthèse d'une protéine APC tronquée incapable d'interagir avec le complexe protéique qui ne peut alors phosphoryler la β-caténine. Celle-ci s'accumule alors et peut stimuler le cycle cellulaire et la prolifération. *Source : Cadigan et al., J cell Science 2006*

prolifération, la survie et le cycle cellulaire (*c-myc*, *Cycline D1*, *c-jun*, *MMP7* (ou matrilysine), *PPAR δ*) (170).

- Une fraction qui reste dans le cytoplasme où elle exerce des propriétés d'adhésion via son interaction de type homotypique avec la E-cadhérine, le constituant principal des jonctions cellule-cellule. Elle relie ces jonctions au cytosquelette intracellulaire d'actine.

Au total, les quantités de β -caténine qui effectuent ces deux fonctions sont en équilibre l'une par rapport à l'autre, et tout changement de l'une peut influencer sur l'action exercée par l'autre. Cependant, l'activation de la voie Wnt n'est pas la même en fonction de la localisation des cellules épithéliales coliques. En effet, des marquages immunohistochimiques de gènes activés dans la voie Wnt ont montré que cette voie n'était active que dans les cellules de la zone proliférative des cryptes de l'épithélium colique normal, et inactive lorsque les cellules migrent vers le sommet de la crypte (171).

Dans les cancers, indépendamment de toute activation du récepteur Fz, c'est l'inactivation, ou l'activation, des gènes codant pour des protéines impliquées dans le complexe phosphorylant la β -caténine qui bloque la dégradation de la β -caténine. Dans le CCR, la voie Wnt est activée le plus souvent par des mutations de *APC* induisant la synthèse d'une protéine APC tronquée incapable d'interagir avec le complexe protéique qui ne peut alors phosphoryler la β -caténine. Celle-ci s'accumule alors et peut stimuler le cycle cellulaire et la prolifération. Dans 15% des CCR sporadiques ayant une protéine APC intacte, il peut aussi s'agir de mutations au niveau de séquences répétées codantes du gène codant pour l'axine, ou de mutations activatrices dans l'exon 3 du gène codant pour la β -caténine (*CTNNB1*) au niveau des sites de phosphorylation (172), ou de *TCF4* (173).

Pour que la protéine APC soit inactivée, il est nécessaire d'obtenir la mutation des 2 allèles du gène *APC*. Dans la polypose adénomateuse familiale, il y a mutation germinale héréditaire d'un des allèles du gène *APC*, et lorsque intervient une mutation somatique de l'autre allèle, la voie Wnt est activée de façon constitutive. A ce jour 825 mutations germinales d'*APC* ont été rapportées, et il semble exister une corrélation entre le génotype (type de mutation) et le phénotype (âge des lésions, nombre d'adénomes, présence d'autres tumeurs) (28, 31). Dans 60% des cancers colorectaux sporadiques, il y a également production d'une protéine APC tronquée inactive par mutations somatiques des 2 allèles du gène *APC*, à l'origine d'une activation constitutive de la voie Wnt (174).

2.2. Voie Ras/MAPK

La famille des proto-oncogènes RAS comprend trois gènes bien caractérisés *HRAS*, *NRAS* et *KRAS*. Les protéines RAS font partie de la famille des GTPases, et jouent un rôle important dans la transmission de signaux extracellulaires provenant des récepteurs membranaires vers le noyau, aboutissant à la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire, ainsi que de l'angiogénèse. Leur activation est déclenchée par l'intermédiaire de récepteurs membranaires tyrosine kinase (RTK) dont l'EGFR. Les protéines RAS jouent un rôle « d'interrupteur » au sein des voies de signalisation et oscillent entre deux états : un état actif où elles sont liées au GTP (Guanosine Tri-Phosphate), et un état inactif où elles sont liées au GDP (fig.23).

L'activation de la voie de signalisation des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) débute par l'activation et le recrutement à la membrane par RAS de la protéine RAF-1, qui active en cascade par phosphorylation les protéines MEK (MAPK-ERK-Kinase) et ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) ; cette dernière pénètre par translocation dans le

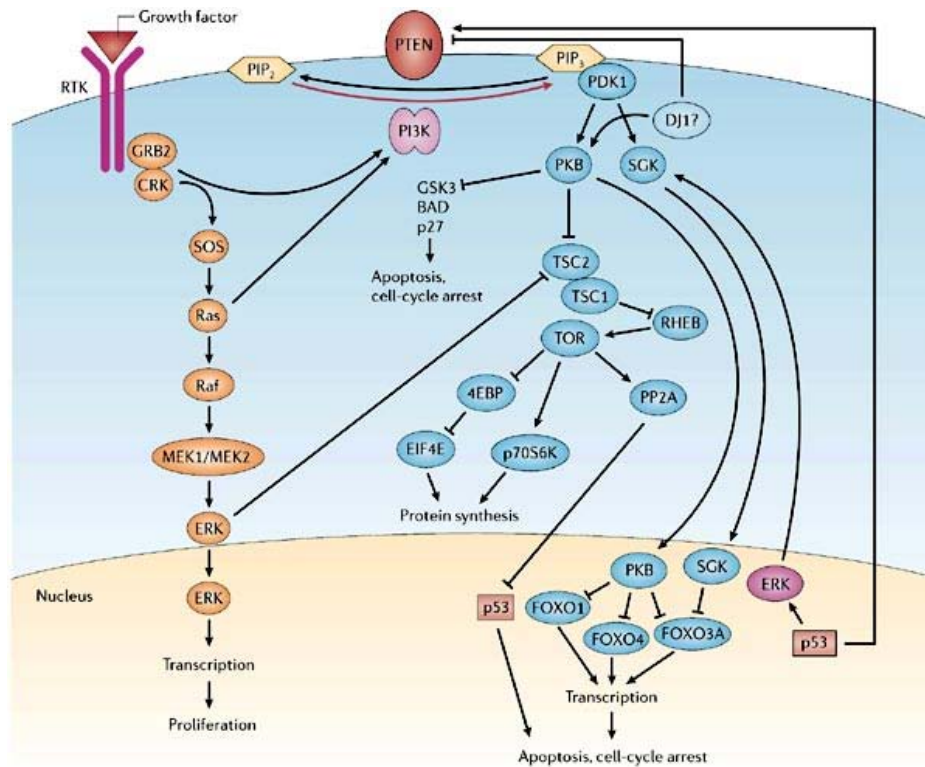


Figure 23 : Représentation schématique des voies Ras/MAPK et PI3K/AKT. Les ligands de ces voies de signalisation sont des facteurs de croissance (EGF, TGF α) qui se fixent sur des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) tel EGFR. L'activation et le recrutement à la membrane par RAS de la protéine RAF-1 active en cascade par phosphorylation MEK puis ERK qui pénètre par translocation dans le noyau et induit l'expression de gènes codant des facteurs de transcription au rôle majeur dans l'initiation du cycle cellulaire en G1. Les voies de signalisation Ras passent aussi par l'activation de l'unité catalytique p110 de PI3K (phosphoinositide-3 kinase). Les PI3K activent Akt, exerçant des fonctions anti-apoptotiques. L'activation d'Akt est régulée négativement par la phosphatase PTEN, impliquée dans de nombreux cancers dont le cancer colorectal. *Source : Cully et al., 2006*

noyau et entraîne l'expression de gènes codant pour des facteurs de transcription (*c-FOS*, *c-MYC*, *c-JUN* ou *JUNB*) qui, à leur tour, stimulent l'expression d'un grand nombre de gènes, en particulier ceux de la cycline D1 et de *cdk6* ayant un rôle majeur dans l'initiation du cycle cellulaire en phase G1 (175).

KRAS est un des oncogènes les plus fréquemment activés dans les cancers. Dans le cancer colorectal, 35-40 % des tumeurs possèdent une des mutations de Kras (codons 12 et 13 et plus rarement codon 61) notamment dans 50% des tumeurs de phénotype CIN (175). La présence de telles mutations au niveau tumoral est responsable d'une activation de la voie RAS/MAPK en aval de l'EGFR, indépendante de la fixation de ligand.

Concernant les protéines de la famille RAF-1, seul le gène *BRAF* a été décrit comme muté. Une mutation quasiment unique est observée au niveau de ce gène, cette mutation activatrice est responsable d'une augmentation de l'activité kinase de la protéine BRAF, et il a été montré qu'elle avait des capacités oncogéniques dans des modèles cellulaires (176). Les cancers colorectaux ont une mutation de *B-Raf* dans 5 à 10% des cas, surtout les tumeurs de phénotype MIN.

L'activation de la voie RAS/MAPK peut également être due à une surexpression de récepteurs de facteurs de croissance, comme l'EGFR, surexprimé dans 30 à 70% des CCR (177). Les mécanismes sont variés : augmentation du nombre de récepteurs à la surface de la cellule, synthèse d'un récepteur anormal activé de manière constitutive (variant REGFvIII rare dans les CCR), augmentation de la quantité de ligands de l'EGFR ($TGF\alpha$) ou amplification du gène de l'EGFR. (pour revue, voir (175)).

2.3. Voie TP53

Le gène suppresseur de tumeur *TP53* est localisé sur le bras court du chromosome 17 en 17p13.1, et code pour une protéine nucléaire de 53 kDa, la protéine p53. Dans une cellule à l'état normal, p53 est rapidement ubiquitinilée puis dégradée par le protéasome (fig.24). En réponse aux différents stress cellulaires de types intrinsèque (activation de voies oncogéniques) ou extrinsèque (agents génotoxiques), l'augmentation de l'expression de p53 induit l'expression de très nombreux gènes cibles impliqués dans le maintien de l'intégrité du génome. La protéine p53 intervient principalement dans la régulation du cycle cellulaire et dans l'apoptose, mais agit également sur l'expression du gène suppresseur de tumeur *PTEN*. L'importance de p53 dans la régulation du cycle cellulaire et le maintien de l'intégrité de l'ADN l'ont fait baptisé le « gardien du génome » (178). *TP53* est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment retrouvé muté dans les cancers, et l'un des premiers à avoir été décrit.

Les mutations du gène *TP53* sont des substitutions dans plus de 75% des cas et concernent essentiellement 4 régions de la protéine (179). Dans le cas particulier de *TP53*, une mutation sur un seul allèle suffit à diminuer l'activité de la protéine p53 par « l'effet dominant négatif » : il s'agit de la liaison de la protéine p53 mutée à la protéine p53 sauvage qui provoque l'inactivation de cette dernière (180). Dans le cancer colorectal, des mutations de *TP53* sont retrouvées dans 50 à 70%, et sont à l'origine de la synthèse d'une protéine p53 non fonctionnelle dont la demi-vie est allongée, rendant possible sa détection notamment immunohistochimique (181). Si la protéine p53 est mutée à un stade tardif de la séquence adénome – cancer dans le CCR sporadique, il n'en est pas de même pour les CCR associés aux MICI où les mutations de *TP53* ont lieu au début de la carcinogénèse (162).

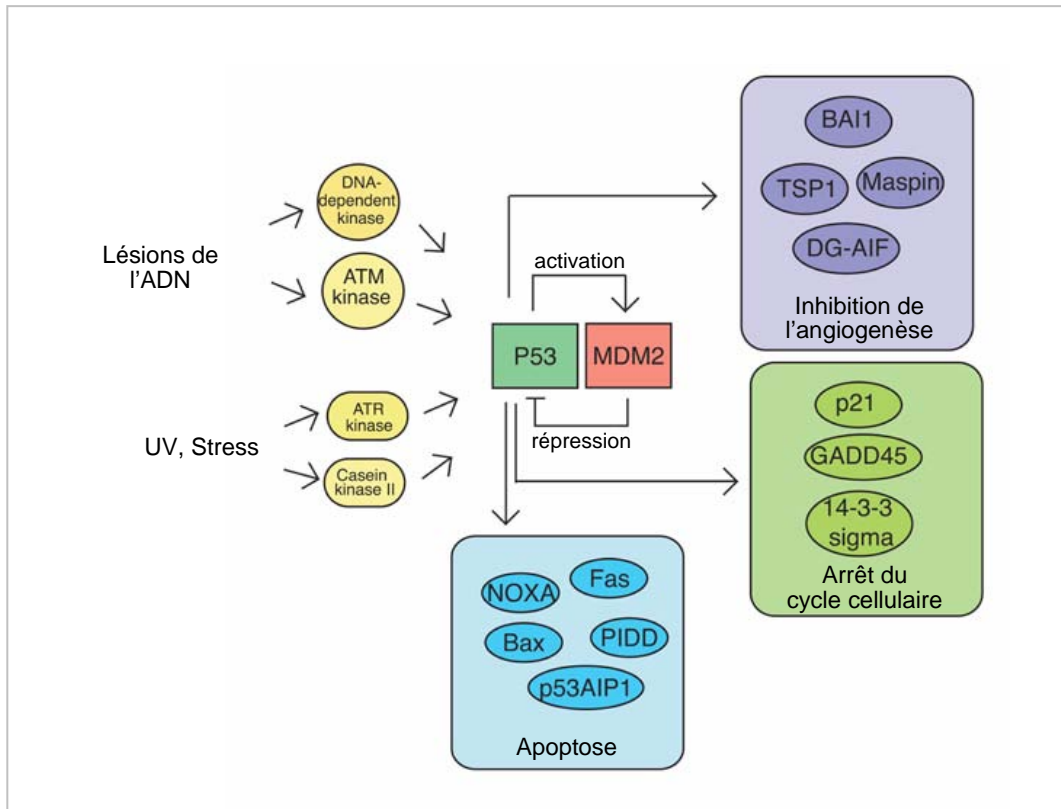


Figure 24 : Rôle du gène suppresseur de tumeur *TP53* dans le cycle cellulaire, l'apoptose et l'angiogenèse. En réponse aux différents stress cellulaires, l'augmentation de l'expression de p53 induit l'expression de très nombreux gènes cibles impliqués dans le maintien de l'intégrité du génome. La protéine p53 intervient principalement dans la régulation du cycle cellulaire et dans l'apoptose, mais agit également sur l'expression du gène suppresseur de tumeur PTEN.

Une mutation sur un seul allèle de *TP53* suffit à diminuer l'activité de la protéine p53. Dans le cancer colorectal, des mutations de *TP53* sont retrouvées dans 50 à 70%, et sont à l'origine de la synthèse d'une protéine p53 non fonctionnelle dont la demi-vie est allongée, rendant possible sa détection notamment immunohistochimique.

Source : Dr. Koji Nakade

2.4. Voie Ras/PI3K/AKT

Cette voie peut être activée, soit directement par activation de récepteurs à activité tyrosine-kinase (EGFR ou autre), soit par l'intermédiaire de la protéine RAS. Il existe donc un lien étroit entre la voie de signalisation RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT, par l'intermédiaire de RAS (fig.23, pages précédentes). Les mutations de différents composants de cette voie sont très fréquentes dans la majorité des cancers et leur caractère oncogénique (mutations gain de fonction) est démontré. Dans les CCR, la plupart des mutations affectent le gène PIK3CA codant pour la sous-unité catalytique alpha de la PI(3)Kinase (p110 α). 40% des CCR sporadiques ont une mutation sur l'un des acteurs de la voie PI(3)K/Akt, dont *PTEN* (Phosphatase and TENsin homolog), *Akt2* ou *p85* (182). Ces mutations sont généralement exclusives, suggérant qu'une atteinte unique de la voie est suffisante pour procurer un avantage de sélection.

La kinase Akt possède de très nombreux substrats ayant un rôle mitogénique ou d'induction de survie cellulaire, directe ou indirecte (fig.23, pages précédentes) :

- Phospho-MDM2, transloquée dans le noyau pour induire la dégradation de p53 (183)
- Phospho-p21, stabilisée pour induire la survie cellulaire (184)
- Phospho-Bad, séquestrée par la famille des protéines 14-3-3, pour inhiber l'apoptose (185).

2.5. Voie TGF β /SMAD

La voie de signalisation TGF- β est impliquée dans le contrôle de nombreux processus cellulaires, tels la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, la mobilité, l'adhésion et la mort cellulaires (186). C'est une des voies de signalisation les plus fréquemment altérées

dans la carcinogénèse humaine (187). L'activation de cette voie est initiée par la liaison des ligands TGF- β au récepteur TGF- β de type II (T β RII) qui permet le recrutement et l'activation par phosphorylation du récepteur TGF- β de type I (T β RI). La transduction du signal des récepteurs jusqu'au noyau est assurée principalement par la phosphorylation d'une famille de protéines cytoplasmiques conservées au cours de l'évolution, les Smads (188). Cette famille est divisée en trois groupes fonctionnels différents : les Smads associés au récepteur (R-Smad), qui interagissent de façon spécifique directement avec le T β RI activé et sont spécifiques d'un ligand, les Smads médiateurs communs pour tous les membres de la famille du TGF- β (co-Smads), et les Smads inhibiteurs (I-Smad) (189). Après phosphorylation par T β RI, les R-Smads s'associent à l'unique co-Smad (Smad4) et ce nouveau complexe migre alors dans le noyau où il joue le rôle de facteur de transcription de gènes TGF- β dépendants (fig.25).

Ces fonctions participent au contrôle du développement et de l'homéostasie des tissus dans des situations normales et pathologiques (190). Leurs effets dépendent de l'intensité et de la durée des signaux induits via leurs récepteurs (191).

Dans les CCR, plusieurs mutations peuvent intervenir :

- une mutation inactivatrice du gène codant pour T β RII est retrouvée dans plus de 80% des tumeurs de phénotype MIN (192), et dans 30% de l'ensemble des CCR. La conséquence de cette inactivation est une augmentation de la prolifération cellulaire, T β RII agissant comme suppresseur de tumeur (193).
- une mutation des gènes de la famille Smad : Smad4 est mutée dans 16 à 25% des CCR et une altération de Smad2 a été rapportée dans 6% des CCR (194). En fait Smad2 et Smad4 sont tous les deux situés sur le chromosome 18q, une région très fréquemment délétée dans le CCR (195). Smad4 fonctionne comme un suppresseur de tumeur dans le CCR

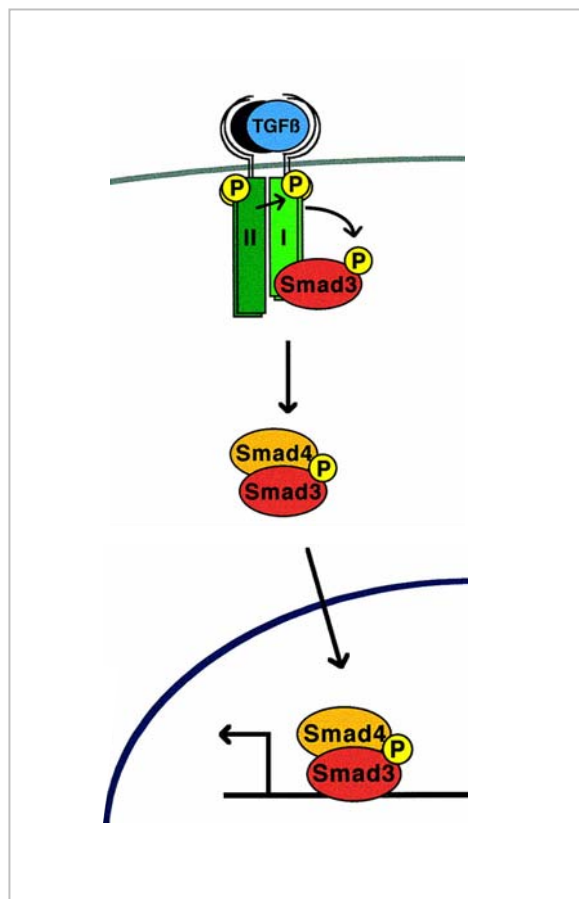


Figure 25 : Représentation schématique de la voie de signalisation TGFβ/SMAD4.

L'activation de cette voie est initiée par la liaison des ligands TGF-β au récepteur TGF-β de type II qui permet le recrutement et l'activation par phosphorylation du récepteur TGF-β de type I. La transduction du signal des récepteurs jusqu'au noyau est assurée par la phosphorylation de la protéine Smad3 qui s'associe à Smad4, et la translocation de ce nouveau complexe vers le noyau joue le rôle de facteur de transcription de gènes TGF-β dépendants. Dans les CCR, une mutation inactivatrice du gène codant pour TβRII est retrouvée dans 30% de l'ensemble des CCR. La conséquence de cette inactivation est une augmentation de la prolifération cellulaire, TβRII agissant comme suppresseur de tumeur. Une mutation des gènes de la famille Smad peut également intervenir. Smad4 fonctionne comme un suppresseur de tumeur dans le CCR.
 Source : Letamendia et al., 2001

- d'autres mutations (Smad3, T β RI) sont décrites, mais plus rares et aux conséquences encore mal connues.

2.6. Autres voies de signalisation

La voie NF- κ B est impliquée dans de nombreux processus inflammatoires et carcinogéniques. Les protéines NF- κ B sont des activateurs transcriptionnels présents à l'état basal dans le cytoplasme cellulaire. Ce sont des dimères retenus dans le cytoplasme sous forme inactive par leur interaction avec la famille des I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , p105 et p100). Après activation par des facteurs inflammatoires, physiques ou chimiques, les molécules I κ B sont phosphorylées par un complexe kinase composé de 3 sous-unités (2 sous-unités catalytiques IKK α et IKK β et une sous-unité régulatrice NEMO/IKK γ). Les molécules I κ B sont ainsi ubiquitinylées puis dégradées dans le protéasome. NF- κ B est transloquée dans le noyau, se fixe sur l'ADN et induit l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire : cytokines, facteurs de croissance, chimiokines, molécules d'adhésions.

Il existe 2 voies d'activation de NF- κ B (fig.26):

- la voie classique, dite « canonique » induite par des stimuli inflammatoires (famille des TNF- α , IL-1, toll-like receptor ligands) et aboutissant à une dégradation complète des I κ B. Elle joue un rôle essentiel dans l'immunité innée, dans l'inhibition de l'apoptose induite par des infections ou des facteurs pro-inflammatoires.
- la voie alterne induite par d'autres molécules (lymphotoxine β , BAFF, CD40, RANKL – récepteur-activated NF- κ B ligand) impliquant d'autres protéines kinases (NIK pour Nck interacting kinase) aboutissant à une dégradation partielle des I κ B. Cette voie alterne joue un rôle crucial en contrôlant le développement et le fonctionnement des organes lymphoïdes secondaires (196).

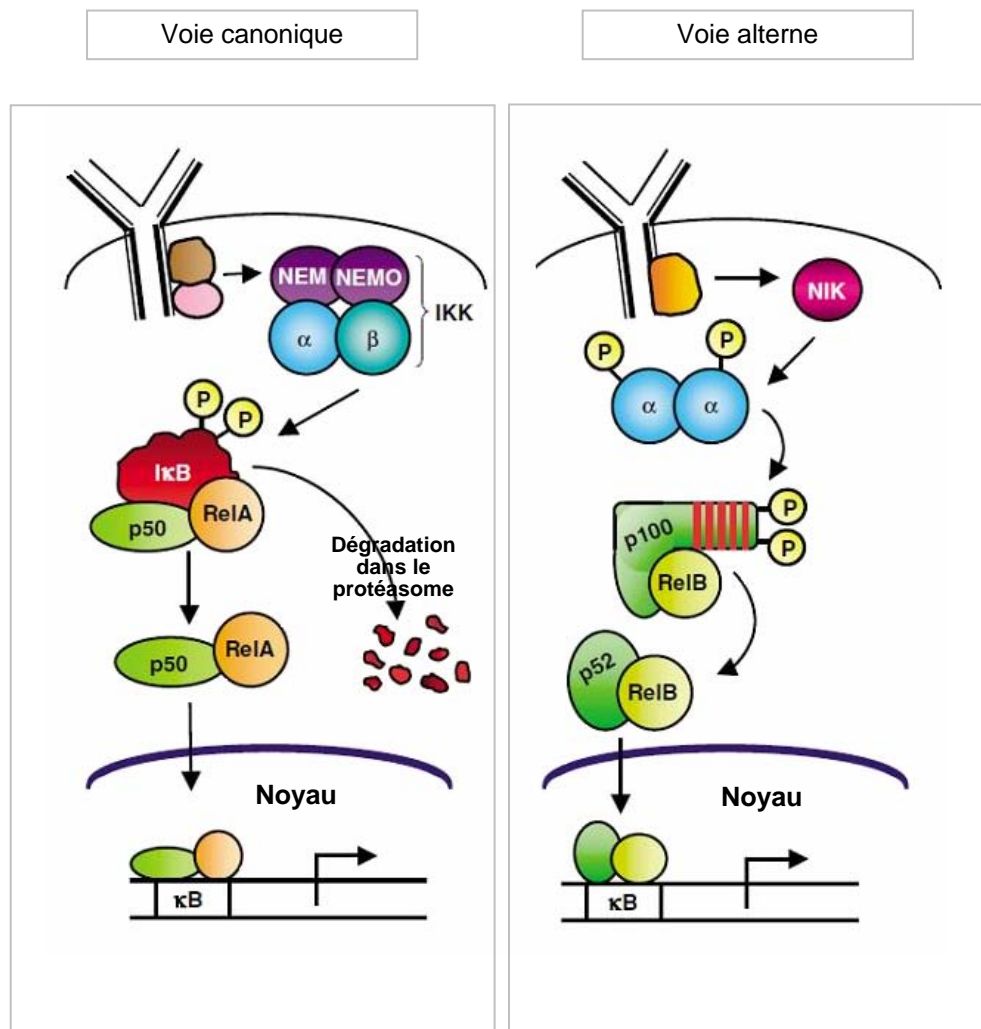


Figure 26 : Représentation schématique de la voie de signalisation NF-κB. Après activation par des facteurs inflammatoires, physiques ou chimiques, les molécules IκB sont phosphorylées par un complexe kinase composé de 3 sous-unités (2 sous-unités catalytiques IKKα et IKKβ et une sous-unité régulatrice NEMO/IKKγ). Les molécules IκB sont ainsi ubiquitinylées puis dégradées dans le protéasome. NF-κB est transloquée dans le noyau, se fixe sur l'ADN au niveau des boîtes κB et induit l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire : cytokines, facteurs de croissance, chimiokines, molécules d'adhésions. Dans le cancer colorectal, NF-κB peut bloquer l'apoptose par dérégulation de protéines anti-apoptotiques, et promouvoir la prolifération, la carcinogenèse et le développement de métastases. *Source : Perkins et al., 2006.*

Comparé à des cellules normales, les cellules cancéreuses ont une activité NF- κ B très élevée, produite par la cellule cancéreuse elle-même ou par les cellules inflammatoires péri-tumorales (197). NF- κ B peut être activé par plusieurs voies, comprenant le stress cellulaire, des lésions de l'ADN, l'exposition au TNF α et de nombreuses voies carcinogènes (198).

Les gènes de réparation de l'ADN - Plusieurs gènes impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN sont mutés dans les CCR notamment héréditaires, associés à la PAF et au syndrome HNPCC. Au cours de la synthèse de l'ADN, le système de réparation des mésappariements (MMR pour « *mismatch repair* ») intervient lorsque les erreurs de réplication échappent au système de réparation intrinsèque. Ce système comprend 7 protéines (hMLH1, hMLH3, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 et hPMS2) qui s'associent en hétérodimères fonctionnels capables de réparer les erreurs de réplication de l'ADN (199). Une mutation au niveau d'un de ces gènes va entraîner la perte de fonction. Les mutations germinales de ces gènes sont responsables du syndrome HNPCC alors que les mutations somatiques s'observent dans 10 à 15% des CCR sporadiques. MYH

D'autres gènes intervenant dans les systèmes de réparation de l'ADN endommagé, comme le système de réparation par excision de base (BER) ou le système de réparation par excision de nucléotides (NER) peuvent être altérés dans le CCR. C'est le cas du gène *MYH* qui appartient au système BER et corrige les défauts d'appariement de l'adénine par le 8-oxo-7,8-hydroxy-2V-deoxyguanosine, un produit particulièrement stable lors des lésions oxydatives de l'ADN. Il prévient les mutations transversions G:C \rightarrow T:A (200). La mutation de *MYH* aboutit à un excès de mutations G:C \rightarrow T:A, essentiellement sur le gène *APC*, et conduit au phénotype MAP (pour « *MYH-associated polyposis* ») qui est une PAF de forme atténuée (une centaine de polypes colorectaux).

3. Voies génétiques de la carcinogénèse colique

Trois types de mécanismes sont principalement rencontrés :

3.1. L'instabilité chromosomique

Appelée aussi voie CIN (pour *Chromosomal INstability*), cette voie de carcinogénèse concerne 70 à 85% des cancers colorectaux. Elle est donc appelée voie traditionnelle ou encore voie suppressive (« *suppressive pathway* ») car elle se caractérise par la perte de matériel chromosomique entraînant l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (201, 202). L'instabilité chromosomique conduit au phénotype LOH+ (*loss of heterozygoty*) et se caractérise par une aneuploïdie. La séquence adénome-cancer est le support clinique de cette voie de carcinogénèse : des foyers de cryptes aberrantes se développent à partir de l'épithélium colique sain, puis il y a formation d'un adénome d'abord précoce, intermédiaire puis tardif, et enfin d'un carcinome. Selon le modèle de Fearon et Vogelstein, à chaque étape intervient une mutation qui s'ajoute à la précédente et induit une modification phénotypique : mutation du gène *APC* (5q21), du gène *Kras* (12p12), des gènes *SMAD4* ou *DCC* (18q21) et du gène *TP53* (17p13) (15). Le défaut d'une de ces mutations stoppe l'expression phénotypique et bloque la séquence, qui ne se poursuit pas même si les mutations suivantes s'opèrent. Cependant, seule une petite proportion de CCR possède l'ensemble de ces mutations, ce qui tend à montrer que d'autres événements génétiques interviennent et court-circuitent la voie CIN pour délivrer le message biologique nécessaire à la poursuite de la séquence (203).

Par cette voie génétique, la séquence adénome-cancer peut se résumer ainsi :

- la lésion initiale est le foyer de cryptes aberrantes : la mutation d'APC est présente lorsqu'il s'agit d'un PAF, mais absente dans le CCR sporadique. Dans ce cas K-ras est d'abord muté, et la mutation APC intervient après dans la séquence adénome - cancer, conduisant au développement d'un adénome précoce (fig.8, pages précédentes) Si la mutation intervient chez un sujet K-ras sauvage (le plus fréquent), il n'y a pas d'évolution vers les stades ultérieurs de la séquence, ce qui explique que la majorité des adénomes n'évoluent pas vers un adénome plus grave. Si la mutation intervient chez un sujet déjà muté K-ras, cette dernière agit comme un court-circuit et accélère le passage de l'adénome précoce vers un adénome plus avancé (adénome intermédiaire).
- Les mutations de DCC, SMAD2 et surtout SMAD4 font avancer la séquence adénome-cancer par interférence avec l'apoptose qui permet l'accumulation de mutations et le développement d'un adénome tardif ;
- La mutation de p53 est la dernière étape de la séquence, signant le passage d'une lésion non cancéreuse (adénome tardif) à une lésion cancéreuse (adénocarcinome).

3.2. L'instabilité microsatellitaire

L'instabilité microsatellitaire est associée au phénotype MSI ou MIN (*Microsatellite Instability*) typique du syndrome HNPCC, et est retrouvée dans 10 à 15% des CCR sporadiques. C'est la « voie mutationnelle » (*mutator pathway*). Il s'agit de mutations sur des séquences courtes et répétées, appelées séquences microsatellites, situées sur les zones régulatrices ou promotrices de certains gènes. Ces anomalies sont normalement réparées par le système de réparation de l'ADN, le système MMR pour « *Mismatch Repair* », qui est composé de 7 protéines (hMLH1, hMLH3, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 et hPMS2). Lorsque les gènes codant pour les protéines du système MMR sont mutés, ces protéines

deviennent défectueuses et ne réparent pas les anomalies des séquences microsatellitaires. Dans le CCR, 5 séquences microsatellites sont majoritairement impliquées : 2 séquences mono-nucléotidiques (BAT25 et BAT26) et 3 séquences di-nucléotidiques (D5S346, D2S123, D17S250). En fonction des séquences microsatellites touchées se définissent 3 phénotypes (204):

3.2.1. Phénotype MSI-H

Ce phénotype MSI-H (*High*) est retrouvé lorsque 2 séquences microsatellites ou plus sont mutées : ce phénotype est rencontré dans pratiquement 100% des CCR du syndrome HNPCC. *hMLH1* et *hMSH2* sont les 2 gènes du système MMR les plus fréquemment mutés (90% des HNPCC) (205). Les mutations interviennent sur les 2 allèles ce qui explique la nécessité de rendre totalement inactif les 2 copies d'un gène MMR avant qu'une tumeur ne se développe (206, 207). Les CCR HNPCC MSI-H sont corrélés à un certain nombre de caractéristiques cliniques et histologiques : situation dans le côlon proximal (en amont de l'angle splénique), tumeur peu différenciée et/ou avec contingent mucineux, existence d'infiltrats inflammatoires « Crohn's like », contenu ADN diploïde, stade tumoral précoce au moment du diagnostic, et meilleure survie à long terme (208). De même 50% des adénomes ont ce phénotype, ce qui montre une implication plutôt précoce dans la séquence adénome-cancer. Les mutations somatiques de *hMLH1* et *hMSH2* sont beaucoup moins fréquentes, probablement car d'autres gènes sont impliqués. Cependant, la perte d'expression de ces gènes est retrouvée dans 95% des CCR sporadiques (209). Ce qui explique probablement que les caractéristiques cliniques et biologiques de ces tumeurs sont les mêmes que pour le syndrome HNPCC. En revanche, le phénotype MSI n'est retrouvé que dans 1.8 à 2.5% des adénomes, ce qui sous-entend que cette voie de carcinogénèse intervient très tardivement dans le séquence adénome-cancer du CCR sporadique (210).

3.2.2. Phénotype MSI-L

Le phénotype MSI-L (*Low*) est retrouvé lorsqu'une seule séquence microsatellite est mutée : ce phénotype peut être rencontré dans le syndrome HNPCC, par mutation du gène *hMSH6* du système MMR (211, 212). Dans le CCR sporadique, il arbore les mêmes caractéristiques que le phénotype MSS, sauf que les proportions de *K-ras* et d'*APC* mutés sont respectivement supérieure (54 vs 27%) et inférieure (23 vs 48%) (213). De façon surprenante, le taux de *K-ras* muté dans les MSI-L est non seulement supérieur à MSS mais également à MSI-H, contrairement à ce qu'on pourrait attendre d'une instabilité croissante. De plus, MSI-L est un facteur pronostique indépendant dans les CCR stade III (214). Finalement, MSI-L est un phénotype à part et non un intermédiaire entre 2 formes d'instabilité microsatellite. Deux mécanismes sont avancés pour expliquer ce phénotype dans le CCR sporadique :

- le gène *MGMT* (0-6-Methylguanine DNA Methyltransferase) appartenant au système MMR corrige spécifiquement les erreurs sur la Guanine, et sa perte d'expression (par silencing épigénétique) est responsable d'une non réparation sur le gène *K-ras* (conversion G → A) (215). Cela explique l'inadéquation entre la forte prévalence de *K-ras* muté par rapport aux autres phénotypes (MSI-L et MSS) et le bas grade de MSI. MSI-L serait alors la combinaison des 2 mécanismes (suppressif et mutationnel) et donc une entité bien à part.
- le gène *hMLH1*, muté dans le phénotype MSI-H, peut être partiellement méthylé, entraînant sa perte d'expression. Ce phénotype est alors plutôt rencontré dans les CCR issus d'adénomes festonnés, dont l'expression diffère du CCR sporadique classique (216). Dans ce cas, *K-ras* n'est pas muté et il n'y a pas d'instabilité chromosomique

3.2.3. Phénotype MSS

Le phénotype MSS (*Stable*) est retrouvé lorsque aucune séquence microsatellite n'est mutée. Ce phénotype est le plus fréquent dans la voie mutationnelle, de 54 à 78% en fonction du type d'adénome (festonné ou non festonné) (216). Par rapport aux autres phénotypes MSI, la différence se joue essentiellement sur les gènes *K-ras*, *BCL2* et la voie Wnt (APC/ β -caténine) (213).

Dans le syndrome HNPCC, il s'agit de mutations germinales d'un des gènes MMR (217). Dans 15% des CCR sporadiques, il ne s'agit pas de mutation mais d'une hyperméthylation du promoteur du gène hMLH1 (218). La cellule acquiert alors un phénotype hypermutateur qui prédispose à la survenue de mutations de certains oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs. La chronologie des mutations dans les CCR de phénotype MSI reste encore mal connue.

Quel que soit le mécanisme (mutation de gènes MMR ou silencing épigénétique) l'augmentation du nombre des erreurs génétiques finit par toucher une ou plusieurs des 5 séquences microsatellites mentionnées ci-dessus. Ces séquences sont retrouvées dans des gènes impliqués dans le CCR, tels *TGF- β RII*, *Bax*, *Caspase 5*, *MSH3*, *MSH6*, *β -caténine*, *APC*, *IGF-II*, et *E2F4*, qui se retrouvent mutés, participant ainsi à la carcinogénèse (204).

3.3. L'instabilité épigénétique

Les modifications épigénétiques sont des altérations qui ne modifient pas la structure même de l'ADN et peuvent se transmettre au cours de la division cellulaire, mais qui sont réversibles. Deux types de modifications épigénétiques sont rencontrés, les acétylations et méthylations des histones, et les méthylations de l'ADN.

Dans le CCR, il existe une hypométhylation globale du génome, qui peut rendre compte d'une activation de gènes réprimés dans des conditions normales (familles des gènes *LINE*, *SIME* et *Alu*), et une hyperméthylation des îlots CpG (résidus Cytosine précédant un résidu Guanine) situés au niveau du promoteur et/ou du 1^{er} exon de 60% des gènes chez l'homme (219). Certains individus semblent prédisposés à ces hyperméthylations aberrantes de séquences promotrices, notamment de gènes suppresseurs de tumeurs (*hMLH1*, *p14*, *p16*, *MINT1*, *MINT2* et *MINT3*). Ce phénotype, appelé *CpG Island Methylator Phenotype* (CIMP), s'associe fréquemment à des mutations des gènes *K-ras* et *BRAF* et plus rarement de *TP53*, avec une histologie bien spécifique (tumeurs peu différenciées, contingents mucineux), une composante familiale et une sévérité de pronostic. Le phénotype CIMP peut être cependant divisé en 3 catégories (220) :

- CIMP1 : méthylation intense de multiples gènes, MSI et mutations du gène *BRAF*. Les CCR sont plutôt proximaux, de bon pronostic et s'apparentent aux cancers MSI-H. La lésion initiale est plutôt un polype hyperplasique ou un adénome festonné ;
- CIMP2 : méthylation d'un groupe limité de gènes, augmentation du niveau de méthylation de gènes liés à l'âge, et mutations du gène *K-ras* (par inactivation du gène *MGMT*). Les CCR sont plutôt proximaux, mais de moins bon pronostic. La lésion initiale est un adénome vilieux.
- CIMP- : méthylations rares et mutation de *p53*

III - Microbiote et cancer

1. La flore microbienne intestinale chez l'homme

1.1. L'être humain, un "super-organisme"

L'être humain héberge une importante communauté microbienne (221-223). Le génome collectif des microbes du microbiote humain – défini par le microbiome – contient 2.85 billion de paire de bases, 100 fois plus de gènes que le génome humain (224), et code des fonctions que le génome de l'homme seul n'est pas capable d'assurer (225). L'être humain associé au microbiote constitue donc un « super organisme » possédant un « métagénome » composé des gènes microbiens et Homo sapiens. Cette association est le fruit d'une co-évolution de l'hôte avec sa flore (222, 223), qui a conduit à une relation symbiotique où la flore exerce une influence importante sur le phénotype métabolique humain (226).

La grande majorité des microbes de l'homme (10 à 100 trillions) loge dans le tractus digestif et constitue le microbiote intestinal, notamment au niveau du côlon (224). Ce tropisme colique s'explique par les caractéristiques physico-chimiques du tube digestif : pH adapté à la croissance bactérienne car loin de l'estomac, concentration faible en sels biliaires car loin du foie et du pancréas, péristaltisme colique plus faible que celui de l'intestin facilitant la colonisation, taux faible de cellules de Paneth produisant des peptides antimicrobiens, et peu de cellules cryptiques au faible renouvellement permettant une colonisation plus stable (227).

Le microbiote exerce une influence nutritionnelle bien connue et décrite comme une amélioration de l'efficacité de la capitation énergétique des aliments ingérés et la synthèse de

vitamines. Il intervient dans de nombreux autres processus physiologiques, comme la prolifération cellulaire intestinale, le maintien du pH, le développement du système immunitaire et la protection contre les pathogènes (228). Ces fonctions essentielles ont fait considérer le microbiote intestinal comme l'organe oublié du corps humain (229).

1.2. Phylogénèse du microbiote intestinal

Des analyses phylogénétiques de la composition de la flore intestinale ont été réalisées à partir de l'amplification et du séquençage de l'ADN codant la sous-unité ribosomale 16S des microorganismes. Il ressort de ces études qu'une petite fraction de la diversité bactérienne connue est représentée dans notre tube digestif ; 10 des 100 phyla bactériens ont été observées (230) et 99% des bactéries appartiennent à 5 phyla, les Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, et Fusobacteria. Les Firmicutes et Bacteroidetes représentent plus de 90% des bactéries (65% et 25% respectivement, (231)) alors que les Actinobacteria, Proteobacteria, et Fusobacteria sont des phyla sous-dominants (5, 8, et 1% respectivement). Il faut descendre à un niveau taxonomique inférieur pour observer une explosion de la biodiversité bactérienne : au moins 1,800 genres et 15,000 à 36000 espèces ont été répertoriées à ce jour, sachant qu'une plus grande diversité resterait à découvrir (230, 232). Les études sur l'évolution de la distribution des phylotypes microbiens tout au long du tube digestif montrent que le même phylum prédominant est retrouvé au niveau de l'estomac, de l'intestin grêle et du colon, bien que leur nombre et le type d'espèces varie selon une distribution céphalo-caudale (230) (fig.27).

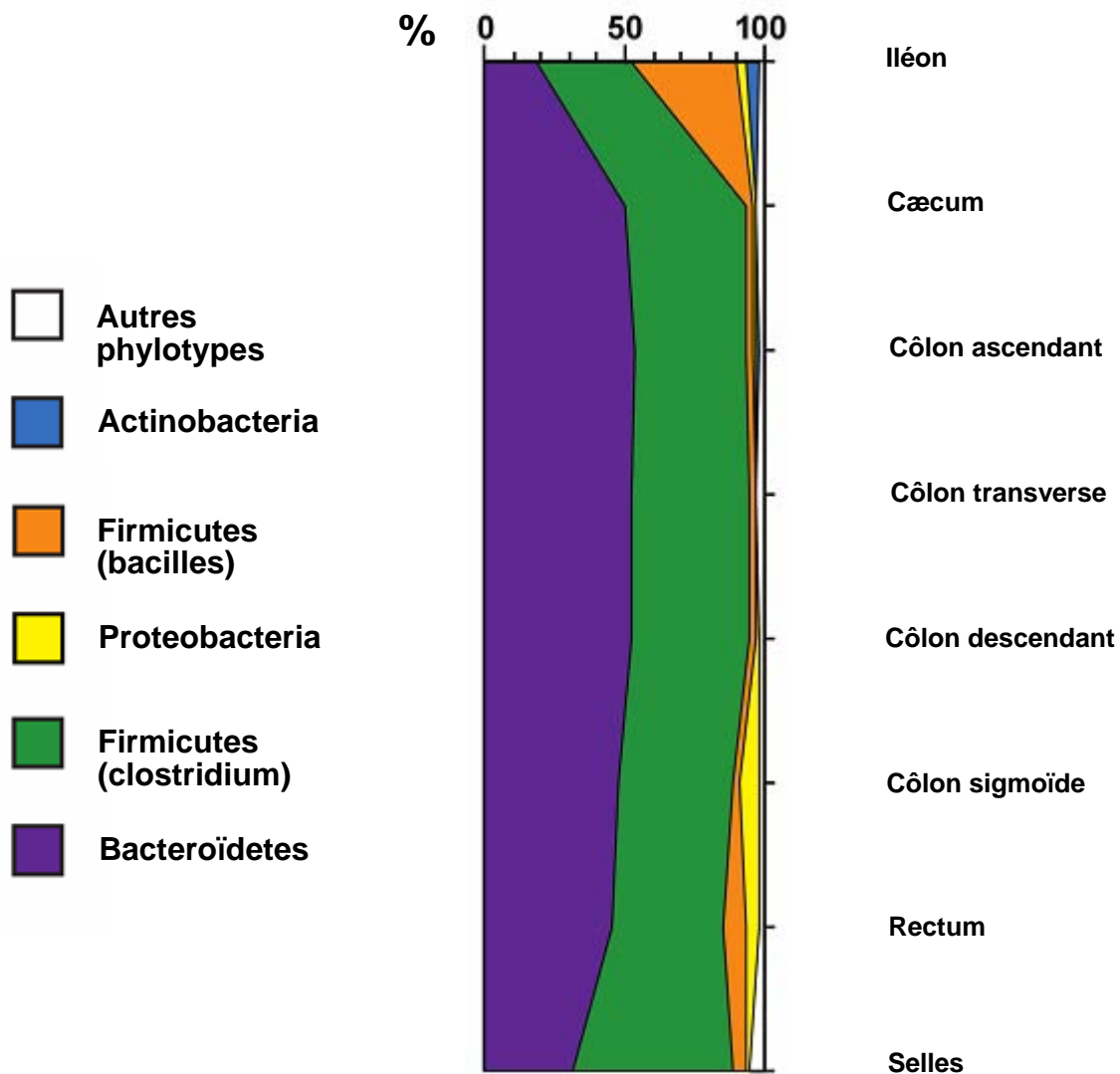


Figure 27 : Schéma de l'évolution de la distribution des phylotypes microbiens le long du tube digestif. 13000 séquences d'ARN 16s de sujets sains ont été analysées par PCR. Le même phylum prédominant est retrouvé au niveau de l'estomac, de l'intestin grêle et du colon, bien que leur nombre et le type d'espèces varie selon une distribution céphalo-caudale. *Source : Peterson et al., 2008*

1.3. microbiote intestinal individuel (fig.28)

Le microbiote intestinal varie de façon considérable entre deux individus en termes d'espèces et de souches bactériennes (221) : 70% des phylotypes identifiés dans le tube digestif sont spécifiques d'un individu, et aucun phylotype commun à la population générale n'est représenté à plus de 0.5% chez un même individu (233). L'exposition aux bactéries maternelles et à l'environnement pendant les phases initiales de la vie, ainsi que le patrimoine génétique de chaque individu définissent des caractéristiques microbiennes singulières propres à un individu donné. Pendant sa croissance et son développement, la plupart des phylotypes sont continuellement présents et inchangés dans le tube digestif (232) de sorte que le microbiote peut être défini comme un noyau stable de colonisation microbienne autour duquel gravitent des visiteurs transitoires (221, 234). Cependant, malgré la grande variabilité d'espèces microbiennes interindividuelles, la représentation phénotypique de l'ensemble des gènes incorporés dans le génome bactérien varie peu d'un individu à l'autre du fait d'une certaine redondance fonctionnelle de ces différents gènes (230). Récemment un vaste microbiome central - au niveau génique - commun à tous les individus a été identifié (233). Cet ensemble de gènes code des fonctions métaboliques, dont le rôle est essentiel dans le maintien de la relation entre l'hôte et son microbiote. A côté de ce microbiome central, chaque individu possède également un *microbiome fonctionnel variable*, avec un set de gènes fonctionnels particulier et différent selon les individus (235). Il est important de noter que des membres d'une même famille ont le plus souvent un microbiome fonctionnel variable similaire à celui d'individus sans lien, ce qui montre une transmission interindividuelle de ce microbiome variable, et probablement le rôle important de l'environnement (236). Cependant le rôle exact du microbiome central et du microbiome variable dans la physiologie humaine

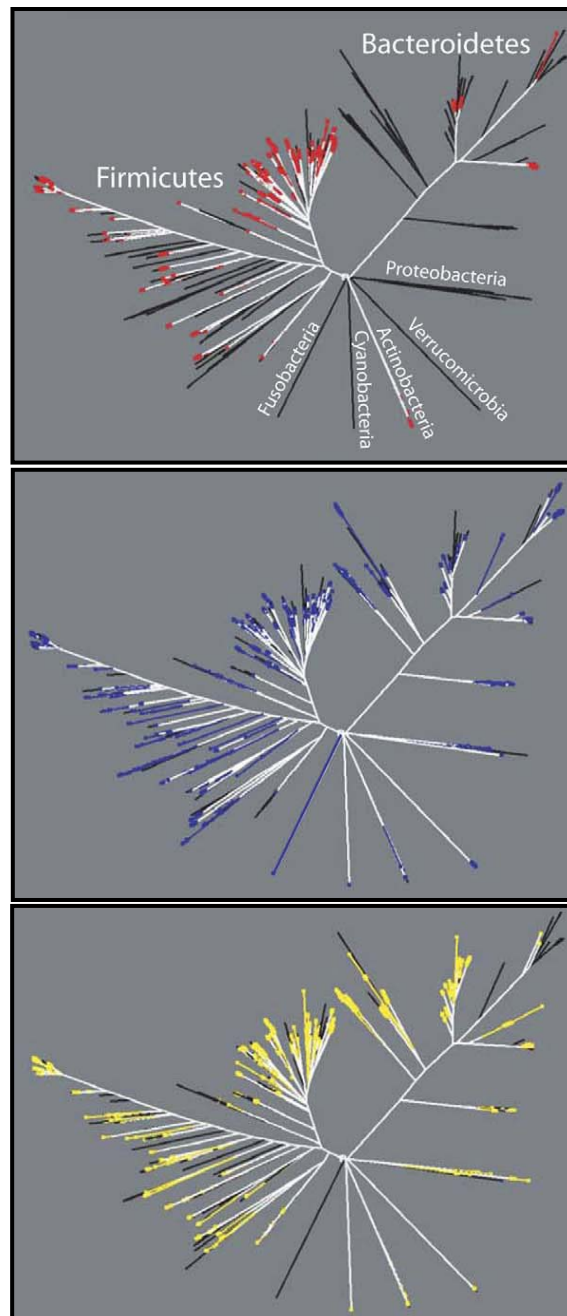


Figure 28 : arbre phylogénique des bactéries du microbiote humain. Exemple de variations inter-individuelles entre 3 individus. Chaque arbre phylogénique représente la flore d'un individu. Les portions colorées (rouge, bleu, jaune) représentent la diversité de la flore propre à l'individu, les portions blanches représentent les genres communs à d'autres individus, et les portions noires représentent la diversité qui n'était pas rencontrée chez un individu donné. *Source : Ley et al., 2006.*

est encore mal connu. Des études fonctionnelles sont donc nécessaires à partir des résultats de séquences afin de mieux préciser les fonctions exactes du microbiome humain.

1.4. microbiote et hôte : une inflammation constitutive physiologique

Le système immunitaire du tube digestif a acquis la capacité de différencier les pathogènes nuisibles des micro-organismes commensaux. Ces derniers ne possèdent pas de facteurs de virulence et évoluent le plus souvent à distance des entérocytes protégés par le film de mucine (237). En revanche, les micro-organismes pathogènes possèdent un arsenal de facteurs d'adhésion et d'invasion qui leur permet d'entrer en contact avec les entérocytes voire même de pénétrer dans l'épithélium. Il faut un système immunitaire dynamique mais permissif qui puisse ajuster la réponse immunitaire en fonction du degré de danger : les bactéries commensales sont tolérées par une « inflammation constitutive physiologique de bas grade » alors que les pathogènes induisent une réaction immunitaire intense destinée à provoquer leur élimination. Le premier des acteurs de ce système immunitaire est l'épithélium intestinal qui évalue la proximité et la densité des micro-organismes résidents (238). La perception de micro-organismes se fait par l'intermédiaire des récepteurs appelés PRR pour *pattern recognition receptors* qui reconnaissent spécifiquement des ligands macromoléculaires bactériens appelés MAMP (« *microbial-associated molecular patterns* »). Les PRRs incluent 2 types de récepteurs : les Nod-like receptors (NLRs) et les Toll-like receptors (TLRs). Les NLRs ont le rôle de vigiles au niveau du compartiment intracellulaire. Ils sont recrutés soit par des MAMP dont l'entrée fait intervenir des protéines de transport situées sur le pôle apical de la cellule (tels hPepT1 ou OCTN2), soit par les bactéries elles mêmes lors de leur entrée dans la cellule. Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires surtout exprimés au niveau baso-latéral. Ils sont impliqués dans la sécrétion de cytokines et

dans l'immunité cellulaire (fig.29). L'activation de ces PRRs induit l'activation des voies MAPK et NF- κ B.

La distribution spatiale des PRRs permet aux entérocytes de différencier les microorganismes commensaux des pathogènes (239). Les antigènes bactériens du compartiment luminal activent les NLRs cytoplasmiques. La réponse aux MAMPs commensaux induit un signal de tolérance immunitaire via le *transforming growth factor β* (TGF- β), la *thymic stromal lymphopietin* (TSLP) et les prostaglandines E2. Ces médiateurs anti-inflammatoires concourent à établir une réponse immunitaire physiologique de bas grade dirigée contre le microbiote intestinal. Parallèlement, en réponse à ces antigènes commensaux, l'épithélium intestinal exprime de multiples effecteurs anti-microbiens comme les peptides antimicrobiens (α -defensines), des espèces réactives oxygénées (ROS pour reactive oxygen species) et le mucus intestinal (240). L'action concertée de ces composants protecteurs aide au maintien d'un « no man's land » stérile immédiatement adjacent à l'épithélium de surface. A l'opposé, les microorganismes pathogènes établissent un contact direct avec les entérocytes et pénètrent fréquemment l'épithélium intestinal. Cela provoque une réaction intense des NLRs et des TLR qui engendre la biosynthèse d'effecteurs antimicrobiens, de cytokines et chimiokines inflammatoires dont le tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), l'interferon- γ (IFN- γ), l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-23, qui provoquent une réaction inflammatoire majeure (241).

Les micro-organismes symbiotiques possèdent par ailleurs des propriétés visant à faire avorter la reconnaissance immunitaire et supprimer la réponse de l'hôte. Ainsi, ils modulent activement le système immunitaire de l'hôte et participent au maintien d'une balance homéostatique avec l'hôte (238). Les bactéries commensales sont capables d'inhiber l'inflammation en ciblant NF- κ B, un médiateur clé de la réponse inflammatoire dans l'entérocyte. Par exemple, *Bacteroides thetaiotaomicron* cible la sous-unité RelA de NF- κ B,

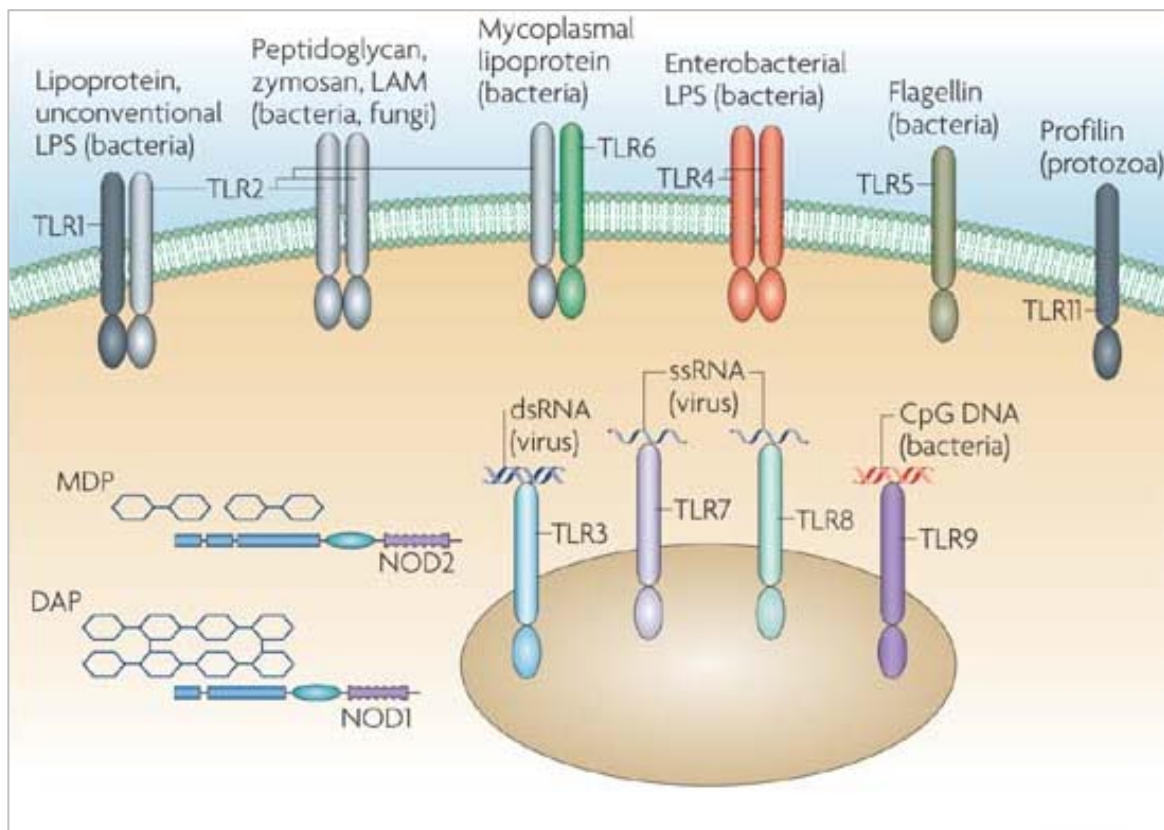


Figure 29 : Représentation schématique de la signalisation par les récepteurs TLR et NLR suite à la reconnaissance de composants bactériens dans les cellules épithéliales.

La perception des micro-organismes se fait par l'intermédiaire des récepteurs appelés PRR (pattern recognition receptors) qui reconnaissent spécifiquement des ligands macromoléculaires bactériens appelés MAMP (microbial-associated molecular patterns). Les PRRs incluent 2 types de récepteurs : les Nod-like receptors (NLRs) et les Toll-like receptors (TLRs). Les NLRs ont le rôle de vigiles au niveau du compartiment intracellulaire. Ils sont recrutés soit par des MAMP dont l'entrée fait intervenir des protéines de transport situées sur le pôle apical de la cellule, soit par les bactéries elles mêmes lors de leur entrée dans la cellule. Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires surtout exprimés au niveau baso-latéral. Ils sont impliqués dans la sécrétion de cytokines et dans l'immunité cellulaire. L'activation de ces PRRs induit l'activation des voies MAPK et NF- κ B. *Source : Kaufmann, 2007.*

et en provoquant sa sortie du noyau, empêche la transcription de gènes pro-inflammatoires (242). *Lactobacillus casei* induit une sous-expression de composants du protéasome, protège ainsi le facteur I κ B de sa dégradation et maintient donc NF- κ B dans un état inactif (243). De même, plusieurs espèces du microbiote intestinal humain, tels *L. plantarum*, *Bifidobacterium breve*, et *Fecalibacterium prausnitzii* sont capables de diminuer la réponse pro-inflammatoire des entérocytes en produisant des métabolites qui ciblent la voie NF- κ B (244-246).

Un élément de décision clé entre tolérance et réponse inflammatoire est le contexte dans lequel les antigènes microbiens sont présentés au système immunitaire gastro-intestinal adaptatif (247). Le tissu lymphoïde associé au tube digestif appelé GALT pour « gut-associated lymphoid tissue » est organisé en structures discrètes appelées plaques de Peyer et follicules lymphoïdes isolés. Ces éléments du système immunitaire sont associés à des cellules de l'épithélium spécialisées, les cellules M. Grâce à leur machinerie endocytaire, ces cellules, transportent continuellement les antigènes microbiens de la lumière intestinale vers le tissu lymphoïde muqueux sous-jacent, où des cellules dendritiques présentent l'antigène à des cellules naïves B et aux lymphocytes T CD4. Lorsque des signaux de tolérance sont induits par les microorganismes symbiotiques, les cellules dendritiques sont maintenues dans un état quiescent. Quand ces cellules présentent l'antigène à des lymphocytes T CD4 naïfs, elles entraînent leur différenciation en sous populations régulatrices : les lymphocytes T CD4 Treg et les lymphocytes pro-inflammatoires, T CD4 helper (TH1, TH2 et TH17). Les lymphocytes Treg induisent un état de tolérance *vis-à-vis* des bactéries commensales par inhibition de la réponse inflammatoire, et cela grâce à la biosynthèse de cytokines anti-inflammatoires telles l'interleukine IL-10 et le TGF- β (248). De façon simultanée, la présentation d'antigènes du microbiote aux cellules B sous le contrôle de TGF- β induit leur différenciation en cellules sécrétrices d'IgA. Les IgA sécrétoires spécifiques sont synthétisées et se fixent sur la couche de mucus qui couvre l'épithélium de surface. En empêchant

l'adhésion de microorganismes et en neutralisant les toxines, les IgA exercent un rôle important dans l'homéostasie entre microorganismes symbiotiques et l'hôte, et aide à cantonner les microorganismes dans la lumière intestinale. En revanche, dans un contexte de réponse pro-inflammatoire induite par la reconnaissance de pathogènes par l'entérocyte, les cellules dendritiques provoquent la différenciation exclusive des cellules effectrices TH1 et TH17 qui induisent une forte réponse inflammatoire contre les micro-organismes invasifs (241).

1.5. Facteurs influençant la composition du microbiote

Bien que considéré comme stable, une vue dynamique du microbiote intestinal humain est en train d'émerger (249, 250). De nombreux facteurs liés à l'hôte peuvent influencer la composition du microbiote (232). L'âge, l'état de santé, les facteurs environnementaux – localisation géographique, ethnie, nourriture – peuvent impacter le microbiote en terme qualitatif et quantitatif (250, 251). En particulier, il est de plus en plus évident que le changement d'alimentation et le statut immunologique du tractus intestinal provoque un changement de la composition des espèces dans le microbiote (234, 249, 252).

Généralement il est admis que les régimes riches en fibres favorisent la croissance des microorganismes du symbiote par rapport aux autochtones opportunistes ou aux allochtones entéro-pathogènes (253). De plus, Turnbaugh et collaborateurs (249) ont montré que le passage d'un régime pauvre en graisses et riche en polysaccharides à un régime riche en graisses et en sucres modifiait le microbiote chez la souris en un seul jour. Chez l'homme, le régime occidental riche en graisses diminue la diversité du microbiote et augmente le taux d'*Actinobacteria* et de Firmicutes par rapport aux Bacteroidetes (233). Il a été démontré récemment que le régime pauvre en graisses et riche en polysaccharides de plantes favorisait

les échanges de nutriments entre Bacteroidetes et Firmicutes producteurs de butyrate. Cette interaction métabolique conduit à la production de butyrate au rôle fondamental dans l'homéostasie de l'hôte (254). De façon opposée un régime pauvre en polysaccharidiques complexes diminue la production de butyrate.

Les maladies humaines non infectieuses caractérisées par une inflammation intestinale aberrante telles que les allergies, ou les facteurs génétiques et environnementaux qui prédisposent à une perte d'antigènes intestinaux intraluminaux (255) pourraient conduire à des activations pro-inflammatoires non contrôlées avec un impact majeur sur la composition du microbiote intestinal (235, 252). L'inflammation rompt l'homéostasie lié au microbiote intestinal en favorisant les bactéries pathogènes au détriment des microorganismes symbiotiques protecteurs (239). Les pathobiontes – comme *Helicobacter*, certains *Clostridium* et *Enterococcus* – sont des pathogènes opportunistes qui réside communément dans le tractus gastro-intestinal (252, 256, 257). Habituellement composants mineurs du microbiote des sujets en en bonne santé, ces pathogènes opportunistes peuvent échapper à la surveillance dans un écosystème inflammatoire, prendre le pas sur les symbiontes et induire une pathologie (252). En maîtrisant l'effet létal de la réponse inflammatoire, les pathobiontes se servent de l'inflammation pour éliminer l'effet barrière du microbiote, éventuellement rompre la barrière physique de l'épithélium et assouvir leurs besoins métaboliques (258). Des modifications spécifiques du microbiote ont été associées au développement de certaines maladies chez l'homme (259), bien qu'il soit difficile de savoir s'il s'agissait de la cause ou de la conséquence. En particulier, des perturbations singulières du microbiote ont été observées dans l'obésité, le diabète de type II, la surcharge graisseuse hépatique (NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease), et les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) (247, 260, 261). L'obésité a été associée à une plus importante proportion de Firmicutes et d'Actinobacteria par rapport aux Bacteroidetes et une diminution globale de la

diversité bactérienne (233, 262). Les MICI sont caractérisées par une réduction marquée de la diversité bactérienne dans les groupes IV et XVa de Clostridium, une diminution des Bacteroidetes, et une augmentation correspondante de Proteobacteria et Bacillus (244, 263). De façon analogue l'inflammation intestinale a été généralement liée à une augmentation marquée des Entérobactéries et une diminution d'autant des membres de la flore résidente (264, 265).

2. Microbiote et cancer colorectal

Même s'il existe peu d'études sur le sujet, le rôle potentiel du microbiote intestinal dans la carcinogenèse colique semble être de plus en plus évident (266-272). Des études métagénomiques et métabolomiques de ce microbiote ont montré pour la première fois son extrême complexité, sa grande variabilité interindividuelle et son immense potentiel métabolique. Parallèlement, une dynamique très inattendue de ce microbiote en réponse à l'alimentation a été montrée. Cette activité des bactéries dans la carcinogenèse ne peut donc s'entrevoir que sous une approche multifactorielle.

2.1. Alimentation, microbiote et carcinogenèse

Le colon chez l'homme est exposé en permanence à un mélange complexe de composés, qui sont d'origine alimentaire ou le résultat de processus de digestion, d'excrétion ou microbiens. Certains de ces composés peuvent endommager la muqueuse intestinale et être à l'origine du cancer. On peut citer notamment les amines hétérocycliques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques amenés par l'alimentation et des composés endogènes spécifiques du système digestif comme les acides biliaires ou des dérivés du

métabolisme enzymatique comme les nitrosamines. L'importance de ces facteurs est cependant difficile à évaluer dans la mesure où aucune étude épidémiologique n'a confirmé leur rôle.

Le métabolisme des substrats alimentaires par certains groupes bactériens du microbiote intestinal peut potentiellement produire aussi des mutagènes et des métabolites réactifs carcinogènes (273, 274). En conséquence l'hypothèse selon laquelle certains groupes bactériens du microbiote associés à une alimentation représentent un facteur de risque de CCR a été avancée (268, 273-275). Considérant l'hypothèse d'une interaction entre alimentation et microbiote dans le CCR, il a été avancé que les différences de microbiote liées à l'alimentation pourraient expliquer l'augmentation du risque de CCR chez les afro-américains (269, 271). Ainsi, certains microorganismes intestinaux peuvent promouvoir des lésions de l'ADN dans les cellules épithéliales (273, 274). Ils activent les amines hétérocycliques générées lors de la cuisson du bœuf en dérivés électrophiles susceptibles de former des adduits d'ADN. Par exemple l'amine hétérocyclique 2-amino-3-méthyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ) est produit par la pyrolyse de la créatinine sucrée. IQ est un pro-carcinogène et peut être converti par l'espèce *Eubacterium* en 2-amino-3-méthyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline-7-one (HOIQ), un mutagène direct (276). L'alcool déshydrogénase microbienne (ADH) exprimée par certains groupes bactériens du côlon peut être impliquée dans l'induction de dommages à l'ADN dans les cellules épithéliales. En présence d'éthanol, l'ADH microbienne peut conduire à la production de l'acétaldéhyde, un carcinogène chimique connu (277). Les membres du groupe bactérien intestinal *Bacteroidetes* produisent une concentration détectable de composés carcinogènes dans le côlon, les Fecapentènes (273). Les Fecapentènes sont une famille de lipides polyinsaturés possédant un effet mutagénique potentiel (278). Il a été démontré dans des fibroblastes humains en culture que ces derniers en présence de glutathion endommagent l'ADN à des concentrations micromolaires (279). Bien

que le mode d'action des Fecapentaenes sur l'ADN soit encore obscur, Kassee et collègues ont démontré que le magnésium, présent en grandes quantités dans certains aliments végétaux, bloquait l'apparition de ces lésions (280). Les intermédiaires réactifs de l'oxygène tels que le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, les radicaux d'hydroxyle et le peroxyde d'azote, attaquent directement ou indirectement l'ADN. Ainsi il a été montré que les lésions de l'ADN dans les cellules épithéliales peuvent être également provoquées par certaines bactéries commensales, telles que les bactéries appartenant à l'espèce *Eubacterium faecalis*, qui produisent du superoxyde extracellulaire. Les bactéries sulfidogéniques sont des membres du microbiote du côlon normal. Ces bactéries utilisent le sulfate comme oxydant pour la dégradation de la matière organique et du sulfure d'hydrogène est formé lors de ces réactions ; or une association entre le sulfure et le CCR a été démontrée (281). En outre, il est intéressant de noter que pendant la circulation entéro-hépatique, les sels biliaires rencontrent les bactéries anaérobies et facultatives du tractus digestif et deviennent le substrat d'une biotransformation microbienne significative (282). La déhydroxylation des acides biliaires déconjugés effectuée par certaines bactéries du côlon conduit à la formation d'acides biliaires secondaires dont le rôle comme co-carcinogènes ou promoteurs de tumeur dans le CCR est clairement établi (283). En particulier, l'acide désoxycholique et l'acide lithocholique sont liés à la carcinogenèse du côlon dans plusieurs études épidémiologiques humaines (284). Ainsi, la consommation d'aliments à haute teneur en graisses, qui induit une sécrétion forte d'acides biliaires, est corrélée avec le risque de CCR (283). D'ailleurs, la taurine, un acide biliaire conjugué, est réduit et transformé en sulfure d'hydrogène après déconjugaison, composé lié à la carcinogenèse car induisant une augmentation de la prolifération cellulaire et inhibition du métabolisme du butyrate (282).

2.2. Microbiote intestinal, inflammation et cancer

A côté de la production de carcinogènes, cocarcinogènes ou pro-carcinogènes, certains microorganismes du colon peuvent intervenir à différents stades du processus néoplasique par l'induction d'une inflammation muqueuse. Cette relation entre cancer et inflammation a été suggérée pour la première fois par Virchow en 1863 et retrouvée ensuite dans de nombreux modèles de cancer, dont le cancer colorectal (255, 274, 285). Les bactéries du microbiote intestinal peuvent ainsi agir par 2 voies : une voie directe liée aux propriétés de ces bactéries et/ou de leur produits de sécrétion (toxines) ; ce sont les facteurs de virulence, développés dans le chapitre suivant (chapitre 2.3) ; et une voie indirecte par l'inflammation chronique non spécifique qu'ils engendrent ou entretiennent.

Une réponse inflammatoire aberrante d'origine non-infectieuse dans le tractus digestif peut conduire à une dysbiose intestinale en faveur de pathobiontes ou des pathogènes allochtones (258). L'envahissement par ces microorganismes pathogènes contribue à la consolidation de l'état inflammatoire par l'induction d'une boucle pro-inflammatoire auto-entretenu. Les pathobiontes peuvent faire basculer la balance d'un état de faible inflammation physiologique à un état inflammatoire majeur indépendamment d'un état inflammatoire préexistant (252). La conséquence de la dysbiose est une réponse inflammatoire chronique auto-entretenu qui peut favoriser le développement du cancer colorectal (270, 286, 287). L'inflammation chronique peut agir sur les premières phases de la carcinogenèse (étape d'*initiation*, où une cellule normale acquiert son 1^{er} événement mutationnel) mais surtout lorsque le processus de transformation néoplasique a débuté (étape de *promotion*).

* initiation tumorale : l'environnement inflammatoire d'un tissu augmente le taux de mutations et la prolifération des cellules mutées. Les cellules inflammatoires activées

(macrophages, neutrophiles) sont à l'origine d'un stress oxydant, soit directement par la production de composés ROS (*reactive oxygen species*) et RNI (*reactive nitrogen intermediates*), soit indirectement via la production de cytokines (TNF α) (fig.29bis) (288). Ce stress oxydant induit des lésions de l'ADN qui touchent principalement les gènes du système de réparation de l'ADN MMR, mais peut également inactiver par oxydation les enzymes de ce système, le rendant non fonctionnel (289, 290). Ces altérations peuvent ainsi conduire à un phénotype MSI, impliqué dans le CCR.

* promotion tumorale : l'inflammation chronique exerce un effet facilitateur à tous les niveaux de la carcinogénèse, si bien que des lésions dormantes peuvent être stimulées après plusieurs années de quiescence. Les cytokines produites par les cellules inflammatoires activent des facteurs de transcription (NF- κ B, STAT3) qui régulent l'expression de gènes impliqués dans l'angiogénèse, la prolifération cellulaire, la survie, la mobilité et l'invasivité (fig.29ter) (291, 292). De plus, la croissance tumorale nécessite des apports nutritifs croissants à l'origine d'une hypoxie tumorale et d'un recrutement de macrophages TAM (« *Tumor Associated Macrophages* »), qui activent la transcription de facteurs pro-angiogéniques (HIF, VEGF) régulés entre autres par les voies NF- κ B et STAT3 (293, 294). Cette néo-angiogénèse est une étape capitale dans le développement et la croissance tumorale.

Dans ce contexte d'inflammation chronique, NF- κ B s'est révélé être le facteur clé qui fournit un lien entre inflammation et cancer (295). NF- κ B est activé par différentes voies de signalisation passant par les TLRs détecteurs de microorganismes ou les cytokines inflammatoires telles que le TNF- α et l'Il-1 β (296) (fig.30, page suivante). NF- κ B activé induit alors l'expression de gènes pro-inflammatoires à l'origine d'un stress oxydatif (cytokines inflammatoires, enzymes de la voie de synthèse des prostaglandines, et monoxyde d'azote (NO)), de gènes anti-apoptotiques et codant des facteurs d'angiogénèse, qui contribue à la promotion du cancer et à sa progression (285, 297).

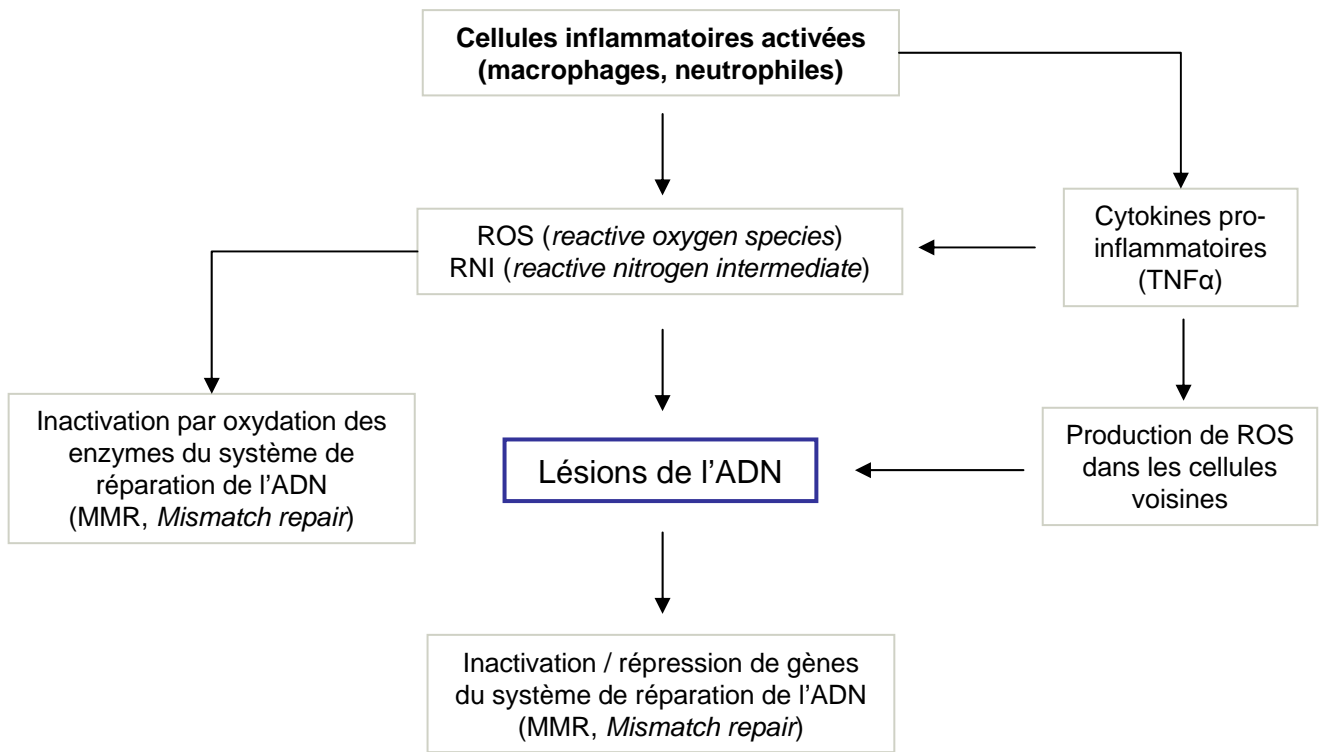


Figure 29bis : Mécanismes inflammatoires impliqués dans l'initiation tumorale. Les cellules inflammatoires activées sont à l'origine d'un stress oxydant de façon directe ou indirecte, via la sécrétion de cytotoxines. Ce stress oxydant est susceptible de générer des lésions de l'ADN touchant principalement les gènes du système de réparation de l'ADN, mais également d'inactiver des enzymes de ce même système, altérant ainsi ses capacités de réparation

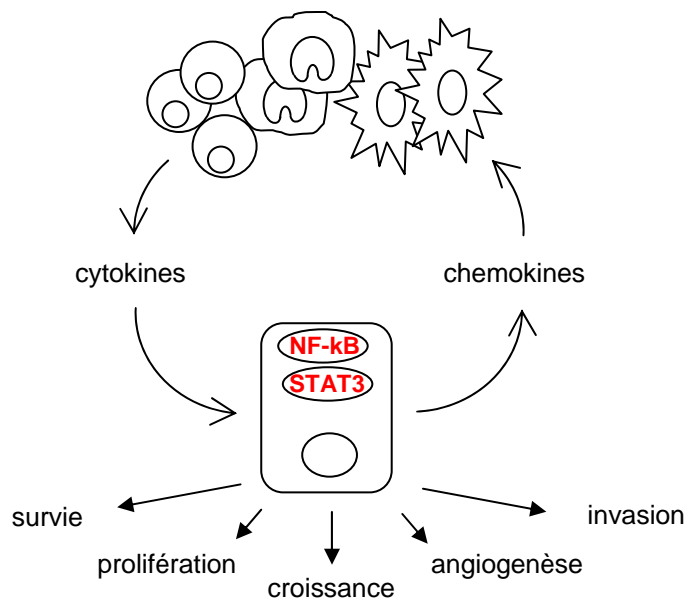


Figure 29ter : Mécanismes inflammatoires impliqués dans la promotion tumorale. Les cellules inflammatoires activées (macrophages, lymphocytes et cellules dendritiques) activent les voies de signalisation impliquées dans la croissance et l'invasion tumorale, via la sécrétion de cytokines. Ces mêmes voies de signalisation provoquent la sécrétion de chemokines qui vont recruter localement d'autres cellules inflammatoires, par chimiotactisme, et pérenniser ainsi la réponse inflammatoire.

2.3. Facteurs de virulence bactérienne dans l'inflammation et le cancer

Certaines bactéries produisent des toxines qui perturbent le cycle des cellules eucaryotes ou provoquent directement des lésions de l'ADN.

2.3.1. *Helicobacter pylori*

La relation la plus forte entre bactéries et cancer concerne *H. pylori*, une bactérie gram négatif qui colonise de façon chronique la muqueuse gastrique de l'homme. Les souches virulentes induisent un état pro-inflammatoire favorisant la survenue de maladies gastriques sévères, telles que l'ulcère gastrique, le cancer gastrique et le lymphome de type MALT (« *mucosa-associated lymphoid tissue* ») (298-300). Les facteurs de virulence de *H. pylori* ont fait l'objet de nombreux travaux ces dernières années. 60 à 70% des souches de *H. pylori* possèdent un îlot de pathogénicité appelé cagPAI qui code pour différentes protéines formant un appareil de sécrétion de type IV. Cet appareil de sécrétion permet l'injection directe dans les cellules épithéliales gastriques de composés bactériens (301). Les modifications des signaux de transduction des cellules épithéliales conduisent à des altérations du cytosquelette et à l'activation de cascades inflammatoires (NF- κ B et protéine activatrice 1 avec synthèse importante d'interleukine-8) et à l'expression de proto-oncogènes (*c-fos* et *c-jun*) (302-304). La sécrétion d'IL-8 induit chez l'homme une forte réponse immunitaire cellulaire et humorale. La réponse cellulaire prédominante chez l'homme induite par *H. pylori* est une réponse de type Th1 et est associée à la libération de cytokines pro-inflammatoires (Interferon-gamma (IFN- γ), IL12, IL18, TNF α) ainsi qu'à une activation des macrophages, contribuant aux dommages tissulaires (305, 306). A côté de ces effets pro-inflammatoires, la protéine CagA, codée par le gène *cagA* appartenant au cagPAI, peut aussi induire des réponses cellulaires de l'hôte telles qu'une perturbation des jonctions serrées et adhérentielles,

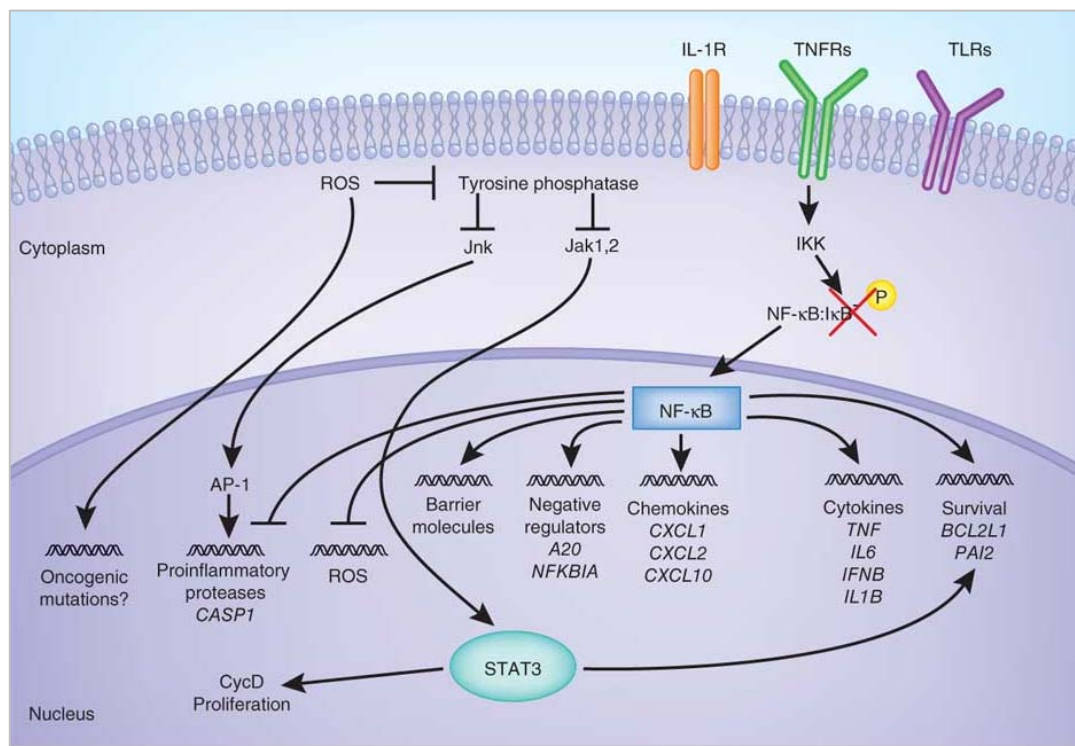


Figure 30 : Mécanismes d'activation de NF-κB dans l'inflammation chronique. NF-κB est activé par différentes voies de signalisation passant par les TLRs détecteurs de microorganismes ou les cytokines inflammatoires telles que le TNF-α et l'Il-1β. NF-κB activé induit alors l'expression de gènes pro-inflammatoires à l'origine d'un stress oxydatif (cytokines inflammatoires, enzymes de la voie de synthèse des prostaglandines, et monoxyde d'azote (NO)), de gènes anti-apoptotiques et codant des facteurs d'angiogenèse, qui contribue à la promotion du cancer et à sa progression. *Source : Ben-Neriah & Karin, 2011*

une perte de polarité cellulaire et une activité mitogène et pro-inflammatoire [pour revue, cf. (307)]. La protéine VacA, une cytotoxine vacuolisante active, est produite dans 50 à 65 % des souches de *H. pylori*. VacA est un facteur de virulence majeur chez *H. pylori*. Elle a la particularité d'être une cytotoxine multifonctionnelle, incluant entre autres une vacuolisation cellulaire, la formation de canaux membranaires, la perturbation des fonctions endosomales/lysosomales, l'apoptose et un effet immunosuppresseur. La capacité de la toxine à former des pores anioniques est une caractéristique importante de son mécanisme d'action [pour revue, cf. (308)]. Malgré l'abondance de ses effets *in vitro*, le rôle précis de cette protéine dans la carcinogénèse gastrique est encore mal connu.

Il a été évoqué l'association de *H. pylori* avec le cancer colorectal, mais les études sont discordantes à ce sujet (pour revue, voir (309)). Vraisemblablement, Il s'agirait plus d'un mécanisme indirect via la sécrétion exagérée de gastrine induite par la présence de *H. pylori* dans l'estomac (310-312).

2.3.2. Bacteroides fragilis

B. fragilis est un membre normal et fréquent du microbiote intestinal. Sa forme toxigénique, qui produit une toxine dénommée TBF pour « toxine de *B. fragilis* » (313), se rencontre chez plus de 20% des sujets sains et peut être responsable de diarrhée et probablement même de MICI. TBF est une métalloprotéase qui clive la E-cadherine, une protéine cruciale pour le contact cellule-cellule, qui interagit avec le cytosquelette via les α - et β -caténines. La dégradation de la E-cadhérine par la TBF provoque la migration de β -caténine vers le noyau où elle se lie à des facteurs de transcription qui activent *c-myc* et la *cyline-D*, ce qui induit une prolifération cellulaire (314). TBF stimule également la voie NF- κ B et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules coliques (313). L'existence d'un lien entre les souches toxiques de *B. fragilis* et le CCR a été suggérée par Toprak et

collaborateurs qui ont observé une augmentation de la charge toxigénique de *B. fragilis* chez les patients atteints de CCR (315). Même si *B. fragilis* entérotoxigène (BFET) et *B. fragilis* non toxigène (BFNT) colonisent tous les deux le colon de souris, seul BFET provoque une colite et l'apparition de néoplasies intestinales. L'action de BFET se traduit par une activation majeure et sélective de la voie STAT3 (« *Signal Transducer and Activator of Transcription-3* ») et une colite caractérisée par une réponse sélective des lymphocytes T helper type 17 (TH17) (316).

2.3.3. *Escherichia coli*

E. coli est une bactérie commensale résidant dans le colon des hommes et des animaux. Certaines souches ont cependant acquis des facteurs de virulence, qui sont à l'origine de pathologies intestinales ou extra-intestinales. Parmi les 4 phylogroupes majeurs de *E. coli* (A, B1, B2 et D), les souches pathogènes intestinales appartiennent le plus souvent aux phylogroupes A et B1 et les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux au phylogroupe B2. Parmi les facteurs de virulence, les toxines produites par certaines souches de *E. coli* (appelées cyclomodulines) nous intéressent plus particulièrement car elles interfèrent avec le cycle cellulaire des cellules de l'hôte. Ces cyclomodulines peuvent être réparties en 2 groupes : les toxines interagissant avec les voies de signalisation cellulaire, et les génotoxines donnant des lésions directes de l'ADN.

2.3.3.1. *Toxines agissant par perturbation du signal cellulaire*

Il s'agit essentiellement de 2 toxines :

- la cyclomoduline **CNF** (pour « *cytotoxic necrozing factor* ») est une toxine sécrétée par certaines souches de *E. coli* uropathogènes et entéro-pathogènes (317, 318). Trois variants ont été caractérisés chez *E. coli* (CNF1, CNF2 et

CNF3), et un facteur similaire appelé CNFY est présent chez *Yersinia pseudotuberculosis*. L'essentiel des études a porté sur CNF1. Le gène *cnf1* est situé dans l'îlot de pathogénicité II (PAI-II) fréquemment observé chez les *E. coli* du phylogroupe B2. L'association entre *E. coli* producteurs de CNF1 et des lésions coliques cancéreuses ou précancéreuses a été rapporté chez l'homme (317, 319). L'activité cytotoxique de CNF1 s'effectue par 2 mécanismes : elle active temporairement les protéines Rho GTPase, un interrupteur moléculaire qui contrôle et régule la physiologie cellulaire (320). Ces protéines jouent un rôle clé dans la carcinogenèse : leur activation permanente favorise l'inflammation via un stress oxydant et l'activation des voies NF- κ B et Cox-2, force la progression du cycle cellulaire en déclenchant la transition de phase G1/S et la réplication de l'ADN, induit des aberrations nucléaires (aneuploïdie, multinucléation, segmentations nucléaires et mitoses multipolaires), et bloque l'apoptose via l'activation de la voie de signalisation Akt/IkappaB kinase (321-326). CNF1 agit également en exploitant les mécanismes physiologiques d'inactivation des protéines Rho GTPase (le protéasome), favorisant alors la mobilité et l'invasion des cellules épithéliales (327).

- La cyclomoduline **Cif** (« *Cycle Inhibition Factor* ») est une toxine protéique inhibant le cycle cellulaire. La prévalence du gène *cif* a été évaluée à moins de 2% chez *E. coli* (328). La toxine Cif est codée par un prophage lambdaïdoïde présent dans la plupart des souches EHEC et EPEC (329). Bien que retrouvé principalement dans les souches du phylogroupe B1, le gène *cif* peut être présent dans les 4 principaux groupes phylogénétiques de *E. coli*. Un point commun des souches porteuses de ce gène est la présence du locus

d'attachement et d'effacement des entérocytes (locus LEE), qui caractérise le pathotype EPEC et est également observé chez de nombreux EHEC (329). Ce locus code un système de sécrétion de type III (SST3) permettant l'injection dans la cellule hôte de Cif. Cette cyclomoduline n'est pas seulement observée chez *E. coli*, quatre protéines homologues de Cif ayant été mises en évidence chez *Yersinia pseudotuberculosis*, *Photobacterium luminescens*, *Photobacterium asymbiotica*, et *Burkholderia pseudomallei*. Cif induit une synthèse de l'ADN sans division cellulaire (mécanisme d'endoreduplication caractérisé par un cycle cellulaire sans phases G₂ et M). La teneur en ADN des cellules augmente ainsi et peut atteindre 16n. Le cycle cellulaire s'arrête alors de façon irréversible en G₂/M ou G₁/S *in vitro*. Le blocage du cycle cellulaire est lié à l'accumulation des protéines inhibitrices du cycle cellulaire CKI p21^{Waf1/Cip1} et p27^{Kip1}, suite à l'inhibition de leur dégradation par la voie ubiquitine/protéasome. Récemment, Cui *et al.* ont montré que Cif était un puissant inhibiteur de la voie d'ubiquitination eucaryote (330). Cif désamide spécifiquement la protéine ubiquitine-like Nedd8. Cette toxine altère ainsi le processus d'ubiquitination et donc la dégradation de protéines comme p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} et RhoA. A l'heure actuelle, aucun lien entre l'expression de Cif et la carcinogenèse colique n'a été établi. Cependant, l'activité de Cif sur l'ubiquitination suggère une activité pléiotropique, qui pourrait affecter des protéines clés de la cancérogenèse comme p53 et les ubiquitine-ligases. Les endoreduplications induites par Cif peuvent aussi engendrer des anomalies génétiques susceptibles de favoriser le développement tumoral.

2.3.3.2. Toxines induisant des lésions de l'ADN

Il s'agit essentiellement de 2 types de cyclomodulines :

- Les toxines **CDT** (« *Cytolethal Distending Toxin* ») sont observées chez 6 espèces de bactéries Gram négatif. Cinq variants, CDT-I à CDT-V ont été caractérisés chez *E. coli*. Ils sont essentiellement retrouvés chez les souches du phylogroupe B2. Elles sont codées par trois gènes *cdtA*, *cdtB* et *cdtC* organisés en un opéron le plus souvent chromosomique, parfois plasmidique (plasmide Vir codant CDT-III et CNF2). Les CDT possèdent une activité DNase qui catalyse des cassures de l'ADN double brin. *In vitro*, cette activité aboutit à l'arrêt du cycle cellulaire au point de contrôle G2/M et à la mise en place d'une réponse visant à réparer les lésions (331). CDT, dont la production favorise une colonisation persistante de l'intestin, provoque aussi la sécrétion de molécules proinflammatoires telles que NF- κ B, TNF- α , IL-6, et COX-2 et est à l'origine le développement de dysplasie dans un modèle d'hépatocarcinogénèse induite par la bactérie *H. hepaticus* (332, 333). L'activité génotoxique de CDT favoriserait l'acquisition d'évènements mutationnels pouvant activer des gènes oncogènes et/ou inactiver des gènes suppresseurs de tumeurs.
- La **colibactine**, produite par certaines souches de *E. coli* qui contiennent un îlot génomique de 54kp appelé îlot *pks*, appartiennent au phylogroupe B2 regroupant principalement des souches pathogènes extra-intestinales et des souches commensales persistantes (334). De façon surprenante, l'îlot *pks* est également porté par *E. coli* Nissle 1917, une souche utilisée comme probiotique (335). L'îlot *pks* contrôle la production d'un ou plusieurs composés polycétoniques et polypeptidiques non ribosomiaux induisant des

cassures double brin de l'ADN (335). Comme observés avec les bactéries productrices de CDT, les souches porteuses de cet îlot induisent *in vitro* un arrêt réversible du cycle cellulaire en phase G2/M, suite à l'activation de la voie de réparation des lésions de l'ADN CHK2/ATM. Les souches de l'îlot *pks* induisent également des lésions de l'ADN *in vivo*, une instabilité chromosomique, sont mutagènes et favorisent la transformation des cellules (336). Le rôle de *pks* reste à définir. Il pourrait favoriser la colonisation bactérienne en freinant le renouvellement épithélial, altérer la réponse immunitaire et ainsi aider le processus infectieux mais aussi à long terme favoriser le développement de CCR (337).

2.4. Microbiote intestinal et protection contre le risque de CCR

Alors que la plupart des études se sont focalisées sur les capacités carcinogéniques du microbiote intestinal, un rôle des bactéries dans la protection émerge à présent. Les probiotiques, les prébiotiques et les symbiotiques ont montré une efficacité contre le risque de CCR chez l'homme (266). Dans une étude sur 4 ans de 368 patients, l'administration de *L. casei* diminuait la taille des tumeurs et le risque de récurrence de polypes coliques atypiques, sans toutefois d'effet sur l'incidence du CCR (338). Les effets d'un produit symbiotique contenant les probiotiques *L. rhamnosus GG* et *B. lactis Bb12*, ont été testés lors d'un essai clinique chez 37 patients atteints de CCR et 43 patients polypectomisés (339, 340). Le traitement symbiotique réduisait les lésions de l'ADN et la prolifération cellulaire colique, bien qu'aucun effet n'ait été observé sur le stade tumoral.

En ce qui concerne les mécanismes de protection impliqués, on peut supposer que les bactéries commensales intestinales entrent en compétition avec les pathogènes producteurs de

toxines pro-carcinogènes et limitent ainsi leur implantation et leur prolifération. Certains probiotiques tels *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* présentent également une capacité à contrecarrer la colonisation par des pathogènes (341). De plus, les symbiotes favorisent une inflammation physiologique intestinale de bas grade qui pourrait jouer un rôle dans la protection contre le développement du CCR en favorisant le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale et l'efficacité du système immunitaire contre les bactéries pathogènes (247).

Les microorganismes résidents et des probiotiques permettent de lutter contre l'inflammation chronique, qui est un facteur de risque de CCR. Les cellules Treg joueraient un rôle important par leur habilité à contrôler l'inflammation associée au cancer (342). Par l'induction d'une réponse immunomodulatrice dépendante de l'IL-10, des microorganismes protecteurs favoriseraient l'expansion des cellules Treg, et la suppression de signaux pro-inflammatoires épithéliaux (244-246, 265, 343). Ils pourraient également cibler spécifiquement la voie pro-inflammatoire dépendante de NF- κ B. *B. thetaiotaomicron* par exemple induit l'exportation de la protéine RelA en dehors du noyau aboutissant à une diminution de la transcription des gènes dépendants de NF- κ B. De la même façon, *Faecalibacterium prausnitzii*, un membre dominant du microbiote intestinal appartenant au groupe IV des Clostridium, sécrète des métabolites capables de bloquer l'activation de la voie NF- κ B (244). *Bacteroides fragilis*, un autre commensal intestinal essentiel, produit un polysaccharide bactérien A (PSA pour *bacterial polysaccharide A*) qui fonctionne comme une molécule anti-inflammatoire (256).

Les commensaux intestinaux peuvent également avoir un rôle actif dans la détoxification des carcinogènes. Par exemple des membres des groupes *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* apparaissent comme des antagonistes de l'effet mutagène du 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) (344). Le mécanisme ferait appel à l'inactivation ou le

piégeage de IQ à la surface bactérienne. De même, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* assimilent l'acide cholique ce qui pourrait contribuer à diminuer le risque de développer un CRC (345, 346).

Certains groupes intestinaux génèrent des métabolites actifs dans la protection du CCR comme par exemple, les acides gras à chaîne courte (butyrate, propionate et acétate) qui sont des produits finaux de la fermentation de carbohydrates complexes par le microbiote. Ces acides gras à chaîne courte induisent l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et de la différenciation cellulaire dans des modèles animaux. Associés au butyrate, certains microorganismes coliques comme les membres des groupes XIVa et IV de *Clostridium* sont impliqués dans la formation d'acide linoléique conjugué, un acide gras à chaîne longue protecteur du cancer (347, 348). De plus, de nombreux composants de plantes du groupe des Lignans peuvent être métabolisés par les bactéries en composés préventifs du cancer par des groupes intestinaux de symbiontes comme l'enterodiol et l'entérolactone qui diminuent significativement le risque d'adénome colique (349, 350).

Des commensaux *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont capables de capturer le plasminogène humain, qui est surexprimé dans le cancer et impliqué dans la croissance tumorale, l'invasion et les métastases en agissant sur l'angiogenèse et la migration cellulaire (227, 351). Ces bactéries pourraient ainsi soustraire le plasminogène humain aux cellules métastatiques et ralentir la progression du CRC.

Il est à noter cependant que toutes les données acquises sur l'effet des prébiotiques, des probiotiques et des symbiotiques sont issues de recherches in vitro ou expérimentales chez l'animal. Les études chez l'homme n'ont pas réussi à démontrer un effet significatif chez l'homme (352-354).

IV - Cancer colorectal, AIEC et maladie de Crohn

Les découvertes récentes en microbiologie médicale ont montré que les bactéries étaient impliquées dans la plupart des grandes affections de notre ère. La meilleure compréhension des phénomènes de carcinogenèse a fait naître l'hypothèse que le cancer pouvait avoir lui aussi une origine infectieuse. Le rôle carcinogène de certains virus (virus de l'hépatite B HBV, Epstein barr virus HPV, Human papilloma virus HPV) est clairement démontré via un mécanisme direct résultant souvent de l'action d'un seul gène (355). Le rôle des bactéries est plus controversé, étant donné la difficulté de savoir si les bactéries retrouvées dans certains cancers sont la cause ou une conséquence de la carcinogenèse. Cependant, certains agents bactériens (*Helicobacter pylori*, *Bacteroides fragilis* toxigène) semblent impliqués dans les cancers chez l'homme et chez l'animal, le plus souvent par le biais d'une infection chronique (316, 356).

1. Cancer colorectal et *E. coli*

La forte incidence du CCR est à l'origine de nombreuses études épidémiologiques qui ont étudié les associations bactéries – CCR. Une revue récente de la littérature a montré que plusieurs agents bactériens (dont *Streptococcus bovis*, *Helicobacter pylori*, *Bacteroides fragilis* et *Escherichia coli*) pourraient intervenir dans le cancer colorectal (357). Parmi eux, *E. coli* joue un rôle particulier de par sa vaste représentation dans le tube digestif et de par son implication dans de nombreuses affections inflammatoires. *Streptococcus bovis*, *Helicobacter pylori* et *Bacteroides fragilis* ne sont pas considérées comme des bactéries commensales du tube digestif, contrairement à *E. coli*, même si ces bactéries sont fréquemment retrouvées chez

les sujets sains. De même, les souches de *E. coli* impliquées ne seraient pas des souches commensales, mais des souches ayant acquis des facteurs de pathogénicité (358).

Certains mécanismes d'action permettant de suspecter un rôle potentiel de souches de *E. coli* dans le CCR ont été mis en évidence. C'est le cas pour des souches de *E. Coli* entéropathogènes (EPEC) qui possèdent le gène *eae* codant une protéine bactérienne d'attachement, l'intimine, impliquée dans des propriétés d'attachement des bactéries à la muqueuse colique, au niveau de la partie proliférative des cryptes (359). Ces *E. coli*, appartenant à la classe des AEEC (« *Attaching and Effacing E. Coli* »), sont surreprésentées chez les patients CCR et sont capables d'induire dans les cellules hôtes une diminution d'expression de certaines protéines (hMLH1, hMSH2) du système de réparation de l'ADN. Ceci est à l'origine d'un phénotype MSI, voie de carcinogenèse bien identifiée dans le cancer colorectal.

D'autres souches de *E. coli* produisent des toxines appelées cyclomodulines, qui interfèrent avec le cycle cellulaire (cf. chapitre 2.3.3). Certaines de ces CM – comme CDT par exemple – ont une activité génotoxique, et il est tentant de penser qu'elles pourraient intervenir dans la carcinogenèse colique (360). D'autres, telle Cif qui provoque une endoreduplication, ou CNF qui est à l'origine d'hyperploïdie en l'absence de toute division cellulaire, pourraient être considérées comme des promoteurs potentiels d'anomalies génétiques. De surcroît, par activation directe ou indirecte de GTPases, il a été montré que les CM pouvaient bloquer l'apoptose, un autre mécanisme important dans la carcinogenèse (361). Si les *E. coli* producteurs de CM ont surtout été décrits dans les affections extra-intestinales, certains *E. coli* associés au CCR ont également montré leur aptitude à produire des CM, en particulier CNF et CDT (317).

Selon un mécanisme similaire aux AEEC, certaines souches de *E. coli* ont montré des propriétés d'adhésion et d'invasion dans les cellules épithéliales intestinales. Swidsinski et

collaborateurs ont comparé la colonisation de la muqueuse colique par des populations bactériennes adhérentes et invasives chez des sujets normaux (symptomatiques et asymptomatiques), porteurs d'adénomes colorectaux et porteurs de CCR (362). Des bactéries adhérentes ont été retrouvées associées à la muqueuse de 3% des sujets contrôles asymptomatiques, alors qu'elles étaient retrouvées dans 90% et 93% des patients porteurs d'adénomes et de CCR respectivement. Une même colonisation était observée au niveau de la muqueuse tumorale ou non tumorale. Parmi ces bactéries, plus de 80% étaient des *E. coli*, et 87% d'entre elles étaient intracellulaires. Ces résultats suggéraient donc l'implication de souches de *E. coli* dans le CCR, mais sans préciser si ces souches étaient la cause ou la conséquence du cancer. Cependant, la présence de ces bactéries adhérentes et invasives à des stades très précoces de la carcinogenèse (adénome) et dans la muqueuse non tumorale des patients plaident pour une action au début du processus de carcinogenèse. De même, Martin et collaborateurs ont rapporté un taux plus important de bactéries associées à la muqueuse et de bactéries intra-muqueuses sur des biopsies de patients CCR comparé à des contrôles sains (317). Des *E. coli* exprimant des hémagglutinines étaient plus souvent retrouvés chez les patients CCR que chez les contrôles (38% vs 4%, $p=0.01$). Les mécanismes d'actions n'ont pas été explorés de façon exhaustive mais de nombreux gènes codant des toxines et des adhésines ont été identifiés, dont des gènes codant des cyclomodulines (*cnf1*, *cnf2*, *cdt*). Dans cette même étude, les auteurs ont comparé les patients CCR à des patients atteints de maladie de Crohn. Les taux de bactéries adhérentes à la muqueuses ou intra-muqueuses étaient similaires à ceux des patients CCR, ainsi que la proportion de patients hébergeant des souches productrices d'hémagglutinines. A l'issue de cette étude les auteurs ont soulevé l'hypothèse d'une origine inflammatoire du CCR médiée par les bactéries, étant donnée la présence de souches similaires de *E. coli* associées à la muqueuse chez les patients CCR et les patients Crohn. Une telle situation est similaire à ce qui a pu être observé avec *Helicobacter pylori* et

son rôle dans le cancer de l'estomac. D'ailleurs, le CCR sporadique et le CCR associé aux MICI présentent des similarités de la séquence adénome – cancer (162). Le CCR sporadique pourrait être associé à un dysfonctionnement de l'apoptose dû à un état d'inflammation chronique de bas grade de la muqueuse intestinale, état inflammatoire résultant de l'interaction entre certaines espèces du microbiote intestinal et la muqueuse colique. De plus, la capacité de ces souches à exprimer la cyclomoduline *cnf1*, dont le produit de gène induit une expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) dans les cellules hôtes infectées, corrobore cette hypothèse.

2. AIEC, CEACAM6 et maladie de Crohn

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique intestinale, dont l'une des complications est la dégénérescence adénocarcinomeuse, due *à priori* à l'inflammation chronique de la muqueuse intestinale résultant des poussées successives. Les similitudes bactériennes entre MC et CCR dans l'étude de Martin et collaborateurs suggèrent la séquence bactérie – inflammation chronique intestinale – cancer dans la genèse du CCR sporadique, où l'inflammation intestinale chronique serait latente et asymptomatique (317). Si l'étiopathogénie de la MC reste encore méconnue, le rôle des bactéries de la flore – et des *E. coli* en particulier – semble jouer un rôle prépondérant.

En effet, une étude ancienne sur le sérum de patients atteints de MC avait déjà rapporté un taux anormalement élevé de *E. coli*, et suggérait leur implication dans la pathogénèse de cette affection (363). Plus tard, des prélèvements biopsiques de muqueuses de patients atteints de MC en poussée ont montré la présence d'antigènes spécifiques de *E. coli* au niveau des zones ulcérées, des granulomes inflammatoires et des macrophages de la muqueuse (364-367). Par la suite, des études microbiologiques indépendantes ont montré un

nombre plus important de souches *E. coli* associés à la muqueuse des patients atteints de MC par rapport à des sujets contrôles (317, 367-373) ; ces souches de *E. coli* appartiennent d'ailleurs plus souvent aux groupes phylogéniques pathogènes B2 et D (374). Enfin, la caractérisation phénotypique de ces souches de *E. coli* a permis de retrouver des propriétés d'adhésion et d'invasion de cellules épithéliales intestinales, de survie et de réplication dans les macrophages, définissant ainsi un nouveau pathovar : le pathovar AIEC, pour Adherent Invasive Escherichia Coli (375).

2.1. Propriétés d'adhésion des souches AIEC

La majeure partie des souches de *E. coli* retrouvées au niveau de la muqueuse intestinale ou dans des selles de patients atteints de MC possède des propriétés d'adhésion aux cellules eucaryotes *in vitro*. Ainsi, deux études avaient montré que 62% à 53% des souches de *E. coli* isolées des selles de patients atteints de MC présentaient des propriétés d'adhésion aux cellules buccales contre 5% à 6% des souches isolées de sujets contrôles (376, 377). Dans une autre étude, 84,6% des patients atteints de MC et 78,9% des patients présentant une récurrence de MC hébergeaient des souches de *E. coli* adhérant aux cellules épithéliales intestinales Caco-2, contre seulement 33,3% des contrôles (368). Dans l'étude de Martin et al., les patients atteints de MC présentaient des souches *E. coli* présentant des propriétés d'hémagglutination en proportion plus importante par rapport aux sujets contrôles (39% vs 4%, $p=0.02$) (317). L'étude spécifique des bactéries AIEC dans la MC a montré que les propriétés d'adhésion étaient liées à des pili de type 1 présents à la surface des bactéries, qui interagissaient avec des résidus mannose situés au pôle apical des entérocytes, au niveau d'un récepteur glycosylé appelé CEACAM6 (cf. infra) (378).

2.2. Propriétés d'invasion des souches AIEC

Plusieurs études indépendantes ont rapporté chez les patients atteints de MC la présence de *E. coli* internalisés dans la muqueuse, ou la capacité des *E. coli* associés à la muqueuse d'envahir les cellules épithéliales intestinales (317, 319, 370, 373, 374). La souche de *E. coli* LF82, isolée d'une lésion iléale chronique d'un patient atteint de MC (319, 368) représente la souche AIEC de référence. Cette souche est capable d'envahir *in vitro* les cellules épithéliales intestinales Intestine-407, Caco-2 et HCT-8, ainsi que les cellules épithéliales de larynx HEP-2, et ceci avec un niveau d'internalisation comparable à celui des *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), pathovar de référence de *E. coli* pour le phénotype invasif et très proche de *Shigella* spp. (375). L'interaction entre la souche LF82 et les cellules épithéliales est caractérisée par l'émission d'élongations membranaires à la surface des cellules cibles qui englobent les bactéries adhérentes. Ces élongations, localisées aux sites de contact intime avec les bactéries, sont sous-tendues par une accumulation d'éléments du cytosquelette cellulaire, comme en témoignent les zones cytoplasmiques denses observées au niveau des sites d'interaction (fig.31). Ce phénomène d'internalisation de la souche LF82 dans les cellules HEP-2 nécessite une polymérisation active d'actine et le recrutement de microtubules. Cependant, aucun des déterminants génétiques d'invasion connus chez *Shigella* spp., *Salmonella* spp., ou chez les *E. coli* pathogènes n'a été retrouvé chez la souche LF82 (375). Comme d'autres souches invasives du type EIEC, la souche LF82 est capable de survivre mais aussi de se multiplier dans les cellules intestinales. L'analyse en microscopie électronique à transmission a montré que la souche LF82 avait la capacité, tout comme *Shigella* spp., de lyser la membrane de la vacuole d'endocytose (fig.31) et de se retrouver libre dans le cytoplasme, environnement favorable à une multiplication bactérienne (375).

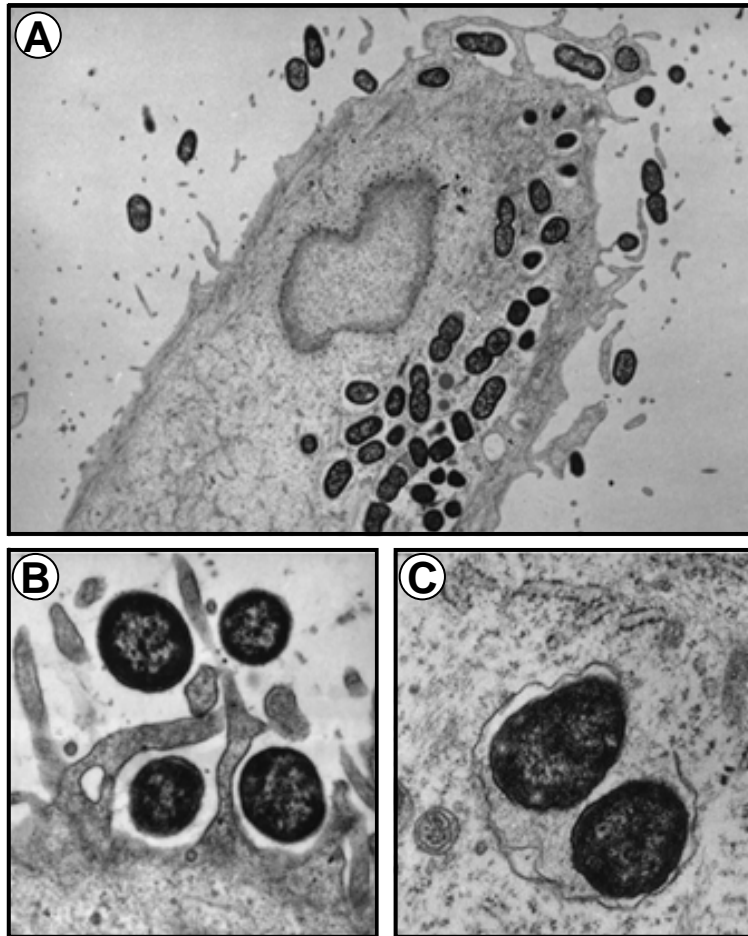


Figure 31 : Clichés de microscopie électronique à transmission de cellules épithéliales HEp-2 infectées par la souche de *E. coli* LF82.

(A) Adhésion et invasion des bactéries LF82 à la cellule hôte ($\times 6\ 200$).

(B) Formation d'extensions membranaires par la cellule hôte infectée qui englobent les bactéries adhérentes en vue de leur internalisation ($\times 21\ 600$).

(C) Lyse de la vacuole d'endocytose contenant les bactéries LF82 ($\times 28\ 800$). *Source : Boudeau et al., 1999*

2.3. Propriétés de survie et multiplication en macrophages des souches AIEC

Parmi les souches isolées de patients atteints de MC, les souches de *E. coli* appartenant au pathovar AIEC ont été sélectionnées et leur comportement étudié dans des cellules macrophagiques murines et humaines. Il a été démontré que toutes les souches AIEC isolées de patients atteints de MC étaient capables, après phagocytose par les macrophages murins J774, de survivre et de se multiplier fortement jusqu'à 48 h post-infection, avec un nombre de bactéries intracellulaires à 48 h post-infection pouvant atteindre 74 fois le nombre de bactéries internalisées à 1 h. (379). Une étude plus poussée avec la souche AIEC de référence LF82 a montré sa capacité à résister à l'activité bactéricide des cellules macrophagiques J774 pendant au moins 5 jours (379). Les clichés obtenus en microscopie électronique à transmission ont montré que les bactéries LF82 induisaient la formation d'une large vacuole à 24 h post-infection, par fusion de vacuoles précoces tout en préservant l'intégrité de la cellule hôte (fig.32). Aucune bactérie libre dans le cytoplasme n'a été observée, et aucune mort cellulaire de macrophages infectés n'a été constatée, que ce soit par apoptose ou par nécrose, contrairement aux macrophages infectés par *Shigella* spp. ou *Salmonella* spp.

Il a également été montré que les macrophages infectés par la souche LF82 sécrétaient des grandes quantités de TNF- α , qui à son tour augmentait le pouvoir réplicatif de la souche LF82, créant ainsi une boucle d'amplification (379). Enfin, il a pu être observé que la machinerie autophagique était recrutée au site d'entrée des bactéries lors de l'infection de macrophages, et que ce processus autophagique était nécessaire pour limiter la réplication intramacrophagique des souches de *E. coli* adhérentes et invasives, mais également pour initier la réponse inflammatoire (380).

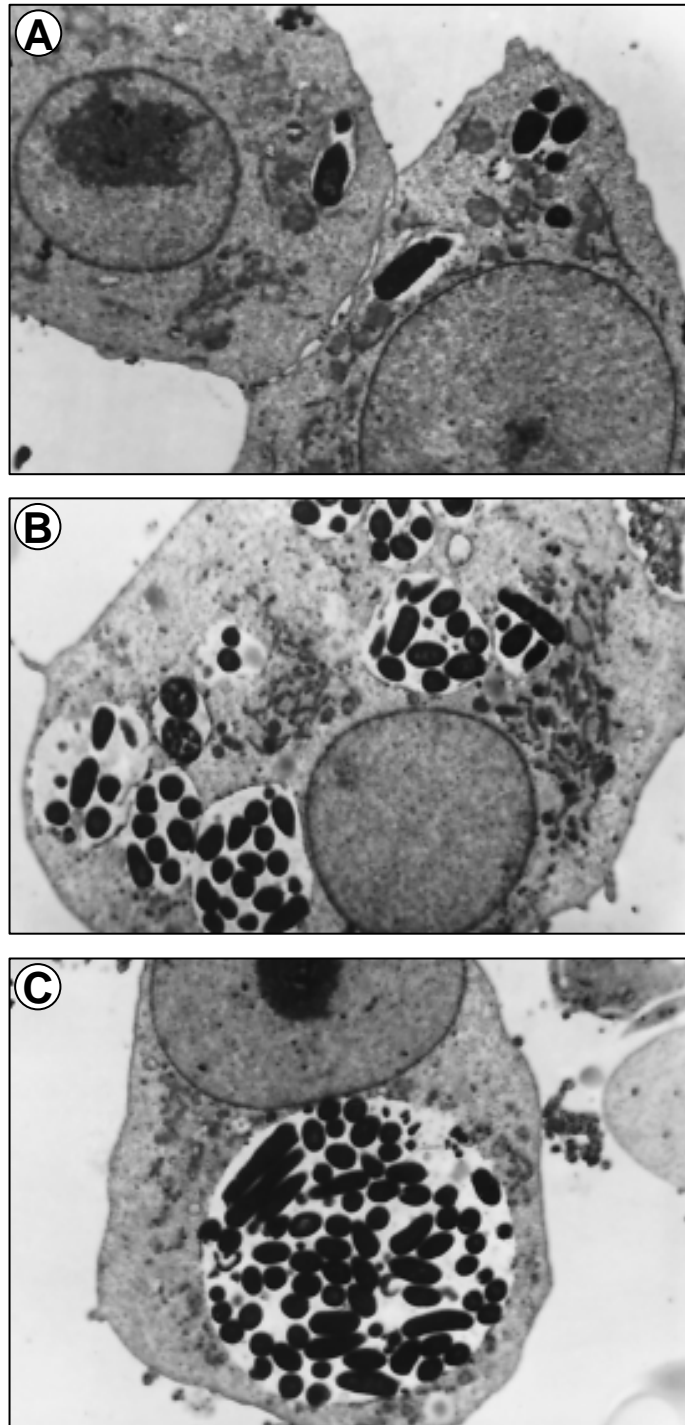


Figure 32 : Clichés de microscopie électronique à transmission de macrophages J774-A1 infectés par la souche de *E. coli* LF82.

(A) Après 1 h d'infection, les bactéries LF82 sont internalisées dans un phagosome.

(B) Les bactéries LF82 sont capables de se multiplier, et à 8 h postinfection des vacuoles contenant plusieurs bactéries sont observées.

(C) A 24 h post-infection, les bactéries LF82 se retrouvent dans une large et unique vacuole ($\times 7\ 200$).

Source : Glasser *et al.*, 2001

2.4. Rôle du récepteur CEACAM6

La famille des molécules d'adhésion cellulaire CEACAMs (*carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule*) est une sous-famille de la superfamille des Immunoglobulines, exprimées dans de nombreux tissus digestifs et extra-digestifs, et notamment le colon (145) (fig.33). L'épithélium intestinal normal secrète de grandes quantités de CEACAMs (50–70 mg par jour), et il a été suggéré que ces molécules intervenaient dans des processus d'adhésion intercellulaire par des liaisons homo- ou hétéro-typiques mais également dans la protection de la muqueuse contre les micro-organismes (134, 381-383). La famille des CEACAMs est divisée en deux groupes selon le mode d'ancrage à la membrane cellulaire, qui peut-être trans-membranaire ou via un pied glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) (134).

Certains membres de la famille des CEACAMs, notamment CEACAM5 et CEACAM6, ancrés à la membrane cellulaire via GPI, interviennent dans l'invasion et la migration cellulaire, et influencent donc l'architecture tissulaire (384). Dans le côlon, ces deux molécules sont visibles dans l'intestin primitif au cours de la vie fœtale et localisées essentiellement au niveau apical tout au long du développement (142). Leur expression est à minima dans le compartiment prolifératif des cryptes intestinales, alors qu'elle est maximale au sommet des cryptes, suggérant un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire.

2.4.1. Dans la maladie de Crohn

Le mécanisme d'adhésion des bactéries AIEC à la muqueuse intestinale fait intervenir les pili de type 1 présents à la surface de ces bactéries (385). La présence de ces pili de type 1 est un facteur de virulence des bactéries AIEC dans la MC (385). Le mécanisme d'adhésion de ces pili aux entérocytes intestinaux fait intervenir des résidus mannoses exprimés au pôle apical des entérocytes et surexprimés chez les patients atteints de MC (378). Parmi les

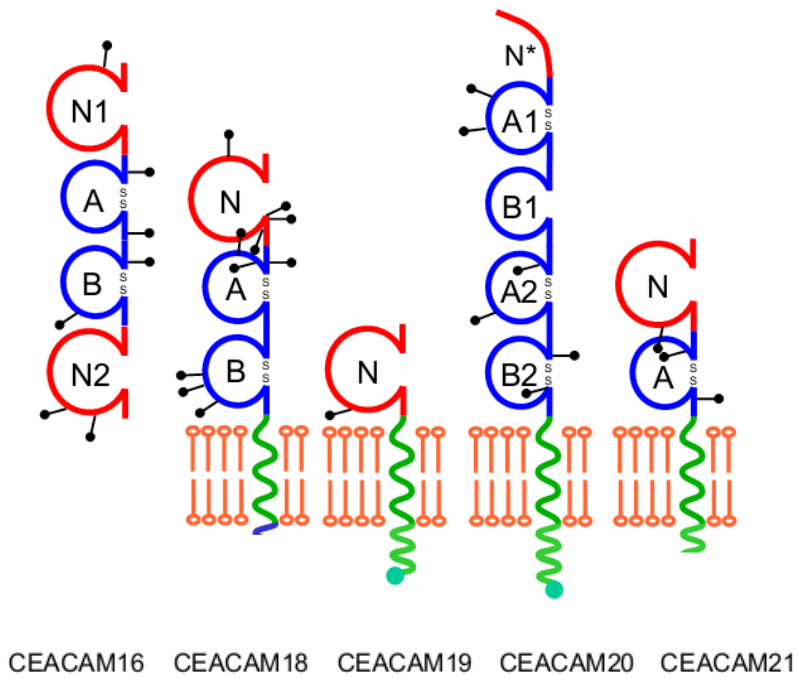
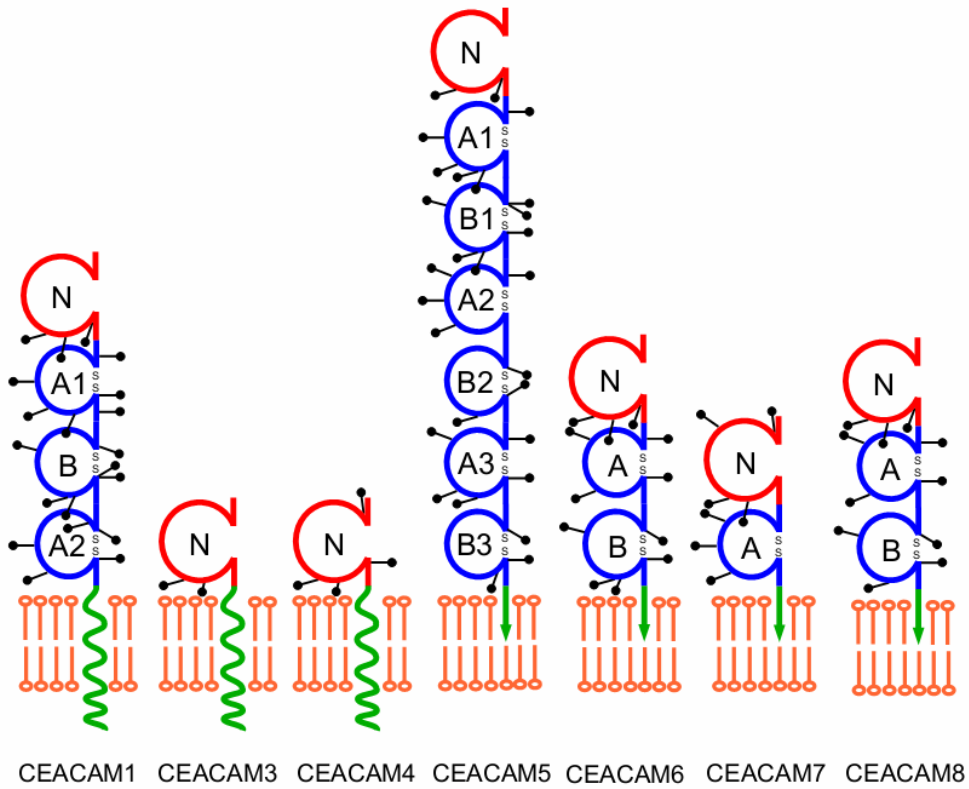


Figure 33 : Structure schématique des molécules de la famille des CEACAM. Les glycosylations sont représentées par les barres pointées (—●).

récepteurs glycosylés des pili de type 1, le récepteur CEACAM6 présente une surexpression iléale chez les patients atteints de MC, non seulement au niveau de la muqueuse pathologique mais également au niveau de la muqueuse saine. Le rôle de CEACAM6 – via des résidus mannoses – dans l’adhésion des souches AIEC à la muqueuse intestinale a ensuite été confirmé par des études *in vitro* (378). En effet, le traitement d’entérocytes isolés par des anticorps anti-CEACAM6 ou par du D-mannose inhibait l’adhésion des souches AIEC à la bordure en brosse des entérocytes et les mutants AIEC n’exprimant pas les pili de type 1 perdaient leurs propriétés d’adhésion aux entérocytes. Parallèlement, la stimulation de cellules épithéliales intestinales Caco-2 par des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ et TNF- α) augmentait l’expression de CEACAM6 et favorisait l’adhésion des souches AIEC aux cellules épithéliales intestinales (378). Cette hypothèse a d’ailleurs été validée dans un modèle de souris transgéniques CEABAC10 exprimant le récepteur CEACAM6 humain. Les bactéries AIEC, contrairement aux bactéries *E. coli* K-12 non pathogènes, étaient capables de coloniser la muqueuse intestinale et d’induire une colite sévère chez les souris CEABAC10 (386). Finalement, les bactéries AIEC seraient capables de promouvoir leur propre colonisation en induisant une expression accrue du récepteur CEACAM6 à la surface des cellules hôtes, constituant ainsi une boucle d’amplification de colonisation et d’inflammation (378, 387).

2.4.2. Dans le cancer colorectal

Les glycoprotéines CEACAM5 et CEACAM6 sont surexprimées dans de nombreux cancers dont le cancer colorectal (134, 143-145, 388). CEACAM5 est très utilisé en pratique clinique comme marqueur tumoral pour le suivi des patients atteints de CCR, mais il serait moins spécifique que CEACAM6 pour cette affection et ne constitue pas un facteur

pronostique indépendant comme CEACAM6 lorsque ces deux marqueurs sont comparés sur une même cohorte (146).

CEACAM6 est surexprimé dans les polypes hyperplasiques et adénomateux, avec une localisation préférentielle au niveau de la partie supérieure des polypes, où il y a en général perte de la polarité d'expression. En effet, plutôt que d'être limité au pôle apical des cellules, CEACAM6 est retrouvé tout le long de la membrane externe de la cellule (142). Cette perte de polarité serait à l'origine du développement de tumeurs par le biais d'un retour de l'épithélium adulte monostratifié vers une configuration embryonnaire pluristratifiée (389). Lorsque la cellule épithéliale perd son attachement à la matrice extracellulaire (phénomène d'anoïkis) une surexpression de CEACAM6 inhibe la différenciation cellulaire et l'apoptose, comme observé dans de nombreuses lignées cellulaires et notamment intestinales (384, 390-394). CEACAM6 est également corrélé à l'expression de HIF-1 α (« *hypoxia inducible factor* »), une protéine mise en jeu dans l'hypoxie tumorale qui accompagne le développement d'une tumeur (395-399). HIF-1 α est à son tour capable d'activer voie VEGF/VEGFR dont le rôle dans l'angiogenèse tumorale est maintenant reconnu (396, 399). Toutes ces caractéristiques physiologiques expliquent ainsi le potentiel carcinogène de cette molécule notamment en cas de surexpression quelle qu'en soit la cause. Enfin, CEACAM6 serait également impliquée dans le processus métastatique, ce qui est suggéré par l'expression supérieure de cette molécule dans les métastases hépatiques de CCR par rapport aux tumeurs primitives (145, 393).

Des études sur pièce opératoires fraîches de CCR ont montré que l'expression tissulaire de CEACAM6 était inversement corrélée au degré de différenciation cellulaire. En d'autres termes, la surexpression de CEACAM6 dans le CCR serait liée à des tumeurs peu ou mal différenciées, expliquant ainsi son influence négative sur le pronostic (146, 400). De plus, un modèle de souris transgéniques exprimant fortement le récepteur CEACAM6 à la surface

de l'épithélium intestinal a montré une perte de la capacité de polarisation cellulaire, et une absence de formation des glandes cryptiques coliques, confirmant ainsi les données *in vitro*) (400).

Finalement, CEACAM6 semble être fortement impliqué dans la carcinogenèse colique, non seulement dans les étapes précoces de la séquence adénome-cancer mais également dans les stades très tardifs, comme en témoigne sa surexpression respectivement dans les lésions hyperplasiques coliques et les métastases hépatiques de CCR.

Objectifs du travail

A la lumière de ces 2 derniers paragraphes, il semble donc exister un lien très fort entre *E. coli*, inflammation chronique, récepteur CEACAM6 et cancer colorectal. Le but de ce travail était de préciser l'association entre infection bactérienne et cancer colorectal, et ainsi d'identifier des souches *E. coli* associées au cancer colorectal et d'étudier leur mécanisme d'action, notamment via le récepteur CEACAM6. Plus spécifiquement, les objectifs étaient de :

- explorer les changements induits par la présence d'une tumeur cancéreuse colique sur la colonisation de la muqueuse colique par les bactéries *E. coli* associées et internalisées, non seulement au niveau de la tumeur mais également au niveau de la muqueuse à distance de la tumeur ;
- identifier et caractériser les populations de *E. coli* associées au cancer colorectal, étudier la présence de toxines bactériennes potentiellement génotoxiques et rechercher parmi ces bactéries le phénotype AIEC par l'analyse de leur propriétés d'adhésion et d'invasion des cellules épithéliales intestinales, et leur capacité à survivre en macrophages murins ;
- étudier et comparer les niveaux d'expression de CEACAM5 et CEACAM6 dans le tissu tumoral des patients atteints de cancer colorectal, mais également dans la muqueuse tumorale, et les ramener au taux de colonisation afin de déterminer si ces deux récepteurs sont impliqués dans le contact des bactéries avec la muqueuse colique dans le cancer colorectal, et à quel moment intervient ce phénotype ;
- sélectionner une ou plusieurs souches *E. coli* représentatives de patients cancers, et évaluer leur capacité à induire l'expression de CEACAM6 de façon comparable aux bactéries *E. coli* impliquées dans la maladie de Crohn ; utiliser un modèle de colite chez la souris et analyser l'influence des souches de *E. coli* issues de cancer

colorectal sur la muqueuse colique et sa capacité éventuelle à promouvoir des tumeurs du colon.

Matériels et méthodes

1. Patients

1.1. Base de données

Des patients atteints de cancer colorectal (CCR) résécable (n=51) ou de diverticulose (n=33) ont été inclus prospectivement. Les patients étaient tous des adultes volontaires devant être opérés dans le service de chirurgie digestive du CHU de Clermont-Ferrand, France. Tous les patients avaient donné leur consentement et l'étude a été approuvée par le comité d'éthique local. Les critères d'exclusion étaient l'administration d'une chimiothérapie néo-adjuvante, un antécédent de résection colique, une chirurgie en urgence et une antibiothérapie en cours ou datant de moins de 1 mois. Toutes les données anamnestiques et cliniques préopératoires ont été collectées de façon anonyme.

1.2. Intervention chirurgicale

Aucun des patients n'avaient reçu de préparation colique ni d'antibiothérapie avant l'intervention. Au moment de l'incision chirurgicale, tous les patients recevaient une antibioprofylaxie à base de céphalosporine de 3^{ème} génération selon les recommandations de la Société Française d'Anesthésie et de Réanimation (www.sfar.org). L'intervention était effectuée par laparotomie ou par coelioscopie, et débutait par le bilan macroscopique des lésions tumorales (caractéristiques de la tumeur primitive, recherche de ganglions de drainage, de carcinose péritonéale et de métastases hépatiques). La résection colique (droite ou gauche selon le cas) était réalisée avec curage ganglionnaire pour les patients atteints d'un cancer colorectal, et sans curage ganglionnaire pour les patients atteints de diverticulose, afin de

minimiser le risque de troubles fonctionnels post-opératoires. Le rétablissement de la continuité digestive était réalisé en 1 temps, sans colostomie. Aucun drainage post-opératoire n'était laissé en place.

1.3. Traitement des prélèvements coliques

La pièce opératoire était nettoyée au sérum physiologique de façon à exposer la totalité de la muqueuse. Sur pièce fraîche, les prélèvements suivants ont été effectués :

- pour les patients du groupe diverticulose, un fragment de muqueuse de 5mm² à distance des zones inflammatoires et/ou dysplasiques.
- pour les patients du groupe cancer, un fragment de muqueuse non tumorale de 5mm² situé à environ 10 cm de la tumeur primitive et un fragment de tumeur de 5mm² situé en périphérie et en surface de la tumeur (pour ne pas compromettre l'analyse histopathologique classique et éviter tout problème éthique).

Chaque fragment était à son tour divisé en 2 : une partie pour l'analyse bactérienne immédiate, stockée à 4°C et acheminée rapidement au laboratoire de bactériologie, l'autre partie congelée dans l'azote liquide puis transférée au congélateur à - 80°C pour les autres analyses (histologie, immunohistochimie, biologie moléculaire). Une fois les prélèvements effectués, la pièce opératoire fraîche était acheminée au laboratoire d'Anatomie Pathologique (Pr. Déchelotte) pour analyse macroscopique et histopathologique conventionnelle.

1.4. Anatomie pathologique

Les données caractéristiques des tumeurs (classification TNM, degré de différenciation, engainements périnerveux, composante colloïde muqueuse, nécrose, embolies

vasculaires) ont été collectées de façon prospective et enregistrées dans la base de données (cf. table 1).

Marquage immunohistochimique des récepteurs CEACAM5 et CEACAM6

Des coupes de 5 µm ont été réalisées à partir des blocs de paraffine utilisés pour l'analyse histopathologique conventionnelle. Les marquages immunohistochimiques ont été réalisés sur un automate Benchmark XT (Ventana Medical systems, Tucson, Arizona) après démasquage des épitopes par un tampon de citrate pH 6.6 (Ventana), en utilisant des anticorps monoclonaux de souris anti-CEACAM5 (clone IL-7 ; Dako, Glostrup, Danemark) et anti-CEACAM6 (clone 9A6 ; Aldevron, Fribourg, Allemagne) dilués 1/50^{ème} et révélés avec le kit ultraView DAB Detection (Ventana Medical systems, Tucson, Arizona). Les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline de Mayer. L'analyse qualitative du marquage a été réalisée en tenant compte du type de cellule marquée, de l'intensité du marquage et de sa distribution cellulaire. L'analyse a été faite en aveugle par deux anatomo-pathologistes.

Les marquages de CEACAM5 et de CEACAM6 étaient comparés et gradés en 2 groupes : (-/+) indiquait un marquage absent ou très faible du cytoplasme ou de la bordure en brosse ; (++) indiquait un marquage modéré ou fort du cytoplasme ou de la bordure en brosse. Chaque coupe adjacente à un marquage par l'anticorps de référence était marquée par un anticorps monoclonal de souris IgG1 (Sigma-Aldrich) servant de contrôle isotypique.

2. Etude microbiologique

2.1. Analyse des populations de Gammaproteobacteria et de *E. coli* associées à la muqueuse

Les prélèvements de muqueuses ou de tumeurs ont été placés dans un tube stérile contenant du PBS (Phosphate Buffer Saline; pH 7,2 ; Euromedex, Souffelweyersheim, France) (1 tube par prélèvement). Chaque prélèvement était divisé en 2 parties de 50 à 100 mg, lavé 3 fois dans 10 mL de PBS, dilacéré au scalpel et pesé dans des tubes pré-tarés.

2.1.1. Quantification et sélection des Gammaproteobacteria associées à la muqueuse.

La première partie de l'échantillon était reprise dans 500 µL de PBS et broyée au disrupteur Ultraturrax® T10 basic (IKA®, Staufen, Germany) pendant 1' puis incubée 15' en présence de 0.1% de Triton X100 (Euromedex) sous agitation à température ambiante.

2.1.2. Quantification et sélection des Gammaproteobacteria internalisées dans la muqueuse.

La seconde partie de l'échantillon était incubée une heure à 37°C en milieu Minimal Essential Medium (MEM ; PAA, Linz, Autriche) + 200µg/mL de gentamicine pour éliminer les bactéries extracellulaires, centrifugée et rincée 3 fois dans du PBS. Le prélèvement était ensuite broyé par Ultraturrax® et traité avec 0.1% de Triton X100 (cf. 1^{ère} partie du prélèvement).

L'ensemble des lysats étaient ensuite dilués puis étalés sur géloses de Columbia agar contenant 5% de sang de mouton (Oxoid, Dardilly, France), sur milieu de Drigalski (Biorad, San Diego, Californie) sélectif pour les entérobactéries, et sur milieu chromogène CPS ID 3® (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Les Géloses étaient incubées à 37°C pendant 24 heures en condition anaérobie pour les milieux Columbia et en condition aérobie pour les autres milieux. La quantification était alors effectuée et exprimée en UFC (Unités Formant des Colonies) de Gammaproteobacteria / g de tissu.

Parmi les colonies de Gammaproteobacteria, au moins 10 colonies de *E. coli* (5 adhérentes et 5 invasives) ont été identifiées par milieu chromogénique CPS ID 3® et par automate Vitek II® (bioMérieux) en seconde ligne. Ces colonies isolées ont été ensuite repiquées en microplaque 96 puits en milieu Luria Bertani (LB) additionné de 15 % de glycérol, incubées 24 heures à 37°C puis conservées à -80°C pour analyses ultérieures.

2.2. Typage moléculaire et groupage phylogénique des souches de *E. coli*

Deux méthodes de génotypage ont été utilisées pour déterminer la clonalité des isolats de *E. coli*. Une Technique par « Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus » (ERIC)-PCR avec un primer ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') et une technique par « Random Amplified Polymorphism DNA » (RAPD)-PCR avec un primer 1283 (5'-GCG ATC CCC A-3') ont été réalisées (401, 402). Pour chaque clone, un isolat représentatif a été analysé et congelé à -80°C dans un milieu de Luria-Bertani supplémenté par 15% de glycérol. Les souches de *E. coli* ont alors été classées selon le système *E. coli* Reference collection (ECOR) (403) en 4 groupes phylogéniques A, B1, B2 et D par technique de PCR multiplex (404, 405). Le gène de ménage *uidA* et la souche RS218, qui arborent tous les gènes cibles par la PCR multiplex, ont été utilisés comme contrôles positifs.

2.3. Détection et identification des gènes codant les cyclomodulines

Les gènes codant les cyclomodulines ont été détectés par technique d'hybridation en dot-blot. Les sondes ont été obtenues par PCR en utilisant des amorces précédemment décrites (328) avec le kit d'amorces PCR DIG (Roche Applied Science, Penzberg, Allemagne) selon les instructions du fabricant. Deux microgrammes d'échantillon d'ADN ont été fixés sur des membranes chargées positivement par illumination UV pendant 20 minutes. L'hybridation a été réalisée avec un kit de détection et de marquage Roche comme indiqué par le fabricant. Chaque spot était vérifié par une sonde du gène de l'ARN ribosomal 16S. L'îlot *pks*, qui contient le groupe de gènes codant des enzymes impliquées dans la production de la colibactine (*clb*), était ciblé avec une sonde chevauchant les gènes *clbK* et *clbJ*. Les gènes *cnf* étaient détectés avec un mélange de sondes spécifiques de *cnf1*, *cnf2* et *cnf3*. Les gènes *cdtB* étaient détectés par 2 expériences d'hybridation avec les mix de sondes *cdtB-II-cdtB-III* et *cdtB-I-cdtB-IV*. Le gène *cif* était détecté par une sonde interne spécifique. Les sensibilités et spécificités des sondes étaient vérifiées sur chaque membrane par dépôts de spots d'extraits d'ADN de toutes les souches de contrôle des cyclomodulines. Les hybridations positives avec les sondes de cyclomoduline étaient sujettes à confirmation par PCR comme déjà reporté (328). Le mix de réaction contenait 50ng d'ADN de l'échantillon, 0.2mM de chaque deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.4μM de chaque primer, 3nM MgCl₂, et 1.0U de polymérase RedGoldStar DNA (Eurogentec, Seraing, Belgique) dans le tampon réactif correspondant. Les amorces localisées dans les régions 3' et 5' de l'îlot *pks* (gènes *clbA* et *clbQ*) ont été utilisés pour confirmer la présence de l'îlot producteur de colibactine.

2.4. Étude du pouvoir cytopathogène des cyclomodulines

Les effets cytopathogènes de CNF et CDTs ont été menés sur toutes les souches, et ceux de la colibactine et de Cif sur les souches non hémolytiques comme décrit précédemment (406). Les effets de CDT et de CNF ont été détectés avec un test de d'interaction de lyse cellulaire. Après 48 heures de culture à 37°C sous agitation dans un bouillon de LB, les cellules bactériennes ont été soniquées (sonicateur Vibracell 75115, Thermolab System), filtrées stérilement et séparément sur des filtres de porosité 0.22µm. Des cellules Hela ont été traitées avec les lysats bactériens puis observées au microscope inversé (Nikon Eclipse 1000, Tokyo, Japon). Les effets de la colibactine et de Cif ont été détectés avec un test d'interaction cellule-bactérie, basé sur l'interaction entre cellules Hela et bactéries. Des cultures sur la nuit en milieu LB des différents clones de *E. coli* ont été dilués dans un milieu d'interaction, et les cultures cellulaires Hela ont été infectées à une multiplicité d'infection (« *Multiplicity of infection* », MOI) de 100 et 200 bactéries / cellule. Les cellules ont été lavées 3 à 6 fois 4 heures après l'inoculation et ont été incubées avec du milieu de culture cellulaire additionné de 200µg/mL de gentamicine jusqu'à l'analyse. Après 72 heures d'incubation à 37°C sous atmosphère 5% de CO₂, le milieu était enlevé par plusieurs lavages du tapis cellulaire.

Les caractéristiques de modifications morphologiques des cellules éventuellement induites par CDT, CNF, colibactine et Cif ont été évaluées après coloration au Giemsa. La détection de l'alpha-hémolysine était réalisée pour toutes les souches étudiées par croissance une nuit à 37°C sur gélose de Columbia additionnée de 4% de sang de mouton (Oxoid). La souche *E. coli* ATCC 25922 a été utilisée comme souche de référence.

2.5. Gel d'électrophorèse « single-cell »

Des cultures de cellules HeLa ont été infectées à MOI 500 avec des *E. coli* cultivés sur milieu Luria-Bertani. Après 3 heures d'incubation, les cellules ont été lavées et incubées une nuit à 37°C sous 5% de CO₂ dans le milieu de culture cellulaire supplémenté avec 200 µg/ml de gentamicine. Les cellules ont été lavées avec du PBS et incluses dans de l'agarose bas point de fusion (0,5% en PBS stérile, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) maintenu à 37°C. Le mélange cellules-agarose a été appliqué à 37°C sur des lames de verre recouvertes d'agarose en PBS stérile à 1.5% (Molecular Biology Grade, Bio-Rad). L'ensemble a été recouvert d'une lamelle de verre et incubé à 4°C pendant 60 min pour permettre la solidification de l'agarose bas point de fusion. Les lames ont été ensuite traitées avec un tampon de lyse cellulaire (10 mM Tris-HCl, 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA contenant 1% de Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) pendant 2 heures à 4°C dans le noir. Les lames étaient ensuite immergées par le tampon d'électrophorèse (1mM EDTA 300 mM NaOH pH 13) 1 heure à 4°C et un champ électrique a été appliqué (1V/cm) pendant 40 minutes. Le tampon a ensuite été neutralisé à l'aide d'un tampon Tris-HCl 400mM pH 7.5. Après séchage, 40µl d'une dilution au 1:10000 de SybrGreen a été appliqués directement sur les lames et les noyaux des cellules ont été visualisés par microscopie à fluorescence (Microscope Axioplan2, Carl Zeiss Inc). La souche recombinante *E. coli* hébergeant l'îlot *pks* cloné (DH10β pBACpks) a été utilisée comme contrôle positif, et la souche DH10β hébergeant un plasmide vecteur natif (DH10β pBAC) comme contrôle négatif (335).

2.6. Recherche du phénotype AIEC chez les souches *E. coli* isolées des patients

2.6.1. Choix des souches bactériennes

La souche AIEC de référence choisie était la souche AIEC LF82 (Amp^R, Ery^R) isolée d'une lésion chronique de patient atteint de maladie de Crohn (368). La souche *E. coli* non pathogène de référence était la souche K-12 MG1655 (Rif^R) (stock de laboratoire). Les bactéries ont été cultivées à 37°C sans agitation en milieu liquide LB. Si nécessaire les antibiotiques suivants ont été rajoutés dans le milieu : le chloramphénicol (Cm) a été utilisé à une concentration de 25µg/mL, l'ampicilline (Amp) à une concentration de 50 µg/mL et la rifampicine (Rif) à une concentration de 300µg/mL.

La densité optique a été mesurée à 620nm. Une DO à 1 correspond à une concentration de 1.6×10^9 bactéries / mL. La suspension bactérienne a donc été diluée dans du PBS pour ramener la culture à une concentration connue (DO 0.1 ou 0.2 selon les protocoles).

2.6.2. Cultures cellulaires

Les lignées cellulaires utilisées ont été :

- Intestine-407 (I-407) : cellules épithéliales de type intestinal embryonnaire d'origine humaine (ATCC CCL-6) ;
- Caco-2 : cellules épithéliales isolées d'un adénocarcinome colique d'origine humaine (ATCC HTB-37) ;
- Caco-2/TC7 : sous clone de la lignée parentale des cellules Caco-2, plus facilement cultivables et exprimant davantage le récepteur CEACAM6
- J774 : lignée cellulaire de macrophages murins (HTCC TIB-67) ;

Les cellules ont été cultivées dans des flacons de culture cellulaire de 75 ou 150 cm² à 37°C en atmosphère humide enrichie à 5% en CO₂, dans du milieu de culture qui était selon le

type de cellule soit du Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM ; PAA) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF ; Lonza, Basel, Suisse), soit du Dulbecco Minimal Essential Medium (DMEM ; PAA) additionné de 20% de SVF, supplémenté de 1% de L-glutamine, 200 U/L de pénicilline, 1% d'acides aminés non essentiels, 50mg/mL de streptomycine, 0.25 mg/L d'amphotéricine B et 1% de vitamines. Après 2 à 5 jours, les cellules atteignent un état de confluence et sont donc dédoublées pour garder leurs propriétés de cellules indifférenciées. Pour cela, le milieu est éliminé, le tapis cellulaire est lavé au PBS et les cellules sont décollées de leur support plastique par traitement à la trypsine, enzyme détruisant la matrice extracellulaire, pendant 2 minutes. Un tiers des cellules décollées est remis en culture dans un flacon de 75 cm² contenant 15 mL de milieu de culture.

2.6.3. Tests d'adhésion et d'invasion en cellules épithéliales I-407 et Caco-2

L'ensemble des étapes d'incubation a été réalisé à 37°C sous une atmosphère humide enrichie à 5% en CO₂. Des puits cellulaires de 1x10⁵ cellule/cm² ont été préparés à partir des cultures cellulaires. 48 heures après, le tapis cellulaire a été lavé une fois avec du PBS, puis 1 mL de milieu d'infection propre à chaque lignée cellulaire a été ajouté dans chaque puits. Les cellules ont ensuite été infectées à une MOI de 10 bactéries / cellule. Une étape de centrifugation de 10 min à 1000g à température ambiante a été réalisée au début de l'infection pour forcer le contact bactéries / cellules lorsque nécessaire.

- Pour la procédure d'adhésion, les plaques ont été incubées pendant 3 heures à 37°C. Les tapis ont ensuite été lavés 5 fois avec du PBS.
- Pour la procédure d'invasion, le test de protection à la gentamicine, antibiotique incapable de pénétrer dans les cellules eucaryotes, a été utilisé. Après infection, les plaques ont été incubées pendant 3 heures à 37°C. Après lavages en PBS, le milieu a

été remplacé par un milieu contenant 100µg/mL de gentamicine. La plaque a ensuite été incubée pendant 1h à 37°C puis les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS.

Pour chacune des procédures, les cellules eucaryotes ont été lysées par ajout de 0,5 mL de Triton X-100 (Euromedex) à 1% en eau déminéralisée pendant 5 min (une telle concentration de Triton X-100 n'a pas d'effet sur la viabilité bactérienne pour des traitements n'excédant pas 30 min). Après homogénéisation à la pipette automatique, différentes dilutions de raison 10 en eau physiologique ont été étalées sur des géloses LB afin de déterminer le nombre d'Unité Formant Colonie (UFC) par puits.

Les résultats d'adhésion et d'invasion ont été exprimés en pourcentage de bactéries adhérentes et invasives par rapport à l'inoculum de départ, défini comme le 100%. Ces index pour le phénotype AIEC doivent être respectivement supérieurs à 1 et 0.1 (368).

2.6.4. Entrée et survie en macrophages murins J774

La survie des bactéries en macrophages J774 a été mesurée selon le test de protection à la gentamicine. Des puits cellulaires de 2×10^5 cellule/cm² ont été préparés à partir de cultures cellulaires. 24 heures après, les cellules ont été infectées à une MOI de 100 bactéries par cellule. Après 10 min de centrifugation à 1000 g pour favoriser le contact entre bactéries et cellules et 10 min d'incubation à 37°C sous une atmosphère enrichie à 5% en CO₂, le tapis cellulaire a été lavé avec du PBS, puis 1 mL de milieu de culture contenant de la gentamicine à 50µg/mL a été ajouté par puits. Le nombre d'UFC a été déterminé à 1h (entrée) et à 24h (survie – réplique) post-infection selon le même principe que celui décrit ci-dessus sur cellules épithéliales. La réplique était donnée en % de bactéries vivantes à 24 heures par rapport à celle obtenue à 1 heure post-infection. Les souches bactériennes étaient considérées

comme répliquatives en macrophage lorsque le nombre de UFC à 24 heures était supérieur à 100% par rapport au nombre de UFC à 1 heure.

2.7. Entrée et survie en cellules épithéliales intestinales Caco-2

Des cellules Caco-2 différenciées (14 jours de culture à confluence) ont été préparées et ensemencées dans des plaques 24 puits (2cm² ; BD Falcon, Franklin lakes, New Jersey) à la densité de 1x10⁵ cellules par cm². Les cellules ont été lavées avec du PBS avant adhésion, infectées à MOI 10 et incubées 3 heures à 37°C sous 5% de CO₂. Chaque tapis cellulaire était lavé 2 fois avec du PBS, et du milieu de culture frais contenant 100µg/mL de gentamicine était ajouté. Après incubation pendant 1, 24 et 48 heures, le milieu était retiré, les cellules lysées par 1% de Triton-X100 et le lysat était étalé sur des géloses pour culture. La survie et la réplication des souches de *E. coli* à 24 et 48 heures post-infection était exprimée en pourcentage par rapport au temps 1 heure, défini comme le 100%. Parallèlement, la préservation des tapis cellulaires dans les puits a été évaluée par traitement des tapis à la trypsine et numération cellulaire en cellules de Malassez.

3. Test d'induction du CEACAM6 par les souches de *E. coli* après infection de cellules Caco-2 in vitro

Ces tests ont été réalisés avec les souches de *E. coli* issues de patients ne présentant qu'un seul clone bactérien après typage moléculaire. Parmi ces souches de clones uniques de *E. coli*, 1 souche (clone CCR20) représentative a été sélectionnée de par ses propriétés

d'adhésion, d'invasion et de survie en cellules épithéliales intestinales et en macrophages murins J774, et utilisées pour les analyses spécifiques ultérieures.

3.1. Analyse de l'expression de CEACAM6 par Western Blot après infection de cellules épithéliales Caco-2 par une souche de *E. coli* (CCR20)

3.1.1. Infection des cellules Caco-2

Des cellules Caco-2 non différenciées ont été infectées (cf. protocole plus haut) à MOI 100 pendant 5 heures à 37°C par des cultures bactériennes (DO 0.2) de K-12 MG1655, LF82 et CCR20.

3.1.2. Extraction protéique et Western blot

Les cellules ont ensuite été lavées en PBS froid (4°C) puis lysées sur la glace avec un tampon de lyse (50mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 4mL triton 1X, 1mM EDTA + anti-protéase [Mini cOmplete, Roche Applied sciences]). Après dosage des protéines totales par la méthode de Bradford (Protein Assays, BioRad), 15µg de protéines ont été diluées dans un tampon de dépôt SDS-PAGE (2% SDS, 50mM Tris-HCl pH 6,8, 12,5% glycérol (Euromedex), 400 mM β-mercaptoéthanol (Sigma) et 0,01% Bleu Bromophénol (Sigma)), puis dénaturées 5 min à 95°C et séparées sur gel SDS-PAGE à 12%. Les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose (GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin). Après saturation avec un tampon TBS contenant 2% de BSA (Bovine Serum Albumin ; Sigma), les membranes ont été incubées soit avec les anticorps primaires de souris anti-CEACAM6 clone 9A6 (dilué au 1/2000^{ème} ; Aldevron), soit avec des anticorps primaires de lapin anti-actine (dilué au 1/2000^{ème} ; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri). Les complexes antigène-anticorps ont été révélés au moyen d'un anticorps secondaire anti-IgG de lapin ou de souris (Stressgen,

Victoria, Canada), couplé à une peroxydase (dilué au 1/1000^{ème}), du réactif ECL (GE Healthcare) et par autoradiographie. Les signaux ont été quantifiés par densitométrie (logiciel ImageJ®).

3.2. Analyse de l'expression de CEACAM6 par ELISA sandwich après infection de cellules Caco-2 par les souches de clones uniques de *E. coli*

3.2.1. Infections de cellules Caco2/TC7

Des cellules Caco-2/TC7 différenciées ont été infectées 5 heures à MOI 100 sous CO₂ à 37°C. 18 souches de clones uniques de *E. coli* issus de patients DIV et CCR, et les souches K-12 MG1655 (témoin négatif) et LF82 (témoin positif-AIEC de référence) ont été testés.

3.2.2. Elisa sandwich

Le dosage du récepteur CEACAM6 a été réalisé avec le kit ELISA sandwich (SinoBiologicals, Beijing, Chine). Des plaques 96 puits haute affinité (BD Falcon) ont été coâtées à l'aide d'anticorps monoclonal anti-CEACAM6 (SinoBiologicals) dilués à 2µg/mL dans du tampon de coating pendant une nuit à 4°C. Les puits ont été saturés avec la solution de blocage pendant 1 heure à température ambiante. Les différentes dilutions d'échantillons et la gamme (50µl) réalisée à partir de CEACAM6 recombinant (SinoBiologicals) ont été déposées dans la plaque et incubées 2 heures à température ambiante. La détection a été effectuée avec un anticorps anti-CEACAM6 polyclonal conjugué à la biotine (SinoBiologicals) puis révélée par réaction chromogénique de dégradation du TMB (Sigma, 30 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante). La réaction a été stoppée par ajout de solution d'arrêt. La lecture des résultats a été effectuée sur un lecteur de microplaque Multiskan Ascent (Thermo Labsystem, Madrid, Espagne) à 450 nm. Pour chaque échantillon,

la quantité de récepteur CEACAM6 dosée a été normalisée par la mesure absolue de la quantité d' α -tubuline. Le dosage de l' α -tubuline (gène de ménage) a été réalisé avec le kit ELISA Sandwich PathScan (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts). L'anticorps de capture anti- α -tubuline (CST) dilué au 1/100^{ème} (50 μ l) dans du tampon de coating a été transféré dans une plaque ELISA haute affinité et incubé une nuit à 4°C. Les puits ont été ensuite saturés avec la solution de blocage pendant 2 heures 37°C. Les différentes dilutions d'échantillons (50 μ L) ont été déposées dans la plaque et incubés 1 heures à 37°C. La détection s'est effectuée avec un anticorps anti- α -tubuline de souris (CST) dilué à au 1/100^{ème} (50 μ l) pendant une heure à 37°C. La révélation a été effectuée avec un anticorps anti-IgG de souris-HRP (CST, 30 minutes, 37°C) par réaction chromogénique de dégradation du TMB (Sigma, 30 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante). La réaction était stoppée par ajout de solution d'arrêt et la lecture de la densité optique à 450 nm était effectuée sur un lecteur MultiSkan Ascent (Thermo Labsystem). Toutes les solutions utilisées pour cette expérience sont détaillées en annexe 1.

4. Étude de la persistance des souches de *E. coli* isolées de tissus coliques humains dans des modèles murins exprimant le récepteur CEACAM6

4.1. Infection de souris transgéniques CEABAC10 : étude de la colonisation

4.1.1. Souris

Toutes les souris étaient hébergées dans des conditions EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique) dans l'unité de Stabulation d'Expérimentation animale de l'UFR 79 (Clermont-Ferrand, France). Les protocoles animaux ont été approuvés par le Comité pour la

Recherche et les Questions éthiques de l'Association Internationale pour l'Etude de la Douleur. Le modèle utilisé était les souris CEABAC10 (fond génétique FVB/N, (407)) qui sont des souris transgéniques avec un chromosome artificiel bactérien contenant une partie des gènes humains de la famille des CEACAM dont les CEACAM3, 5, 6 et 7, et dont les caractéristiques d'expression au niveau du côlon, à la fois spatiales et temporelles, sont remarquablement similaires à celles de l'homme. Des souris FVB/N WT (Charles River Laboratoires, L'Arbresle, France) et des souris transgéniques CEABAC10 hétérozygotes ont été croisées afin d'obtenir 50 % de souris WT et 50 % de CEABAC10 hétérozygotes. Les souris ont été sélectionnées pour l'expérience après avoir été génotypées.

4.1.2. Génotypage des souris

Après anesthésie des animaux à l'isofluorane, un morceau de queue de 0.2 cm a été prélevé. Dans un premier temps, ce prélèvement a été lysé dans 300µL d'une solution de soude à 50 mM au bain marie à 100°C pendant 20 min. Après ajout de 25 µL de tampon de neutralisation (Tris-HCl 0.1 M, pH 7), l'échantillon a été centrifugé pour éliminer les débris tissulaires. Le surnageant a été utilisé pour réaliser une PCR avec des amorces spécifiques au gène CEACAM6 humain (PCR-CEA-5' primer : 5'-GAAATGACACAGCAAGCTAC-3', PCR-CEA-3' primer : 5'-ATAGACTGTGATCGTCGTGA-3') donnant des fragments d'amplification de 738 paires de bases. Le programme de PCR utilisé comprenait une étape initiale de dénaturation (94°C, 5 min), 30 cycles d'amplification (94°C 1 min, 55°C 1 min et 72°C 1 min) et une étape d'élongation finale (72°C, 7 min). Le profil des produits d'amplification a été visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (p/v agarose).

4.1.3. Infection des souris

Quarante souris femelles transgéniques CEABAC10 de 10 semaines (poids entre 20 & 25g) ont été divisées en 4 groupes de 10 animaux, en fonction du type de bactérie administrée : PBS (pas de bactérie), K-12 MG1655, LF82 et CCR20. Les souris ont été prétraitées en début d'expérience par un antibiotique à large spectre, la streptomycine (20 mg par souris par administration intragastrique) pour éliminer la flore résidente normale dans l'intestin (264, 408). Des cycles de 4 semaines ont été débutés par l'administration orale de 0.25% de DSS (dextran sulfate sodium, masse moléculaire = 36,000-50,000 daltons; MP Biomedicals) dans l'eau de boisson afin d'augmenter l'accessibilité de la surface épithéliale aux bactéries (l'administration de DSS à 0.25% n'affecte pas le poids des souris et n'induit pas de colite clinique). Après 48 heures le DSS était remplacé par de l'eau et les souris étaient gavées avec $2 \cdot 10^8$ bactéries 2 fois / semaine pendant 3 semaines. La quantité de bactéries dans les fèces était mesurée à la 4^{ème} semaine 5 jours après la dernière administration bactérienne.

4.1.4. Estimation de la colonisation

5 jours après la dernière infection, pour chaque souris des échantillons frais de selles (100–200 mg) étaient collectées et re-suspendus dans du PBS. Après une série de dilution, les bactéries étaient comptées UFC après étalement sur milieu de agar LB contenant 50 mg/μl d'ampicilline et 20 mg/μl d'érythromycine pour isoler la souche LF82, 30 mg/μl de rifampicine pour isoler la souche K-12 MG1655, et 50 mg/μl de kanamycine et 50 mg/μl d'ampicilline pour isoler la souche CCR20, et incubation à 37°C.

4.1.5. Expression des résultats

Après 8 cycles, les souris ont été euthanasiées. Après le sacrifice, le colon et le cæcum étaient prélevés et ouverts longitudinalement. Une 1^{ère} partie était fixée au formol 10%

tamponné et incluse en paraffine pour étude histologique, une 2^{ème} partie était congelée à -80°C pour analyse ARN et une dernière partie utilisée pour la quantification des bactéries associées.

4.2. Analyse histologique du colon et du cæcum des souris CEABAC10

Les échantillons de rolls colique et cæcal inclus en paraffine ont été coupés au microtome (5 µm) puis étalées sur lames salynisées (Superfrost® plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Allemagne). Les coupes ont été déparaffinées dans 2 bains de xylène successifs pendant 3 minutes, puis trempées dans des bains d'alcool à 100° puis à 70° 3 minutes chacun. Elles ont ensuite été réhydratées par un rinçage à l'eau pendant 5 min. Les lames ont ensuite été colorées à l'hématoxyline de Harris (colorant primaire, 2 min), rincées dans un bain d'eau, colorées à la phloxine (colorant secondaire, 3 min), rincées rapidement à l'eau, plongées dans un bain d'alcool à 100° pendant 2 minutes, puis colorées par du safran alcoolique (coloration tertiaire, 45 s). Les lames ont été rincées à l'alcool à 100° et au toluène puis montées entre lame et lamelle. L'observation a été réalisée au microscope optique (grossissements 10, 40 & 100 x). Un score histologique compris entre 0 & 3 a été déterminé pour chaque échantillon selon des critères d'inflammation (tableau 6).

4.3. Recherche de bactéries dans les cryptes coliques par hybridation in situ par fluorescence

Les échantillons de rolls colique et cæcal inclus en paraffine ont été coupés au microtome (5 µm) puis étalées sur lames salynisées. Les lames ont été déparaffinées par 3 bains successifs de xylène (15 min), plongées dans un bain d'alcool à 96° puis séchées. Les

Tableau 6 : Score histologique d'inflammation intestinale (D'après Barnich et al., 2007). Le score était établi après sacrifice des souris à la fin du 8^{ème} cycle, prélèvement du côlon et inclusion en paraffine, suivi d'une coloration HES. Les lames étaient interprétées en aveugle par deux anatomopathologistes.

intitulé	description
infiltration par des cellules inflammatoires	
0	rare cellules inflammatoires dans la lamina propria
1	augmentation du nombre de cellules inflammatoires, incluant les neutrophiles dans la lamina propria
2	confluence des cellules inflammatoires s'étendant à la sous muqueuse
3	extension transmurale de l'infiltrat inflammatoire
infiltration de l'épithélium par des cellules polynucléaires	
0	pas d'infiltration
1	en surface
2	dans la crypte
3	abcès cryptique
sévérité des lésions épithéliales	
0	pas de lésion muqueuse
1	lésions lymphoépithéliales
2	érosions / ulcérations muqueuses
3	lésions muqueuses extensives et extension au structures les plus profondes de la paroi
étendue des lésions épithéliales	
0	normal
1	focal
2	multifocal
3	étendu

coupes ont été délimitées par un gel hydrophobe de Dakopen® (DAKO, Trappes, France). Une sonde spécifique des eubactéries (Cy3-EUB338, 0.21 nM, Eurogentec) diluée au 100^{ème} dans du tampon d'hybridation (annexe 2) a été placée sur le prélèvement et incubée sur la nuit à 37°C en chambre humide. Les lames ont ensuite été rincées pendant 20 min avec du tampon d'hybridation préchauffé à 37°C puis 15 minutes avec un tampon de lavage (annexe 3) contenant du colorant nucléaire de Hoescht (3 µg/mL, Sigma) préchauffé à 37°C. Après refroidissement et séchage, les lames ont été montées puis visualisées au microscope confocal avec le logiciel Zeiss®. La localisation des bactéries a été observée sur 2 coupes de colon et de cæcum, pour chaque souris du protocole.

4.4. Etude de l'expression du marqueur de prolifération PCNA par RT-PCR quantitative

4.4.1. Extraction des ARNs totaux

Environ 25 mg de tissus issus des congelas de colon des souris CEABAC10 ont été prélevés, pesés et broyés. L'ARN total a été purifié par le kit d'extraction Nucleospin® RNA/Protein (Macherey-Nagel GmbH & Co, Düren, Allemagne) selon les instructions du fabricant et congelé à -80°C. La qualité des ARNm a été vérifiée par migration de 100ng de chaque échantillon sur gel d'agarose à 2% (p/v agarose).

4.4.2. Transcription inverse

Les ARN totaux (250µg) ont été rétro-transcrits en ADN complémentaire grâce au kit High Capacity cDNA Reverse transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, Californie) selon les instructions du fournisseur. La transcription inverse a été effectuée dans l'appareil thermocycler GS1 (G-Storm, UK). Les ADNc ont été congelés à -80°C.

4.4.3. PCR quantitative en temps réel

Les ADNc ainsi obtenus ont été quantifiés par PCR quantitative en temps réel. Les amorces spécifiques des transcrits 26S et PCNA utilisées pour l'amplification sont répertoriées en annexe 4. Le mélange réactionnel a été préparé pour tous les échantillons puis réparti sur une microplaque 96 puits : chaque réaction de PCR contenait 5µL de tampon FastStart SYBR® Green Master (Roche Applied Science), 0.5 µL d'amorces à 1 mM, 1 µL d'ADNc (1µg/mL) et 3.5 µL d'eau. La microplaque a été ensuite placée dans l'appareil Mastercycler Realplex² (Eppendorf, Hambourg, Allemagne). Le programme de PCR comprenait une étape de dénaturation initiale (10 minutes, 95°C), 35 cycles d'amplification/hybridation/élongation (15 sec à 95°C et 1 min à 60°C) et se terminait par la courbe fusion (20 min avec passage progressif de 60 à 95°C). La spécificité des produits d'amplification a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (p/v agarose) et par la courbe de fusion. La quantification a été déterminée par le logiciel Realplex 2.2 (Eppendorf) par la méthode du $\Delta\Delta CT$ en utilisant le transcrit codant le « 26S ribosomal protein » comme gène de ménage et l'échantillon d'une souris CEABAC10 non traitée comme échantillon de référence (100%).

5. Analyse statistique

La population est décrite par des effectifs et pourcentages associés pour les variables qualitatives et catégorielles et par des moyennes \pm écart-type associé, médianes et étendue [range] pour les variables quantitatives. La comparaison entre deux paramètres qualitatifs a été réalisée via le test du Chi² ou le test exact de Fisher le cas échéant. La normalité des variables quantitatives a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk ; les données quantitatives ont été comparées entre groupes par le test de Student ou ANOVA suivie d'un test post-hoc ou

par le test de Kruskal-Wallis si conditions de l'ANOVA non respectées. Afin de prendre en considération la variabilité inter- intra-patient, des modèles à effets aléatoires ont été utilisés en compléments d'ANOVA pour données répétées.

Toutes les analyses ont été réalisées en formulation pour un risque de 1ière espèce bilatéral de 5% (hormis tests multiples) sous STATA V10 (Stata Corp., College Station, Texas, USA).

Résultats

I - Étude de la colonisation bactérienne colique dans la cohorte de patients

1. Description de la cohorte

1.1. Données cliniques

Pour chaque patient CCR, la distinction a été faite entre la muqueuse non tumorale (c'est-à-dire à distance de la tumeur) et la muqueuse tumorale (c'est-à-dire la tumeur proprement dite). Les patients du groupe cancer colorectal (CCR, n=51) ont été divisés en 2 groupes : patients avec une atteinte colique proximale (n=22) et patients avec une atteinte colique distale (n=29). De même, pour le groupe diverticulose (DIV, n=33), il s'agissait à chaque fois de prélèvements en muqueuse normale de localisation distale. L'âge médian des patients CCR était de 70.5 ans (74 ans pour les CCR de localisation proximale et 68 ans pour les CCR de localisation distale). Il était significativement moins élevé dans le groupe DIV (58 ans, $p=0.03$). Le sexe ratio (M/F) était de 1.26 chez les patients CCR quelle que soit la localisation proximale ou distale (1 et 1.5 respectivement, $p=0.58$) et de 0.88 chez les patients DIV.

1.2. Données anatomopathologiques

En collaboration avec le service d'anatomopathologie du CHU Estaing dirigé par le Pr. Déchelotte, nous avons effectué une analyse anatomopathologique de tous les prélèvements des patients opérés (patients CCR et patients DIV). Parmi les patients DIV, aucun ne présentait de signe de transformation néoplasique ni de polype adénomateux. Trois patients DIV (9%) présentaient un polype hyperplasique bénin sur la zone de résection. Onze patients (33%) avaient des signes d'inflammation aiguë (n=5) ou chronique (n=6) (congestion muqueuse et/ou sous-muqueuse, exulcérations, infiltrats de polynucléaires, abcès).

Parmi les patients du groupe CCR, tous présentaient un adénocarcinome lieberkühnien infiltrant. Toutes les tumeurs ont été analysées selon la **classification internationale AJCC/UICC TNM** (T pour l'extension locale de la tumeur, N pour l'atteinte ganglionnaire, M pour extension métastatique) :

Concernant le stade T, 3 patients (6%) présentaient une tumeur avec invasion épithéliale stricte (statut TIS), 9 patients (18%) une extension sous-muqueuse (statut T1), 4 patients (8%) une extension à la musculuse (statut T2), 31 patients (61%) une extension à la séreuse (statut T3) et 5 patients (10%) un franchissement de la séreuse et/ou extension à un organe de voisinage (statut T4). Le grade tumoral n'était pas différent entre les tumeurs de localisation distale ou proximale (Tableau 7).

Concernant l'atteinte ganglionnaire (stade N), 33 patients (63.5%) ne présentaient pas d'envahissement ganglionnaire (N0), 13 patients (25%) présentaient un nombre de ganglions envahis égal ou inférieur à trois (N1) et 6 patients (11.5%) présentaient un nombre de ganglions envahis supérieur à trois (N2). Il n'a pas été observé de différence de stade N selon la localisation proximale ou distale des tumeurs.

Tableau 7 : Répartition des patients de l'étude selon le stade TNM. Seul le statut métastatique était différent selon la localisation de la tumeur primitive (proximale ou distale).

	CCR proximal	CCR distal	DIV	Valeur p
N	22	29	33	
Age	74 [37-95]	68 [35-84]	58 [34-81]	0.04
Sexe (M/F)	11/11	18/11	14/19	
T				
Tis (%)	1 (4,5)	2 (6.9)	/	1.00
T1 (%)	2 (9,1)	7 (24.1)	/	0.27
T2 (%)	2 (9,1)	2 (6.9)	/	1.00
T3 (%)	15 (68,2)	16 (55.2)	/	0.40
T4 (%)	2 (9,1)	3 (10.3)	/	1.00
N				
N0	14 (63)	18 (62)	/	1.00
N1	4 (18)	9 (31)	/	0.35
N2	4 (18)	2 (6.9)	/	0.38
M				
M0	16 (72.7)	28 (96.6)	/	0.03
M1	4 (18)	1 (3.4)	/	0.15
Mx	2 (9)	0 (0)	/	

Enfin concernant l'extension métastatique (stade M), 5 patients (9.6%) présentaient une ou plusieurs métastases (exclusivement hépatiques) au moment du diagnostic. Ces patients avaient été opérés sans chimiothérapie néoadjuvante, soit en raison d'une tumeur symptomatique (n=4) soit en raison de métastase unique facilement résécable (n=1). La majorité de ces patients présentait une tumeur primitive du côlon proximal (n=4).

Parallèlement nous avons analysé des **critères histologiques indépendants de la classification TNM**, à savoir le degré de différenciation, les engainements périnerveux, le composant colloïde muqueux, les emboles vasculaires, et la présence d'un contingent de nécrose intratumorale (Tableau 8). L'analyse du degré de différenciation a indiqué qu'un seul patient (1.9%) avait une tumeur peu différenciée, 24 patients une tumeur moyennement différenciée (46.1%) et 21 patients une tumeur bien différenciée (40.4%). Des engainements périnerveux n'ont été retrouvés que chez 4 patients (7.7%), des emboles vasculaires chez 8 patients (15.4%) et un composant colloïde muqueux chez 7 patients (13.5%, supérieur à 50% chez 3 patients). L'existence d'une nécrose a été retrouvée chez 13 patients (25%).

1.3. Données immunohistochimiques : analyse de l'expression tissulaire des protéines CEACAM5 et CEACAM6

1.3.1. Marquage de la protéine CEACAM5

Nous avons analysé l'expression de la protéine CEACAM5 (ACE) qui est un marqueur pronostique sérique et tissulaire reconnu de cancer colorectal (139). Nous avons donc évalué le marquage de CEACAM5 au niveau des tumeurs et des muqueuses du groupe CCR et des muqueuses du groupe DIV. Une échelle de marquage déjà décrite prenant en compte l'intensité du marquage et sa localisation (pôle apical des cellules, cytoplasme, pôle

Tableau 8 : Répartition des patients de la cohorte CCR en fonction de la localisation de la tumeur primitive, selon les critères histologiques déterminés après analyse anatomo-pathologique des pièces opératoires. Seule la composante colloïde muqueuse était plus importante dans le groupe CCR proximal.

	CCR proximal (%)	CCR distal (%)	Valeur p
Degré de différenciation			
Peu	1 (4.5)	0 (0)	1.00
Moyen	11 (50)	13 (45)	0.78
Bien	10 (5.5)	16 (55)	0.58
Engainements péri-nerveux			
Oui	2 (9)	2 (7)	1.00
Non	20 (91)	27 (93)	1.00
Emboles vasculaires			
Oui	2 (9)	6 (20.5)	0.44
Non	20 (91)	23 (79.5)	0.44
Composant colloïde muqueux			
> 50%	3 (13.5)	0 (0)	0.07
< 50%	4 (18.5)	0 (0)	0.03
Non	15 (68)	29 (100)	0.0015
Nécrose			
Oui	7 (32)	6 (20.5)	0.52
Non	15 (68)	23 (79.5)	0.52

baso-latéral ou stroma) a été appliquée pour les tumeurs (409). Étant donnée la différence forte d'expression entre les tumeurs et les muqueuses, ce score a été adapté pour les tissus normaux. Nous avons élaboré une échelle spécifique évaluant l'intensité du marquage dans les muqueuses, sans prendre en compte la localisation qui était la plupart du temps apicale ou cytoplasmique, cotant ce marquage -/+ lorsque l'intensité était faible ou nulle, et ++ lorsqu'elle était forte ou très forte (fig.34). Dans tous les cas, la lecture a été effectuée en aveugle par un anatomopathologiste du CHU de Clermont-Ferrand.

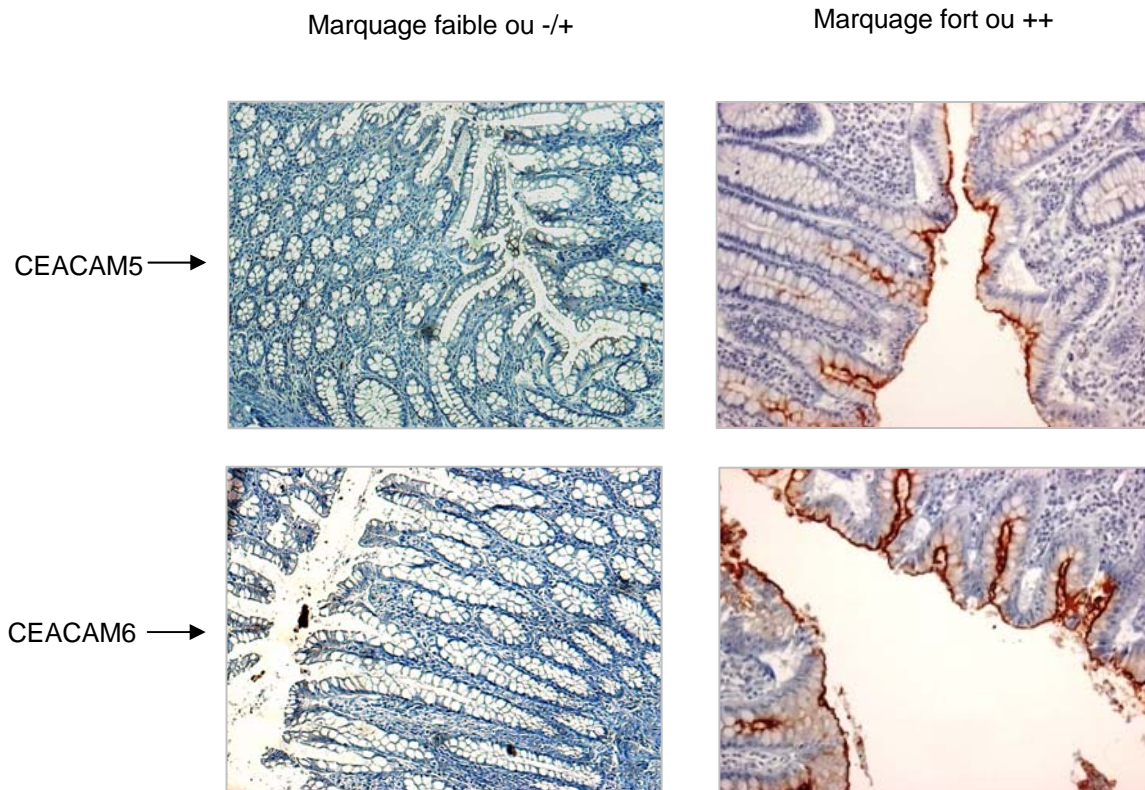


Figure 34 : Détection immunohistochimique de CEACAM5 et CEACAM6 dans les muqueuses des patients DIV et CCR. Le marquage a été effectué à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CEACAM5 et anti-CEACAM6 révélés par un kit DAB. Les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline de Mayer. L'analyse qualitative du marquage a été réalisée en tenant compte du type de cellule marquée, de l'intensité du marquage et de sa distribution cellulaire. L'analyse au microscope optique X100 et X400 a été faite en aveugle par deux anatomo-pathologistes. Les marquages de CEACAM5 et de CEACAM6 étaient comparés et gradés en 2 groupes : (-/+) indiquait un marquage absent ou très faible du cytoplasme ou de la bordure en brosse ; (++) indiquait un marquage modéré ou fort du cytoplasme ou de la bordure en brosse.

Colonne de gauche : exemple d'un marquage faible

Colonne de droite : exemple d'un marquage fort

Le score de CEACAM5 dans les tumeurs CCR était à chaque fois fort ou très fort, et très supérieur à celui des muqueuses CCR et DIV (fig.35). Il n'y avait pas de différence significative du score CEACAM5 entre les tumeurs proximales et les tumeurs distales. En ce qui concerne les muqueuses, le marquage CEACAM5 n'était pas significativement différent entre patients CCR et patients DIV, même si la proportion de patients CCR exprimant fortement CEACAM5 était plus importante dans le groupe CCR (98% vs 88%, $p=0.075$) (tableau 9, page suivante).

1.3.2. Marquage de la protéine CEACAM6

En parallèle, l'expression de la protéine CEACAM6, de description plus récente, a été évaluée car également surexprimée dans le cancer colorectal au niveau tissulaire, avec une spécificité supérieure en termes de pronostic par rapport à CEACAM5 (134, 143-146, 388).

Comme pour CEACAM5, nous avons comparé le marquage de CEACAM6 au niveau des tumeurs CCR, des muqueuses CCR et des muqueuses DIV. Les mêmes scores et les mêmes procédures que pour CEACAM5 ont été appliqués pour l'évaluation de ce marquage.

Le score de CEACAM6 dans les tumeurs CCR était à chaque fois fort ou très fort, et très supérieur à celui des muqueuses CCR et DIV. Il n'y avait pas de différence significative du score CEACAM6 entre tumeurs proximales et tumeurs distales. Dans les muqueuses DIV le marquage CEACAM6 était fort (coté ++) dans 23/33 cas (70%) et faible (coté -/+) dans 10/33 cas (30%). Dans les muqueuses CCR le marquage était fort (coté ++) dans 41/51 cas (80%) et faible (coté -/+) dans 10/51 cas (20%) montrant que le score CEACAM6 n'est pas différent entre les muqueuses des différents groupes ($p=0.30$). De même, il n'y avait pas de différence d'expression au niveau des muqueuses en fonction de la localisation proximale ou distale des tumeurs.

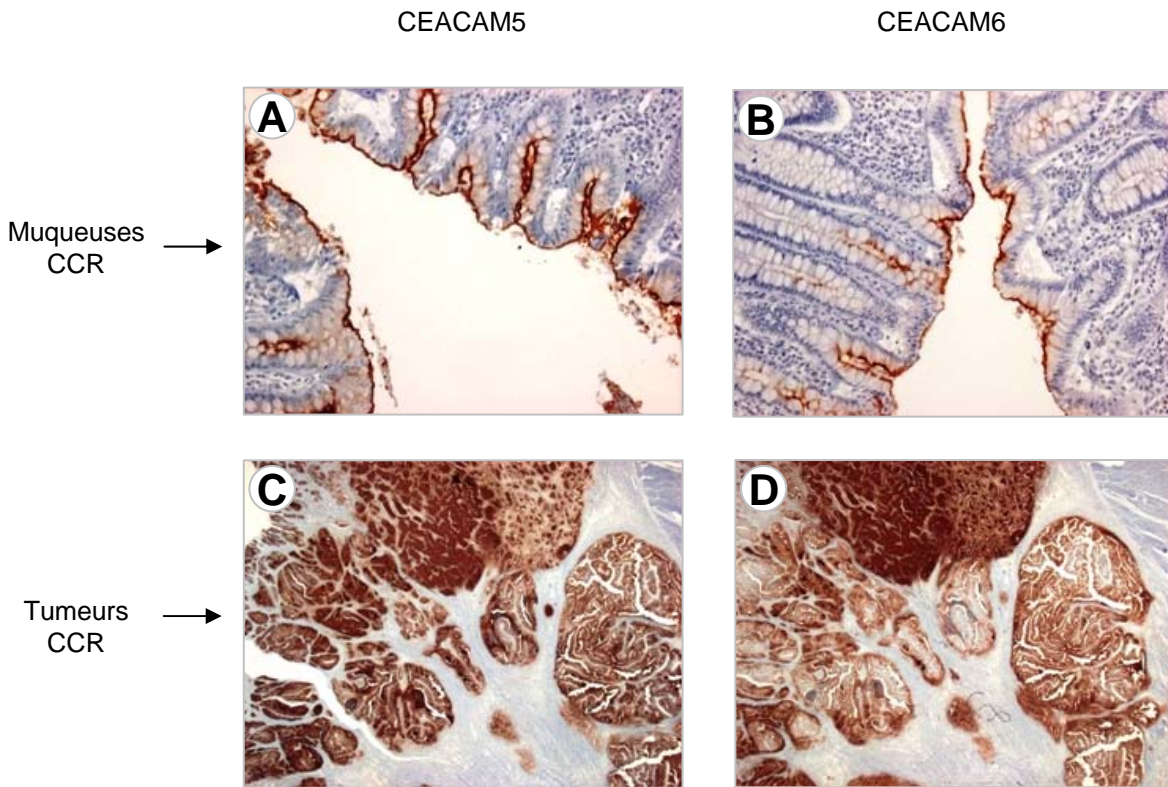


Figure 35 : Comparaison des marquages immunohistochimiques de CEACAM5 et CEACAM6 en tumeurs et en muqueuses CCR. Le marquage a été effectué à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CEACAM5 et anti-CEACAM6 révélés par un kit DAB. Les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline de Mayer. L'analyse qualitative du marquage a été réalisée en tenant compte du type de cellule marquée, de l'intensité du marquage et de sa distribution cellulaire. L'analyse au microscope optique x 100 et x 400 a été faite en aveugle par deux anatomo-pathologistes. Exemples de muqueuses (A et B) et de tumeurs (C et D) présentant un fort marquage de CEACAM5 et CEACAM6.

Cet exemple illustre l'impossibilité de comparer les prélèvements tumeur CCR et muqueuse CCR du fait d'un marquage des tumeurs (C et D) toujours plus fort à celui des muqueuses CCR.

2. Analyse de la flore bactérienne associée à la muqueuse

Nous avons analysé la flore bactérienne cultivable associée à la muqueuse colique des patients des groupes CCR et DIV, et aux tumeurs des patients CCR. Nous nous sommes focalisés sur les bactéries de la famille des Gammaproteobacteria qui représentent la majeure partie des bactéries aéro-anaérobies cultivables du tube digestif. Deux populations bactériennes ont été analysées :

- les bactéries associées qui regroupent à la fois les bactéries adhérentes à la muqueuse et les bactéries internalisées dans la muqueuse.

- les bactéries internalisées qui représentent la fraction de bactéries associées à la muqueuse qui ont pénétré dans la muqueuse, quelle que soit leur localisation dans le tissu.

Pour chaque groupe, deux types d'analyses ont été effectués : une analyse *qualitative* tenant compte de la proportion de prélèvements colonisés par les bactéries, et une analyse *quantitative* prenant compte du nombre de bactéries dans chaque prélèvement.

2.1. Bactéries associées à la muqueuse

L'analyse *qualitative* a montré un taux de prélèvements colonisés par des Gammaproteobacteria associées identique dans les tumeurs CCR, les muqueuses CCR et les muqueuses DIV (94%, 90.2% et 87.9% respectivement, p=NS). Il n'y avait pas de différence entre côlon proximal et côlon distal, que ce soit pour les muqueuses ou les tumeurs CCR, (90.9% vs 89.6% pour les muqueuses, et 90.9% vs 96.6% pour les tumeurs).

L'analyse *quantitative* des Gammaproteobacteria associées aux tissus a montré des taux de colonisation allant de 10^0 à 10^5 UFC/g pour les muqueuses DIV, de 10^0 à 10^6 pour les

Tableau 9 : Répartition des prélèvements en fonction de l'intensité du marquage de CEACAM5 et CEACAM6. La lecture était effectuée en aveugle par 2 anatomopathologistes différents. Il n'y avait pas de différence d'expression significative entre ces 2 marqueurs, quel que soit le prélèvement (muqueuse DIV, muqueuse CCR et tumeur).

		CEACAM5		CEACAM6	
		Faible (%)	Fort (%)	Faible (%)	Fort (%)
Muqueuse CCR					
	Proximal (n=22)	0 (0)	22 (100)	4 (18)	18 (82)
	Distal (n=29)	1 (3)	28 (97)	6 (21)	23 (79)
	Total (n=51)	1 (2)	50 (98)	10 (20)	41 (80)
Tumeur CCR					
	Proximal (n=22)	3 (14)	19 (86)	0 (0)	22 (100)
	Distal (n=26)	1 (4)	25 (96)	0 (0)	26 (100)
	Total (n=48)	4 (8)	44 (92)	0 (0)	48 (100)
Muqueuse DIV					
		4 (12)	29 (88)	10 (30)	23 (70)

muqueuses CCR et de 10^0 à 10^8 pour les tumeurs CCR (fig.36). En considérant la médiane des prélèvements, il n'a pas été observé de différence significative de colonisation entre les muqueuses DIV et les muqueuses CCR (14660 vs 10800 UFC/g). En revanche, un nombre significativement plus important de Gammaproteobacteria associées aux tumeurs CCR a été observé par rapport aux muqueuses des groupes CCR et DIV (200000 vs 14660 et 10800 UFC/g respectivement, $p < 0.01$ et $p < 0.001$). Cette différence entre muqueuses CCR et tumeurs CCR était observée quelle que soit la localisation (proximale ou distale), sans différence significative entre les 2 localisations.

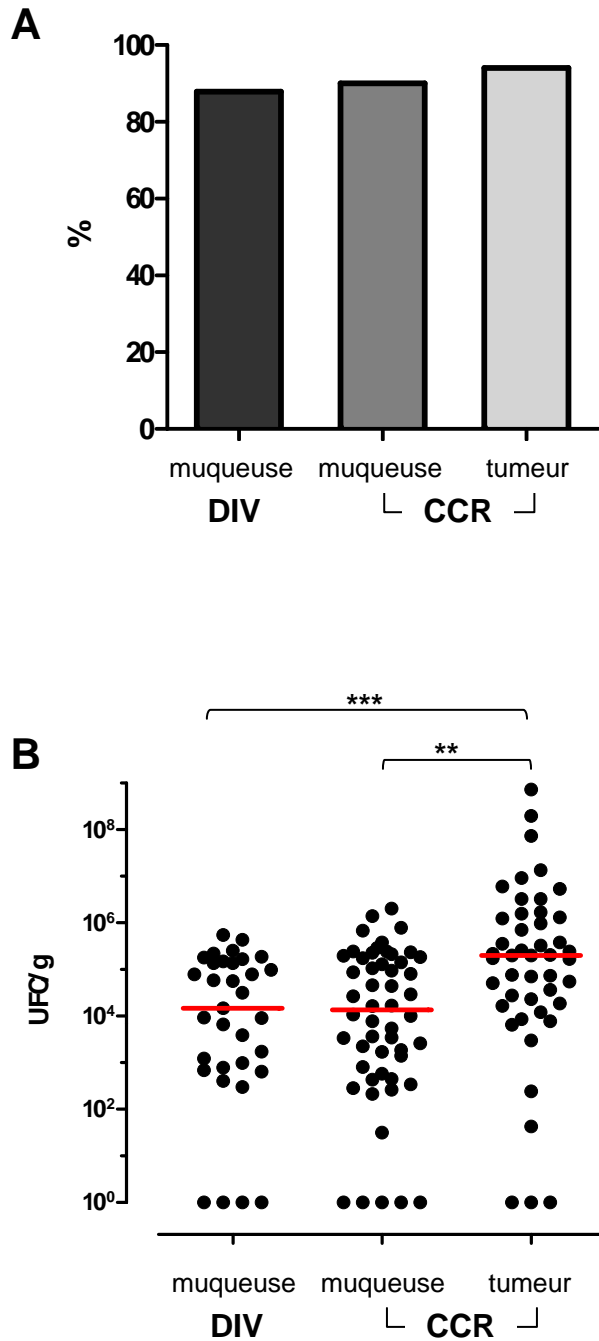


Figure 36 : Colonisation par les Gammaproteobacteria associées des muqueuses DIV (n=33), des muqueuses CCR (n=52) et des tumeurs CCR (n=52), exprimé en UFC par gramme de tissu.

A) Proportion de patients colonisés dans chaque groupe : il n'y avait pas de différence de nombre de patients colonisés dans les groupes CCR (muqueuse et tumeur) et DIV.

B) Niveau de colonisation des patients de chaque groupe : la médiane de colonisation est représentée en rouge. La colonisation par les Gammaproteobacteria associées était plus importante dans les tumeurs que dans les muqueuses CCR ($p < 0.01$) et les muqueuses DIV ($p < 0.001$).

2.2. Bactéries internalisées dans la muqueuse

Les Gammaproteobacteria internalisées représentent environ 1% de la fraction des bactéries associées. Ce taux était supérieur pour les tumeurs CCR (2.86%) par rapport aux muqueuses CCR (0.17%) et aux DIV (0.04%) ($p < 0.01$).

L'analyse *qualitative* a montré un taux de prélèvements colonisés plus important dans les tumeurs CCR que dans les muqueuses CCR et les muqueuses DIV (84.4% vs 59.0% et 48.5% respectivement, $p = 0.001$ et $p = 0.001$) (fig.37). Le taux de patients colonisés par des Gammaproteobacteria n'était pas différent entre côlon proximal et côlon distal, que ce soit pour les muqueuses ou les tumeurs CCR, (59.0 vs 48.3% pour les muqueuses, et 86.3% vs 82.6% pour les tumeurs).

L'analyse *quantitative* a montré des niveaux d'internalisation allant de 10^0 à 10^5 UFC/g pour les muqueuses DIV, de 10^0 à 10^4 pour les muqueuses CCR et de 10^0 à 10^6 pour les tumeurs CCR (fig.37). En considérant la médiane des prélèvements, il a été observé une variation non significative d'internalisation entre les muqueuses DIV et les muqueuses CCR (149 vs 0 UFC/g, $p = 0.47$). En revanche, comme rapporté ci-dessus pour les bactéries associées, un nombre significativement plus important de Gammaproteobacteria internalisées dans les tumeurs CCR a été observé par rapport aux muqueuses CCR et aux muqueuses DIV (11000 vs 149 et 0 UFC/g respectivement, $p < 0.001$ et $p < 0.001$). Cette différence entre muqueuses CCR et tumeurs CCR était observée quelle que soit la localisation (proximale ou distale), sans différence significative entre les 2 localisations.

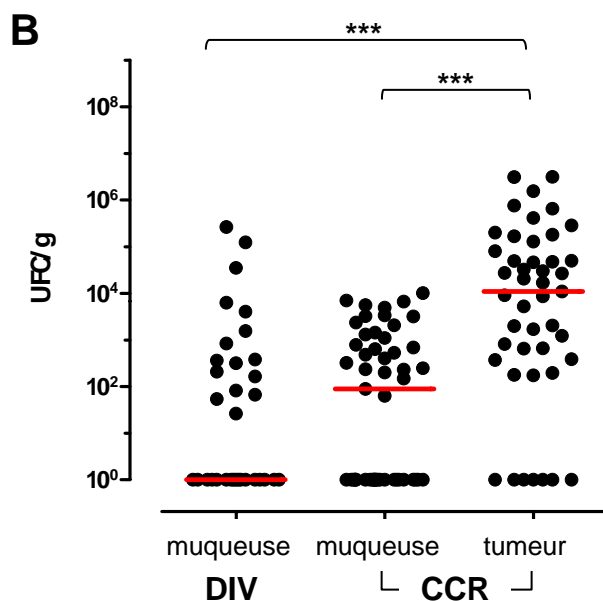
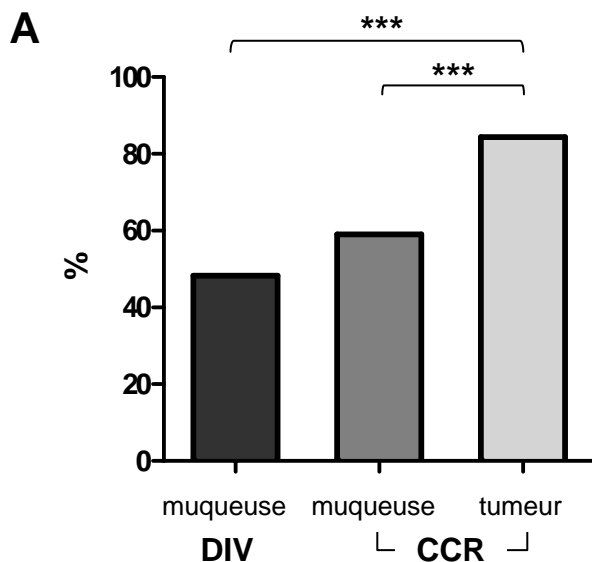


Figure 37 : Colonisation par les Gammaproteobacteria internalisées dans les muqueuses CCR et DIV et dans les tumeurs. Les propriétés d'internalisation ont été évaluées en utilisant le test de protection à la gentamicine visant à éliminer les bactéries extracellulaires.

(A) Proportion de patients colonisés dans chaque groupe. Il y avait plus de patients colonisés par des Gammaproteobacteria internalisées dans les tumeurs CCR que dans les muqueuses CCR ($p < 0.001$) et dans les muqueuses DIV ($p < 0.001$).

(B) Niveau de colonisation des patients de chaque groupe. La médiane de colonisation est représentée en rouge. Le niveau de colonisation par des Gammaproteobacteria internalisées était significativement plus élevé en tumeur qu'en muqueuse CCR ($p < 0.001$) et qu'en muqueuse DIV ($p < 0.001$). La différence entre muqueuse CCR et muqueuse DIV n'était pas significative.

2.3. Cas particulier des bactéries *E. coli*

Dans notre étude, l'espèce *E. coli* représentait la majorité des Gammaproteobacteria *associées*, que ce soit en tumeurs ou en muqueuses. En effet, les souches *E. coli* représentaient plus de 50% des Gammaproteobacteria dans 84% des prélèvements, et la totalité dans 68% des prélèvements. Des résultats tout à fait comparables à ceux obtenus avec les Gammaproteobacteria ont été observés, à savoir aucune différence significative de colonisation entre les muqueuses DIV et CCR, et une colonisation plus forte au niveau des tumeurs CCR par rapport aux muqueuses CCR et DIV (176000 vs 14900 et 9000 UFC/g respectivement, $p=0.026$ et $p<0.01$) (fig.38). Cette différence entre muqueuses CCR et tumeurs CCR était observée quelle que soit la localisation (proximale ou distale), sans différence significative entre les 2 localisations.

De même, l'espèce *E. coli* représentait également la majorité des Gammaproteobacteria *internalisées*, que ce soit en tumeurs ou en muqueuses. Des données globalement identiques aux Gammaproteobacteria internalisées ont donc été globalement observées. Les bactéries *E. coli* internalisées étaient quasiment indétectables dans les muqueuses DIV et CCR (médiane de 0 et 63 UFC/g respectivement), alors qu'une internalisation plus forte était retrouvée au niveau des tumeurs CCR (8181 UFC/g, $p<0.001$ et $p<0.001$ par rapport aux muqueuses DIV et CCR) (fig.38). Cette différence entre muqueuses CCR et tumeurs CCR était observée quelle que soit la localisation (proximale ou distale), sans différence significative entre les 2 localisations.

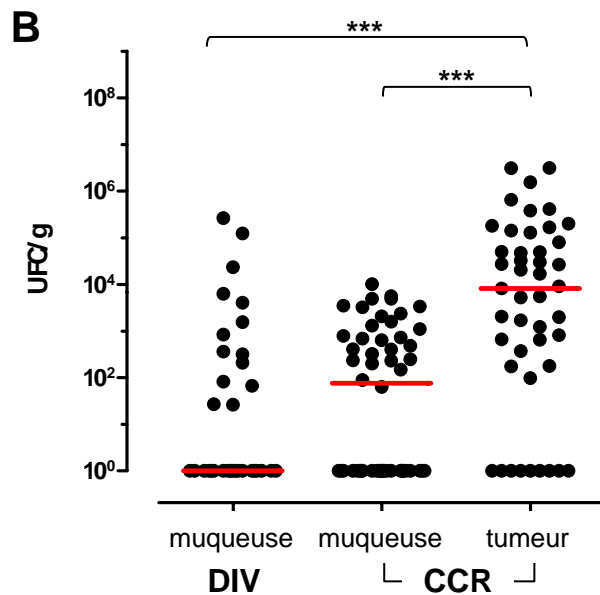
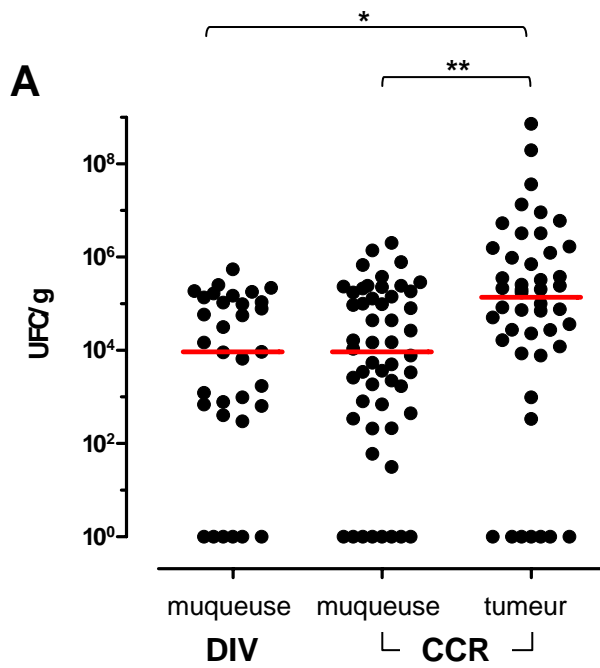


Figure 38 : Niveau de colonisation des muqueuses CCR et DIV et des tumeurs par les souches *E. coli*. Les souches *E. coli* ont été identifiées par un milieu chromogénique CPS ID 3® et par automate Vitek II®. Les médianes de colonisation sont représentées en rouge.

(A) *E. coli* associés. Le niveau de colonisation était significativement plus élevé en tumeur qu'en muqueuse CCR ($p < 0.05$) et qu'en muqueuse DIV ($p < 0.01$).

(B) *E. coli* internalisés. Le niveau de colonisation significativement plus élevé en tumeur qu'en muqueuse CCR ($p < 0.001$) et qu'en muqueuse DIV ($p < 0.001$). La différence entre muqueuse CCR et muqueuse DIV n'était pas significative.

3. Corrélation entre colonisation et données cliniques

Nous avons analysé les relations entre la colonisation par les bactéries associées à la muqueuse, les données cliniques des patients et les caractéristiques tumorales. Comme dans les autres chapitres nous nous sommes focalisés sur les bactéries de la classe Gammaproteobacteria en général et de l'espèce *E. coli* en particulier. Cependant, afin de ne pas alourdir la rédaction, nous n'avons exposé que les résultats concernant les Gammaproteobacteria, les résultats obtenus pour les *E. coli* étant toujours superposables.

3.1. Colonisation & sexe

Il n'a pas été observé de différence de colonisation par des bactéries associées et internalisées entre les muqueuses DIV, les muqueuses CCR et les tumeurs CCR, ni au sein de chacun de ces groupes en fonction du sexe des patients (fig.39A).

3.2. Colonisation & âge

Etant donné la distribution étalée des effectifs, nous avons stratifié les 2 cohortes (CCR et DIV) en 2 groupes d'âges, > 65 ans et < 65 ans.

- Chez les patients DIV, les niveaux de colonisation par les Gammaproteobacteria associées à la muqueuse et internalisées étaient significativement plus importants chez les patients > 65 ans ($p=0.046$ et $p=0.045$ respectivement) (fig.39B).

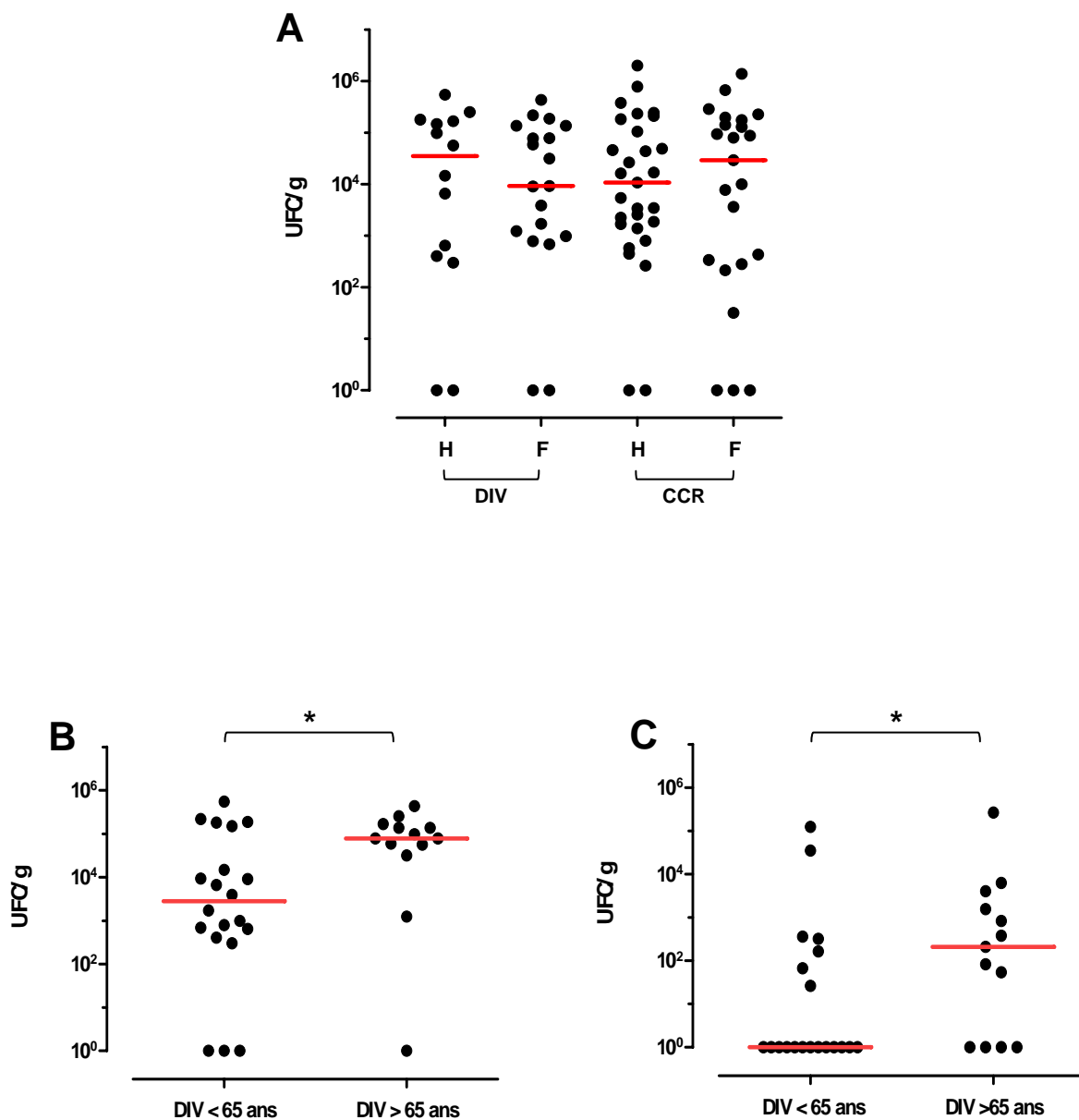


Figure 39 : Influence des données cliniques des patients de l'étude sur la colonisation par les Gammaproteobacteria. Les médianes de colonisation sont représentées en rouge.

(A) influence du sexe sur la colonisation en Gammaproteobacteria associées : aucune différence significative de colonisation n'a été observée dans les groupes DIV et CCR ni entre ces groupes.

(B) influence de l'âge sur la colonisation en Gammaproteobacteria associées des patients DIV : les patients du groupe DIV ont été regroupés en 2 catégories d'âge (> 65 ans et < 65 ans). Il existait une différence significative entre ces 2 groupes, avec une colonisation plus importante chez les patients plus âgés ($p < 0.05$).

(C) influence de l'âge sur la colonisation en Gammaproteobacteria internalisées des patients DIV. Il existait une différence significative entre ces 2 groupes, avec une colonisation plus importante chez les patients plus âgés ($p < 0.05$).

- Chez les patients CCR, les niveaux de colonisation par les Gammaproteobacteria associées à la muqueuse et internalisées n'étaient pas dépendants de l'âge que ce soit en muqueuse ou en tumeur CCR (fig.39C, page précédente).

3.3. Colonisation & stade T

Pour cette analyse, nous avons rassemblé les patients CCR en 2 groupes : les patients avec un stade T avancé (T_3 ou T_4 , noté $T_{3/4}$) et les patients avec un stade T peu avancé (T_{is} , T_1 ou T_2 , noté $T_{is/1/2}$). Les corrélations ont été faites entre le stade T d'une part, et la colonisation des muqueuses CCR et des tumeurs CCR d'autre part.

Dans les muqueuses CCR – La colonisation par les Gammaproteobacteria associées à la muqueuse chez les patients $T_{is/1/2}$ était significativement inférieure à celle des patients $T_{3/4}$ ($p=0.0058$). Une telle différence n'a pas été observée pour les Gammaproteobacteria internalisées (fig.40A).

Dans les tumeurs CCR – La colonisation par les Gammaproteobacteria associées et internalisées dans les tumeurs CCR était similaire quel que soit le stade tumoral de la tumeur, et quelle que soit la localisation considérée (proximale ou distale) (fig.40B).

Ces résultats montrent donc que la différence significative de colonisation retrouvée pour les bactéries associées dans les muqueuses CCR en fonction du stade tumoral n'est plus retrouvée dans les tumeurs.

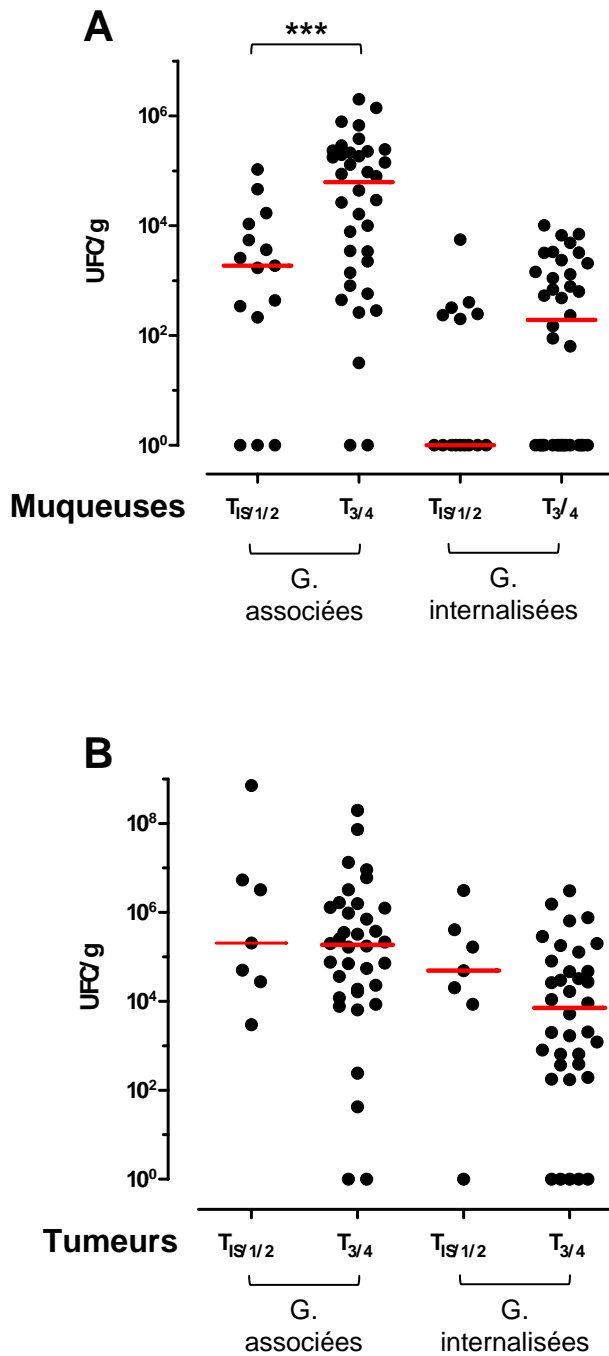


Figure 40 : Colonisation des muqueuses CCR (A) et des tumeurs CCR (B) par les Gammaproteobacteria associées et internalisées rapportée au stade tumoral T. Les médianes sont représentées en rouge.

(A) Le niveau de colonisation par les Gammaproteobacteria associées aux muqueuses CCR était plus élevé lorsque le stade tumoral été avancé ($p=0.0058$). Le niveau de colonisation par les Gammaproteobacteria internalisées dans les muqueuses CCR n'était pas fonction de l'extension tumorale T.

(B) Les niveaux de colonisation par les Gammaproteobacteria associées et internalisées dans les tumeurs CCR n'étaient pas dépendants de l'extension tumorale T.

3.4. Colonisation & stade N

Nous avons choisi, comme pour le stade T, de regrouper les effectif CCR en 2 catégories : les patients sans envahissement ganglionnaire (notés N-) et les patients avec envahissement ganglionnaire, quel que soit le nombre de ganglions envahis (N_1 et N_2 , notés N+).

Dans les muqueuses CCR – La colonisation des muqueuses CCR par les Gammaproteobacteria associées à la muqueuse était significativement augmentée lorsque les patients avaient un envahissement ganglionnaire (N+) que lorsqu'ils n'en avaient pas (N-) ($p=0.04$) (fig.41A). En revanche, il n'y avait aucune différence de répartition des Gammaproteobacteria internalisées en fonction du stade N.

Dans les tumeurs CCR – La colonisation des tumeurs CCR par les Gammaproteobacteria associées était significativement augmentée lorsque les patients avaient un envahissement ganglionnaire (N+) que lorsqu'ils n'en avaient pas (N-) ($p=0.055$) (fig.41B). En revanche, la colonisation des tumeurs CCR par les Gammaproteobacteria internalisées ne montrait pas de différence significative en fonction du stade N.

Ces résultats montraient donc que la colonisation par des Gammaproteobacteria associées aux muqueuses et aux tumeurs de patients CCR était corrélée au statut ganglionnaire N.

3.5. Colonisation & stade M

La cohorte de patients CCR a été divisée en 2 sous-populations : les patients sans envahissement métastatique (notés M-) et les patients avec envahissement métastatique (notés N+).

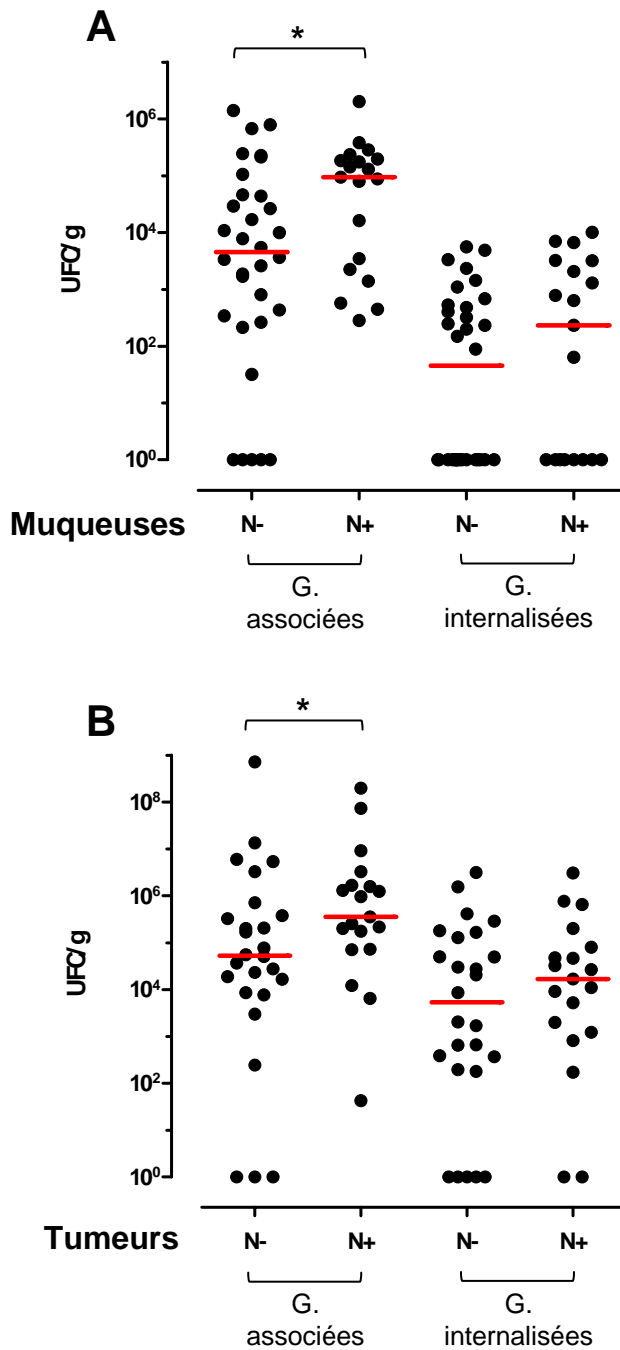


Figure 41 : Colonisation des muqueuses CCR (A) et des tumeurs CCR (B) par les Gammaproteobacteria associées et internalisées rapportée au stade d’envahissement ganglionnaire N. Les médianes sont représentées en rouge.

(A) Le niveau de colonisation par les Gammaproteobacteria associées aux muqueuses CCR était plus élevé lorsqu’il existait un envahissement ganglionnaire (N+) ($p=0.04$). En revanche, le niveau de colonisation par les Gammaproteobacteria internalisées dans les muqueuses CCR n’était pas fonction du statut ganglionnaire.

(B) Les niveaux de colonisation par les Gammaproteobacteria associées aux tumeurs CCR était plus élevé lorsqu’il existait un envahissement ganglionnaire ($p=0.055$). En revanche, le niveau de colonisation par les Gammaproteobacteria internalisées dans les tumeurs CCR n’était pas fonction du statut ganglionnaire.

Dans les muqueuses CCR – La colonisation par les Gammaproteobacteria associées était plus importante chez les patients M+ par rapport aux patients M- même si seulement 5 patients présentaient des métastases dans cette études (fig.42A) ($p=0.079$). Il n'y avait aucune différence de répartition des Gammaproteobacteria internalisées en fonction du stade M.

Dans les tumeurs CCR – La colonisation par les Gammaproteobacteria associées était plus importante chez les patients M+ par rapport aux patients M- (fig.42B) ($p=0.06$). Il n'y avait aucune différence de répartition des Gammaproteobacteria internalisées en fonction du stade M.

De façon intéressante, bien que l'effectif de patients M+ soit très réduit, il semble exister une relation entre la colonisation par des Gammaproteobacteria associées aux muqueuses et le statut métastatique M de la tumeur primitive.

3.6. Autres données anatomopathologiques

La colonisation par les Gammaproteobacteria associés et internalisées aux muqueuses et aux tumeurs des patients CCR n'était pas significativement différente selon le degré de différenciation, le degré de nécrose tumorale, l'existence d'embolies vasculaires ou d'engainements périnerveux, ou l'importance du composant colloïde muqueux.

3.7. Colonisation et localisation tumorale

La colonisation par les Gammaproteobacteria associées et internalisées en fonction de la localisation tumorale (CCR proximal – CCR distal) ne présentait pas de différence significative, que la comparaison intéresse les muqueuses entre elles ou les tumeurs entre elles. La localisation tumorale ne semblait donc pas affecter le niveau des bactéries associées

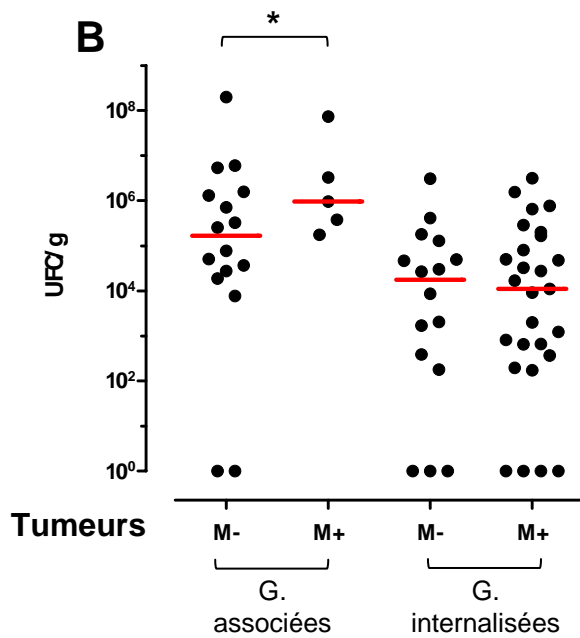
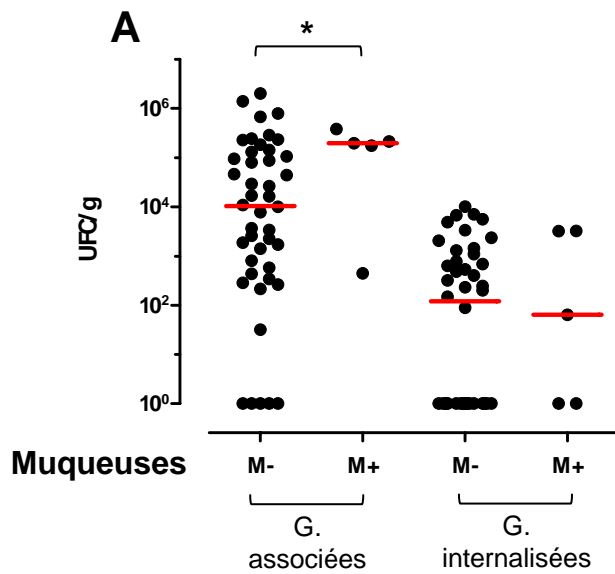


Figure 42 : Colonisation des muqueuses CCR (A) et des tumeurs CCR (B) par les Gammaproteobacteria associées et internalisées rapportée au stade d'invasion métastatique M. Les médianes sont représentées en rouge.

(A) Le niveau de colonisation par les Gammaproteobacteria associées aux muqueuses CCR était plus élevé lorsqu'il existait un envahissement métastatique (M+) ($p=0.076$). En revanche, le niveau de colonisation par les Gammaproteobacteria internalisées dans les muqueuses CCR n'était pas fonction du statut métastatique.

(B) Les niveaux de colonisation par les Gammaproteobacteria associées aux tumeurs CCR étaient plus élevés lorsqu'il existait un envahissement métastatique ($p=0.06$). En revanche, le niveau de colonisation par les Gammaproteobacteria internalisées dans les tumeurs CCR n'était pas fonction du statut métastatique.

et internalisées dans la muqueuse colique. Cependant, nous avons vu que le stade TNM influençait la colonisation par les Gammaproteobacteria associées et internalisées. Nous avons donc recherché cette influence du stade TNM sur chaque localisation tumorale.

3.7.1. tumeurs de localisation proximale

Il n'existait pas d'influence significative du stade tumoral T, N ou M dans cette localisation, que ce soit pour les Gammaproteobacteria associées ou internalisées. Seul le degré de différenciation semblait avoir une influence, car on retrouvait davantage de Gammaproteobacteria associées à la muqueuse CCR lorsque les tumeurs étaient bien différenciées, mais de façon non significative ($p=0.099$).

3.7.2. tumeurs de localisation distale

Il existait une différence de colonisation par les Gammaproteobacteria associées ($p=0.05$) et internalisées ($p=0.06$) chez les patients $T_{is/1/2}$ par rapport aux patients $T_{3/4}$, uniquement dans la muqueuse non tumorale (fig.43). Une influence similaire du stade N était retrouvée dans cette localisation mais uniquement pour les Gammaproteobacteria associées ($p=0.07$) (fig.44). En ce qui concerne le statut métastatique (M), il n'était pas possible de connaître l'influence de la localisation tumorale étant donné le faible effectif des patients M+ (4 patients CCR proximal, 1 patient CCR distal). Les autres facteurs de pronostic n'avaient pas d'influence dans cette localisation tumorale.

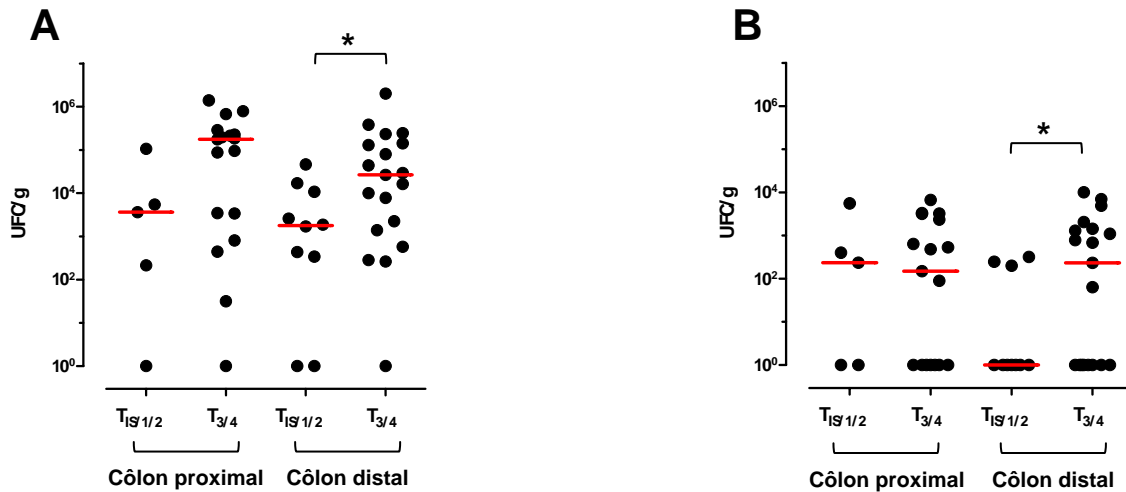


Figure 43 : Colonisation par des Gammaproteobacteria associées (A) et internalisées (B) dans les muqueuses CCR en fonction du stade T et de la localisation tumorale. Les médianes sont représentées en rouge.

(A) Il existait une différence significative de colonisation par les Gammaproteobacteria associées en fonction du stade T uniquement pour les localisations distales de CCR ($p=0.05$)

(B) Il existait une différence significative de colonisation par les Gammaproteobacteria internalisées en fonction du stade T uniquement pour les localisations distales de CCR ($p=0.07$)

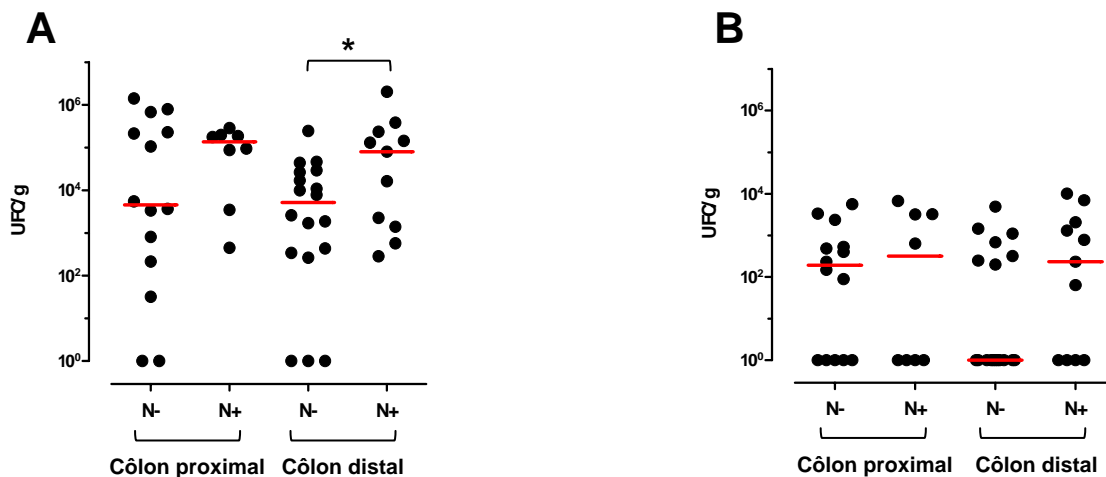


Figure 44 : Colonisation par des Gammaproteobacteria associées (A) et internalisées (B) dans les muqueuses CCR en fonction du stade N et de la localisation tumorale. Les médianes sont représentées en rouge.

A) Il existait une différence significative de colonisation par les Gammaproteobacteria associées en fonction du stade N uniquement pour les localisations distales de CCR ($p=0.07$).

B) il n'existait pas de différence significative de colonisation par les Gammaproteobacteria internalisées en fonction du stade T, quelle que soit la localisation tumorale.

3.8. Colonisation et expression de CEACAM5

La colonisation par les *Gammaproteobacteria associées* n'a pas pu être rapportée à l'expression de CEACAM5 dans les **muqueuses CCR** car les muqueuses exprimaient de manière comparable le récepteur CEACAM5. Au niveau des **muqueuses DIV** et des **tumeurs CCR**, la colonisation par les *Gammaproteobacteria associées* n'était pas significativement différente que le récepteur CEACAM5 soit fortement exprimé ou non ($p=0.85$ et $p=0.80$ respectivement).

La colonisation par les *Gammaproteobacteria internalisées* n'a pas également pu être rapportée à l'expression de CEACAM5 dans les **muqueuses CCR** car la majorité des muqueuses (98%) exprimait de manière comparable ce récepteur CEACAM5. Dans la **muqueuse des patients DIV** et les **tumeur des patients CCR**, la colonisation par les *Gammaproteobacteria internalisées* n'était pas significativement différente que le récepteur CEACAM5 soit fortement exprimé ou non ($p=0.98$ et $p=0.97$ respectivement).

La localisation tumorale n'influçait pas ces résultats, que ce soit pour les *Gammaproteobacteria associées* ou *internalisées*.

3.9. Colonisation et expression de CEACAM6

La colonisation par les *Gammaproteobacteria associées* n'était pas significativement différente que le récepteur CEACAM6 soit fortement exprimé ou non, quel que soit le groupe de patients considéré (DIV, muqueuses CCR et tumeurs CCR) (fig.45). Cependant, lorsque la localisation tumorale était prise en compte, la colonisation en *Gammaproteobacteria associées* aux **tumeurs CCR** de localisation **proximale** était plus importante lorsque l'expression de

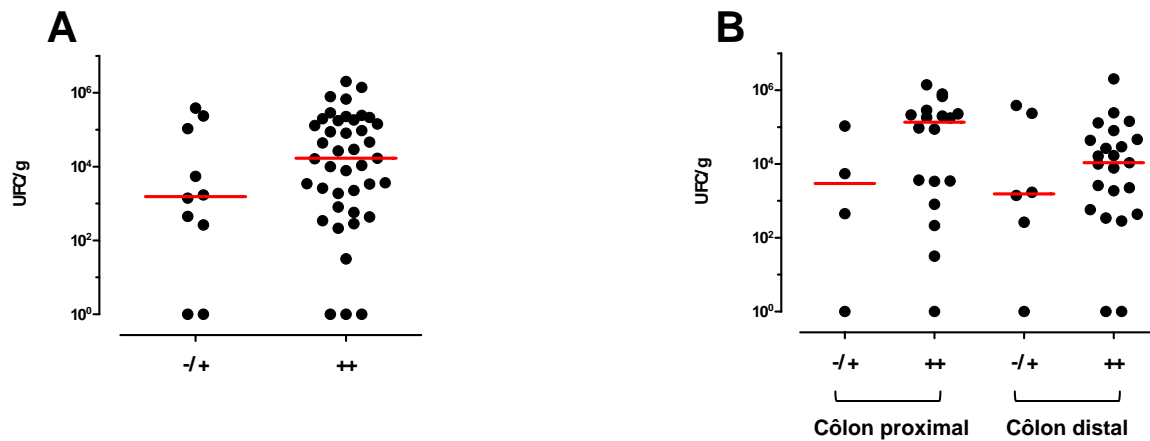


Figure 45 : Colonisation par les Gammaproteobacteria associées à la muqueuse CCR en fonction de l'expression de CEACAM6. L'expression tissulaire de CEACAM6 a été déterminée par immunohistochimie en fonction de L'intensité faible (-/+) ou forte (++) du marquage. Les médianes sont représentées en rouge.

(A) Analyse de la totalité des muqueuses CCR : il n'y avait pas de corrélation entre l'expression de CEACAM6 et le niveau de colonisation par les Gammaproteobacteria.

(B) Répartition en fonction de la localisation tumorale. Quelle que soit la localisation tumorale primitive, il n'y avait pas de corrélation entre l'expression de CEACAM6 et le niveau de colonisation par les Gammaproteobacteria associées à la muqueuse.

CEACAM6 était forte, mais ce résultat était à la limite de la significativité ($p=0.08$) en raison du faible effectif du groupe CEACAM6 -/+ ($n=5$) (fig.46).

La colonisation par les ***Gammaproteobacteria internalisées*** n'a pas pu être reliée à l'expression de CEACAM6 chez les **patients DIV** car le nombre médian de bactéries internalisées dans la muqueuse colique était proche de 0. Chez les **patients CCR**, que ce soit en muqueuse CCR ou en tumeur CCR, la colonisation par les *Gammaproteobacteria internalisées* n'était pas fonction de l'expression de CEACAM6.

3.10. Conclusion sur la colonisation et les données cliniques

Parmi les caractéristiques clinico-pathologiques des patients de cette cohorte, certains se rapportent à la tumeur (stade T, stade N, stade M) tandis que d'autres semblent plus directement liées à l'hôte (âge, sexe, expression de CEACAM6). Il existait une différence significative d'âge entre les patients CCR et les patients DIV (70.5 ans contre 58 ans, $p=0.03$). L'analyse des marquages de CEACAM5 et CEACAM6 confirme leur surexpression dans les tumeurs CCR par rapport aux muqueuses des deux groupes de patients.

3.10.1. *Gammaproteobacteria associées*

L'analyse des *Gammaproteobacteria associées* montre que la proportion de patients colonisés dans les groupes DIV et CCR est comparable. Le niveau de colonisation, similaire entre muqueuses DIV et CCR, s'élève significativement dans les tumeurs CCR. Parmi les *Gammaproteobacteria*, l'espèce *E. coli* est la plus représentée (>50% dans 84% des prélèvements). Les études statistiques de corrélation de la colonisation bactérienne et des caractéristiques clinico-pathologiques ont montré des relations significatives exclusivement pour la population de *Gammaprotéobacteria associées*. L'agressivité tumorale, matérialisée

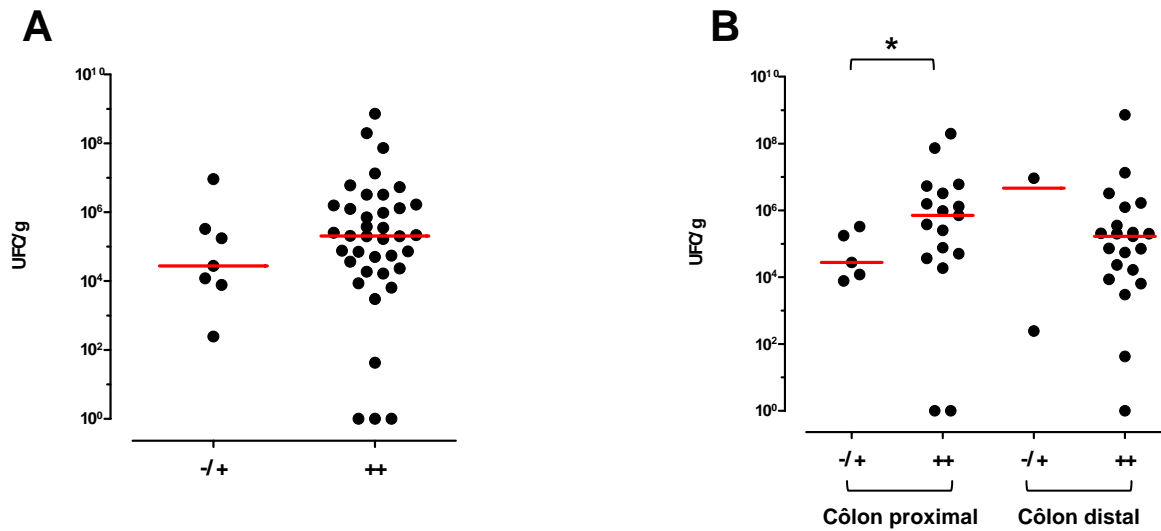


Figure 46 : Colonisation par les Gammaproteobacteria associées à la tumeur CCR en fonction de l'expression de CEACAM6.

L'expression tissulaire de CEACAM6 a été déterminée par immunohistochimie en fonction de l'intensité faible (-/+) ou forte (++) du marquage. Les médianes sont représentées en rouge.

(A) Analyse de la totalité des tumeurs CCR : il n'y avait pas de corrélation entre l'expression de CEACAM6 et le niveau de colonisation par les Gammaproteobacteria.

(B) Répartition en fonction de la localisation tumorale. Il existait une colonisation par les Gammaproteobacteria associées lorsque l'expression de CEACAM6 était forte, mais uniquement pour les tumeurs du colon proximal ($p=0.08$).

par les stades T, N et M de la classification histopronostique TNM, semble être associée à une colonisation bactérienne de la muqueuse CCR plus importante. Cette différence de colonisation n'est pas retrouvée au sein même des tumeurs pour les stades T et M, probablement en raison des importants remaniements architecturaux et moléculaires au niveau tumoral qui gomme cette différence phénotypique. Ces différences de colonisation en fonction du stade tumoral semblent affecter principalement le colon distal, puisque les conclusions entre colonisation et stade tumoral T et N n'étaient valables que pour les tumeurs distales ($p=0.05$ et $p=0.07$ respectivement).

L'expression de CEACAM5 et de CEACAM6 n'a montré aucune relation significative avec la colonisation par les Gammaproteobacteria associées, quels que soient les prélèvements (CCR et DIV). Cependant, lorsque la localisation tumorale était prise en compte, il semblait y avoir une tendance à la colonisation plus importante par les Gammaproteobacteria *associées* dans les tumeurs du *colon proximal* lorsque l'expression de CEACAM6 était forte ($p=0.08$).

3.10.2. Gammaproteobacteria internalisées

Les Gammaproteobacteria internalisées représentent environ 1% de la fraction des bactéries associées. Ce taux d'internalisation est supérieur pour les tumeurs CCR (2.86%) par rapport aux muqueuses CCR (0.17%) et aux muqueuses DIV (0.04%) ($p<0.01$), ce qui se traduit par un niveau de colonisation supérieur dans les tumeurs CCR. De plus, indépendamment du niveau de colonisation, la proportion de tumeurs CCR présentant des Gammaproteobacteria internalisées est plus importante que pour les muqueuses CCR et les muqueuses DIV (84, 59 et 48.5% respectivement). Cela suggère que la transformation néoplasique colique s'accompagne d'une augmentation des processus d'internalisation des Gammaproteobacteria dans la tumeur, dont l'espèce *E. coli* représente la quasi-totalité.

II - Caractérisation *in vitro* du phénotype des souches de *E. coli* isolées de tissus coliques humains

1. Analyse des souches de *E. coli* associées et internalisées à la muqueuse colique

Certaines situations pathologiques chez l'homme se traduisent soit par une perte, soit par un gain de diversité bactérienne (268). Nous avons analysé le nombre de clones de *E. coli* dans chaque prélèvement des patients CCR (muqueuse et tumeur) et des patients DIV (muqueuse). Leur phylogroupe ainsi que leur capacité à sécréter des toxines ont été déterminés. Nous avons ciblé notre étude sur les toxines de type cyclomodulines (CM) qui sont des toxines bactériennes potentiellement carcinogènes par leur action sur le cycle cellulaire ainsi que sur l'induction directe de dommages à l'ADN (410).

1.1. Typage des souches de *E. coli* et détermination du nombre de clones de *E. coli* dans les échantillons CCR et DIV

Afin de caractériser la clonalité des souches de *E. coli*, deux méthodes de génotypage (ERIC-PCR et RAPD-PCR) ont été utilisées. Pour chaque clone, un isolat représentatif a été retenu. Le phylogroupe (A, B1, B2 ou D) de chaque clone a été déterminé par PCR multiplex. Les bactéries associées et internalisées de 31 patients DIV et 39 patients CCR (18 localisations proximales, 21 localisations distales) ont été analysées. Un total de 115 clones de

E. coli a été répertorié sur l'ensemble des cohortes CCR et DIV. Les résultats sont regroupés dans l'annexe 5. Le détail des phylogroupes en fonction de l'origine du prélèvement (DIV, CCR, proximal ou distal) est reporté dans le tableau 10. Il est à noter qu'un même patient pouvait héberger plusieurs *E. coli* de phylogroupes différents, ainsi que des *E. coli* différents mais de même phylogroupe.

1.1.1. Analyse de la totalité des clones de *E. coli*

* **Phylogroupes** – La plupart des clones de *E. coli* isolés de patients CCR appartenaient au phylogroupe B2 contrairement aux *E. coli* isolés de muqueuse de patients DIV (72% contre 42%, $p < 0.01$, tableau 10). Pour ce phylogroupe, il n'y avait aucune différence entre les CCR de localisation proximale ou distale (54.5% contre 60.7%, $p = 0.77$). Concernant les autres phylogroupes, il n'y avait pas de différence significative de répartition entre patients CCR et DIV. Ceci suggère que les isolats de *E. coli* appartenant au phylogroupe B2 colonisent davantage la muqueuse des patients CCR que celle des patients DIV.

* **Clonalité** – Pour un patient donné, le même nombre et les mêmes types de clones bactériens étaient retrouvés a) dans les populations de bactéries associées et internalisées, et b) en muqueuse CCR et en tumeur CCR. Le nombre de clones n'était pas corrélé au niveau de colonisation en *E. coli*, quelle que soit la population (associée ou internalisée), et quel que soit le prélèvement (tumeur CCR, muqueuse CCR ou muqueuse DIV).

Il n'y avait pas de différence significative en termes de nombre de clones par prélèvement entre les patients CCR et les patients DIV (tableau 11). Etant donnée la faiblesse relative de notre effectif, les prélèvements ont été classés en fonction du nombre de clones en 3 groupes (0, 1-2 et ≥ 3 clones) afin de gagner en puissance statistique. Une différence a ainsi été mise en évidence entre patients CCR et patients DIV dans le groupe ≥ 3 clones à la limite

Tableau 10 : Distribution des phylogroupes de *E. coli* (A, B1, B2 et D) chez les patients DIV et CCR. Les souches de *E. coli* ont été génotypées par ERIC-PCR et RAPD-PCR sur les échantillons de muqueuse et de tumeur de 31 patients DIV et 39 patients CCR. La détermination du phylogroupe a été réalisée par PCR multiplex. Il a été retrouvé plus de souches de *E. coli* de phylogroupe B2 chez les patients CCR par rapport aux patients DIV (72% vs 42%, $p < 0.01$).

	% (nombre) d'échantillons contenant <i>E. coli</i>			
	A	B1	B2	D
DIV (n=31)	42 (13)	10 (2)	42 (13)	32 (10)
CCR (n=39)	28 (11)	23 (9)	72 (28)	26 (10)
colon proximal (n=18)	28 (5)	17 (3)	78 (14)	39 (7)
colon distal (n=21)	29 (6)	29 (6)	67 (14)	14 (3)

Tableau 11 : répartition des clones de *E. coli* sur l'ensemble de la cohorte

Localisation	n	n de clones de <i>E. coli</i> (%)				
		0	1	2	3	≥ 4
DIV	33	8 (24,2)	8 (24,2)	15 (45,4)	1 (3)	1 (3)
CCR	50	7 (14)	15 (30)	17 (34)	7 (14)	4 (8)
proximal	22	2 (9)	10 (45,4)	8 (36,4)	2 (9.1)	0 (0,0)
distal	28*	5 (17.9)	5 (17.9)	9 (32)	5 (17.9)	4 (14.3)
P value entre DIV & CCR		0.26	0.62	0.36	0.14	0.64

* pour 1 patient, le nombre de clones n'a pas pu être déterminé.

de la significativité (22% vs 6%, $p=0.066$) (fig.47A). Nous avons alors comparé les patients CCR entre eux, en fonction de la localisation proximale ou distale du cancer (fig.47B) :

- Les prélèvements présentant 1 à 2 clones représentaient 82%, 50% et 70% des CCR proximaux, CCR distaux et des témoins respectivement ($p=0.036$ entre CCR proximaux et CCR distaux) ;
- Les prélèvements présentant 3 clones et plus représentaient 9%, 32% et 6% des CCR proximaux, CCR distaux et des témoins respectivement ($p=0.085$ entre CCR proximaux et CCR distaux, $p=0.016$ entre CCR distaux et témoins)

Ces résultats montrent que les cancers du côlon proximal et du côlon distal affichent des particularités différentes en terme de colonisation / clonalité : en effet au cours de la carcinogenèse le côlon distal est le siège d'un gain relatif de diversité microbienne, au moins en ce qui concerne la population de *E. coli*.

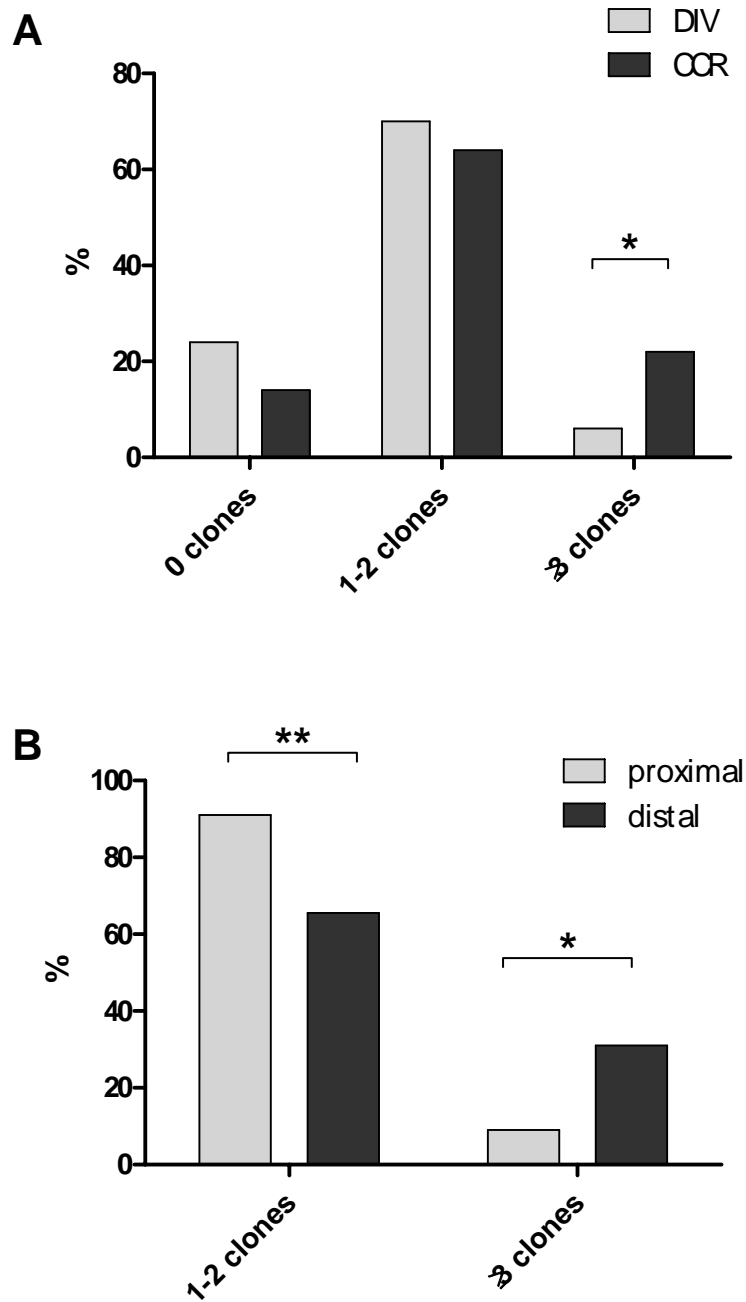


Figure 47 : Analyse de la répartition des clones de *E. coli*. Les prélèvements DIV et CCR ont été classés en fonction du nombre de clones en 3 groupes (0, 1-2 et ≥ 3 clones).

(A) Répartition des clones sur la totalité de la cohorte (CCR + DIV). Il y avait plus de patients CCR présentant ≥ 3 clones par rapport aux patients DIV ($p=0.066$).

(B) Répartition des clones en fonction de la localisation tumorale. Il y avait plus de patients à 1-2 clones dans les CCR proximaux ($p=0.085$) et moins de patients ≥ 3 clones ($p=0.036$)

1.1.2. Cas particulier des clones uniques de *E. coli*

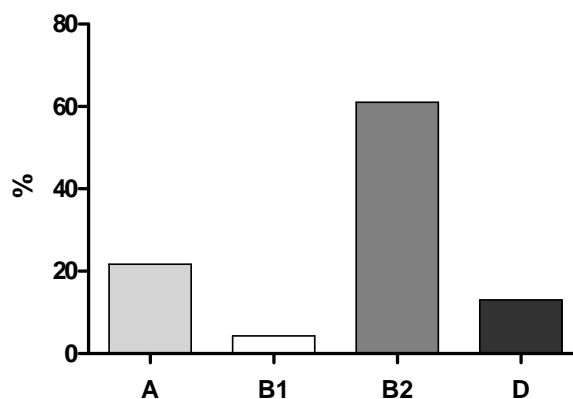
Nous nous sommes focalisés sur les prélèvements colonisés par un seul clone de *E. coli*, considérant qu'ils pouvaient être les témoins d'une pression de sélection pathologique, et être reliés au CCR. L'ensemble de notre cohorte comptait 23 patients présentant un seul clone unique de *E. coli* (8 patients du groupe DIV, 15 patients du groupe CCR). La liste de ces clones, leur phylogroupe et les prélèvements auxquels ils se rattachent sont résumés dans le tableau 12. Il ressort de cette analyse que la majorité de ces clones appartenait au phylogroupe B2 (61%) (fig.48), et que leur répartition était significativement différente en fonction de la localisation tumorale : 45.5% des patients atteints de CCR proximal étaient colonisés par un clone unique (10/22) contre seulement 17.9% des patients atteints de CCR distal (5/28) ($p=0.03$).

Tableau 12 : caractéristiques phénotypiques des clones uniques de *E. coli* isolés de muqueuses et de tumeurs de patients CCR et de muqueuses de patients DIV. Les propriétés d'adhésion et d'invasion ont été définies *in vitro* sur cultures de cellules épithéliales intestinales Caco-2. La survie en macrophage a été étudiée sur des macrophages murins J774 à l'aide d'un test de protection à la gentamicine.

Huit souches (34.7%) de *E. coli* présentaient des index d'adhésion > 1 définissant le phénotype *E. coli* adhérent, 12 souches (52%) présentaient un index d'invasion > 0.1 définissant le phénotype invasif, et 13 souches (56%) étaient capables de survivre et se multiplier dans les macrophages.

n° souche	Localisation	Adh	Inv	Survie en macrophages	PhyloGroupe
K-12MG		0.00	0.00	25	A
LF82		12.98	2.11	112	B2
1	CCR dist	2.61	0.87	50	B2
4	DIV	1.86	/	/	D
5	DIV	0.24	0.42	64	B2
8	CCR dist	0.05	0.00	345	B2
9	CCR prox	0.01	0.02	63	B2
11	CCR prox	0.18	0.08	180	B1
18	DIV	0.62	0.03	186	A
19	CCR prox	0.04	0.08	24	B2
20	CCR prox	1.26	0.59	345	B2
21	CCR prox	2.35	0.45	173	D
23	CCR prox	0.22	0.08	375	B2
26	DIV	1.57	0.14	/	B2
27	DIV	0.38	4.71	/	B2
29	CCR prox	0.09	0.02	44	D
30	DIV	3.85	0.61	173	B2
31	DIV	4.85	0.37	266	A
33	CCR prox	0.56	0.55	300	B2
34	CCR dist	0.12	0.04	280	A
35	CCR prox	0.19	0.09	180	B2
36	CCR prox	2.6	0.19	140	A
37	DIV	0.03	0.02	1200	A
38	CCR dist	0.47	0.50	53	B2
39	CCR dist	0.34	0.11	20	B2

Figure 48 : répartition (%) des phylogrou-pes au sein des différents clones uniques de *E. coli* (patients DIV + CCR).



1.2. Distribution des gènes codant pour les cyclomodulines (CM)

La recherche de gènes codant pour des cyclomodulines (CM) a été effectuée sur 115 clones dont 45 isolés de patients DIV et 70 de patients CCR (32 CCR proximaux, 38 CCR distaux). La distribution des gènes codant pour des CM a été rapportée dans le tableau 13 en fonction du phylogroupe des *E. coli*. Sur les 115 souches testées, 36 (31.3%) possédaient un ou plusieurs gènes codant une CM. Il y avait significativement plus de souches de *E. coli* codant pour une ou plusieurs CM chez les patients CCR par rapport aux patients DIV (42.86% vs 13.3%, $p=0.0009$) (fig.49, tableau 14 page suivante). De même, il y avait plus de patients CCR possédant une ou plusieurs souches de *E. coli* codant pour une CM (64.7% vs 19.4% pour les patients DIV, $p<0.0001$).

1.2.1. Îlot *pks*

L'îlot *pks* impliqué dans la synthèse de colibactine a été retrouvé dans 24.3% des isolats de *E. coli* et dans 78% des *E. coli* producteurs de CM. En considérant la distribution par rapport au phylogroupe, 57.1% des souches *E. coli* de phylogroupe B2 hébergeaient l'îlot *pks*, et toutes les souches hébergeant cet îlot appartenaient à ce phylogroupe B2 ($p < 0.001$ pour le groupe B2 contre les groupes A, B1 et D, individuels ou combinés), ce qui a déjà été observé dans d'autres *E. coli* commensaux et extra-intestinaux, notamment uropathogènes (328, 335).

1.2.2. Gènes *cnf*

Le gène *cnf1* a été retrouvé chez 16.5% des souches. Toutes les souches hébergeant le gène de *cnf1* appartenaient au phylogroupe B2 ($p < 0.001$ pour le groupe B2 contre les autres groupes A, B1 et D, individuels ou combinés), et correspondaient à 36.7% des souches de ce

Tableau 13 : Distribution des gènes codant pour des CM dans les souches *E. coli* de l'ensemble des patients CCR et DIV selon le phylogroupe (A, B1, B2 et D). L'îlot *pks* était le gène codant une CM le plus représenté, et exclusivement de phylogroupe B2.

pourcentage de <i>E. coli</i> appartenant au phylogroupe					
	A (n=33)	B1 (n=12)	B2 (n=49)	D (n=22)	All (n=116)
<i>pks</i>	0.0	0.0	57.1	0.0	23.2
<i>cnf</i>	0.0	8.3	36.7	0.0	16.4
<i>cdt</i>	3.0	8.3	8.2	0.0	5.2
<i>cif</i>	6.1	8.3	0.0	0.0	2.6
cm¹	9.1	16.7	63.3	0.0	30.2

¹, gène codant pour une CM

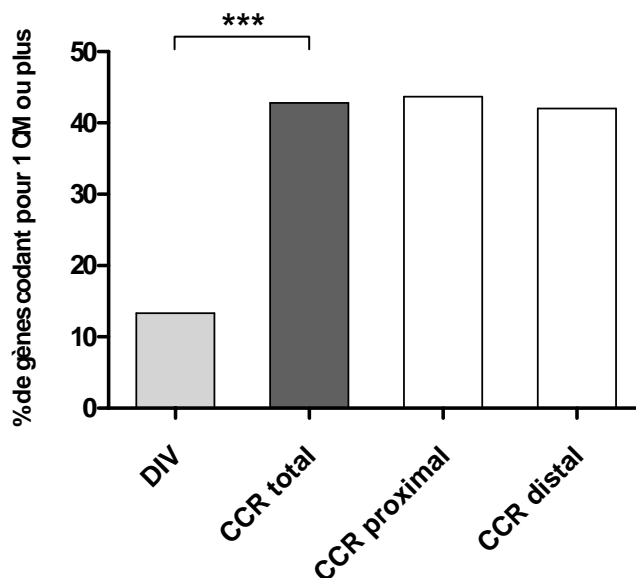


Figure 49 : Nombre de patients présentant un ou plusieurs gènes codant les CM en fonction du prélèvement (CCR ou DIV). Le nombre de prélèvements colonisés par des *E. coli* hébergeant un ou plusieurs gènes codant une CM était plus important chez les patients cancers (42.86% vs 13.3%, p=0.0009). Il n'y avait pas de différence en fonction de la localisation tumorale.

phylogroupe. Il est à noter que 33% des souches B2 possédaient simultanément l'îlot *pks* et le gène *cnf1* ($p < 0.001$ pour le groupe B2 contre les autres groupes A, B1 et D, individuels ou combinés), comme précédemment observé lors d'une analyse de souches urinaires (411). Toutes les souches sauf 3 hébergeant le gène *cnf1* ont montré un phénotype alpha-hémolytique. Cette association est probablement due à la présence de l'îlot de pathogénicité (PAI) II_{J96}-like, possédant le gène *cnf1* en aval de l'opéron *hlyCABD* de l'alpha-hémolysine (412). Les trois souches non hémolytiques *cnf1*-positifs avaient néanmoins le gène *hlyC*, suggérant une anomalie de PAI II_{J96}-like telles que des mutations ou des délétions ponctuelles empêchant la production de l'alpha-hémolysine. Seulement 3% des souches ont montré un phénotype alpha-hémolytique sans le gène *cnf1*. Ces souches avaient probablement un autre PAI contenant l'opéron *hlyCABD*, tel le PAI I_{CFT073}-like (413).

Une seule souche *cnf2*-positive (de phylogroupe B1) et aucune souche *cnf3*-positive n'ont été isolées, en accord avec leur origine animale préférentielle (414).

1.2.3. Gène *cdtB*

Les gènes *cdtB* codant pour CDT ont été observés dans 5.2% des souches dont 66.7% appartenaient au phylogroupe B2. Il n'a pas été observé d'association significative à un groupe phylogénique particulier, même en considérant les différents sous-types des gènes *cdtB*. Les gènes *cdtB-I/cdtB-IV* (n=5) étaient surreprésentés comparé au groupe de gènes *cdtB-II/cdtB-III/cdtB-V* (n=1). Les gènes *cdtB* n'ont montré aucune association particulière avec l'îlot *pks* ou le gène *cnf1*. Etant donné que les gènes *cdtB* ont été intensivement étudiés dans les souches de *Shiga* toxin-producing *E. coli* (STEC) (415-417), les souches *cdtB*-positives ont été analysées pour la présence des gènes *stx* et *eae*, mais aucun de ces gènes n'a été détecté dans ces souches *cdtB*-positives.

Tableau 14 : Distribution des gènes codant pour une CM dans les souches *E. coli* selon l'origine des prélèvements (DIV ou CCR). La recherche de gènes codant une cyclomoduline (CM) a été effectuée sur 115 clones de *E. coli* dont 45 sur des patients DIV et 70 sur des patients CCR. On notait plus de patients CCR possédant une ou plusieurs souches de *E. coli* codant pour une CM (64.7% vs 19.4% pour les patients DIV, $p < 0.0001$).

	pourcentage (nombre) d'échantillons présentant un gène codant une CM				
	<i>pks</i>	<i>cnf</i>	<i>Cdt</i>	<i>cif</i>	<i>cm</i> ¹
DIV (n=31)	19.3	12.9	0.0	0.0	19.4
CCR (n=39)	53.8	38.5	15.4	7.7	64.7
Proximal (n=17)	64.7	52.9	23.5	5.9	76.5
Distal (n=21)	47.8	28.6	9.5	9.5	57.1

Un seul clone *cdt-III*-positif (phylogroupe B1) a été identifié et hébergeait également le gène *cnf2*. Cette combinaison de gènes est fréquemment rapportée et est retrouvée au niveau d'un plasmide appelé pVir principalement présent dans les isolats d'origine bovine (414, 418).

1.2.4. Gène cif

Le gène *cif* a été détecté dans trois souches de *E. coli*. Ces souches appartenaient aux phylogroupes A (n = 1) et B1 (n = 2) et ne présentaient pas d'autre gène codant pour une CM. Ces trois souches dans cette étude possédaient le gène *eae* mais pas le gène *stx1* ni le gène *stx2*, et donc appartenaient au pathotype EPEC.

1.3. Détection phénotypique des CM

Les effets cytopathiques induits par les CM sur des cellules hôtes ont été identifiés pour toutes les souches y compris celles hébergeant des combinaisons de CM excepté pour le clone contenant à la fois l'îlot *pks* et le gène *cdtB-I*. En effet l'expression de ces deux derniers gènes induisant des effets cytopathiques semblables, il n'a pas été possible de distinguer lequel était fonctionnel. De plus, il n'a pas été possible d'étudier l'effet cytopathique chez les souches alpha-hémolytiques en raison de la forte cytotoxicité de l'hémolysine sur les cellules en culture. En revanche, la souche hébergeant les gènes *cnf2* et *cdt-III* montrait un effet cytopathique caractéristique des toxines CNF et CDT à savoir une multinucléation cellulaire pour CNF et une mégaloctose pour CDT. Un effet cytopathique caractéristique de Cif (mégaloctose) était observé pour les 2 clones hébergeant le gène *cif*. Les résultats sont rapportés en annexe 5. L'analyse de la présence d'une mégaloctose qui est l'effet cytopathique caractéristique de la présence d'un îlot *pks* ou de CDT a indiqué que 3 souches

pks positives isolées de prélèvements DIV, CCR proximal et CCR distal ne possédaient pas l'îlot *pks* fonctionnel, et deux souches *cdt*-positives ne montraient pas d'effet cytopathique caractéristique. Une souche isolée chez un patient DIV présentait le gène *cnf* sans que l'effet cytopathique soit observé, indiquant l'absence de cytotoxicité des souches hébergeant les gènes *cnf1*, *hly* ou *cdtB*, résultat déjà observé chez des souches de *E. coli* urinaires (332).

1.4. Distribution des gènes codant pour une cyclomoduline

1.4.1. en fonction du contexte clinique

La distribution des gènes codant pour une CM a été analysée en fonction du contexte physiopathologique. La présence d'au moins un gène codant pour une CM était plus fréquent chez les patients CCR par rapport au groupe témoin DIV (64.1 vs 13.3, $p < 0.0001$). L'îlot *pks* et les gènes *cnf* et *cdt* étaient significativement plus fréquents chez les patients CCR que chez les témoins DIV (55.3% vs 19.3%, $p < 0.01$, 39.5% vs 12.9%, $p = 0.01$ et 15.8% vs 0.0%, $p = 0.02$ respectivement). Cette différence était due principalement à prévalence plus forte – mais non significative – de ces gènes dans les tumeurs de localisation distale par rapport aux tumeurs de localisation proximale (prévalence de *pks*: 64.7% vs 50% ; prévalence de *cnf* : 52.9% vs 30% et prévalence de *cdt* : 23.5% versus 10.0%).

Les *E. coli* présentant au moins un gène codant pour une CM étaient majoritairement de phylogroupe B2 (31/36, 86%). De plus, 63.3% des *E. coli* de ce phylogroupe possédaient un gène codant une CM, contre seulement 16.7%, 9.1% et 0% des *E. coli* des phylogroupes B1, A et D respectivement.

La répartition des souches CM+ n'était pas différente selon le stade tumoral T, que ce soit pour les CCR de localisation proximale ou distale. En revanche, le nombre de patients CM+ était plus important lorsque la tumeur ne présentait pas d'envahissement ganglionnaire

(N-) (77% vs 28.6% pour les N+, $p=0.06$) mais uniquement pour les tumeurs de localisation proximale.

1.4.2. en fonction de la colonisation

La distribution des gènes codant pour une CM a été analysée en fonction de la colonisation par les *E. coli* associés et internalisés. Il n'y avait aucune corrélation entre le niveau de colonisation par des *E. coli* – associées et internalisées – et la présence de souches de *E. coli* hébergeant un ou plusieurs gènes codant une CM (*pks*, *cnf*, *cdt* ou *cif*), ni avec la présence de souches induisant un effet cytopathique (*pks*, CNF, CDT ou Cif). La seule relation mise en évidence est un nombre significativement moins important de souches induisant un effet cytopathique caractéristique de la présence de CNF-CDT parmi les clones issus de patients ne présentant qu'un seul clone de *E. coli* (clones uniques) par rapport aux autres clones (20% vs 68.2%, $p=0.0069$).

1.5. Recherche d'effets cytopathiques en l'absence de gènes codant une cyclomoduline connue

Étant donné que les gènes codant pour une CM (CM+) étaient observés préférentiellement dans les souches *E. coli* de phénotype B2 isolées de patients CCR de localisation distale, nous avons voulu savoir si d'autres souches de *E. coli* dépourvues de gènes codant pour une CM (CM-) pouvaient induire des lésions de l'ADN. Ces propriétés ont été étudiées sur des cultures épithéliales HeLa par la technique des comètes, méthode de référence de détection des lésions d'ADN induites par des génotoxines chimiques. L'analyse a été limitée aux souches *E. coli* isolées des patients CCR de localisation distale afin de pouvoir effectuer une comparaison avec les autres souches CM+ présentes de façon plus

fréquente dans ces localisations. Ainsi, parmi les souches de *E. coli* isolées de CCR distaux, 21 (55%) étaient CM- et ont été sélectionnées pour l'analyse. La souche recombinante *E. coli* hébergeant l'îlot *pks* cloné (DH10 β pBAC*pks*) a été utilisée comme contrôle positif, et la souche DH10 β hébergeant un plasmide vecteur natif (DH10 β pBAC) comme contrôle négatif. De façon intéressante, 5 souches (23.8%) n'hébergeant pas de gène connu pour coder une CM ont induit la formation de comètes avec une tête distincte représentant l'ADN intact et une queue comprenant des fragments de cassures d'ADN (fig.50). Ces souches appartenaient aux phylogroupes D (n=3) et A (n=2) ce qui contraste avec la plupart des *E. coli* producteurs de CM qui appartiennent au phylogroupe B2. Il n'y avait aucune corrélation entre la présence d'un test de comètes positif et le niveau de colonisation par les *E. coli*, que ce soit au niveau des bactéries associées ou internalisées. Ce test des comètes montrait donc que des souches *E. coli* issues de patients CCR pouvaient être responsables de lésion de l'ADN par un mécanisme différent que celui induit par la présence de CM connues.

1.6. Conclusion sur le phénotype des souches *E. coli* associées à la muqueuse

Ce chapitre montre une différence du nombre de clones de *E. coli* entre les patients CCR et les témoins (DIV), notamment pour les prélèvements pour lesquels ont été isolés 3 clones et plus, plus fréquents dans les CCR de localisation distale. Les souches de *E. coli* de phylogroupe B2 étaient significativement plus représentées chez les patients CCR par rapport aux témoins DIV (72 vs 42%, $p < 0.01$), surtout dans les localisations proximales (82.3%).

Les souches de *E. coli* produisant des CM potentiellement génotoxiques appartenaient majoritairement au phylogroupe B2 (88.9%), et étaient plus fréquentes chez les patients CCR que chez les patients témoins (42.86% vs 13.3%, $p = 0.0009$), et dans les CCR de localisation proximale sans envahissement ganglionnaire. Il ne semble pas y avoir de relation entre la

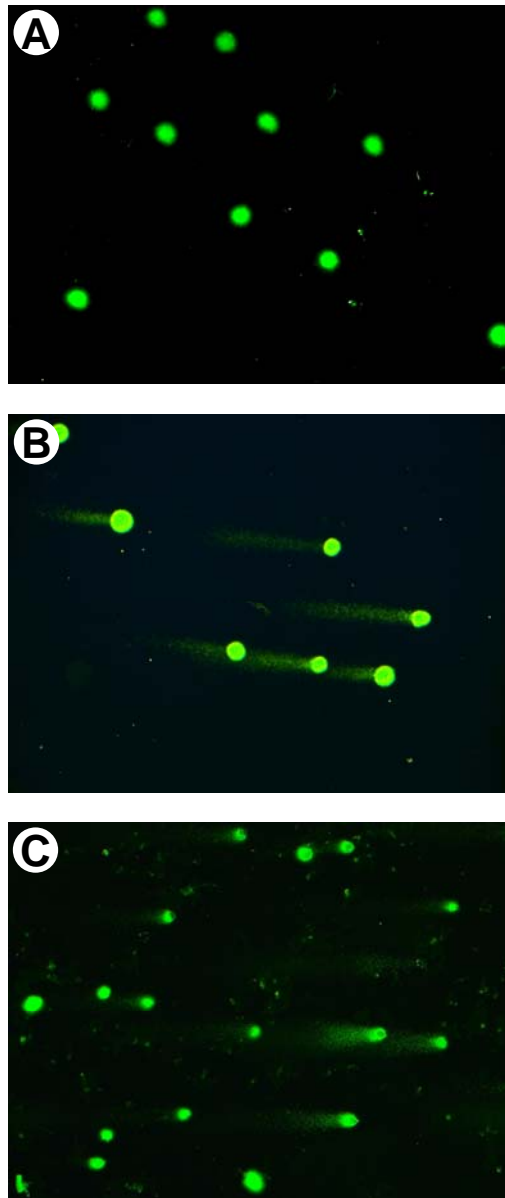


Figure 50 : Mise en évidence des lésions de l'ADN par le test des comètes sur cellules Hela. Des cultures de cellules Hela ont été infectées 3 heures à MOI 500 par 21 clones de *E. coli* non producteurs de CM. Les cellules ont été ensuite incluses dans un gel d'agarose bas point de fusion, appliqué sur des lames puis immergées dans un tampon d'électrophorèse avec un champ électrique de 1V/cm pendant 40 minutes. Un marquage fluorescent (SybrGreen) a ensuite été appliqué sur les lames et les noyaux des cellules ont été visualisés par microscopie à fluorescence.

(A) Témoin négatif (souche *E. coli* DH10 β qui n'héberge pas l'îlot pks) : les noyaux sont intacts, il n'y a pas de queue de comètes donc aucune lésion significative de l'ADN.

(B) Test des comètes positif après infection par le témoin positif DH10 β hébergeant l'îlot pks cloné : induction de la formation de comètes avec une tête distincte représentant l'ADN intact et une queue comprenant des fragments de cassures d'ADN.

(C) Test des comètes positif avec une souche *E. coli* dépourvue de gène codant une cyclomoduline connue.

Au total, 5 souches (23.8%) n'hébergeant pas de gène connu pour coder une CM ont induit la formation de comètes.

présence de gènes codant pour une cyclomoduline fonctionnelle et le niveau de colonisation par les *E. coli* associés et internalisés. Cependant, il semble exister une relation inverse entre l'existence d'un effet cytopathique CNF-CDT et la colonisation par des clones uniques de *E. coli*.

Parmi les souches *E. coli* CCR non productrices de CM, certaines souches présentaient un phénotype génotoxique, car induisant lors d'infection de cellules épithéliales en culture des cassures de l'ADN, au rôle potentiellement carcinogène.

2. Analyse des clones uniques de *E. coli* selon le phénotype AIEC

La flore microbienne associée à la muqueuse joue un rôle majeur dans les processus inflammatoires au niveau de la muqueuse colique. Chez les patients atteints de maladie de Crohn, des souches de *E. coli* pathogènes aux propriétés d'adhésion et d'invasion des cellules épithéliales intestinales et de survie en macrophages, dénommées AIEC, ont été rapportées (319, 368, 375). Il a également été démontré que les taux de *E. coli* associés et internalisés dans la muqueuse étaient équivalents chez les patients atteints de maladie de Crohn et chez les patients atteints de cancer colorectal (317). Il nous a donc paru intéressant d'analyser les souches de *E. coli* de notre cohorte, en se focalisant sur les clones uniques, afin d'identifier la proportion de bactéries appartenant au pathovar AIEC potentiellement impliquées dans la carcinogénèse colique.

En marge de l'étude du phénotype AIEC, nous avons également étudié les propriétés de persistance de ces clones uniques de *E. coli* en cellules épithéliales intestinales. En effet, si la maladie de Crohn est une affection évoluant par poussées aiguës auxquelles sont associés

les AIEC, le cancer colorectal se développe plutôt sous l'effet d'une ou plusieurs agressions latentes s'étendant sur plusieurs années (15). Une infection chronique par des bactéries persistantes de souches de *E. coli* potentiellement carcinogènes internalisées dans la muqueuse colique pourrait s'intégrer dans ce mécanisme d'action.

2.1. Analyse de l'adhésion/invasion en cellules épithéliales intestinales Caco-2 et de survie en macrophages THP1

Les tests *in vitro* d'adhésion, d'invasion et de survie en cellules épithéliales intestinales Caco-2 ont été réalisés sur les 23 clones uniques des patients DIV et CCR (tableau 11, pages précédentes). Le contrôle positif de référence était la souche *E. coli* AIEC LF82 isolée d'un patient atteint de maladie de Crohn et connue pour ses propriétés d'adhésion et d'invasion (375). Les souches *E. coli* non pathogène de laboratoire K-12-MG1655 et K-12-C600 ont été utilisées comme témoins négatifs.

Adhésion – Un niveau d'adhésion ≥ 1 (1 bactérie / cellule) a été défini comme seuil de positivité pour une bactérie adhérente. Parmi les 23 clones uniques, 8 clones (34.8%) avaient des propriétés d'adhésion aux cellules épithéliales *in vitro*.

Invasion – Un index d'invasion ≥ 0.1 a été défini comme seuil de positivité pour une bactérie invasive. Parmi les 23 clones uniques, 5 n'ont pas été testés en raison d'une résistance à la gentamicine (n=4) et d'un index d'adhésion très faible (n=1). Finalement, 11 clones sur 18 testés (58%) avaient des propriétés d'invasion des cellules épithéliales *in vitro*.

Survie en macrophages THP1 – Parmi les 23 clones uniques, 4 présentaient une résistance à la gentamicine et n'ont donc pas été testées. Le nombre de bactéries internalisées en macrophages murins J774 a été déterminé après 1 heure (entrée des bactéries) et après 24 heures (survie et répllication dans les macrophages) de traitement à la gentamicine. La

réplication a été exprimée en pourcentage de bactéries vivantes à 24 heures par rapport à 1 heure. Sur les 19 clones testés, 13 (68%) présentaient des propriétés de résistance au pouvoir bactéricide des macrophages. Parmi ces 13 clones, 9 étaient issus de patients CCR et 4 de patients DIV. Tous les clones uniques capables de se multiplier dans les macrophages avaient un niveau de réplication supérieur à celui de la souche AIEC de référence LF82.

2.2. Capacités de survie en cellules épithéliales intestinales Caco-2

L'étude du phénotype AIEC des clones uniques montre que les *E. coli* associés au CCR ont des index d'adhésion et d'invasion en cellules épithéliales intestinales très inférieurs à la souche AIEC de référence, mais une capacité de survie/réplication en macrophages comparable voire supérieure pour certaines souches. Cela corrobore l'hypothèse de propriétés phénotypiques différentes plutôt axées sur la persistance dans les cellules, et appuie l'importance de l'étude de cette persistance en cellules épithéliales intestinales.

2.2.1. survie en cellules épithéliales intestinales

Nous avons analysé les propriétés de survie et de réplication des clones uniques de *E. coli* lorsque les bactéries sont internalisées dans les cellules épithéliales coliques. Les souches présentant une résistance à la gentamicine (n=4) et celle ayant un index d'invasion trop faible (n=1) ont été exclues. Ce test a donc concerné 18 clones uniques de *E. coli*. La souche de référence choisie comme témoin négatif était la souche *E. coli* non pathogène K-12 MG1655.

Après 48 heures d'incubation sous gentamicine, un index de prolifération a été calculé pour chaque souche, correspondant au rapport du nombre de bactéries présent dans les cellules au temps 48 heures par rapport à celui au temps 1 heure. Il est à noter que l'index de prolifération de la souche *E. coli* MG1655 (appelé IP_{MG1655}) était toujours < 1 , indiquant que

cette souche ne persiste pas dans les cellules épithéliales intestinales. Les résultats ont permis de définir 3 groupes par rapport à la souche de référence MG1655 : un groupe **non persistant** ($IP < IP_{MG1655}$), un groupe **persistant** non répliatif ($IP > IP_{MG1655}$ mais < 1) et un groupe persistant et **répliatif** ($IP > 1$). Parmi les 18 clones testés, 4 (22%) étaient non persistants, 11 (61%) étaient persistants non répliatifs, et 3 (17%) étaient persistants et répliatifs avec des taux allant de 226 à 519% (fig.51).

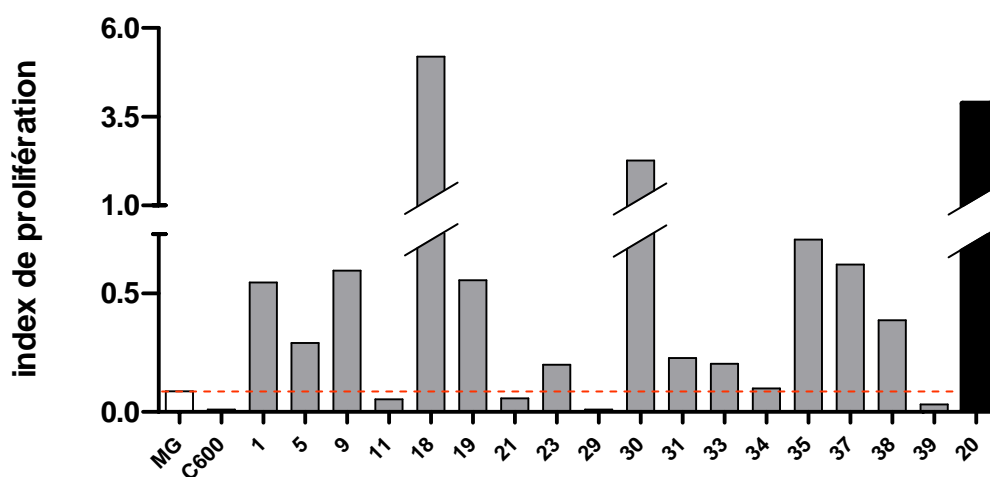


Figure 51 : Survie et réplication des clones uniques de *E. coli* en cellules épithéliales intestinales Caco-2. Des cultures de cellules Caco-2 ont été infectées 5 heures à MOI 100 par 18 clones uniques (5 exclus pour résistance à la gentamicine ou index d'adhésion trop bas). Après 48 heures d'incubation sous gentamicine, un index de prolifération a été calculé pour chaque souche, correspondant au rapport du nombre de bactéries présent dans les cellules au temps 48 heures par rapport à celui au temps 1 heure. La souche K-12 MG1655 était le témoin négatif, et la ligne brisée rouge représente le seuil au dessous duquel les souches ne sont pas considérées comme persistantes. Parmi les 18 clones testés, 4 (22%) étaient non persistants, 11 (61%) étaient persistant non réplcatifs, et 3 (17%) étaient persistants et réplcatifs.

2.2.2. évaluation de la cytotoxicité

La souche n°20 (CCR20) a été choisie comme souche de référence cancer pour la suite des expériences car issue d'un CCR de localisation proximale, appartenant au phylogroupe B2 et présentant des propriétés d'adhésion, d'invasion et de persistance en cellules épithéliales intestinales. Pour cette expérience, c'est la souche AIEC LF82 qui a été choisie comme témoin positif car ses propriétés d'adhésion et d'invasion sont très supérieures aux souches CCR, mais elle aurait des propriétés cytotoxiques sur les cellules intestinales *in vitro* (données non publiées). La souche K-12 MG1655 a été choisie comme témoin négatif, d'autant qu'elle n'induit pas de mort cellulaire *in vitro*. L'analyse a confirmé les propriétés de survie et de multiplication de la souche CCR20 (273% et 449% aux temps 24h et 48h respectivement), supérieures à celles des souches LF82 (162 et 82%) et MG1655 (35 et 22%), $p < 0.01$ et $p < 0.05$ respectivement (fig.52). Le nombre de cellules a été compté aux temps 1h, 24h et 48h post-infection et comparé à un puits de cellules non infectées, pour évaluer la mort cellulaire lors de l'infection par les différentes bactéries testées. A 24 et 48 heures post-infection, le pourcentage de cellules viables était aux alentours de 100% pour les souches CCR et MG (fig.53). Pour la bactérie LF82, ce taux diminuait à 84% à 24 heures ($p = \text{NS}$) et 69% à 48 heures ($p < 0.001$ par rapport à CCR et MG), indiquant une activité cytotoxique importante.

Finalement, ce résultat montre que le clone unique de *E. coli* CCR20 est capable d'entrer dans les cellules épithéliales intestinales *in vitro* et de se répliquer sans induire de mort cellulaire significative.

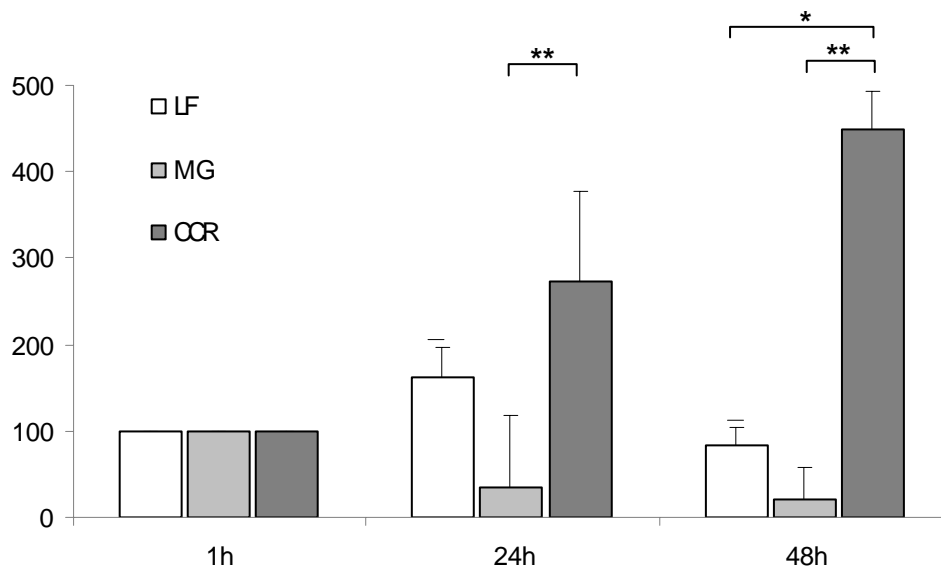


Figure 52 : Évolution du taux de bactéries dans les cellules en fonction du temps, par rapport au temps 1 heure ramené à 100%. Des cultures de cellules Caco-2 ont été infectées 5 h à MOI 100 par la souche CCR20, la souche AIEC LF82 et le témoin négatif K-12 MG1655. Après 48 heures d'incubation sous gentamicine, un index de prolifération a été calculé pour chaque souche, correspondant au rapport du nombre de bactéries présent dans les cellules au temps 48 heures par rapport à celui au temps 1 heure.

Seule la souche CCR20 a montré des capacités à survivre et à se multiplier en cellules épithéliales intestinales par rapport à la souche LF82 ($p < 0.01$) et à la souche K-12MG1655 ($p < 0.05$)

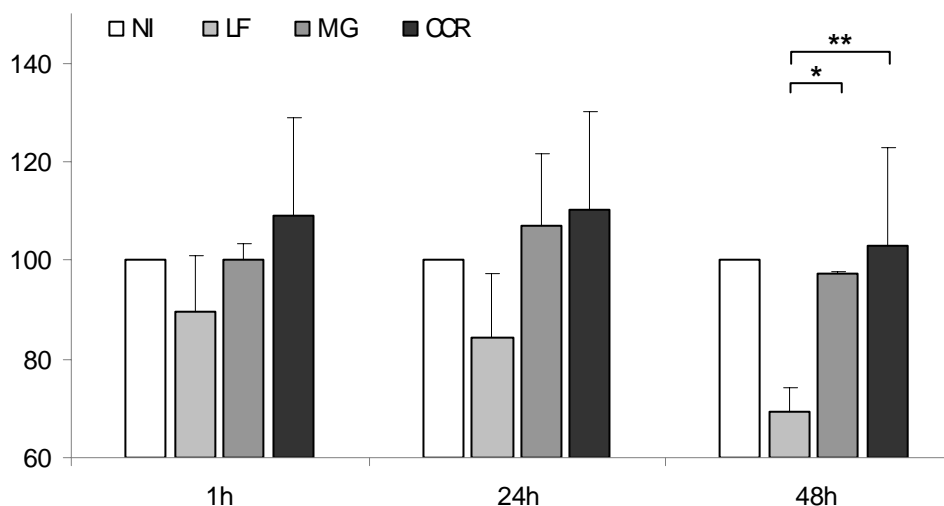


Figure 53 : Évolution du nombre de cellules en fonction du temps, par rapport au temps 1 heure et à la condition NI, ramené à 100%. Des cultures de cellules Caco-2 ont été infectées 5 h à MOI 100 par la souche CCR20, la souche AIEC LF82 et le témoin négatif K-12 MG1655. Le nombre de cellules a été compté aux temps 1h, 24h et 48h post-infection et comparé à un puits de cellules non infectées.

Les souches K-12MG1655 et CCR20 ne provoquaient pas de mort cellulaire ni à 24 h ni à 28 h, contrairement à la souche LF82 ($p < 0.05$ entre LF82 et K-12MG1655 et $p < 0.01$ entre LF82 et CCR20)

2.3. Relations entre phénotype des *E. coli* et cyclomodulines

Sur l'ensemble de la cohorte des clones uniques, il n'a pas été retrouvé de relation entre les index d'adhésion ou d'invasion de ces clones d'une part, et la production de CM ou l'existence d'un effet cytopathique quel qu'il soit d'autre part. Les résultats n'étaient pas différents lorsque l'analyse était effectuée par groupe de prélèvements (CCR proximal, CCR distal et DIV). Il est intéressant de noter qu'aucun des clones uniques du groupe DIV ne codait pour une CM ni n'avait d'effet cytopathique.

De même, parmi les souches ne produisant pas de CM, il n'existait pas de relation entre les index d'adhésion ou d'invasion et la capacité à provoquer des lésions de l'ADN (test des comètes positif).

Pris ensemble, ces résultats montrent que la sécrétion de CM ou l'existence d'un effet cytopathique n'est pas dépendant du phénotype d'adhésion / invasion.

2.4. Conclusion

Ces expériences ont révélé que 8 clones sur 23 testés (34.8%) avaient des propriétés d'adhésion, 11 sur 18 (58%) des propriétés d'invasion en cellules épithéliales intestinales, et 13 sur 19 (68%) des propriétés de répliation en macrophages (tableau 12, pages précédentes). Au total, sur les 23 clones uniques testés, seulement 5 (22%) arboraient les 3 propriétés phénotypiques des AIEC (3 issus de patients CCR proximal, 2 de patients DIV). Cependant, il est à noter que les caractéristiques phénotypiques des AIEC retrouvées dans les clones uniques CCR et DIV sont légèrement différentes de celles des AIEC : les niveaux d'adhésion et d'invasion en cellules épithéliales intestinales sont moins élevés, mais la répliation en macrophages murins est plus intense. De même, la majorité des clones uniques CCR ont des

propriétés de survie en cellules épithéliales intestinales sans induire de mort cellulaire, contrairement à la souche de référence AIEC LF82.

De plus, l'appartenance des souches *E. coli* au pathovar AIEC n'est probablement pas une condition exclusive de la carcinogénèse colique. En effet, il est intéressant de noter que parmi les 23 clones testés, 5 clones uniques non AIEC (22%) présentent des propriétés d'internalisation et de survie en cellules épithéliales intestinales, mécanisme pathogène et donc potentiellement carcinogène.

Ces résultats suggèrent que la majorité des clones uniques de *E. coli* (78%) sont capables de persister dans les cellules épithéliales intestinales et qu'une minorité (17%) peut même se répliquer à l'intérieur des cellules intestinales sans entraîner de mort cellulaire. L'absence de relation entre effet cytopathique des CM et propriétés d'adhésion, d'invasion et de multiplication en cellules épithéliales et en macrophages suggère que les bactéries ne nécessitent pas forcément un contact avec la muqueuse pour exercer un effet cytopathique.

3. Capacité des clones de *E. coli* à induire l'expression de CEACAM6

3.1. Etude de l'expression de CEACAM6 en fonction des clones de *E. coli*

L'expression de CEACAM6 ne semble pas corrélée à la colonisation par les Gammaproteobacteria associées dans les muqueuses et les tumeurs des patients de notre cohorte. Par contre, il est possible que l'expression de CEACAM6 soit corrélée seulement à une espèce ou un groupe défini parmi ces Gammaproteobacteria. Nous avons donc comparé l'expression de CEACAM6 en fonction de différents clones de *E. coli* et des différents

phylogroupes. Nous ne nous sommes intéressés qu'aux bactéries associées puisque les niveaux d'expression de CEACAM6 ne semblent pas être corrélés avec les taux de bactéries internalisées (cf. chapitre I-3.8).

3.1.1. Niveau d'expression de CEACAM6 et phylogroupe de *E.coli*

Pour chaque phylogroupe, nous avons analysé le niveau de colonisation des souches *E. coli* dans les prélèvements DIV et CCR, et nous les avons rapportés à l'expression de CEACAM6. Les souches de *E. coli* des phylogroupes B1 (n=12) et D (n=22) étaient trop peu représentées pour obtenir une comparaison fiable et significative avec l'expression de CEACAM6. Concernant le phylogroupe A (n=33), il n'y avait aucune corrélation entre le niveau de colonisation des *E. coli* de ce phylogroupe et l'expression de CEACAM6, quel que soit les prélèvements considérés (muqueuse DIV, muqueuse CCR ou tumeur CCR). Concernant le phylogroupe B2 (n=49) :

- Au niveau des muqueuses DIV, il n'y avait aucune corrélation entre l'expression de CEACAM6 et la colonisation bactérienne par des *E. coli* B2 associés à la muqueuse.
- Au niveau des muqueuses CCR, le niveau de colonisation par des *E. coli* de phylogroupe B2 associées était supérieur de 3 log dans les muqueuses CCR exprimant fortement CEACAM6 par rapport à celles l'exprimant faiblement. Cette différence n'était pas significative probablement du fait de l'hétérogénéité des données (fig.54).
- Au niveau des tumeurs CCR et notamment pour les localisations proximales, une différence de colonisation supérieure de plus de 4 log en fonction du niveau d'expression de CEACAM6 a été observée, mais uniquement significative pour les localisations proximales (p=0.058) (fig.55).

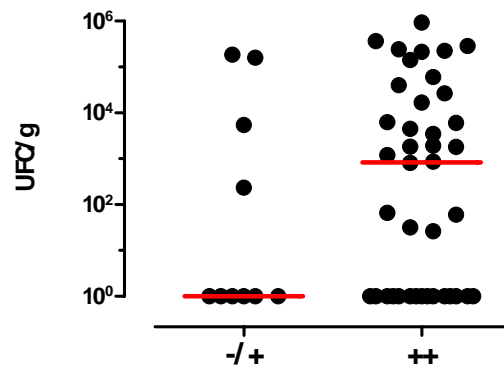


Figure 54 : Colonisation par des *E. coli* associés à la muqueuse de phylogroupe B2 en fonction de l'expression de CEACAM6 chez les patients CCR. L'expression tissulaire de CEACAM6 a été déterminée par immunohistochimie en fonction de l'intensité faible (-/+) ou forte (++) du marquage. Les médianes sont représentées en rouge. Il y avait une différence de colonisation par les *E. coli* B2 en fonction de l'expression de CEACAM6, mais cette différence n'était pas significative.

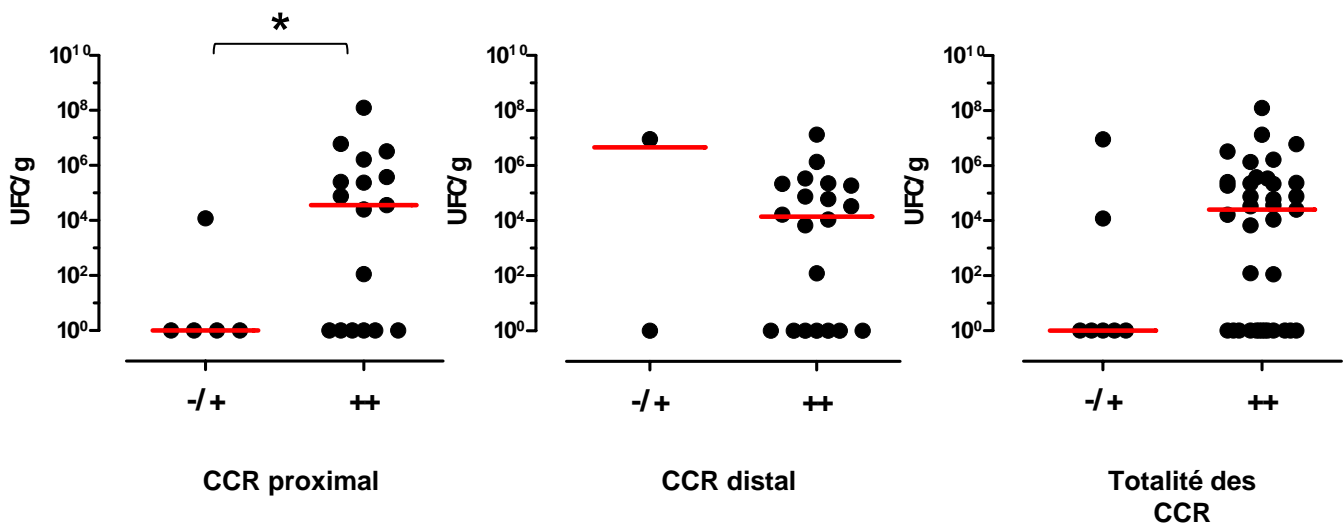


Figure 55 : Colonisation par des *E. coli* de phylogroupe B2 associés aux tumeurs CCR en fonction de l'expression de CEACAM6 et de la localisation tumorale. L'expression tissulaire de CEACAM6 a été déterminée par immunohistochimie en fonction de l'intensité faible (-/+) ou forte (++) du marquage. Les médianes sont représentées en rouge. La colonisation par les *E. coli* de phylogroupe B2 associés à la tumeur était corrélée à l'expression de CEACAM6, mais uniquement pour les localisations proximales.

3.1.2. Niveau d'expression de CEACAM6 et nombre de clones *E. coli*

L'expression de CEACAM6 a été analysée en fonction de la colonisation des prélèvements par un seul, deux ou ≥ 3 clones de *E. coli*. Pour les prélèvements à 2 et ≥ 3 clones de *E. coli*, le niveau de colonisation n'était pas corrélé à l'expression de CEACAM6. En revanche, l'analyse des prélèvements pour lesquels des clones uniques étaient retrouvés a montré une tendance vers un taux de colonisation plus important lorsque le récepteur CEACAM6 était fortement exprimé au niveau des muqueuses ($p=0.08$) (fig.56A) et dans les tumeurs de localisation proximale ($p=0.067$) (fig.56B).

Ce résultat renforce l'hypothèse du rôle de CEACAM6 dans l'adhésion à la muqueuse colique de certaines souches de *E. coli*, et cela surtout au niveau du colon proximal.

3.2. Etude *in vitro* de l'induction de CEACAM6 par les clones uniques de *E. coli*

Il semble exister une association entre l'expression de CEACAM6 et le taux de colonisation par les clones uniques de *E. coli*. Cela suggère la participation de ce récepteur dans l'adhésion de certains *E. coli* à la muqueuse intestinale. De surcroît, nous avons montré dans le paragraphe précédent (II-3) que certains clones uniques avaient les caractéristiques phénotypiques des AIEC. De façon intéressante, il a été montré que les AIEC pouvaient adhérer aux cellules épithéliales intestinales via le récepteur CEACAM6 et les pili de type 1, et avaient la capacité de promouvoir leur propre adhésion en induisant une sécrétion de CEACAM6 (378). Nous avons donc testé *in vitro* la capacité des clones uniques à induire l'expression de CEACAM6 par des cellules épithéliales intestinales.

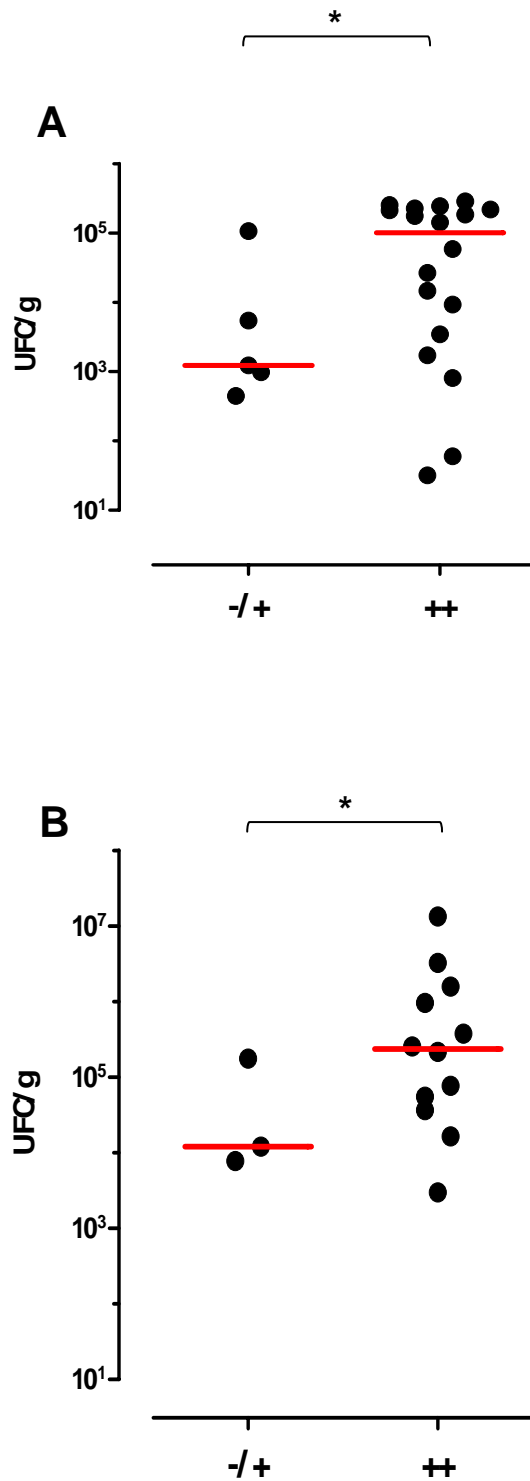


Figure 56 : Colonisation par les clones uniques de *E. coli* en fonction de l'expression tissulaire de CEACAM6. L'expression tissulaire de CEACAM6 a été déterminée par immunohistochimie en fonction de son intensité faible (-/+) ou forte (++). Les médianes sont représentées en rouge.

(A) Clones uniques associés à la muqueuse des patients DIV + CCR. Il existait une corrélation significative entre la colonisation par les clones de *E. coli* et l'expression de CEACAM6 ($p=0.08$).

(B) Clones uniques associés à la tumeur des patients CCR; Il existait une corrélation significative entre la colonisation et l'expression de CEACAM6 ($p=0.067$).

3.2.1. Analyse par ELISA de l'induction de CEACAM6 par les clones uniques

La capacité des clones uniques à induire l'expression de CEACAM6 a été testée sur cellules épithéliales intestinales Caco-2 non différenciées. Parmi les 23 clones uniques de *E. coli*, seuls 18 ont été pris en compte après exclusion de ceux présentant une résistance à la gentamicine (n= 4) ou un niveau d'adhésion trop bas (n=1). Des stimulations ont été réalisées avec l'interféron gamma (INF- γ) car cette cytokine pro-inflammatoire est connue pour induire l'expression de CEACAM6 dans les cellules épithéliales intestinales (378).

Parmi les 18 clones uniques de *E. coli* testés, 13 (72.2%) ont induit une augmentation significative de l'expression de CEACAM6. Cette induction était < 120% dans 3 cas (23%), comprise entre 120 et 150% dans 6 cas (46.2%) et > 150% dans 4 cas (30.1%) (fig.57). Parmi les 5 clones restants qui n'induisaient pas d'expression de CEACAM6, aucun n'avait de propriété d'adhésion *in vitro*. Il n'y avait pas de corrélation entre l'induction de CEACAM6 par les clones uniques et leurs niveaux d'adhésion, d'invasion et de survie en cellules épithéliales ou en macrophages.

3.2.2. Analyse par Western Blot de l'induction de CEACAM6 par le clone CCR20

Nous avons comparé les niveaux d'expression de CEACAM6 après infection des cellules Caco-2 par la souche *E. coli* de clone unique CCR20, la souche AIEC LF82 connue pour induire l'expression de CEACAM6 *in vitro* (378), et la souche non pathogène de laboratoire *E. coli* K-12 C600. Les conditions d'infection ont été reprises de l'expérience précédente (5h à MOI 100 sans adjonction de gentamicine). L'expression de CEACAM6 a été mesurée selon la technique de Western blot et révélée par autoradiographie.

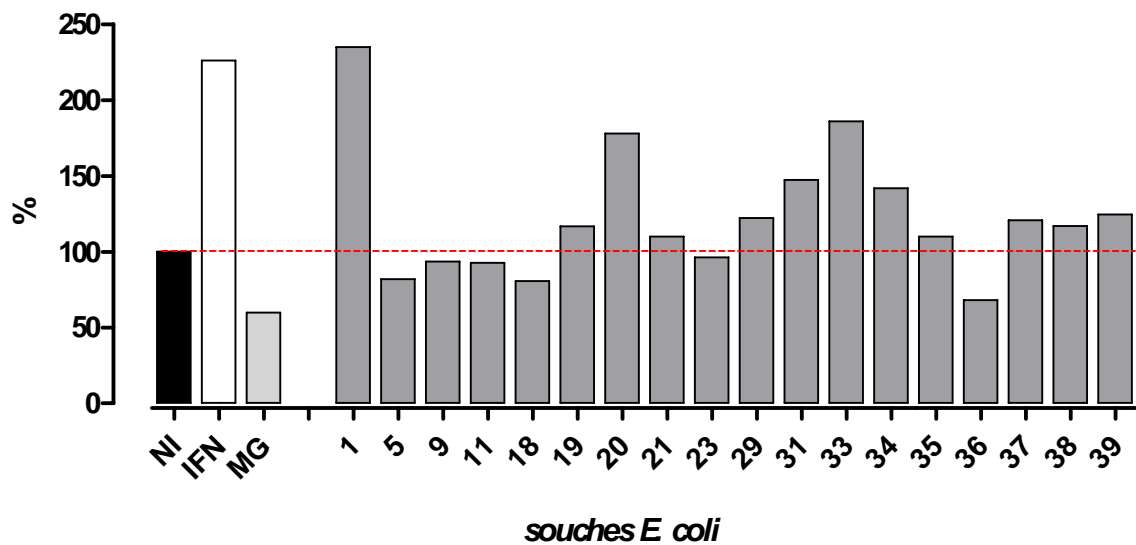


Figure 57 : Analyse par ELISA de l'induction de l'expression de CEACAM6 dans les cellules épithéliales intestinales. Des cultures de cellules Caco-2 ont été infectées à MOI 100 pendant 5 heures à 37°C par 18 souches de clones uniques issues de patients CCR et DIV. La souche K-12 MG1655 était le témoin négatif, l'IFN le témoin positif. L'analyse de l'expression de CEACAM6 a été réalisée avec un kit ELISA et l'anticorps anti-CEACAM6. La ligne horizontale brisée rouge définit le seuil d'induction de l'expression de CEACAM6. L'analyse a montré que 3 souches (CCR1, CCR20 et CCR33) induisaient significativement l'expression de CEACAM6 *in vitro*.

Le niveau d'induction de CEACAM6 était beaucoup plus important lors de l'infection par la souche CCR20 comparé à la souche LF82 et aux témoins K-12 et NI (fig.58). Après quantification par dosimétrie (logiciel ImageJ®), le niveau d'induction de CEACAM6 par la souche CCR20 était 1.86 fois supérieur à celui de la souche LF82 ($p=0.03$), 2.90 fois supérieur à celui de la souche K-12 C600 ($p=0.06$) et 4.86 fois supérieur à la condition NI ($p=0.02$) (fig.58). Ces résultats suggèrent donc que la souche CCR20 est capable d'induire la sécrétion de CEACAM6 par les cellules épithéliales *in vitro*, à un niveau supérieur à celui de la souche AIEC LF82 et peut elle aussi potentialiser sa propre adhésion par induction de l'expression de CEACAM6 a la surface des cellules épithéliales. Il a également été observé une absence de différence du niveau d'induction de CEACAM6 lorsqu'une étape d'incubation à la gentamicine a été ajoutée après l'infection, suggérant un mécanisme d'induction précoce et vraisemblablement induit par les bactéries extracellulaires.

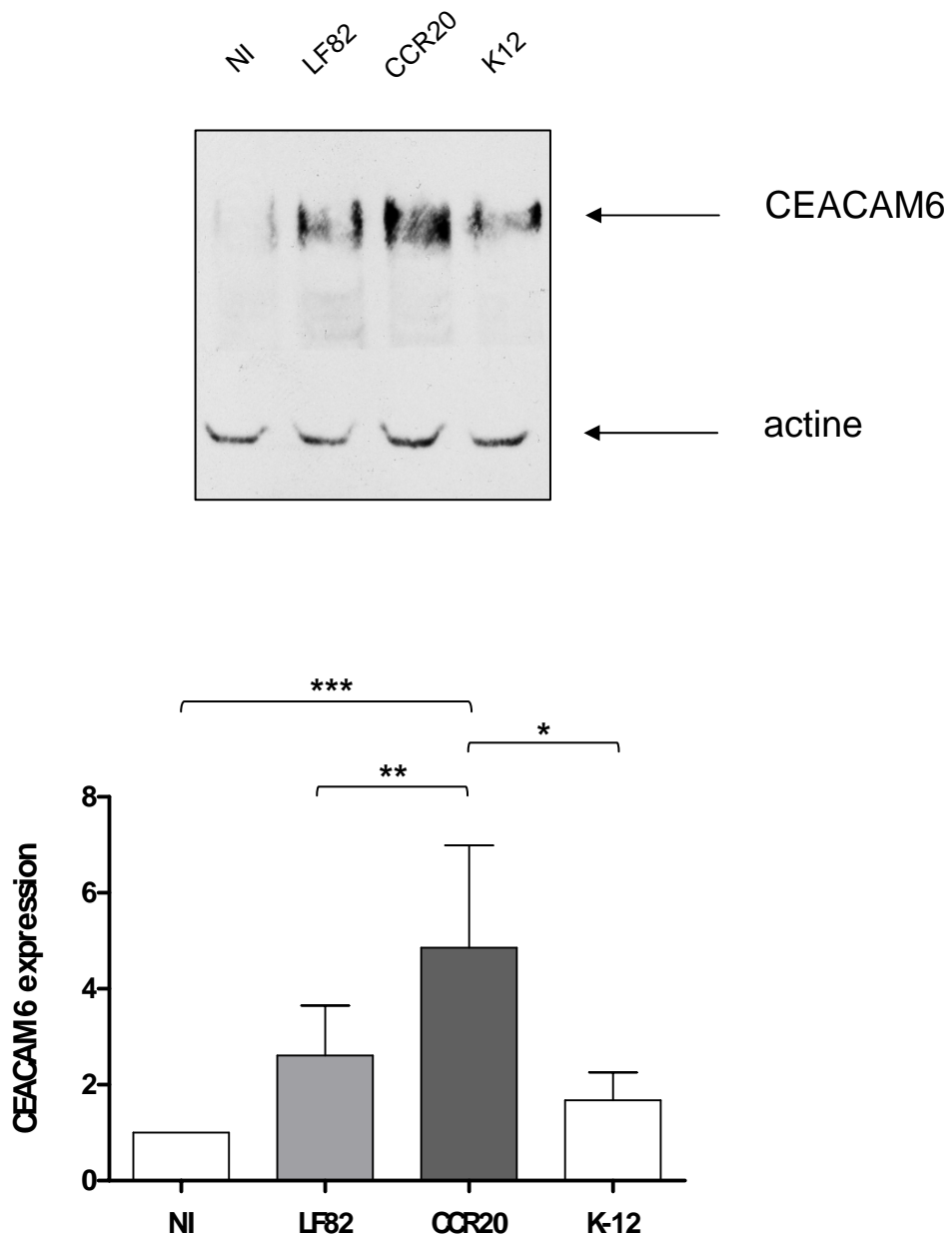


Figure 58 : Analyse par Western-blot de l'induction de l'expression de la protéine CEACAM6 par la souche *E. coli* CCR20.

Des cultures de cellules Caco-2 ont été infectées à MOI 100 pendant 5 heures à 37°C par des cultures bactériennes de K-12 MG1655, LF82 et CCR20. Les protéines ont été extraites après lyse cellulaire, séparées dans un gel SDS-PAGE à 12% et transférées sur membrane de nitrocellulose. L'induction de CEACAM6 a été détecté par un anticorps antiCEACAM6 puis révélé par autoradiographie. Les signaux ont été quantifiés par dosimétrie (logiciel ImageJ®).

L'induction de CEACAM6 par la souche CCR20 était 1.86 x supérieure à celle de la souche LF82, 2.90 x supérieure à celui de la souche K-12 C600 et 4.86 x supérieure à la condition NI (respectivement $p=0.03$, $p=0.06$ et $p=0.02$)

III - Pouvoir de colonisation de la souche *E. coli* CCR20 dans le modèle murin exprimant le récepteur CEACAM6

Nous avons vu au chapitre précédent que la colonisation par les bactéries associées aux muqueuses de patients CCR pourrait être fonction de l'expression de CEACAM6. Il nous a donc paru important d'étudier cette hypothèse *in vivo*. Pour cela, nous avons choisi le modèle murin transgénique CEABAC10 (407). Il s'agit de souris transgéniques qui contiennent une partie des gènes de la famille des molécules d'adhésion CEACAM (CEACAM3, CEACAM5 CEACAM6 et CEACAM7) et dont l'expression spatio-temporelle est remarquablement similaire à celle de l'homme. Nous avons analysé la colonisation intestinale et les effets de la souche CCR20 chez les souris qui expriment CEACAM6, comparativement à la souche *E. coli* non pathogène K-12 MG1655 et la souche *E. coli* pathogène AIEC LF82 impliquée dans la maladie de Crohn.

1. Etude de la colonisation bactérienne dans les souris CEABAC10

La colonisation bactérienne de chaque lot de souris (PBS n=6, MG1655 n=9, LF82 n=10 et CCR20 n=7) a été analysée à la fin de chaque cycle d'infection par dénombrement des bactéries dans les selles. Huit cycles ont été effectués. Pour chaque cycle, les souris étaient gavées 2 fois / semaine pendant 3 semaines. La numération des bactéries était mesurée

à la 4^{ème} semaine, 5 jours après la dernière administration bactérienne, par prélèvement d'échantillons de selles (100–200 mg).

Il n'a pas été observé de colonisation bactérienne par la souche non pathogène MG1655 tout au long des 8 cycles du protocole. En revanche, La moyenne des souris colonisées était de 23.7% pour le lot LF82 et 50.8% pour le lot CCR20, et cette différence était significative ($p=0.0013$).

En considérant chaque cycle individuellement, le niveau de colonisation médian par les bactéries CCR20 était supérieur à celui des bactéries LF82 dans tous les cycles, et significativement dans les cycles 3 et 6 ($p<0.05$) (fig.59).

Ces résultats montrent que la souche CCR20 serait capable de s'implanter plus rapidement dans le tractus digestif de souris CEABAC10 par rapport aux autres souches et même de persister plus longtemps par rapport à une souche AIEC associée à la maladie de Crohn.

2. Analyse des effets de la colonisation sur le côlon des souris

La colonisation persistante de la muqueuse colique par des bactéries associées pathogènes peut être à l'origine de lésions coliques, notamment inflammatoires. La différence phénotypique de la souche cancer CCR20 par rapport à la souche AIEC LF82, ainsi que sa provenance d'une muqueuse intestinale d'un patient atteint de cancer colorectal évoquent la possibilité que cette souche puisse être responsable de lésions non seulement inflammatoires mais également prolifératives. La muqueuse colique de chaque souris a donc été prélevée après sacrifice à la fin du protocole, afin d'analyser les lésions histologiques coliques,

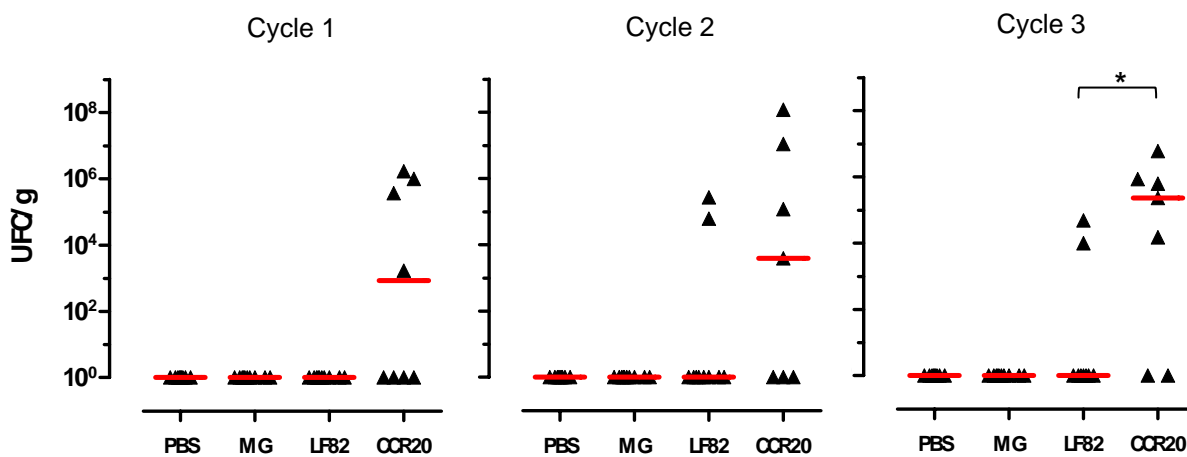


Figure 59 : Colonisation dans les selles des souris de chaque lot au cours des 3 premiers cycles du protocole. La colonisation bactérienne de chaque lot de souris a été analysée à la fin de chaque cycle d'infection par dénombrement des bactéries dans les selles. Pour chaque cycle, les souris étaient gavées 2 fois / semaine pendant 3 semaines. La numération des bactéries était effectuée à la 4^{ème} semaine, 5 jours après la dernière administration bactérienne, par prélèvement d'échantillons de selles (100–200 mg). Il n'a pas été observé de colonisation bactérienne par la souche non pathogène MG1655 tout au long des 8 cycles du protocole. Les médianes sont représentées en rouge. Le niveau de colonisation médian par les bactéries CCR20 était supérieur à celui des bactéries LF82, et stable tout au long des cycles.

* p < 0.05

d'étudier la localisation des bactéries au niveau de la muqueuse, et de rechercher l'expression de marqueurs de prolifération (PCNA).

2.1. Etude histologique

Un score histologique prenant en compte l'inflammation intestinale a été appliqué pour évaluer et comparer la sévérité des lésions entre les lots (tableau 6, pages précédentes) (386). Ce score, mis au point initialement pour un modèle animal de maladie de Crohn, prend en compte l'existence de lésions de l'épithélium intestinal, leur étendue, et la présence d'un infiltrat inflammatoire. Ainsi, l'analyse histologique a montré que le score histologique d'inflammation était significativement plus élevé dans les lots CCR20 par rapport aux témoins non infectés (fig.60) ($p=0.03$). Ce score était également plus élevé dans les lots MG et LF82 par rapport aux témoins, mais de façon plus modérée qu'avec le lot CCR20. Parmi les 4 critères du score histologique, l'existence de lésions épithéliales (érosions, ulcération) était la description la plus fréquente, également présente dans les lots témoins (PBS), et reflétait probablement les effets du DSS. Sur le plan de la prolifération cellulaire, l'analyse histologique n'a pas montré de lésion hyperplasique, adénomateuse ou adénocarcinomeuse, dans aucun des 4 lots de souris.

Ces résultats montrent que la souche *E. coli* CCR20 induit des dommages histologiques plus importants que ceux observés lors de l'infection par la souche LF82 isolée d'un patient atteint de maladie de Crohn.

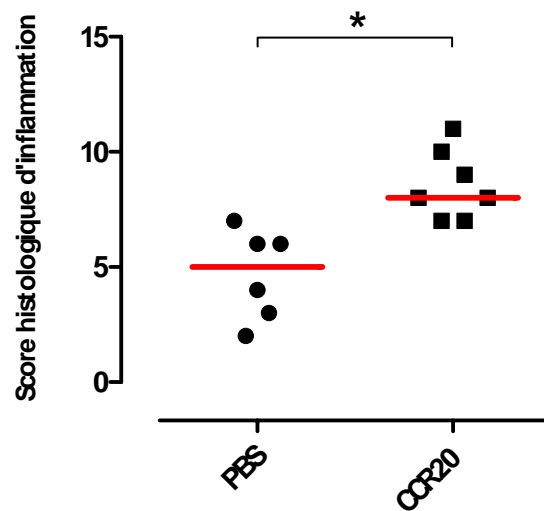


Figure 60 : Score histologique d'inflammation des muqueuses des souris infectées par la souche CCR20 et non infectées (PBS). La médiane des scores est représentée en rouge. Le score histologique d'inflammation était significativement plus élevé dans les lots CCR20 par rapport aux témoins non infectés ($p=0.03$).

2.2. Etude de la localisation bactérienne par FISH

La localisation des bactéries au sein de la muqueuse colique a été analysée par hybridation *in situ*. A l'aide d'une sonde spécifique des Eubactéries Eub388 nous avons analysé la localisation bactérienne sur la portion proximale du colon (cæcum et début du côlon ascendant) et sur la portion distale (reste du côlon sans le rectum) considérant que, comme déjà montré chez l'homme, ces 2 parties anatomiques d'un même organe pouvaient avoir des spécificités différentes.

En muqueuse colique proximale et distale, quel que soit le groupe considéré (PBS, MG1655, LF82 ou CCR20), un nombre peu important de bactéries a été retrouvée à la surface de l'épithélium (<10 bactéries / champ), sans différence significative entre les groupes.

En muqueuse cæcale, des bactéries ont été retrouvées dans les cryptes de la muqueuse des prélèvements dans tous les groupes de souris (>10 bactéries / champ). La répartition de ces bactéries était hétérogène au sein d'un même prélèvement et entre les prélèvements d'un même groupe. En revanche, il était observé davantage de bactéries dans le groupe CCR par rapport aux autres groupes (fig.61). Ces bactéries se localisaient préférentiellement au niveau des cryptes de la muqueuse colique, et certaines étaient internalisées dans la muqueuse.

Ces résultats suggèrent que la souche CCR20 colonise davantage la muqueuse cæcale des souris CEABAC10 que les autres souches de *E. coli*, et qu'elles semblent se localiser de façon plus importante dans les régions cryptiques de la muqueuse.

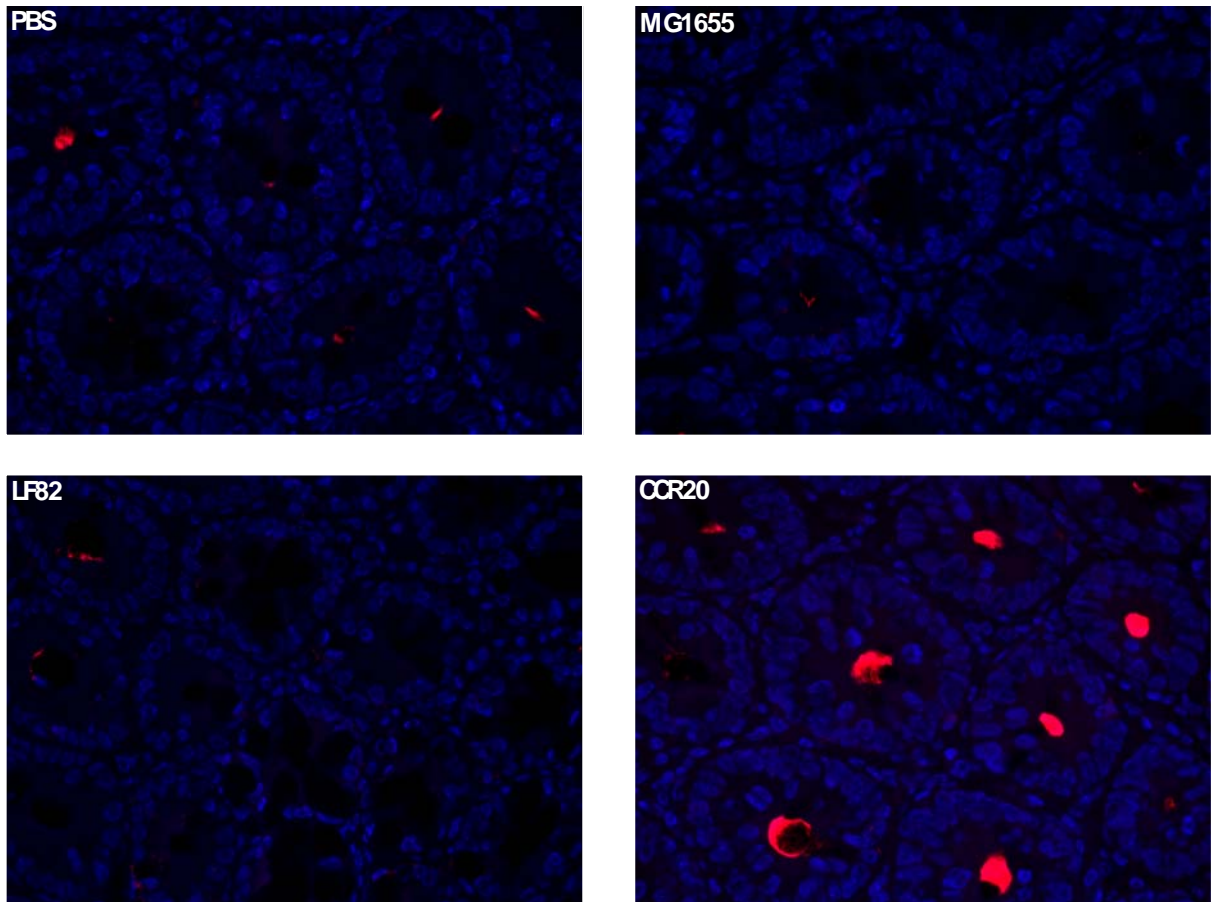


Figure 61 : Recherche de bactéries par méthode FISH dans les cryptes coliques des souris CEABAC10 infectées par K-12 MG1655, LF82 et CCR20, et non infectées. Les bactéries ont été mises en évidence à l'aide d'une sonde spécifique des Eubactéries (Eub338). Des bactéries ont été retrouvées dans les cryptes de la muqueuse des prélèvements dans tous les groupes de souris (>10 bactéries / champ). La répartition de ces bactéries était hétérogène au sein d'un même prélèvement et entre les prélèvements d'un même groupe. En revanche, il était observé davantage de bactéries dans le groupe CCR par rapport aux autres groupes. Ces bactéries se localisaient préférentiellement au niveau des cryptes de la muqueuse.

2.3. Etude de la prolifération cellulaire

L'analyse histologique de la totalité du côlon de chaque souris n'a pas mis en évidence de zones suspectes d'hyperplasie ou de dysplasie pouvant faire évoquer un début de transformation carcinomateuse, quel que soit le groupe considéré. Cependant les mécanismes de carcinogénèse sont parfois infracliniques et nécessitent des méthodes d'évaluation plus sensibles. Nous avons analysé PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) qui est un marqueur de prolifération cellulaire de référence dans le côlon, avec l'avantage d'être exprimé dès les phases initiales de l'hyperplasie de la muqueuse colique (419). Nous avons quantifié l'expression de PCNA dans les cellules des muqueuses coliques des souris CEABAC10 par RT-PCR quantitative.

La quantification des transcrits a montré que l'expression de PCNA dans la muqueuse colique des souris CCR20 était 2,46 fois plus élevée que dans les souris témoins ($p < 0.05$, fig.62) et respectivement 2,03 et 2,88 fois plus élevée que dans les souris MG1655 et LF82 ($p < 0.05$ et $p < 0.01$). Il n'y avait pas de différence significative d'expression de transcrits de PCNA entre les groupes PBS (témoin), MG1655 et LF82.

Ces résultats suggèrent que la souche *E. coli* CCR20 augmente l'index prolifératif des cellules somatiques du colon, contrairement aux autres souches pathogène et non pathogène testées (LF82 et MG1655 respectivement).

3. Conclusion sur le modèle murin

L'utilisation d'un modèle murin préclinique et d'une souche CCR type a permis de mettre en évidence une colonisation importante et durable de cette souche sur la muqueuse colique. Ces bactéries se localisent préférentiellement dans les cryptes, et certaines sont même

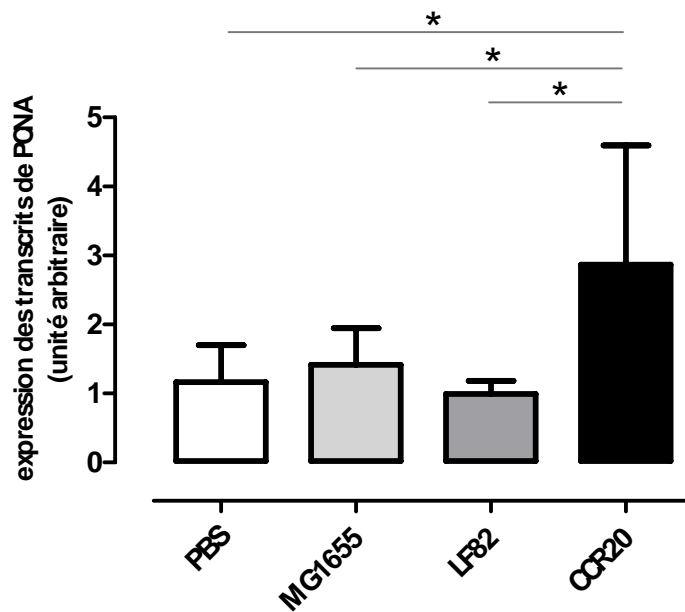


Figure 62 : Index de prolifération de la muqueuse colique des souris CEABAC10 infectées par les souches de *E. coli* MG1655, LF82 et CCR20, et non infectées.

L'index de prolifération a été déterminé en mesurant les transcrits de PCNA par PCR quantitative. L'expression de PCNA dans la muqueuse colique des souris CCR20 était 2,46 fois plus élevée que dans les souris témoins ($p < 0.05$), 2,03 fois plus élevée que les souris MG ($p < 0.05$) et 2,88 fois plus élevée que dans les souris LF82 ($p < 0.01$).

internalisées dans la muqueuse. Elles seraient responsables d'une aggravation des lésions inflammatoires et d'une augmentation de l'index de prolifération des cellules épithéliales coliques, et pourraient être impliquées dans la carcinogenèse.

Discussion

Perspectives

La distribution de certains genres bactériens du microbiote intestinal peut varier en fonction des pathologies intestinales, notamment dans le cancer colorectal sporadique. Par exemple, il a été démontré que la prévalence des genres dominants *Bacteroides* et *Prevotella* dans le microbiote intestinal était supérieure dans les selles de patients CCR par rapport aux témoins, alors que les niveaux de colonisation des bactéries totales n'étaient pas différents (272). Par ailleurs, cette plus forte prévalence chez les patients CCR était associée à une production plus élevée d'IL-17 par les cellules immunitaires de la muqueuse, suggérant une réponse immunitaire exacerbée déjà évoquée dans le CCR (420). L'existence de cette réponse immunitaire dans le CCR évoque la possibilité d'une séquence bactérie – inflammation – cancer. En effet il est reconnu que la réponse inflammatoire joue un rôle promoteur dans la carcinogenèse à tous les stades de développement, de l'initiation jusqu'aux métastases (288). De plus, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont un facteur de risque reconnu de CCR (421) et parmi celles-ci figure la maladie de Crohn, qui est associée à une colonisation anormale de la muqueuse iléo-colique par des bactéries de l'espèce *E. coli* (319). Ces *E. coli* appartiennent au pathovar AIEC, capables d'envahir les macrophages et d'induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (379). Le but de notre travail était d'explorer la séquence *E. coli* – inflammation – cancer dans le CCR sporadique, et d'identifier et de caractériser ces souches *E. coli* associées au CCR. Pour cela, nos études ont été réalisées à partir d'une cohorte de 85 patients opérés soit d'un cancer colorectal (patients CCR), soit d'une diverticulose symptomatique (patients témoins).

Identification et caractérisation des populations de *E. coli* associées à la muqueuse colique de patients CCR.

Notre étude a montré que le niveau de colonisation par des *E. coli associés* aux tissus était significativement plus élevé au niveau des tumeurs CCR qu'au niveau des muqueuses CCR et témoins (DIV). De la même façon, la proportion de patients colonisés par des *E. coli internalisés* ainsi que le niveau de colonisation par ces bactéries étaient plus importants dans les tumeurs CCR que dans les muqueuses CCR et DIV. De plus nous avons montré qu'il n'y avait pas de différence en termes de colonisation globale par les *E. coli* entre les muqueuses des prélèvements CCR et des prélèvements témoins. Cela appuie les données déjà publiées par d'autres équipes (317, 362). Dans notre étude, nous avons isolé et caractérisé les souches de *E.coli* ce qui nous a permis de montrer que :

- pour chaque patient CCR, les mêmes clones de *E. coli* étaient retrouvés dans les prélèvements de muqueuse non tumorale et dans les tumeurs, à la fois pour les populations associées et internalisées. Cela montre une stabilité des populations de *E. coli* associées et internalisées dans la muqueuse normale et tumorale d'un même patient.

- entre patients DIV et CCR, il existait une différence significative du nombre de souches exprimant une ou plusieurs cyclomodulines (CM). En effet on notait une proportion plus faible de *E. coli* producteurs de CM chez les patients DIV (13.3%) par rapport aux patients CCR (42.9%).

Il est difficile de préciser si la différence de colonisation observée entre muqueuse CCR et tumeur CCR a d'abord lieu dans la tumeur puis par extension dans la muqueuse

avoisinante, ou s'il s'agit d'un phénomène global sur toute la muqueuse colique qui conduit au développement tumoral uniquement dans un site précis. Différents arguments sont en faveur d'une différence de colonisation consécutive à la présence d'une tumeur cancéreuse. En effet, l'épithélium colique normal est recouvert d'une couche de mucus qui le protège des agressions physiques, chimiques et bactériennes (422). Dans le CCR, les tumeurs sont majoritairement développées au dépend des entérocytes, diminuant ainsi la proportion de cellules caliciformes. Ce phénomène pourrait avoir une conséquence négative sur la sécrétion de mucus et induire une colonisation excessive par des bactéries du microbiote. Cependant, Martin et collaborateurs n'ont pas retrouvé de différence significative de colonisation par des *E. coli* entre muqueuse CCR et tumeur CCR que soit utilisé ou non du dithiothreitol, agent dissolvant le mucus colique (317).

Lors de croissance tumorale, des phénomènes de dédifférenciation tumorale interviennent à tous les stades de l'évolution du cancer (423). Dans le CCR, il existe un gradient de différenciation entre le bas de la crypte (cellules non différenciées en phase proliférative) et le haut de la crypte (cellules en phase de différenciation). En fonction des étapes de la carcinogenèse, la modification des signaux de différenciation va donner des clones cellulaires plus ou moins différenciés, conduisant à une expression variable des récepteurs membranaires. Parmi ces récepteurs, ceux de la famille des CEACAM jouent un rôle dans le piégeage des bactéries et dans la réponse immune innée, et sont également impliqués dans l'adhésion des bactéries aux cellules (424-426). Leur expression différente en fonction du degré de différenciation peut expliquer la différence de colonisation bactérienne que nous avons observé dans les tumeurs bien différenciées, même si cela n'a été rapporté que dans les localisations proximales (400).

Cependant, il est possible que la différence de colonisation que nous observons entre muqueuse CCR et tumeur CCR soit antérieure au développement de la tumeur. En effet, les mêmes clones de *E. coli* ont été retrouvés dans les prélèvements de muqueuses et de tumeurs chez les patients CCR. Cela montre qu'il n'y a pas une colonisation de la tumeur par de nouvelles souches au cours de la carcinogenèse car toutes les souches présentes dans les tumeurs l'étaient déjà dans les muqueuses. De plus, l'internalisation des mêmes souches de *E. coli* est retrouvée à la fois dans la muqueuse saine et dans la tumeur des patients CCR, ce qui suggère que ces bactéries peuvent envahir les cellules d'un tissu non tumoral. En outre, il y avait significativement plus de souches de *E. coli* produisant des cyclomodulines chez les patients CCR (muqueuse et tumeur) par rapport aux témoins. La présence de ces souches à fort potentiel mutagène internalisées dans les muqueuses non tumorales CCR suggère une colonisation indépendante de la tumeur primitive, d'autant que le stade tumoral n'influence pas la colonisation par ces souches. En effet, même pour des tumeurs en phases initiales de développement (tumeurs T_{is} T₁ ou T₂) la proportion de souches produisant une ou plusieurs cyclomoduline(s) reste la même, en muqueuse comme en tumeur CCR.

Quelle que soit la chronologie de la colonisation bactérienne par rapport à la carcinogenèse colique, il est probable que ces mécanismes soient combinés tout au long du développement tumoral. Il serait intéressant d'étudier la colonisation de la muqueuse non tumorale de patients présentant des lésions précancéreuses, c'est-à-dire des polypes adénomateux non dégénérés supracentrimétriques, ainsi que des polypes non adénomateux, afin d'analyser à quels moments, au cours de la carcinogenèse, interviennent les modifications de colonisation par des souches de *E. coli*, et en particulier de souches à fort potentiel mutagène, et quels types histologiques intéressent ces modifications. Pour des raisons éthiques, il est difficile de se procurer ce type de prélèvement sans compromettre la qualité de

l'analyse histopathologique nécessaire au diagnostic. Une étude prospective sur de nombreuses années devra donc être réalisée pour obtenir suffisamment de prélèvements. Des données préliminaires sur 4 polypes adénomateux montrent qu'ils sont déjà colonisés significativement par des *E. coli* potentiellement pathogènes. De plus il serait intéressant dans les études à venir d'étudier le mucus des prélèvements (tumeur et muqueuse) pour mesurer son épaisseur, sa densité et sa composition, et pour rechercher une corrélation avec la colonisation bactérienne. Ceci pourrait nous permettre de vérifier l'hypothèse de l'existence d'un lien entre défaut de mucus, colonisation et internalisation de souches de *E.coli*.

***E. coli* est il un co-facteur du développement du CCR ?**

Nous avons retrouvé un niveau de colonisation par des *E. coli* associés et internalisés plus important dans les tumeurs CCR que dans les muqueuses CCR et DIV. Cette colonisation excessive est également à corréler aux propriétés particulières de survie en cellules épithéliales intestinales *in vitro* de ces bactéries. Nous avons montré que certains clones de *E. coli* isolés de patients CCR avaient des caractéristiques phénotypiques proches des AIEC associés à la maladie de Crohn, mais d'une façon générale étaient moins adhérents et moins invasifs que les AIEC, et persistaient davantage dans les macrophages et les cellules épithéliales intestinales. De plus, nous avons observé que les souches CCR n'étaient pas cytotoxiques *in vitro* sur les cellules épithéliales intestinales contrairement à la souche AIEC LF82 associée à la maladie de Crohn. Cette différence phénotypique peut être démonstrative de la différence pathogénique entre la maladie de Crohn et le CCR. En effet, la maladie de Crohn est une affection chronique évoluant par poussées inflammatoires aiguës. A contrario, le CCR est une affection dont la genèse est latente, fruit de l'exposition chronique à des mutations, et qui ne devient symptomatique qu'à un stade tardif de son évolution (427). Dans

un cas (maladie de Crohn) les bactéries sont très adhérentes, très invasives et cytotoxiques mais persistent peu dans les cellules épithéliales intestinales car leur cible semble plutôt être les macrophages et la production de cytokines pro-inflammatoires qui en résulte (379). Dans l'autre cas (cancer colorectal) les bactéries sont moins adhérentes et moins invasives, mais sont capables de persister dans les cellules épithéliales sans provoquer de mort cellulaire, ce qui peut permettre à la cellule de cumuler les dommages induits par l'infection bactérienne. De plus, il est à noter que malgré des index d'adhésion et d'invasion *in vitro* inférieurs à la souche AIEC LF82, nous avons pu montrer que la souche cancer CCR20 était retrouvée dans les fèces de souris infectées de façon plus prolongée que la souche LF82, démontrant une capacité de colonisation intestinale plus persistante. Dans nos expériences le marquage des bactéries par FISH a montré que la souche *E. coli* CCR20 avait tendance à coloniser davantage les cryptes par rapport aux témoins et notamment LF82. Cela suggère un mécanisme de colonisation par la souche CCR20 stable et persistant dans le temps, qui peut générer une réponse inflammatoire chronique potentiellement carcinogène. Il est connu que certains pathogènes du microbiote peuvent moduler la réponse immunitaire (316, 428). Dans le CCR, la concentration en cytokines pro-inflammatoires et en prostaglandines est élevée et ces molécules jouent un rôle important dans la régulation de la migration cellulaire, de la prolifération, de l'angiogenèse et de l'apoptose (429). L'adhésion et l'invasion bactériennes peuvent perpétuer cette réponse inflammatoire chronique, comme par exemple *Streptococcus bovis* dont les antigènes de paroi peuvent promouvoir la carcinogenèse *in vitro* et *in vivo* via la surexpression de la cyclo-oxygénase 2 et de l'interleukine 8 (430, 431). De plus, l'inflammation chronique engendrée par le contact de ces bactéries induit un stress oxydant responsable de lésions cellulaires qui participent à la pathogénie des colites inflammatoires et de la carcinogenèse colique (432). L'initiation tumorale dans les tissus inflammatoires est médiée par différents radicaux libres (RONS pour « Reactive Oxygen Nitrogen Species »),

NOS pour « Nitrite Oxyde Synthase » et ROS pour « Reactive Oxygen Species ») qui sont relargués par les cellules du système immunitaire. Il est à noter que les niveaux d'expression de ces molécules sont augmentés dans les MICI (433, 434). Ainsi, la colonisation très importante des tumeurs de notre cohorte par des souches de *E. coli* pourrait contribuer à la progression tumorale par l'intermédiaire de cette réponse inflammatoire dirigée contre les bactéries. Nos expériences *in vivo* sur les souris transgéniques CEABAC10 montrent que l'infection chronique par la souche CCR20 accentue la réaction inflammatoire provoquée par l'administration de DSS, de façon plus intense qu'avec la souche AIEC LF82, avec de surcroît une augmentation de l'index de prolifération uniquement observé après infection par la souche CCR20.

Afin d'identifier le rôle des souches *E. coli* CCR comme cofacteurs de la carcinogenèse colique via ces mécanismes d'inflammation chronique, des études au laboratoire ont débuté sur la voie pro-inflammatoire Cox2 et font l'objet d'un nouveau travail de thèse. Cette voie de signalisation est associée au développement du cancer gastrique via l'infection chronique par *Helicobacter pylori* (435). Cox2 catalyse la synthèse de la prostaglandine PGE2, protéine impliquée dans les mécanismes de prolifération cellulaire, d'apoptose, d'invasion et d'angiogenèse. PGE2 induit l'expression de nombreux facteurs pro-tumoraux, dont le VEGF, facteur angiogénique impliqué dans la néovascularisation tumorale (436). Il pourrait être intéressant d'étudier les capacités des souches de *E. coli* CCR à induire l'expression de cox-2 sur cellules épithéliales intestinales et sur macrophages, et d'analyser la production de la PGE2 et l'expression de VEGF afin d'explorer cette voie de signalisation.

De même le rôle du stress oxydant induit par l'infection bactérienne et l'inflammation chronique devrait être étudié dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Une telle étude pourrait être notamment réalisée à l'aide d'un modèle de souris possédant une prédisposition au CCR, à savoir les souris APC^{min} mutées pour le gène APC (APC^{-/-}) et qui développent spontanément

de nombreux polypes dans l'intestin grêle et quelques polypes dans le côlon (phénotype de la polypose adénomateuse familiale). Il pourrait être envisagé d'infecter ces souris par administration orale de souches de *E. coli* associées au CCR, afin d'évaluer l'effet de l'infection bactérienne sur l'induction d'un stress oxydant, d'inflammation chronique et sur le développement des polypes (nombre, taille, histologie). Un suivi des animaux pourrait être réalisé par imagerie TEP/ [¹⁸F]FDG en utilisant une plateforme imagerie dédiée petit animal.

La souche cancer CCR20 augmente l'index de prolifération des cellules de la muqueuse de souris infectées par cette souche. Il est intéressant de noter que cette souche CCR possède l'îlot *pks* et code pour une cyclomoduline (CM), la colibactine. Sur l'ensemble de la cohorte, 64.1% des patients CCR possédaient une ou plusieurs souches de *E. coli* codant pour une CM, contre seulement 13.3% chez les patients témoins ($p < 0.0001$). La CM la plus représentée était la colibactine, codée par l'îlot *pks*. Comme l'ensemble des CM, l'îlot *pks* était davantage retrouvé dans les souches de *E. coli* issues de patients CCR que dans les souches issues de patients témoins (53.3% vs 19.3%, $p < 0.01$). Des souches de *E. coli* hébergeant les gènes *cnf* et *cdt* étaient également significativement plus représentées chez les patients cancers. Toutes ces CM interviennent sur le cycle cellulaire et pourraient être impliquées dans la carcinogenèse colorectale. En effet, l'infection chronique par des bactéries qui perturbent les processus de signalisation du cycle cellulaire est hautement suspecte de contribuer à la dégénérescence néoplasique en facilitant un état prolifératif anti-apoptotique ou une activité génotoxique (437). Cette activité génotoxique peut être impliquée dans l'initiation ou la promotion tumorale. Par exemple, CNF perturbe le cycle cellulaire mais a également la capacité d'inhiber la différenciation cellulaire (438). Ces propriétés sont dues à l'activation de RhoGTPases, protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette, la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire (439), mais également dans

différentes étapes de la progression du cancer (440, 441). Il est également démontré que CNF exerce un effet anti-apoptotique via le gène *Bcl-2* (442), gène codant une oncoprotéine inhibitrice de l'apoptose dont la surexpression contribue à la transformation néoplasique (443, 444), et dont l'expression est augmentée dans la plupart des CCR à un stade précoce de la carcinogenèse (445, 446). En ce concerne CDT, autre CM retrouvée dans certaines souches associées au CCR, elle peut faciliter l'acquisition d'évènements mutationnels réplicatifs qui participent à la promotion de la carcinogenèse, surtout si les fonctions de « caretakers » (selon le modèle de Kinzler et Vogelstein, (447)) sont altérées ; dans les cellules cancéreuses, l'acquisition de ces évènements mutationnels conduit à l'activation d'oncogènes et/ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (410). De même, la colibactine, produite par les gènes de l'îlot *pks*, induit des lésions ADN double brins dans les cellules eukaryotes (335). De telles lésions de l'ADN activent les voies de signalisations cellulaires de l'hôte qui conduisent à l'arrêt du cycle cellulaire, la mégalocytose et éventuellement la mort cellulaire. Nos résultats corroborent ces hypothèses puisque l'infection chronique de souris par une souche de *E. coli* CCR porteuse de l'îlot *pks* (CCR20) induit une augmentation de l'index prolifératif des cellules de la muqueuse colique, associée à une colonisation persistante de cette bactérie au niveau de la muqueuse intestinale par rapport aux témoins. Parallèlement, le test des comètes a montré que certaines souches de *E. coli* isolées de patients CCR pouvaient induire des effets génotoxiques sans que soient mises en évidence de CM connues. Il existe donc probablement d'autres mécanismes bactériens susceptibles de provoquer des lésions de l'ADN, et une des perspectives à ce travail est également d'étudier cette ou ces nouvelle(s) cyclomoduline(s). Afin de les identifier, il sera nécessaire de séquencer les souches de *E. coli* induisant des cassures d'ADN mais ne produisant pas de CM connue et de réaliser des mutants isogéniques invalidés pour toutes fonctions génotoxiques afin de vérifier dans des

modèles cellulaires et animaux le comportement des souches sauvages comparativement à ces mutants.

Nous n'avons retrouvé aucune corrélation entre la présence d'un effet génotoxique (CM+ ou CM-) et les propriétés d'adhésion et d'invasion, ce qui suggère que les bactéries pourrait exercer cet effet indépendamment d'un contact direct et/ou prolongé avec la muqueuse colique. Excepté Cif dont la translocation dans le cytoplasme des cellules eucaryotes se fait par l'intermédiaire d'un système de sécrétion de type III et nécessite donc la présence de la bactérie (EPEC ou EHEC) au contact de la cellule (329), les autres CM analysées dans cette étude sont des toxines bactériennes produites et excrétées dans le milieu extérieur, et pénètrent dans les cellules via des récepteurs spécifiques ou par des mécanismes indépendants de la bactérie productrice de CM (410, 411). Elles ne nécessitent donc pas un phénotype adhérent ou invasif particulier. Il est intéressant de noter que la proportion de souches CM+ et le niveau de colonisation en *E. coli* ont été retrouvés augmentés chez les patients CCR par rapport aux témoins. Cette double caractéristique montre le sur-risque que représente la présence de souches CM+ : non seulement ces souches sont potentiellement génotoxiques mais elles sont également en plus grand nombre, ce qui a pour effet de décupler cette activité génotoxique au niveau de la muqueuse colique, ce qui pourrait à long terme avoir une influence majeure dans le processus de carcinogenèse. De plus, la présence de souches CM+ dans les muqueuses CCR comme dans les tumeurs n'est pas dépendante du stade T, ce qui montre que l'effet des CM pourrait être présent dès les premiers stades de la carcinogenèse colique.

La population de *E. coli* adhérents est-elle un facteur pronostique du CCR ?

Le pronostic du CCR dépend en grande partie de la classification histopathologique TNM, dont le stade est déterminé après résection chirurgicale de la tumeur et analyse histopathologique de l'extension locale et ganglionnaire. Dans notre étude, nous décrivons pour la première fois que la population de *E. coli* associées est plus importante dans la muqueuse non tumorale lorsque les tumeurs sont de mauvais pronostic (statuts T_{3/4}, N₁ et M₁). Par contre, la colonisation bactérienne au sein même des tumeurs ne varie pas en fonction du statut TNM. On peut évoquer un changement des conditions locales induites par la tumeur au fur et à mesure de sa progression vers des stades plus avancés, mais aucune étude n'a rapporté ce phénomène. La colonisation bactérienne dans la muqueuse pourrait définir l'agressivité tumorale. Ainsi, le niveau de colonisation par les *E. coli* associés à la muqueuse saine pourrait s'avérer un facteur aggravant de la progression tumorale et pourrait donc constituer un marqueur pronostique préopératoire. Il serait intéressant de réaliser une étude sur des patients atteints de lésions coliques cancéreuses et précancéreuses (adénomes). Des prélèvements de muqueuse colique non tumorale par coloscopie pourraient être réalisés afin d'évaluer la colonisation en *E. coli* associés et de la rapporter à l'histologie, au stade tumoral et à la survie à long terme des patients. Un seuil de niveau de colonisation pourrait être déterminé, au dessus duquel la colonisation représenterait un facteur de risque ou un facteur pronostique péjoratif. En cas de matériel précieux et/ou de petite taille (polypes adénomateux) cette technique aurait l'avantage de ne pas risquer de compromettre l'analyse histopathologique définitive et le diagnostic puisque seule la muqueuse saine serait utilisée. Des populations à

risque seraient ainsi définies, permettant d'adapter la surveillance endoscopique en cas de tumeurs bénignes, ou les traitements post-opératoires en cas de tumeur maligne. Ce facteur pronostique pourrait être indépendant de facteurs déjà décrits comme la localisation de la tumeur.

Il est à noter que nous n'avons pas retrouvé de différence de colonisation dans la muqueuse non tumorale en fonction de la localisation de la tumeur primitive (proximale ou distale), bien que le pronostic soit différent pour ces deux localisations (208). Il est pourtant généralement admis que la flore cultivable est nettement plus importante dans la muqueuse normale du colon distal que dans le colon proximal (3). A notre connaissance, l'évaluation de la colonisation bactérienne par *E. coli* au niveau de la muqueuse et de la tumeur selon la localisation tumorale n'a jamais été rapportée. Deux hypothèses peuvent être formulées:

- La distribution des *E. coli* dans le côlon proximal et le côlon distal n'évolue pas de la même façon que le reste du microbiote, car ils représentent une fraction infime de ce dernier (1/1000^{ème} environ) (3) ;

- Les modifications de flore des bactéries associées à la muqueuse dans ce contexte de carcinogénèse affecteraient davantage les populations du colon proximal. Ceci est corroboré par le fait que le nombre médian de bactéries associées à la muqueuse chez les patients CCR distal et chez les patients DIV était similaire, mais qu'il n'est pas possible de faire la même comparaison avec les patients de CCR proximal étant donné l'absence de vrai témoin négatif pour cette localisation dans notre étude, puisque nos patients DIV s'apparentent plus à des témoins de côlon distal. Afin de répondre à cette question et dans le but de comparer la différence physiologique de colonisation par des *E. coli* associés et internalisés entre ces deux localisations coliques, une étude basée sur des prélèvements endoscopiques de colon proximal et distal chez des patients sains volontaires et informés est en cours. Des résultats

préliminaires montrent qu'il n'y aurait pas de différence significative de colonisation par des *E. coli* associés ou internalisés entre les prélèvements proximal et distal d'un même patient d'une part, et entre tous les patients d'autre part. Nous comptons étendre cette étude aux patients atteints de CCR afin de comparer chez un même patient les populations de *E. coli* associées à la muqueuse non tumorale située à proximité de la lésion primitive (prélèvement dit « homolatéral ») et située sur l'autre segment colique (prélèvement dit « controlatéral »). Ceci dans le but de clarifier également l'influence éventuelle que pourrait avoir une tumeur sur son environnement et les limites de cette influence.

CEACAM6 est-il impliqué dans la colonisation par des *E. coli* associés au CCR ?

Notre étude a montré que l'expression de CEACAM6 dans les tumeurs était corrélée au niveau de colonisation par les *E. coli* associés, notamment pour les CCR de localisation proximale. CEACAM6 est un marqueur tissulaire spécifique du CCR et surtout exprimé dans les tumeurs peu différenciées (448). C'est une molécule d'adhésion cellulaire normalement surexprimée dans la muqueuse colique lorsque les cellules intestinales migrent vers le haut de la crypte au fur et à mesure de leur différenciation (142, 448). La dérégulation de CEACAM6 lors des phases de prolifération cellulaire qui précèdent la différenciation bloquent cette dernière, empêche la cohésion et la polarisation cellulaires, et inhibe l'apoptose (384, 393, 394, 400, 431, 449, 450). Des xénogreffes de tumeurs coliques exprimant CEACAM6 montrent une croissance plus rapide des tumeurs par rapport aux contrôles (400). Pourtant,

bien qu'impliqué dans les mécanismes de différenciation cellulaire comme le montre sa plus forte expression dans les tumeurs peu différenciées, CEACAM6 est un facteur pronostique indépendant non lié au degré de différenciation (146). À côté de son rôle dans la balance différenciation / prolifération cellulaire, CEACAM6 joue un rôle dans l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales intestinales. Dans la maladie de Crohn, il a pu être établi que l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales de souches de *E. coli* appartenant au pathovar AIEC induisait une surexpression de CEACAM6 à la surface des cellules, générant une boucle d'auto-amplification de l'adhésion (378). Dans notre étude, chez certains patients présentant une forte expression de CEACAM6, nous avons mis en évidence une colonisation importante de la muqueuse colique par une population clonale de *E. coli*. *In vitro*, ces mêmes souches étaient capables d'induire l'expression de CEACAM6, à un taux identique voire supérieur à celui de la souche AIEC LF82. Ces données suggèrent que, comme dans la maladie de Crohn, certaines souches de *E. coli* associées au cancer peuvent induire l'expression de CEACAM6 au niveau des cellules épithéliales intestinales et favoriser leur propre adhésion à la muqueuse colique. De telles similitudes de colonisation entre maladie de Crohn et CCR ont déjà été évoquées (317, 362, 375). Il est intéressant de noter que les patients atteints de rectocolite hémorragique ne présentent pas de colonisation excessive par des *E. coli* (317). L'association *E. coli* – CEACAM6 est donc un mécanisme qui n'est pas le fait de la seule inflammation colique. Dans le CCR, aucune étude n'a corrélé l'expression de CEACAM6 avec l'excès de colonisation par les souches *E. coli* associées aux tumeurs. Nos expériences *in vivo* suggèrent cependant cette hypothèse : la souche CCR20 colonise davantage les souris transgéniques exprimant le récepteur CEACAM6 que des souris sauvages, et potentialisent une inflammation et des dommages à la muqueuse à un niveau supérieur à celui de la souche AIEC LF82. Il serait intéressant d'initier des expériences *in vitro* comparant le niveau d'adhésion de la souche CCR20 en fonction de l'expression du

récepteur CEACAM6. Une corrélation entre adhésion et expression de CEACAM6 pourrait être établie en utilisant diverses lignées de cellules épithéliales intestinales n'exprimant pas CEACAM6 au même niveau (134), en modulant l'expression de CEACAM6 par ARN interférence ou en bloquant l'interaction bactéries – CEACAM6 à l'aide d'anticorps anti-CEACAM6.

Les molécules de la famille des CEACAM jouent un rôle important dans l'immunité innée au niveau de la muqueuse colique. En effet, CEACAM6 (avec CEACAM1) est une des seules molécules de cette famille qui soit exprimée dans les cellules caliciformes à mucus et relarguée dans la couche de mucus à la surface de l'épithélium (451). Elle jouerait un rôle dans la défense de l'organisme contre les agents microbiens en piégeant les bactéries susceptibles de se lier à ce récepteur pour les empêcher de pénétrer dans les cellules épithéliales intestinales (424), et participerait au mécanisme d'immunité innée associé au processus de phagocytose des polynucléaires neutrophiles (452). Il a été montré que des cytokines pro-inflammatoires (INF- γ , TNF α) augmentaient l'expression de CEACAM6 dans les cellules épithéliales coliques *in vitro* (378, 453), cytokines elles-mêmes sécrétées en grande quantité par les macrophages infectés par des AIEC, dont l'adhésion est dépendante de CEACAM6 (378, 379). Il se crée ainsi une boucle d'amplification dont le point de départ est la présence de souches de *E. coli* et la résultante majeure la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (379). De façon intéressante, certaines de ces cytokines – TNF α en particulier – sont impliquées dans l'inflammation et la carcinogénèse via notamment les voies de signalisation NF- κ B et MAPK (454). Dans notre étude, plus des $\frac{2}{3}$ des *E. coli* associés au cancer avaient des propriétés de survie et de multiplication en macrophages *in vitro*, dont le taux était très souvent supérieur à celui de la souche AIEC de référence LF82. Ce résultat suggère la possibilité d'une activation permanente des voies de signalisation carcinogènes par

certaines souches *E. coli*, qui pourraient favoriser le développement et/ou la croissance des tumeurs dans le CCR. Il serait intéressant d'explorer l'expression de ces cytokines au niveau de la muqueuse colique et de la corrélérer à l'expression de CEACAM6 et à la colonisation bactérienne. Il serait également intéressant d'explorer certaines voies de signalisation comme par exemple Cox-2, qui a été montrée comme impliquée dans le développement du cancer gastrique lié à une infection chronique par *Helicobacter pylori* (435). En effet, Cox-2 catalyse la synthèse de la prostaglandine PGE2, protéine impliquée dans les mécanismes de prolifération cellulaire, d'apoptose, d'invasion et d'angiogenèse. PGE2 induit l'expression de nombreux facteurs pro-tumoraux, dont le VEGF, facteur angiogénique impliqué dans la néovascularisation tumorale (436). Il serait ainsi intéressant d'étudier les capacités des souches de *E. coli* CCR à induire l'expression de Cox-2 dans les cellules épithéliales intestinales et les macrophages, et d'analyser la production de la PGE2 et l'expression de VEGF afin d'explorer le rôle de ces *E. coli* associés au CCR dans ces processus.

Finalement, les *E. coli* associés au CCR sont capables d'induire l'expression de CEACAM6 dans la muqueuse non tumorale, de façon similaire à certaines cytokines pro-inflammatoires. Dans notre étude, l'expression de CEACAM6 dans la muqueuse non tumorale des patients CCR était fonction du niveau de colonisation par les *E. coli*, mais uniquement dans les CCR de localisation proximale. De nombreuses autres propriétés ont montré des différences selon la localisation de la tumeur primitive : nombre de clones uniques, proportion de clones exprimant des cyclomodulines, expression de CEACAM6 par les souches B2, colonisation plus importante sur le modèle murin dans la partie proximale du côlon. Des travaux précédents ont évoqué la différence entre colon proximal et côlon distal, tant au niveau physiologique que moléculaire et carcinologique (5-8). Il est intéressant de noter que, dans notre étude, les propriétés relatives à l'expression de CEACAM6 étaient

retrouvées davantage au niveau du côlon proximal que du côlon distal. Cela suggère un mécanisme de carcinogenèse « crohn ressemblant » et appuie l'hypothèse d'une séquence bactéries – inflammation – cancer, qui ressort surtout dans le côlon proximal. En effet, la maladie de Crohn (MC) est une affection qui touche principalement l'iléon distal et le côlon proximal. Les souches AIEC peuvent adhérer et envahir la muqueuse intestinale des patients atteints de MC et provoquer la sécrétion de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages intramuqueux (379). Ce mécanisme d'adhésion est dépendant du récepteur CEACAM6 via les pili de type 1 (378, 385). Les AIEC peuvent induire l'expression de ce récepteur, favorisant leur propre colonisation et constituant ainsi une boucle d'amplification (378). De façon identique, notre étude montre que la colonisation de la muqueuse CCR par les souches de *E. coli* adhérentes augmente avec l'expression de CEACAM6, et que ces souches sont capables d'induire à leur tour l'expression de ce récepteur. Afin de déterminer la relation entre expression de CEACAM6, colonisation bactérienne et localisation proximale de CCR, il serait également intéressant d'étudier les conditions qui se rapportent plus spécifiquement au colon proximal, et notamment la place des acides biliaires car leur rôle dans la carcinogenèse colique est fortement suggéré (455).

L'ensemble de ces données permet d'affiner les mécanismes de colonisation de la muqueuse colique des patients atteints de cancer colorectal. Nous avons mis en évidence, en ce qui concerne l'hôte le rôle important du récepteur CEACAM6, et en ce qui concerne un agent infectieux potentiellement impliqué dans le cancer colorectal des souches de *E. coli* à fort pouvoir mutagène car productrices de cyclomodulines. Ces souches sont capables d'induire une synthèse accrue de CEACAM6, des perturbations du cycle cellulaire et/ou des

cassures d'ADN comme montré in vitro sur modèles cellulaires, mais également, comme montré en modèle murin au niveau de la muqueuse colique, de coloniser, d'induire une augmentation de l'index prolifératif et de potentialiser une inflammation.

Références

1. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* 2009;71:241-60.
2. Fevr T, Robine S, Louvard D, Huelsken J. Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol Cell Biol.* 2007 Nov;27(21):7551-9.
3. Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology.* 1984 Jan;86(1):174-93.
4. Ganz T. Paneth cells--guardians of the gut cell hatchery. *Nat Immunol.* 2000 Aug;1(2):99-100.
5. Bernier J, editor. *Physiologie du colon* 2nd ed. Paris: Flammarion médecine-sciences; 1983.
6. Bleday R, Braidt J, Ruoff K, Shellito PC, Ackroyd FW. Quantitative cultures of the mucosal-associated bacteria in the mechanically prepared colon and rectum. *Dis Colon Rectum.* 1993 Sep;36(9):844-9.
7. Gervaz P, Cerottini JP, Bouzourene H, Hahnloser D, Doan CL, Benhattar J, et al. Comparison of microsatellite instability and chromosomal instability in predicting survival of patients with T3N0 colorectal cancer. *Surgery.* 2002 Feb;131(2):190-7.
8. Gervaz P, Bucher P, Morel P. Two colons-two cancers: paradigm shift and clinical implications. *J Surg Oncol.* 2004 Dec 15;88(4):261-6.
9. Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P, et al. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique.* 2008 Jun;56(3):159-75.
10. Faivre JG, O; Chatrenet, Ph. . *Epidémiologie du cancer colorectal.* *Acta Endoscopica.* 1992 (suppl.);22(1):75-80.

11. Bouvier AM. Epidémiologie descriptive du cancer colorectal en France. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire. 2009;2-3:14-6.
12. Grellet JD, E, editor. Prévention et dépistage du cancer recto-colique dans les groupes à risques 1993.
13. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. Orphanet J Rare Dis. 2009;4:22.
14. Papaemmanuil E, Carvajal-Carmona L, Sellick GS, Kemp Z, Webb E, Spain S, et al. Deciphering the genetics of hereditary non-syndromic colorectal cancer. Eur J Hum Genet. 2008 Dec;16(12):1477-86.
15. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 1990 Jun 1;61(5):759-67.
16. Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, O'Riordan MA, Pretlow TG, Jucisek JA, et al. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. Cancer Res. 1991 Mar 1;51(5):1564-7.
17. Emura A, Kudo S, Mihara M, Matsuo Y, Sato S, Ichigi Y. Testicular malignant lymphoma; imaging and diagnosis. Radiat Med. 1996 May-Jun;14(3):121-6.
18. Roncucci L, Medline A, Bruce WR. Classification of aberrant crypt foci and microadenomas in human colon. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1991 Nov-Dec;1(1):57-60.
19. Paspatis GA, Papanikolaou N, Zois E, Michalodimitrakis E. Prevalence of polyps and diverticulosis of the large bowel in the Cretan population. An autopsy study. Int J Colorectal Dis. 2001 Aug;16(4):257-61.
20. Park DH, Kim HS, Kim WH, Kim TI, Kim YH, Park DI, et al. Clinicopathologic characteristics and malignant potential of colorectal flat neoplasia compared with that of polypoid neoplasia. Dis Colon Rectum. 2008 Jan;51(1):43-9.

21. Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 1990 Jun;14(6):524-37.
22. Sawyer EJ, Cerar A, Hanby AM, Gorman P, Arends M, Talbot IC, et al. Molecular characteristics of serrated adenomas of the colorectum. *Gut*. 2002 Aug;51(2):200-6.
23. Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE, Libbe SD, Ilstrup DM, MacCarty RL. Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology*. 1987 Nov;93(5):1009-13.
24. Fenoglio CM, Kaye GI, Lane N. Distribution of human colonic lymphatics in normal, hyperplastic, and adenomatous tissue. Its relationship to metastasis from small carcinomas in pedunculated adenomas, with two case reports. *Gastroenterology*. 1973 Jan;64(1):51-66.
25. Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hofmann A. Hepatic metastases from colorectal carcinoma: impact of surgical resection on the natural history. *Br J Surg*. 1990 Nov;77(11):1241-6.
26. Stoffel EM, Chittenden A. Genetic testing for hereditary colorectal cancer: challenges in identifying, counseling, and managing high-risk patients. *Gastroenterology*. 2010 Nov;139(5):1436-41.
27. Kinzler K, Vogelstein B, editors. *Colorectal tumors*. New York: McGraw Hill 2002.
28. Nieuwenhuis MH, Mathus-Vliegen LM, Slors FJ, Griffioen G, Nagengast FM, Schouten WR, et al. Genotype-phenotype correlations as a guide in the management of familial adenomatous polyposis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007 Mar;5(3):374-8.
29. Knudsen AL, Bisgaard ML, Bulow S. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer*. 2003;2(1):43-55.
30. Fearnhead NS, Wilding JL, Bodmer WF. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br Med Bull*. 2002;64:27-43.
31. Beroud C, Soussi T. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*. 1996 Jan 1;24(1):121-4.

32. Olschwang S, Paraf F, Laurent-Puig P, Wang Q, Lecuru F, Hamelin R, et al. [Recent advances for the identification and screening of Lynch syndrome]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2007 Feb;31(2):136-40.
33. Laurent-Puig P, Kirzin S. Comment la découverte d'une prédisposition familiale modifie la prise en charge des malades atteints par un cancer colorectal. *e-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie*, 2004. 2004;3(2):12-4.
34. Desai DC, Murday V, Phillips RK, Neale KF, Milla P, Hodgson SV. A survey of phenotypic features in juvenile polyposis. *J Med Genet*. 1998 Jun;35(6):476-81.
35. Jass JR, Williams CB, Bussey HJ, Morson BC. Juvenile polyposis--a precancerous condition. *Histopathology*. 1988 Dec;13(6):619-30.
36. Olschwang S. [Digestive polyposes: genetic aspects]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2001 Apr;25(4 Suppl):B26-30.
37. Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Jarvinen HJ, Sistonen P, et al. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science*. 1998 May 15;280(5366):1086-8.
38. Teniere P, Songne K, Frebourg T, Moguelet P, Foulatier O, Michot F, et al. [Juvenile polyposis coli. The usefulness of a genetic study and the role of surgical treatment]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2002 Nov;26(11):1047-50.
39. Howe JR, Mitros FA, Summers RW. The risk of gastrointestinal carcinoma in familial juvenile polyposis. *Ann Surg Oncol*. 1998 Dec;5(8):751-6.
40. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001 Apr;48(4):526-35.
41. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*. 2001 Feb 15;91(4):854-62.

42. Friedman S, Rubin PH, Bodian C, Goldstein E, Harpaz N, Present DH. Screening and surveillance colonoscopy in chronic Crohn's colitis. *Gastroenterology*. 2001 Mar;120(4):820-6.
43. Kulaylat MN, Dayton MT. Ulcerative colitis and cancer. *J Surg Oncol*. 2010 Jun 15;101(8):706-12.
44. Brosens LA, Langeveld D, van Hattem WA, Giardiello FM, Offerhaus GJ. Juvenile polyposis syndrome. *World J Gastroenterol*. 2011 Nov 28;17(44):4839-44.
45. Beggs AD, Latchford AR, Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Aretz S, et al. Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. *Gut*. 2010 Jul;59(7):975-86.
46. Potter JD, Slattery ML, Bostick RM, Gapstur SM. Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol Rev*. 1993;15(2):499-545.
47. Hill MJ. Aetiology of colorectal cancer: current concepts. *Baillieres Clin Gastroenterol*. 1989 Jul;3(3):567-92.
48. Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Jun 15;97(12):906-16.
49. Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer*. 2009 Jul 1;125(1):171-80.
50. Moghaddam AA, Woodward M, Huxley R. Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Dec;16(12):2533-47.

51. Oh SW, Kim YH, Choi YS, Chang DK, Son HJ, Rhee PL, et al. The comparison of the risk factors and clinical manifestations of proximal and distal colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2008 Jan;51(1):56-61.
52. Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Schernhammer ES, Curhan GC, Fuchs CS. Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. *JAMA*. 2005 Aug 24;294(8):914-23.
53. Driver JA, Djousse L, Logroscino G, Gaziano JM, Kurth T. Incidence of cardiovascular disease and cancer in advanced age: prospective cohort study. *BMJ*. 2008;337:a2467.
54. Marusch F, Koch A, Schmidt U, Steinert R, Ueberrueck T, Bittner R, et al. The impact of the risk factor "age" on the early postoperative results of surgery for colorectal carcinoma and its significance for perioperative management. *World J Surg*. 2005 Aug;29(8):1013-21.
55. Marusch F, Koch A, Schmidt U, Zippel R, Gastmeier J, Ludwig K, et al. Impact of age on the short-term postoperative outcome of patients undergoing surgery for colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis*. 2002 May;17(3):177-84.
56. Paulson EC, Wirtalla C, Armstrong K, Mahmoud NN. Gender influences treatment and survival in colorectal cancer surgery. *Dis Colon Rectum*. 2009 Dec;52(12):1982-91.
57. McArdle CS, McMillan DC, Hole DJ. Male gender adversely affects survival following surgery for colorectal cancer. *Br J Surg*. 2003 Jun;90(6):711-5.
58. Wichmann MW, Muller C, Hornung HM, Lau-Werner U, Schildberg FW. Gender differences in long-term survival of patients with colorectal cancer. *Br J Surg*. 2001 Aug;88(8):1092-8.
59. Koo JH, Jalaludin B, Wong SK, Kneebone A, Connor SJ, Leong RW. Improved survival in young women with colorectal cancer. *Am J Gastroenterol*. 2008 Jun;103(6):1488-95.

60. McMillan DC, Wotherspoon HA, Fearon KC, Sturgeon C, Cooke TG, McArdle CS. A prospective study of tumor recurrence and the acute-phase response after apparently curative colorectal cancer surgery. *Am J Surg.* 1995 Oct;170(4):319-22.
61. Nozoe T, Matsumata T, Sugimachi K. Preoperative elevation of serum C-reactive protein is related to impaired immunity in patients with colorectal cancer. *Am J Clin Oncol.* 2000 Jun;23(3):263-6.
62. Nielsen HJ, Christensen IJ, Sorensen S, Moesgaard F, Brunner N. Preoperative plasma plasminogen activator inhibitor type-1 and serum C-reactive protein levels in patients with colorectal cancer. The RANX05 Colorectal Cancer Study Group. *Ann Surg Oncol.* 2000 Sep;7(8):617-23.
63. Mendall MA, Patel P, Ballam L, Strachan D, Northfield TC. C reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors: a population based cross sectional study. *BMJ.* 1996 Apr 27;312(7038):1061-5.
64. Koenig W, Sund M, Frohlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A, et al. C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation.* 1999 Jan 19;99(2):237-42.
65. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, et al. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ.* 2000 Jul 22;321(7255):199-204.
66. Ashktorab H, Smoot DT, Carethers JM, Rahmanian M, Kittles R, Vosgian G, et al. High incidence of microsatellite instability in colorectal cancer from African Americans. *Clin Cancer Res.* 2003 Mar;9(3):1112-7.

67. Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet*. 2000 May 20;355(9217):1745-50.
68. Cuffy M, Abir F, Audisio RA, Longo WE. Colorectal cancer presenting as surgical emergencies. *Surg Oncol*. 2004 Aug-Nov;13(2-3):149-57.
69. McArdle CS, Hole DJ. Emergency presentation of colorectal cancer is associated with poor 5-year survival. *Br J Surg*. 2004 May;91(5):605-9.
70. Runkel NS, Schlag P, Schwarz V, Herfarth C. Outcome after emergency surgery for cancer of the large intestine. *Br J Surg*. 1991 Feb;78(2):183-8.
71. Serpell JW, McDermott FT, Katrivessis H, Hughes ES. Obstructing carcinomas of the colon. *Br J Surg*. 1989 Sep;76(9):965-9.
72. Mynster T, Christensen IJ, Moesgaard F, Nielsen HJ. Effects of the combination of blood transfusion and postoperative infectious complications on prognosis after surgery for colorectal cancer. Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group. *Br J Surg*. 2000 Nov;87(11):1553-62.
73. Lee IK, Sung NY, Lee YS, Lee SC, Kang WK, Cho HM, et al. The survival rate and prognostic factors in 26 perforated colorectal cancer patients. *Int J Colorectal Dis*. 2007 May;22(5):467-73.
74. Mandava N, Kumar S, Pizzi WF, Aprile IJ. Perforated colorectal carcinomas. *Am J Surg*. 1996 Sep;172(3):236-8.
75. Abdelrazeq AS, Scott N, Thorn C, Verbeke CS, Ambrose NS, Botterill ID, et al. The impact of spontaneous tumour perforation on outcome following colon cancer surgery. *Colorectal Dis*. 2008 Oct;10(8):775-80.

76. Alvarez JA, Baldonado RF, Bear IG, Truan N, Pire G, Alvarez P. Presentation, treatment, and multivariate analysis of risk factors for obstructive and perforative colorectal carcinoma. *Am J Surg.* 2005 Sep;190(3):376-82.
77. O'Connor ES, Greenblatt DY, LoConte NK, Gangnon RE, Liou JI, Heise CP, et al. Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features. *J Clin Oncol.* 2011 Sep 1;29(25):3381-8.
78. Hermanek P, Henson D, Hutter R, Sobin L, editors. TNM supplement 1993. A commentary on uniform use. Berlin: Springer.
79. Bretagnol F, Dedieu A, Zappa M, Guedj N, Ferron M, Panis Y. T4 colorectal cancer: is laparoscopic resection contraindicated? *Colorectal Dis.* 2011 Feb;13(2):138-43.
80. Law WL, Choi HK, Lee YM, Ho JW. The impact of postoperative complications on long-term outcomes following curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2007 Sep;14(9):2559-66.
81. McArdle CS, McMillan DC, Hole DJ. Impact of anastomotic leakage on long-term survival of patients undergoing curative resection for colorectal cancer. *Br J Surg.* 2005 Sep;92(9):1150-4.
82. Nespoli A, Gianotti L, Totis M, Bovo G, Nespoli L, Chiodini P, et al. Correlation between postoperative infections and long-term survival after colorectal resection for cancer. *Tumori.* 2004 Sep-Oct;90(5):485-90.
83. Walker KG, Bell SW, Rickard MJ, Mehanna D, Dent OF, Chapuis PH, et al. Anastomotic leakage is predictive of diminished survival after potentially curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg.* 2004 Aug;240(2):255-9.
84. Adloff M, Arnaud JP, Ollier JC, Schloegel M. [Can the prognosis of patients treated surgically in cancer of the rectum or colon be improved by follow-up? Prospective study of 909 patients]. *Chirurgie.* 1989;115(3):228-36.

85. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Oct 6;96(19):1420-5.
86. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med.* 1990 Feb 8;322(6):352-8.
87. Taylor SG, Applebaum E, Showel JL, Norusis M, Holinger LD, Hutchinson JC, Jr., et al. A randomized trial of adjuvant chemotherapy in head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 1985 May;3(5):672-9.
88. Wolmark N, Rockette H, Fisher B, Wickerham DL, Redmond C, Fisher ER, et al. The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. *J Clin Oncol.* 1993 Oct;11(10):1879-87.
89. Greene FL, Stewart AK, Norton HJ. A new TNM staging strategy for node-positive (stage III) colon cancer: an analysis of 50,042 patients. *Ann Surg.* 2002 Oct;236(4):416-21.
90. Simmonds PC, Primrose JN, Colquitt JL, Garden OJ, Poston GJ, Rees M. Surgical resection of hepatic metastases from colorectal cancer: a systematic review of published studies. *Br J Cancer.* 2006 Apr 10;94(7):982-99.
91. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Jul;124(7):979-94.
92. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer.* 2000 Apr 1;88(7):1739-57.

93. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol.* 2003 Apr;16(4):376-88.
94. Huh JW, Kim HR, Kim YJ. Lymphovascular or perineural invasion may predict lymph node metastasis in patients with T1 and T2 colorectal cancer. *J Gastrointest Surg.* 2010 Jul;14(7):1074-80.
95. Huh JW, Kim YJ, Kim HR. Ratio of metastatic to resected lymph nodes as a prognostic factor in node-positive colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2010 Oct;17(10):2640-6.
96. Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Nov 1;27(31):5131-7.
97. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology.* 2002 Feb;40(2):127-32.
98. Prall F, Ostwald C. High-degree tumor budding and podia-formation in sporadic colorectal carcinomas with K-ras gene mutations. *Hum Pathol.* 2007 Nov;38(11):1696-702.
99. Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, Bussey HJ, Morson BC, Northover JM, et al. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology.* 2002 Sep;41(3A):59-81.
100. Morodomi T, Isomoto H, Shirouzu K, Kakegawa K, Irie K, Morimatsu M. An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer.* 1989 Feb 1;63(3):539-43.

101. Nakamura T, Mitomi H, Kikuchi S, Ohtani Y, Sato K. Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2005 Sep-Oct;52(65):1432-5.
102. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Aida S, Hase K, et al. Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology*. 2004 Aug;127(2):385-94.
103. Zlobec I, Lugli A, Baker K, Roth S, Minoo P, Hayashi S, et al. Role of APAF-1, E-cadherin and peritumoral lymphocytic infiltration in tumour budding in colorectal cancer. *J Pathol*. 2007 Jul;212(3):260-8.
104. Compton CC. Optimal pathologic staging: defining stage II disease. *Clin Cancer Res*. 2007 Nov 15;13(22 Pt 2):6862s-70s.
105. Chung CK, Zaino RJ, Stryker JA. Colorectal carcinoma: evaluation of histologic grade and factors influencing prognosis. *J Surg Oncol*. 1982 Nov;21(3):143-8.
106. Cho YB, Chun HK, Yun HR, Kim HC, Yun SH, Lee WY. Histological grade predicts survival time associated with recurrence after resection for colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2009 Sep-Oct;56(94-95):1335-40.
107. Purdie CA, Piris J. Histopathological grade, mucinous differentiation and DNA ploidy in relation to prognosis in colorectal carcinoma. *Histopathology*. 2000 Feb;36(2):121-6.
108. Gafa R, Maestri I, Matteuzzi M, Santini A, Ferretti S, Cavazzini L, et al. Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer*. 2000 Nov 15;89(10):2025-37.
109. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol*. 1994 Jul;145(1):148-56.

110. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*. 1989 Apr 14;244(4901):207-11.
111. Benatti P, Gafa R, Barana D, Marino M, Scarselli A, Pedroni M, et al. Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res*. 2005 Dec 1;11(23):8332-40.
112. Bendardaf R, Lamlum H, Ristamaki R, Korkeila E, Syrjanen K, Pyrhonen S. Mismatch repair status is a predictive factor of tumour response to 5-fluorouracil and irinotecan chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Tumour Biol*. 2007;28(4):212-20.
113. Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, Nguyen L, Tajima A, Doctolero RT, et al. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2004 Feb;126(2):394-401.
114. Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, et al. Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer. *Gut*. 2006 Jun;55(6):848-55.
115. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jul 17;349(3):247-57.
116. Popat S, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2005 Sep;41(14):2060-70.
117. Aschele C, Debernardis D, Lonardi S, Bandelloni R, Casazza S, Monfardini S, et al. Deleted in colon cancer protein expression in colorectal cancer metastases: a major predictor of survival in patients with unresectable metastatic disease receiving palliative fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2004 Sep 15;22(18):3758-65.

118. Reymond MA, Dworak O, Remke S, Hohenberger W, Kirchner T, Kockerling F. DCC protein as a predictor of distant metastases after curative surgery for rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1998 Jun;41(6):755-60.
119. Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G, Jr., et al. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 1996 Dec 5;335(23):1727-32.
120. Sun XF, Rutten S, Zhang H, Nordenskjold B. Expression of the deleted in colorectal cancer gene is related to prognosis in DNA diploid and low proliferative colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 1999 Jun;17(6):1745-50.
121. Piard F, Martin L, Chapusot C, Ponnelle T, Monges G. [New histologic prognostic factors in colorectal cancer]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2002 May;26(5 Suppl):B62-73.
122. Ohtani H. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer. *Cancer Immun*. 2007;7:4.
123. Baker K, Zlobec I, Tornillo L, Terracciano L, Jass JR, Lugli A. Differential significance of tumour infiltrating lymphocytes in sporadic mismatch repair deficient versus proficient colorectal cancers: a potential role for dysregulation of the transforming growth factor-beta pathway. *Eur J Cancer*. 2007 Feb;43(3):624-31.
124. Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, et al. High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol*. 1999 Jun;154(6):1805-13.
125. Guidoboni M, Gafa R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Santini A, et al. Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. *Am J Pathol*. 2001 Jul;159(1):297-304.
126. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004 Aug;21(2):137-48.

127. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1960-4.
128. Dixon MR, Haukoos JS, Udani SM, Naghi JJ, Arnell TD, Kumar RR, et al. Carcinoembryonic antigen and albumin predict survival in patients with advanced colon and rectal cancer. *Arch Surg*. 2003 Sep;138(9):962-6.
129. Heys SD, Walker LG, Deehan DJ, Eremin OE. Serum albumin: a prognostic indicator in patients with colorectal cancer. *J R Coll Surg Edinb*. 1998 Jun;43(3):163-8.
130. Cengiz O, Kocer B, Surmeli S, Santicky MJ, Soran A. Are pretreatment serum albumin and cholesterol levels prognostic tools in patients with colorectal carcinoma? *Med Sci Monit*. 2006 Jun;12(6):CR240-7.
131. Al-Shaiba R, McMillan DC, Angerson WJ, Leen E, McArdle CS, Horgan P. The relationship between hypoalbuminaemia, tumour volume and the systemic inflammatory response in patients with colorectal liver metastases. *Br J Cancer*. 2004 Jul 19;91(2):205-7.
132. McMillan DC, Watson WS, O'Gorman P, Preston T, Scott HR, McArdle CS. Albumin concentrations are primarily determined by the body cell mass and the systemic inflammatory response in cancer patients with weight loss. *Nutr Cancer*. 2001;39(2):210-3.
133. Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med*. 1965 Sep 1;122(3):467-81.
134. Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol*. 1999 Apr;9(2):67-81.
135. Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem*. 2001 Apr;47(4):624-30.

136. Wang JY, Lu CY, Chu KS, Ma CJ, Wu DC, Tsai HL, et al. Prognostic significance of pre- and postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with colorectal cancer. *Eur Surg Res.* 2007;39(4):245-50.
137. Wang WS, Lin JK, Chiou TJ, Liu JH, Fan FS, Yen CC, et al. Preoperative carcinoembryonic antigen level as an independent prognostic factor in colorectal cancer: Taiwan experience. *Jpn J Clin Oncol.* 2000 Jan;30(1):12-6.
138. Carriquiry LA, Pineyro A. Should carcinoembryonic antigen be used in the management of patients with colorectal cancer? *Dis Colon Rectum.* 1999 Jul;42(7):921-9.
139. Chapman MA, Buckley D, Henson DB, Armitage NC. Preoperative carcinoembryonic antigen is related to tumour stage and long-term survival in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1998 Nov;78(10):1346-9.
140. Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM, Hoffman RG, Stearns M, Schwartz MK, et al. Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 1978 Aug 31;299(9):448-51.
141. Li M, Li JY, Zhao AL, He JS, Zhou LX, Li YA, et al. Comparison of carcinoembryonic antigen prognostic value in serum and tumour tissue of patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2009 Mar;11(3):276-81.
142. Scholzel S, Zimmermann W, Schwarzkopf G, Grunert F, Rogaczewski B, Thompson J. Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *Am J Pathol.* 2000 Feb;156(2):595-605.
143. Higashide T, Hinoda Y, Itoh J, Takahashi H, Satoh Y, Ibayashi Y, et al. Detection of mRNAs of carcinoembryonic antigen and nonspecific cross-reacting antigen genes in colorectal adenomas and carcinomas by in situ hybridization. *Jpn J Cancer Res.* 1990 Nov;81(11):1149-54.

144. Chevinsky AH. CEA in tumors of other than colorectal origin. *Semin Surg Oncol.* 1991 May-Jun;7(3):162-6.
145. Blumenthal RD, Leon E, Hansen HJ, Goldenberg DM. Expression patterns of CEACAM5 and CEACAM6 in primary and metastatic cancers. *BMC Cancer.* 2007;7:2.
146. Jantschkeff P, Terracciano L, Lowy A, Glatz-Krieger K, Grunert F, Micheel B, et al. Expression of CEACAM6 in resectable colorectal cancer: a factor of independent prognostic significance. *J Clin Oncol.* 2003 Oct 1;21(19):3638-46.
147. Koike Y, Miki C, Okugawa Y, Yokoe T, Toiyama Y, Tanaka K, et al. Preoperative C-reactive protein as a prognostic and therapeutic marker for colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 2008 Dec 1;98(7):540-4.
148. Canna K, McMillan DC, McKee RF, McNicol AM, Horgan PG, McArdle CS. Evaluation of a cumulative prognostic score based on the systemic inflammatory response in patients undergoing potentially curative surgery for colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2004 May 4;90(9):1707-9.
149. Nozoe T, Matsumata T, Kitamura M, Sugimachi K. Significance of preoperative elevation of serum C-reactive protein as an indicator for prognosis in colorectal cancer. *Am J Surg.* 1998 Oct;176(4):335-8.
150. McMillan DC, Canna K, McArdle CS. Systemic inflammatory response predicts survival following curative resection of colorectal cancer. *Br J Surg.* 2003 Feb;90(2):215-9.
151. Crozier JE, McKee RF, McArdle CS, Angerson WJ, Anderson JH, Horgan PG, et al. The presence of a systemic inflammatory response predicts poorer survival in patients receiving adjuvant 5-FU chemotherapy following potentially curative resection for colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2006 Jun 19;94(12):1833-6.

152. Gunter MJ, Stolzenberg-Solomon R, Cross AJ, Leitzmann MF, Weinstein S, Wood RJ, et al. A prospective study of serum C-reactive protein and colorectal cancer risk in men. *Cancer Res.* 2006 Feb 15;66(4):2483-7.
153. Shiu YC, Lin JK, Huang CJ, Jiang JK, Wang LW, Huang HC, et al. Is C-reactive protein a prognostic factor of colorectal cancer? *Dis Colon Rectum.* 2008 Apr;51(4):443-9.
154. Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, et al. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature.* 1988 Mar 3;332(6159):83-5.
155. Shen P, Hawksworth J, Lovato J, Loggie BW, Geisinger KR, Fleming RA, et al. Cytoreductive surgery and intraperitoneal hyperthermic chemotherapy with mitomycin C for peritoneal carcinomatosis from nonappendiceal colorectal carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2004 Feb;11(2):178-86.
156. Gray R, Barnewell J, Hills R, McConhey C, Williams N, Kerr D, et al. Quasar : A randomized study of adjuvant chemotherapy. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2004;23:246 (abstract).
157. Andre T, Tournigand C, Achille E, Tubiana-Mathieu N, Lledo G, Raoul Y, et al. [Adjuvant treatment of colon cancer MOSAIC study's main results]. *Bull Cancer.* 2006 Feb 1;93 Suppl 1:S5-9.
158. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med.* 2004 Jun 3;350(23):2343-51.
159. Kishi Y, Zorzi D, Contreras CM, Maru DM, Kopetz S, Ribero D, et al. Extended preoperative chemotherapy does not improve pathologic response and increases postoperative liver insufficiency after hepatic resection for colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol.* 2010 Nov;17(11):2870-6.

160. Jones RP, Jackson R, Dunne DF, Malik HZ, Fenwick SW, Poston GJ, et al. Systematic review and meta-analysis of follow-up after hepatectomy for colorectal liver metastases. *Br J Surg*. 2012 Jan 19.
161. Rajagopalan H, Lengauer C. Aneuploidy and cancer. *Nature*. 2004 Nov 18;432(7015):338-41.
162. Rhodes JM, Campbell BJ. Inflammation and colorectal cancer: IBD-associated and sporadic cancer compared. *Trends Mol Med*. 2002 Jan;8(1):10-6.
163. Humphries A, Wright NA. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008 Jun;8(6):415-24.
164. Wasan HS, Park HS, Liu KC, Mandir NK, Winnett A, Sasieni P, et al. APC in the regulation of intestinal crypt fission. *J Pathol*. 1998 Jul;185(3):246-55.
165. Boman BM, Walters R, Fields JZ, Kovatich AJ, Zhang T, Isenberg GA, et al. Colonic crypt changes during adenoma development in familial adenomatous polyposis: immunohistochemical evidence for expansion of the crypt base cell population. *Am J Pathol*. 2004 Nov;165(5):1489-98.
166. Nakamura S, Kino I. Morphogenesis of minute adenomas in familial polyposis coli. *J Natl Cancer Inst*. 1984 Jul;73(1):41-9.
167. Bellaïche Y, Perrimon N. La voie de signalisation Wingless chez la drosophile. *Med Sci*. 1997;13:166-74.
168. Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev*. 2005 Apr 15;19(8):877-90.
169. Romagnolo B. APC, β -caténine et cancer : les diaboliques. *Med Sci*. 1997;13:872-3.
170. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005 Apr 14;434(7035):843-50.

171. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*. 2002 Oct 18;111(2):241-50.
172. Samowitz WS, Powers MD, Spirio LN, Nollet F, van Roy F, Slattery ML. Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. *Cancer Res*. 1999 Apr 1;59(7):1442-4.
173. Shimizu Y, Ikeda S, Fujimori M, Kodama S, Nakahara M, Okajima M, et al. Frequent alterations in the Wnt signaling pathway in colorectal cancer with microsatellite instability. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 Jan;33(1):73-81.
174. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*. 1992 Sep 17;359(6392):235-7.
175. Lièvre A, Laurent Puig P. La voie de signalisation RAS/MAPK. *Cancéro Dig*. 2010;2(1):38-42.
176. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.
177. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3291-310.
178. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):15-6.
179. Sozzi G, Miozzo M, Pastorino U, Pilotti S, Donghi R, Giarola M, et al. Genetic evidence for an independent origin of multiple preneoplastic and neoplastic lung lesions. *Cancer Res*. 1995 Jan 1;55(1):135-40.
180. Dridi W, Krabchi K, Gadjji M, Lavoie J, Bronsard M, Fetni R, et al. Activité dominante négative des protéines p53 mutées. *Médecines Sciences*. 2006;22(3):301-7.

181. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994 Sep 15;54(18):4855-78.
182. Samuels Y, Ericson K. Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol.* 2006 Jan;18(1):77-82.
183. Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, Tanaka K, et al. Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem.* 2002 Jun 14;277(24):21843-50.
184. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol.* 2001 Mar;3(3):245-52.
185. Nomura M, Shimizu S, Sugiyama T, Narita M, Ito T, Matsuda H, et al. 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J Biol Chem.* 2003 Jan 17;278(3):2058-65.
186. Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell.* 2000 Oct 13;103(2):295-309.
187. Akhurst RJ. TGF beta signaling in health and disease. *Nat Genet.* 2004 Aug;36(8):790-2.
188. Massague J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 2000 Mar 15;14(6):627-44.
189. Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv Immunol.* 2000;75:115-57.
190. Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab.* 1998;24(2-3):111-9.

191. Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Dec;8(12):970-82.
192. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol.* 2006 Mar;41(3):185-92.
193. Xu Y, Pasche B. TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Hum Mol Genet.* 2007 Apr 15;16 Spec No 1:R14-20.
194. Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Miyanishi K, Nobuoka A, Nakajima T, et al. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology.* 2001 Sep;121(3):599-611.
195. Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002;3:101-28.
196. Dejardin E. The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol.* 2006 Oct 30;72(9):1161-79.
197. Guo X, Evans TR, Somanath S, Armesilla AL, Darling JL, Schatzlein A, et al. In vitro evaluation of cancer-specific NF-kappaB-CEA enhancer-promoter system for 5-fluorouracil prodrug gene therapy in colon cancer cell lines. *Br J Cancer.* 2007 Sep 17;97(6):745-54.
198. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest.* 2001 Feb;107(3):241-6.
199. Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:101-33.
200. Cheadle JP, Sampson JR. Exposing the MYtH about base excision repair and human inherited disease. *Hum Mol Genet.* 2003 Oct 15;12 Spec No 2:R159-65.
201. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, et al. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol.* 2001 Apr;3(4):433-8.

202. Somasundaram K. Tumor suppressor p53: regulation and function. *Front Biosci.* 2000 Apr 1;5:D424-37.
203. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 9;99(14):9433-8.
204. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol.* 2007 Jul 28;13(28):3784-91.
205. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996 Oct 18;87(2):159-70.
206. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell.* 1993 Dec 17;75(6):1215-25.
207. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science.* 1994 Mar 18;263(5153):1625-9.
208. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg.* 2002 Jul;89(7):845-60.
209. Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res.* 1998 Apr 15;58(8):1713-8.
210. Samowitz WS, Slattery ML, Potter JD, Leppert MF. BAT-26 and BAT-40 instability in colorectal adenomas and carcinomas and germline polymorphisms. *Am J Pathol.* 1999 Jun;154(6):1637-41.

211. Wijnen J, de Leeuw W, Vasen H, van der Klift H, Moller P, Stormorken A, et al. Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nat Genet.* 1999 Oct;23(2):142-4.
212. Wu Y, Berends MJ, Mensink RG, Kempinga C, Sijmons RH, van Der Zee AG, et al. Association of hereditary nonpolyposis colorectal cancer-related tumors displaying low microsatellite instability with MSH6 germline mutations. *Am J Hum Genet.* 1999 Nov;65(5):1291-8.
213. Jass JR, Biden KG, Cummings MC, Simms LA, Walsh M, Schoch E, et al. Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J Clin Pathol.* 1999 Jun;52(6):455-60.
214. Kohonen-Corish MR, Daniel JJ, Chan C, Lin BP, Kwun SY, Dent OF, et al. Low microsatellite instability is associated with poor prognosis in stage C colon cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Apr 1;23(10):2318-24.
215. Whitehall VL, Walsh MD, Young J, Leggett BA, Jass JR. Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. *Cancer Res.* 2001 Feb 1;61(3):827-30.
216. Tuppurainen K, Makinen JM, Junttila O, Liakka A, Kyllonen AP, Tuominen H, et al. Morphology and microsatellite instability in sporadic serrated and non-serrated colorectal cancer. *J Pathol.* 2005 Nov;207(3):285-94.
217. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature.* 1997 Apr 10;386(6625):623-7.
218. Ahuja N, Mohan AL, Li Q, Stolker JM, Herman JG, Hamilton SR, et al. Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1997 Aug 15;57(16):3370-4.

219. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002 Jan 1;16(1):6-21.
220. Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Nov 20;104(47):18654-9.
221. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature.* 2007 Oct 18;449(7164):804-10.
222. Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Oct;6(10):776-88.
223. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science.* 2008 Jun 20;320(5883):1647-51.
224. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* 2006 Jun 2;312(5778):1355-9.
225. Xu J, Mahowald MA, Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Martens EC, et al. Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS Biol.* 2007 Jul;5(7):e156.
226. Martin FP, Dumas ME, Wang Y, Legido-Quigley C, Yap IK, Tang H, et al. A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. *Mol Syst Biol.* 2007;3:112.
227. Candela M, Bergmann S, Vici M, Vitali B, Turrone S, Eikmanns BJ, et al. Binding of human plasminogen to *Bifidobacterium*. *J Bacteriol.* 2007 Aug;189(16):5929-36.
228. Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H, Toyoda A, et al. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.* 2007 Aug 31;14(4):169-81.

229. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006 Jul;7(7):688-93.
230. Peterson DA, Frank DN, Pace NR, Gordon JI. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe.* 2008 Jun 12;3(6):417-27.
231. Rajilic-Stojanovic M, Smidt H, de Vos WM. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ Microbiol.* 2007 Sep;9(9):2125-36.
232. Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut.* 2008 Nov;57(11):1605-15.
233. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009 Jan 22;457(7228):480-4.
234. Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environ Microbiol.* 2007 May;9(5):1101-11.
235. Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):859-70.
236. Turnbaugh PJ, Quince C, Faith JJ, McHardy AC, Yatsunencko T, Niazi F, et al. Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Apr 20;107(16):7503-8.
237. Forstner JF, Olivier MG, Sylvester FA, editors. Production, structure, and biologic relevance of gastrointestinal mucins. New York: Raven Press; 1995.
238. Sansonetti PJ, Medzhitov R. Learning tolerance while fighting ignorance. *Cell.* 2009 Aug 7;138(3):416-20.
239. Sansonetti PJ. Host-bacteria homeostasis in the healthy and inflamed gut. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008 Jul;24(4):435-9.

240. Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*. 2005 Mar 25;307(5717):1920-5.
241. Maynard CL, Weaver CT. Intestinal effector T cells in health and disease. *Immunity*. 2009 Sep 18;31(3):389-400.
242. Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol*. 2004 Jan;5(1):104-12.
243. Tien MT, Girardin SE, Regnault B, Le Bourhis L, Dillies MA, Coppee JY, et al. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *J Immunol*. 2006 Jan 15;176(2):1228-37.
244. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 28;105(43):16731-6.
245. Heuvelin E, Lebreton C, Grangette C, Pot B, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Mechanisms involved in alleviation of intestinal inflammation by *bifidobacterium breve* soluble factors. *PLoS One*. 2009;4(4):e5184.
246. van Baarlen P, Troost FJ, van Hemert S, van der Meer C, de Vos WM, de Groot PJ, et al. Differential NF-kappaB pathways induction by *Lactobacillus plantarum* in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 17;106(7):2371-6.
247. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. 2009 Jan;136(1):65-80.
248. Murphy KM, Travers P, Walport M, editors. *The mucosal immune system*. London: Garland Publishing Inc; 2008.

249. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med.* 2009 Nov 11;1(6):6ra14.
250. Sonnenburg JL, Chen CT, Gordon JI. Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. *PLoS Biol.* 2006 Nov;4(12):e413.
251. Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, et al. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One.* 2010;5(5):e10667.
252. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009 May;9(5):313-23.
253. Gibson GR. Prebiotics as gut microflora management tools. *J Clin Gastroenterol.* 2008 Jul;42 Suppl 2:S75-9.
254. Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, Turnbaugh PJ, Fulton RS, Wollam A, et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Apr 7;106(14):5859-64.
255. McConnell BB, Yang VW. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2009 Apr 1;5(2):69-74.
256. Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature.* 2008 May 29;453(7195):620-5.
257. Chow J, Mazmanian SK. A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. *Cell Host Microbe.* 2010 Apr 22;7(4):265-76.
258. Sansonetti PJ, Di Santo JP. Debugging how bacteria manipulate the immune response. *Immunity.* 2007 Feb;26(2):149-61.

259. McKenna P, Hoffmann C, Minkah N, Aye PP, Lackner A, Liu Z, et al. The macaque gut microbiome in health, lentiviral infection, and chronic enterocolitis. *PLoS Pathog.* 2008 Feb 8;4(2):e20.
260. Rawls JF. Enteric infection and inflammation alter gut microbial ecology. *Cell Host Microbe.* 2007 Aug 16;2(2):73-4.
261. Jia W, Li H, Zhao L, Nicholson JK. Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Feb;7(2):123-9.
262. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006 Dec 21;444(7122):1027-31.
263. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Aug 21;104(34):13780-5.
264. Stecher B, Robbiani R, Walker AW, Westendorf AM, Barthel M, Kremer M, et al. *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 2007 Oct;5(10):2177-89.
265. Pedron T, Sansonetti P. Commensals, bacterial pathogens and intestinal inflammation: an intriguing ménage à trois. *Cell Host Microbe.* 2008 Jun 12;3(6):344-7.
266. Davis CD, Milner JA. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *J Nutr Biochem.* 2009 Oct;20(10):743-52.
267. O'Keefe SJ. Nutrition and colonic health: the critical role of the microbiota. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008 Jan;24(1):51-8.
268. Scanlan PD, Shanahan F, Clune Y, Collins JK, O'Sullivan GC, O'Riordan M, et al. Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. *Environ Microbiol.* 2008 Mar;10(3):789-98.

269. Mai V, McCrary QM, Sinha R, Glei M. Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers. *Nutr J.* 2009;8:49.
270. Uronis JM, Muhlbauer M, Herfarth HH, Rubinas TC, Jones GS, Jobin C. Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS One.* 2009;4(6):e6026.
271. O'Keefe SJ, Ou J, Aufreiter S, O'Connor D, Sharma S, Sepulveda J, et al. Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. *J Nutr.* 2009 Nov;139(11):2044-8.
272. 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(1):e16393.
273. Huycke MM, Gaskins HR. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004 Jul;229(7):586-97.
274. Hope ME, Hold GL, Kain R, El-Omar EM. Sporadic colorectal cancer--role of the commensal microbiota. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Mar 1;244(1):1-7.
275. O'Keefe SJ, Chung D, Mahmoud N, Sepulveda AR, Manafe M, Arch J, et al. Why do African Americans get more colon cancer than Native Africans? *J Nutr.* 2007 Jan;137(1 Suppl):175S-82S.
276. Carman RJ, Van Tassell RL, Kingston DG, Bashir M, Wilkins TD. Conversion of IQ, a dietary pyrolysis carcinogen to a direct-acting mutagen by normal intestinal bacteria of humans. *Mutat Res.* 1988 Nov;206(3):335-42.
277. Obe G, Anderson D. International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC Working Paper No. 15/1. Genetic effects of ethanol. *Mutat Res.* 1987 Nov;186(3):177-200.

278. Povey AC, Schiffman M, Taffe BG, Harris CC. Laboratory and epidemiologic studies of fecapentaenes. *Mutat Res.* 1991 Mar-Apr;259(3-4):387-97.
279. Plummer SM, Grafstrom RC, Yang LL, Curren RD, Linnainmaa K, Harris CC. Fecapentaene-12 causes DNA damage and mutations in human cells. *Carcinogenesis.* 1986 Sep;7(9):1607-9.
280. Kassae MZ, Bekhradnia AR. The kinetics of interactions between fecapentaene-12 and DNA. *J Biosci Bioeng.* 2003;95(5):526-9.
281. Levitt MD, Furne J, Springfield J, Suarez F, DeMaster E. Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. *J Clin Invest.* 1999 Oct;104(8):1107-14.
282. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res.* 2006 Feb;47(2):241-59.
283. Costarelli V. Bile acids as possible human carcinogens: new tricks from an old dog. *Int J Food Sci Nutr.* 2009 Jun 3:1-10.
284. Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorakova K, Garewal H. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat Res.* 2005 Jan;589(1):47-65.
285. Horst D, Reu S, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. The intratumoral distribution of nuclear beta-catenin is a prognostic marker in colon cancer. *Cancer.* 2009 May 15;115(10):2063-70.
286. Stecher B, Hardt WD. The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol.* 2008 Mar;16(3):107-14.
287. Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, Sekirov I, Champion OL, Gaynor EC, et al. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe.* 2007 Sep 13;2(3):204.
288. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):883-99.

289. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003 Apr;3(4):276-85.
290. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009 Jul;30(7):1073-81.
291. Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010 Feb;21(1):11-9.
292. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*. 2009 Nov;9(11):798-809.
293. Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, Herrmann A, Kay H, Yu H. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest*. 2008 Oct;118(10):3367-77.
294. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature*. 2008 Jun 5;453(7196):807-11.
295. Kraus S, Arber N. Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2009 Aug;9(4):405-10.
296. Lee SH, Hu LL, Gonzalez-Navajas J, Seo GS, Shen C, Brick J, et al. ERK activation drives intestinal tumorigenesis in *Apc(min/+)* mice. *Nat Med*. 2010 Jun;16(6):665-70.
297. Femia AP, Luceri C, Toti S, Giannini A, Dolara P, Caderni G. Gene expression profile and genomic alterations in colonic tumours induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in rats. *BMC Cancer*. 2010;10:194.
298. Logan RP. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Lancet*. 1994 Oct 15;344(8929):1078-9.

299. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, et al. Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med.* 1994 May 5;330(18):1267-71.
300. Lochhead P, El-Omar EM. Helicobacter pylori infection and gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2007;21(2):281-97.
301. Censini S, Stein M, Covacci A. Cellular responses induced after contact with Helicobacter pylori. *Curr Opin Microbiol.* 2001 Feb;4(1):41-6.
302. Peek RM, Jr., Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jan;2(1):28-37.
303. Sharma SA, Tummuru MK, Blaser MJ, Kerr LD. Activation of IL-8 gene expression by Helicobacter pylori is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J Immunol.* 1998 Mar 1;160(5):2401-7.
304. Meyer-ter-Vehn T, Covacci A, Kist M, Pahl HL. Helicobacter pylori activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun. *J Biol Chem.* 2000 May 26;275(21):16064-72.
305. D'Elios MM, Manghetti M, De Carli M, Costa F, Baldari CT, Burroni D, et al. T helper 1 effector cells specific for Helicobacter pylori in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J Immunol.* 1997 Jan 15;158(2):962-7.
306. Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of Helicobacter pylori: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:615-40.
307. Backert S, Selbach M. Role of type IV secretion in Helicobacter pylori pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2008 Aug;10(8):1573-81.
308. Isomoto H, Moss J, Hirayama T. Pleiotropic actions of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin, VacA. *Tohoku J Exp Med.* 2010 Jan;220(1):3-14.

309. Burnett-Hartman AN, Newcomb PA, Potter JD. Infectious agents and colorectal cancer: a review of *Helicobacter pylori*, *Streptococcus bovis*, JC virus, and human papillomavirus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Nov;17(11):2970-9.
310. Thorburn CM, Friedman GD, Dickinson CJ, Vogelmann JH, Orentreich N, Parsonnet J. Gastrin and colorectal cancer: a prospective study. *Gastroenterology.* 1998 Aug;115(2):275-80.
311. Mulholland G, Ardill JE, Fillmore D, Chittajallu RS, Fullarton GM, McColl KE. *Helicobacter pylori* related hypergastrinaemia is the result of a selective increase in gastrin 17. *Gut.* 1993 Jun;34(6):757-61.
312. Sobhani I, Lehy T, Laurent-Puig P, Cadiot G, Ruszniewski P, Mignon M. Chronic endogenous hypergastrinemia in humans: evidence for a mitogenic effect on the colonic mucosa. *Gastroenterology.* 1993 Jul;105(1):22-30.
313. Sears CL. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Apr;22(2):349-69.
314. Wu S, Morin PJ, Maouyo D, Sears CL. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology.* 2003 Feb;124(2):392-400.
315. Toprak NU, Yagci A, Gulluoglu BM, Akin ML, Demirkalem P, Celenk T, et al. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Aug;12(8):782-6.
316. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med.* 2009 Sep;15(9):1016-22.
317. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofo C, Nayar M, Singh R, et al. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology.* 2004 Jul;127(1):80-93.

318. Bronowski C, Smith SL, Yokota K, Corkill JE, Martin HM, Campbell BJ, et al. A subset of mucosa-associated *Escherichia coli* isolates from patients with colon cancer, but not Crohn's disease, share pathogenicity islands with urinary pathogenic *E. coli*. *Microbiology*. 2008 Feb;154(Pt 2):571-83.
319. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004 Aug;127(2):412-21.
320. Boquet P. The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon*. 2001 Nov;39(11):1673-80.
321. Hahn A, Barth H, Kress M, Mertens PR, Goppelt-Struebe M. Role of Rac and Cdc42 in lysophosphatidic acid-mediated cyclo-oxygenase-2 gene expression. *Biochem J*. 2002 Feb 15;362(Pt 1):33-40.
322. Boyer L, Travaglione S, Falzano L, Gauthier NC, Popoff MR, Lemichez E, et al. Rac GTPase instructs nuclear factor-kappaB activation by conveying the SCF complex and Ikbalpha to the ruffling membranes. *Mol Biol Cell*. 2004 Mar;15(3):1124-33.
323. Miraglia AG, Travaglione S, Meschini S, Falzano L, Matarrese P, Quaranta MG, et al. Cytotoxic necrotizing factor 1 prevents apoptosis via the Akt/IkappaB kinase pathway: role of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *Mol Biol Cell*. 2007 Jul;18(7):2735-44.
324. Falzano L, Quaranta MG, Travaglione S, Filippini P, Fabbri A, Viora M, et al. Cytotoxic necrotizing factor 1 enhances reactive oxygen species-dependent transcription and secretion of proinflammatory cytokines in human uroepithelial cells. *Infect Immun*. 2003 Jul;71(7):4178-81.
325. Munro P, Flatau G, Doye A, Boyer L, Oregioni O, Mege JL, et al. Activation and proteasomal degradation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor-1 elicit a controlled inflammatory response. *J Biol Chem*. 2004 Aug 20;279(34):35849-57.

326. Travaglione S, Fabbri A, Fiorentini C. The Rho-activating CNF1 toxin from pathogenic *E. coli*: a risk factor for human cancer development? *Infect Agent Cancer*. 2008;3:4.
327. Doye A, Mettouchi A, Bossis G, Clement R, Buisson-Touati C, Flatau G, et al. CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell*. 2002 Nov 15;111(4):553-64.
328. Dubois D, Delmas J, Cady A, Robin F, Sivignon A, Oswald E, et al. Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2010 Jun;48(6):2122-9.
329. Marches O, Ledger TN, Boury M, Ohara M, Tu X, Goffaux F, et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol Microbiol*. 2003 Dec;50(5):1553-67.
330. Cui J, Yao Q, Li S, Ding X, Lu Q, Mao H, et al. Glutamine deamidation and dysfunction of ubiquitin/NEDD8 induced by a bacterial effector family. *Science*. 2010 Sep 3;329(5996):1215-8.
331. Lara-Tejero M, Galan JE. Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends Microbiol*. 2002 Mar;10(3):147-52.
332. Ge Z, Schauer DB, Fox JG. In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol*. 2008 Aug;10(8):1599-607.
333. Ge Z, Rogers AB, Feng Y, Lee A, Xu S, Taylor NS, et al. Bacterial cytolethal distending toxin promotes the development of dysplasia in a model of microbially induced hepatocarcinogenesis. *Cell Microbiol*. 2007 Aug;9(8):2070-80.
334. Escobar-Paramo P, Grenet K, Le Menac'h A, Rode L, Salgado E, Amorin C, et al. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Sep;70(9):5698-700.

335. Nougayrede JP, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*. 2006 Aug 11;313(5788):848-51.
336. Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrede JP. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 22;107(25):11537-42.
337. Hayashi T. *Microbiology*. Breaking the barrier between commensalism and pathogenicity. *Science*. 2006 Aug 11;313(5788):772-3.
338. Ishikawa H, Akedo I, Otani T, Suzuki T, Nakamura T, Takeyama I, et al. Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors. *Int J Cancer*. 2005 Sep 20;116(5):762-7.
339. Pool-Zobel BL. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *Br J Nutr*. 2005 Apr;93 Suppl 1:S73-90.
340. Rafter J, Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R, Karlsson PC, et al. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr*. 2007 Feb;85(2):488-96.
341. Candela M, Perna F, Carnevali P, Vitali B, Ciati R, Gionchetti P, et al. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol*. 2008 Jul 31;125(3):286-92.
342. Gounaris E, Blatner NR, Dennis K, Magnusson F, Gurish MF, Strom TB, et al. T-regulatory cells shift from a protective anti-inflammatory to a cancer-promoting proinflammatory phenotype in polyposis. *Cancer Res*. 2009 Jul 1;69(13):5490-7.
343. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003 Feb 8;361(9356):512-9.

344. Humblot C, Lhoste E, Knasmuller S, Gloux K, Bruneau A, Bensaada M, et al. Protective effects of Brussels sprouts, oligosaccharides and fermented milk towards 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-induced genotoxicity in the human flora associated F344 rat: role of xenobiotic metabolising enzymes and intestinal microflora. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004 Mar 25;802(1):231-7.
345. Kurdi P, van Veen HW, Tanaka H, Mierau I, Konings WN, Tannock GW, et al. Cholic acid is accumulated spontaneously, driven by membrane Δ pH, in many lactobacilli. *J Bacteriol.* 2000 Nov;182(22):6525-8.
346. Kurdi P, Tanaka H, Van Veen HW, Asano K, Tomita F, Yokota A. Cholic acid accumulation and its diminution by short-chain fatty acids in bifidobacteria. *Microbiology.* 2003 Aug;149(Pt 8):2031-7.
347. Ewaschuk JB, Walker JW, Diaz H, Madsen KL. Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs in vitro and in vivo in mice. *J Nutr.* 2006 Jun;136(6):1483-7.
348. Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett.* 2009 May;294(1):1-8.
349. Kuijsten A, Arts IC, Hollman PC, van't Veer P, Kampman E. Plasma enterolignans are associated with lower colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Jun;15(6):1132-6.
350. Blaut M, Clavel T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J Nutr.* 2007 Mar;137(3 Suppl 2):751S-5S.
351. McMahon B, Kwaan HC. The plasminogen activator system and cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2008;36(3-4):184-94.
352. Limburg PJ, Mahoney MR, Ziegler KL, Sontag SJ, Schoen RE, Benya R, et al. Randomized phase II trial of sulindac, atorvastatin, and prebiotic dietary fiber for colorectal cancer chemoprevention. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011 Feb;4(2):259-69.

353. Worthley DL, Le Leu RK, Whitehall VL, Conlon M, Christophersen C, Belobrajdic D, et al. A human, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of prebiotic, probiotic, and synbiotic supplementation: effects on luminal, inflammatory, epigenetic, and epithelial biomarkers of colorectal cancer. *Am J Clin Nutr.* 2009 Sep;90(3):578-86.
354. Roller M, Clune Y, Collins K, Rechkemmer G, Watzl B. Consumption of prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* has minor effects on selected immune parameters in polypectomised and colon cancer patients. *Br J Nutr.* 2007 Apr;97(4):676-84.
355. Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med.* 2000 Sep;248(3):171-83.
356. Franco AT, Israel DA, Washington MK, Krishna U, Fox JG, Rogers AB, et al. Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jul 26;102(30):10646-51.
357. Collins D, Hogan AM, Winter DC. Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2011 May;12(5):504-12.
358. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004 Feb;2(2):123-40.
359. Maddocks OD, Short AJ, Donnenberg MS, Bader S, Harrison DJ. Attaching and effacing *Escherichia coli* downregulate DNA mismatch repair protein in vitro and are associated with colorectal adenocarcinomas in humans. *PLoS One.* 2009;4(5):e5517.
360. Oswald E, Nougayrede JP, Taieb F, Sugai M. Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Curr Opin Microbiol.* 2005 Feb;8(1):83-91.
361. Samba-Louaka A, Nougayrede JP, Watrin C, Oswald E, Taieb F. The enteropathogenic *Escherichia coli* effector Cif induces delayed apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun.* 2009 Dec;77(12):5471-7.

362. Swidsinski A, Khilkin M, Kerjaschki D, Schreiber S, Ortner M, Weber J, et al. Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology*. 1998 Aug;115(2):281-6.
363. Tabaqchali S, O'Donoghue DP, Bettelheim KA. *Escherichia coli* antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 1978 Feb;19(2):108-13.
364. Cartun RW, Van Kruiningen HJ, Pedersen CA, Berman MM. An immunocytochemical search for infectious agents in Crohn's disease. *Mod Pathol*. 1993 Mar;6(2):212-9.
365. Fujita H, Eishi Y, Ishige I, Saitoh K, Takizawa T, Arima T, et al. Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria* spp., *Bacteroides vulgatus*, and *Escherichia coli* in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol*. 2002;37(7):509-16.
366. Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Cortot A, Colombel JF. Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1995 May;108(5):1396-404.
367. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002 Jan;122(1):44-54.
368. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1998 Dec;115(6):1405-13.
369. Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, et al. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J*. 2007 Sep;1(5):403-18.

370. Conte MP, Schippa S, Zamboni I, Penta M, Chiarini F, Seganti L, et al. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2006 Dec;55(12):1760-7.
371. Martinez-Medina M, Mora A, Blanco M, Lopez C, Alonso MP, Bonacorsi S, et al. Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains. *J Clin Microbiol*. 2009 Dec;47(12):3968-79.
372. Neut C, Bulois P, Desreumaux P, Membre JM, Lederman E, Gambiez L, et al. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2002 Apr;97(4):939-46.
373. Sasaki M, Sitaraman SV, Babbin BA, Gerner-Smidt P, Ribot EM, Garrett N, et al. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest*. 2007 Oct;87(10):1042-54.
374. Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2007 May;56(5):669-75.
375. Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun*. 1999 Sep;67(9):4499-509.
376. Burke DA, Axon AT. Hydrophobic adhesin of *E coli* in ulcerative colitis. *Gut*. 1988 Jan;29(1):41-3.
377. Gjaffer MH, Holdsworth CD, Duerden BI. Virulence properties of *Escherichia coli* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 1992 May;33(5):646-50.
378. Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantscheff P, Allez M, et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest*. 2007 Jun;117(6):1566-74.

379. Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, Perruchot MH, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun*. 2001 Sep;69(9):5529-37.
380. Lapaquette P, Glasser AL, Huett A, Xavier RJ, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol*. 2010 Jan;12(1):99-113.
381. Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K, Stanners CP. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*. 1989 Apr 21;57(2):327-34.
382. Oikawa S, Inuzuka C, Kuroki M, Matsuoka Y, Kosaki G, Nakazato H. Cell adhesion activity of non-specific cross-reacting antigen (NCA) and carcinoembryonic antigen (CEA) expressed on CHO cell surface: homophilic and heterophilic adhesion. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Oct 16;164(1):39-45.
383. Rojas M, Fuks A, Stanners CP. Biliary glycoprotein, a member of the immunoglobulin supergene family, functions in vitro as a Ca²⁺(+)-dependent intercellular adhesion molecule. *Cell Growth Differ*. 1990 Nov;1(11):527-33.
384. Duxbury MS, Ito H, Benoit E, Ashley SW, Whang EE. CEACAM6 is a determinant of pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness. *Br J Cancer*. 2004 Oct 4;91(7):1384-90.
385. Boudeau J, Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol Microbiol*. 2001 Mar;39(5):1272-84.
386. Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, Darcha C, Chan CH, Stanners CP, et al. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med*. 2009 Sep 28;206(10):2179-89.

387. Abraham C, Cho JH. Bugging of the intestinal mucosa. *N Engl J Med.* 2007 Aug 16;357(7):708-10.
388. Neumaier M, Gaida FJ, Lewis MR, Hefta LJ, Shively LE, Raubitschek A, et al. A chimeric anti-CEA antibody with heavy interchain disulfide bonds deleted: molecular characterization and biodistributions in normal and tumor bearing mice. *Anticancer Res.* 1999 Jan-Feb;19(1A):13-21.
389. Stanners CP, editor. Contributions of the human CEA family to malignant transformation. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 1998.
390. Eidelman FJ, Fuks A, DeMarte L, Taheri M, Stanners CP. Human carcinoembryonic antigen, an intercellular adhesion molecule, blocks fusion and differentiation of rat myoblasts. *J Cell Biol.* 1993 Oct;123(2):467-75.
391. Screatton RA, Penn LZ, Stanners CP. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, cooperates with Myc and Bcl-2 in cellular transformation. *J Cell Biol.* 1997 May 19;137(4):939-52.
392. Taheri M, Saragovi HU, Stanners CP. The adhesion and differentiation-inhibitory activities of the immunoglobulin superfamily member, carcinoembryonic antigen, can be independently blocked. *J Biol Chem.* 2003 Apr 25;278(17):14632-9.
393. Ordonez C, Screatton RA, Ilantzis C, Stanners CP. Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Res.* 2000 Jul 1;60(13):3419-24.
394. Soeth E, Wirth T, List HJ, Kumbhani S, Petersen A, Neumaier M, et al. Controlled ribozyme targeting demonstrates an antiapoptotic effect of carcinoembryonic antigen in HT29 colon cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2001 Jul;7(7):2022-30.
395. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):677-84.

396. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):401-10.
397. Brown LF, Guidi AJ, Schnitt SJ, Van De Water L, Iruela-Arispe ML, Yeo TK, et al. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res*. 1999 May;5(5):1041-56.
398. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971 Nov 18;285(21):1182-6.
399. Mimouna S, Goncalves D, Barnich N, Darfeuille-Michaud A, Hofman P, Vouret-Craviari V. Crohn disease-associated *Escherichia coli* promote gastrointestinal inflammatory disorders by activation of HIF-dependent responses. *Gut Microbes*. 2011 Nov 1;2(6).
400. Ilantzis C, DeMarte L, Screatton RA, Stanners CP. Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia*. 2002 Mar-Apr;4(2):151-63.
401. Versalovic J, Koeuth T, McCabe ER, Lupski JR. Use of the polymerase chain reaction for physical mapping of *Escherichia coli* genes. *J Bacteriol*. 1991 Sep;173(17):5253-5.
402. Wang G, Whittam TS, Berg CM, Berg DE. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic Acids Res*. 1993 Dec 25;21(25):5930-3.
403. Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1990 Nov;172(11):6175-81.
404. Bidet P, Metais A, Mahjoub-Messai F, Durand L, Dehem M, Aujard Y, et al. Detection and identification by PCR of a highly virulent phylogenetic subgroup among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* B2 strains. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Apr;73(7):2373-7.

405. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Oct;66(10):4555-8.
406. Peres SY, Marches O, Daigle F, Nougayrede JP, Herault F, Tasca C, et al. A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol Microbiol.* 1997 Jun;24(5):1095-107.
407. Chan CH, Stanners CP. Novel mouse model for carcinoembryonic antigen-based therapy. *Mol Ther.* 2004 Jun;9(6):775-85.
408. Wadolkowski EA, Laux DC, Cohen PS. Colonization of the streptomycin-treated mouse large intestine by a human fecal *Escherichia coli* strain: role of adhesion to mucosal receptors. *Infect Immun.* 1988 May;56(5):1036-43.
409. Lapertosa G, Baracchini P, Fulcheri E, Tanzi R. Immunohistochemical study of carcinoembryonic antigen, epithelial membrane antigen, and secretory immunoglobulin system in the large bowel adenoma-carcinoma sequence. *Cancer Detect Prev.* 1986;9(5-6):469-76.
410. Nougayrede JP, Taieb F, De Rycke J, Oswald E. Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends Microbiol.* 2005 Mar;13(3):103-10.
411. Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA, Nougayrede JP, Oswald E. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. *J Clin Microbiol.* 2008 Dec;46(12):3906-11.
412. Blum G, Falbo V, Caprioli A, Hacker J. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and alpha-hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. *FEMS Microbiol Lett.* 1995 Feb 15;126(2):189-95.
413. Guyer DM, Kao JS, Mobley HL. Genomic analysis of a pathogenicity island in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: distribution of homologous sequences among

isolates from patients with pyelonephritis, cystitis, and Catheter-associated bacteriuria and from fecal samples. *Infect Immun.* 1998 Sep;66(9):4411-7.

414. De Rycke J, Milon A, Oswald E. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Vet Res.* 1999 Mar-Jun;30(2-3):221-33.

415. Pandey M, Khan A, Das SC, Sarkar B, Kahali S, Chakraborty S, et al. Association of cytolethal distending toxin locus *cdtB* with enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with acute diarrhea in Calcutta, India. *J Clin Microbiol.* 2003 Nov;41(11):5277-81.

416. Bielaszewska M, Fell M, Greune L, Prager R, Fruth A, Tschape H, et al. Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infect Immun.* 2004 Mar;72(3):1812-6.

417. Orth D, Grif K, Khan AB, Naim A, Dierich MP, Wurzner R. The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007 Nov;59(3):235-42.

418. Johnson TJ, DebRoy C, Belton S, Williams ML, Lawrence M, Nolan LK, et al. Pyrosequencing of the *Vir* plasmid of necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol.* 2010 Jul 29;144(1-2):100-9.

419. Kubben FJ, Peeters-Haesevoets A, Engels LG, Baeten CG, Schutte B, Arends JW, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a new marker to study human colonic cell proliferation. *Gut.* 1994 Apr;35(4):530-5.

420. Le Gouvello S, Bastuji-Garin S, Aloulou N, Mansour H, Chaumette MT, Berrehar F, et al. High prevalence of *Foxp3* and *IL17* in MMR-proficient colorectal carcinomas. *Gut.* 2008 Jun;57(6):772-9.

421. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA, Allan RN. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut*. 1994 Nov;35(11):1590-2.
422. Johansson ME, Larsson JM, Hansson GC. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4659-65.
423. Fusenig NE, Breitkreutz D, Boukamp P, Tomakidi P, Stark HJ. Differentiation and tumor progression. *Recent Results Cancer Res*. 1995;139:1-19.
424. Hammarstrom S, Baranov V. Is there a role for CEA in innate immunity in the colon? *Trends Microbiol*. 2001 Mar;9(3):119-25.
425. Leusch HG, Drzeniek Z, Markos-Pusztai Z, Wagener C. Binding of Escherichia coli and Salmonella strains to members of the carcinoembryonic antigen family: differential binding inhibition by aromatic alpha-glycosides of mannose. *Infect Immun*. 1991 Jun;59(6):2051-7.
426. Sauter SL, Rutherford SM, Wagener C, Shively JE, Hefta SA. Identification of the specific oligosaccharide sites recognized by type 1 fimbriae from Escherichia coli on nonspecific cross-reacting antigen, a CD66 cluster granulocyte glycoprotein. *J Biol Chem*. 1993 Jul 25;268(21):15510-6.
427. Majumdar SR, Fletcher RH, Evans AT. How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. *Am J Gastroenterol*. 1999 Oct;94(10):3039-45.
428. Erdman SE, Poutahidis T. Roles for inflammation and regulatory T cells in colon cancer. *Toxicol Pathol*. 2010 Jan;38(1):76-87.
429. Wang D, DuBois RN. Pro-inflammatory prostaglandins and progression of colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2008 Aug 28;267(2):197-203.

430. Biarc J, Nguyen IS, Pini A, Gosse F, Richert S, Thierse D, et al. Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S.bovis*). *Carcinogenesis*. 2004 Aug;25(8):1477-84.
431. Ellmerich S, Scholler M, Duranton B, Gosse F, Galluser M, Klein JP, et al. Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. *Carcinogenesis*. 2000 Apr;21(4):753-6.
432. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004 Jul;287(1):G7-17.
433. Hofseth LJ, Saito S, Hussain SP, Espey MG, Miranda KM, Araki Y, et al. Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jan 7;100(1):143-8.
434. Rachmilewitz D, Stamler JS, Bachwich D, Karmeli F, Ackerman Z, Podolsky DK. Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 1995 May;36(5):718-23.
435. Liu D, He Q, Liu C. Correlations among *Helicobacter pylori* infection and the expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in gastric mucosa with intestinal metaplasia or dysplasia. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Apr;25(4):795-9.
436. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 2005;69 Suppl 3:4-10.
437. Lax AJ, Thomas W. How bacteria could cause cancer: one step at a time. *Trends Microbiol*. 2002 Jun;10(6):293-9.
438. Horiguchi Y, Nakai T, Kume K. Effects of *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin on the structure and function of osteoblastic clone MC3T3-e1 cells. *Infect Immun*. 1991 Mar;59(3):1112-6.

439. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:247-69.
440. Bellovin DI, Simpson KJ, Danilov T, Maynard E, Rimm DL, Oettgen P, et al. Reciprocal regulation of RhoA and RhoC characterizes the EMT and identifies RhoC as a prognostic marker of colon carcinoma. *Oncogene.* 2006 Nov 2;25(52):6959-67.
441. Simpson KJ, Dugan AS, Mercurio AM. Functional analysis of the contribution of RhoA and RhoC GTPases to invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 2004 Dec 1;64(23):8694-701.
442. Fiorentini C, Matarrese P, Straface E, Falzano L, Fabbri A, Donelli G, et al. Toxin-induced activation of Rho GTP-binding protein increases Bcl-2 expression and influences mitochondrial homeostasis. *Exp Cell Res.* 1998 Jul 10;242(1):341-50.
443. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.* 1985 Jun 21;228(4706):1440-3.
444. Monni O, Joensuu H, Franssila K, Klefstrom J, Alitalo K, Knuutila S. BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 1997 Aug 1;90(3):1168-74.
445. Bronner MP, Culin C, Reed JC, Furth EE. The bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. *Am J Pathol.* 1995 Jan;146(1):20-6.
446. Huerta S, Goulet EJ, Livingston EH. Colon cancer and apoptosis. *Am J Surg.* 2006 Apr;191(4):517-26.
447. Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain. *Science.* 1998 May 15;280(5366):1036-7.
448. Ilantzis C, Jothy S, Alpert LC, Draber P, Stanners CP. Cell-surface levels of human carcinoembryonic antigen are inversely correlated with colonocyte differentiation in colon carcinogenesis. *Lab Invest.* 1997 May;76(5):703-16.

449. Rojas M, DeMarte L, Screaton RA, Stanners CP. Radical differences in functions of closely related members of the human carcinoembryonic antigen gene family. *Cell Growth Differ.* 1996 May;7(5):655-62.
450. Wirth T, Soeth E, Czubayko F, Juhl H. Inhibition of endogenous carcinoembryonic antigen (CEA) increases the apoptotic rate of colon cancer cells and inhibits metastatic tumor growth. *Clin Exp Metastasis.* 2002;19(2):155-60.
451. Frangsmyr L, Baranov V, Hammarstrom S. Four carcinoembryonic antigen subfamily members, CEA, NCA, BGP and CGM2, selectively expressed in the normal human colonic epithelium, are integral components of the fuzzy coat. *Tumour Biol.* 1999 Sep-Oct;20(5):277-92.
452. Billker O, Popp A, Brinkmann V, Wenig G, Schneider J, Caron E, et al. Distinct mechanisms of internalization of *Neisseria gonorrhoeae* by members of the CEACAM receptor family involving Rac1- and Cdc42-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 2002 Feb 15;21(4):560-71.
453. Fahlgren A, Baranov V, Frangsmyr L, Zoubir F, Hammarstrom ML, Hammarstrom S. Interferon-gamma tempers the expression of carcinoembryonic antigen family molecules in human colon cells: a possible role in innate mucosal defence. *Scand J Immunol.* 2003 Dec;58(6):628-41.
454. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009 May;9(5):361-71.
455. Bernstein C, Holubec H, Bhattacharyya AK, Nguyen H, Payne CM, Zaitlin B, et al. Carcinogenicity of deoxycholate, a secondary bile acid. *Arch Toxicol.* 2011 Aug;85(8):863-71.

Annexes



Annexe 1 : tampons et solutions pour ELISA sandwich

Tampon de coating :

3,2 mM Na₂HPO₄ 3,2 mL de 100 mM

0,5 mM KH₂PO₄ 0,5

1,3 mM KCl 1,3

135 mM NaCl 13,5 mL de 1M

QSP 100 (81,5) mL PBS, pH = 7,4

Tampon de lavage :

PBS + 0,05% Tween 20

Solution de blocage :

1 % BSA dans du tampon de lavage.

Solution stock de TMB :

50 mg dans 5 mL DMSO (4°C, noir)

Tampon d'acétate de sodium :

6,8 g d'acétate de sodium qsp 500mL dH₂O, pH = 6,0

Solution de développement :

11 mL d'acétate de sodium + 11 µL H₂O₂ + 110 µL TMB stock

Solution stop :

1 mL H₂SO₄ + 18 mL dH₂O

Annexe 2 : tampon d'hybridation pour FISH

0.9M NaCl

100 mM Tris HCl

0.1% SDS

30% formamide

pH 7.2

Annexe 3 : Tampon de lavage

0.9M NaCl

100 mM Tris HCl

pH 7.2

Annexe 4 : séquences des amorces pour PCR

- 26S : sens 5'-TGT-CAT-TCG-GAA-CAT-TGT-AG-3'

 antisens 5'-GGC-TTT-GGT-GGA-GGT-C-3'

- PCNA sens 5'-CCA-CAT-TGG-AGA-TGC-TGT-TG-3'

 antisens 5'-CAG-TGG-AGT-GGC-TTT-TGT-GA-3'

Température d'hybridation = 58°C

Annexe 5 : tableau récapitulatif des clones de *E. coli* isolés de prélèvements DIV et CCR.Clones de *E. coli* isolés de patients CCR (côlon proximal) :

Patient	Localisation	Souche de <i>E. coli</i>	Phylogroupe	Effets cytopathiques			Gènes codant une CM			
				hémolysine	pkc-cif	cdt-cnf	<i>pkc</i>	<i>cnf</i>	<i>cdt</i>	<i>cif</i>
15	CCR prox	CFF15-3C4	B1	-	-	-	-	-	-	-
		CFF15-4A9	B2	-	-	-	-	-	-	-
16	CCR prox	CFF16-2F8	B2	+	NA	+	+	<i>cnf1</i>	<i>cdtIV</i>	-
		CFF16-2G3	B1	-	-	-	-	-	-	-
		CFF16-2G5	A	-	-	-	-	-	-	-
37	CCR prox	CFF37-2G2	B2	+	NA	-	-	-	-	-
43	CCR prox	CFF43-6B1	B1	-	-	-	-	-	-	-
44	CCR prox	CFF44-6C12	A	-	-	-	-	-	-	-
		CFF44-6C10	A	-	-	-	-	-	-	-
56	CCR prox	CFF56-8F1	B2	+	NA	+	-	<i>cnf1</i>	-	-
		CFF56-8F8	A	-	-	-	-	-	-	-
62	CCR prox	CFF62-10C5	A	-	-	+	-	-	<i>cdtIV</i>	-
		CFF62-10D8	D	+	NA	-	-	-	-	-
		CFF62-10D12	B2	-	+	-	+	-	-	-
82	CCR prox	CFF82-11F1	B2	-	-	-	-	-	-	-
83	CCR prox	CFF83-11G5	B2	-	+	-	+	-	-	-
85	CCR prox	CFF85-11H5	D	-	-	-	-	-	-	-
87	CCR prox	CFF87-12B1	B2	+	NA	+	+	<i>cnf1</i>	-	-
107	CCR prox	CFF107-13H2	B2	+	NA	+	+	<i>cnf1</i>	-	-
		CFF107-13H4	B1	+	NA	-	-	-	-	-
119	CCR prox	CFF119-14G4	D	-	-	-	-	-	-	-
120	CCR prox	CFF120-14H2	B1	-	-	-	-	-	-	-
		CFF120-14H2	B2	-	-	-	+	-	-	-
130	CCR prox	CFF130-16C1	B2	-	+	-	+	-	-	-
138	CCR prox	CFF138-18C3	B2	+	NA	+	+	<i>cnf1</i>	-	-
		CFF138-18C5	B2	-	-	-	-	-	-	-
144	CCR prox	Aucun								
149	CCR prox	CFF149-18H5	B2	-	+	-	+	-	-	-
151	CCR prox	CFF151-19B8	A	-	+	-	-	-	-	+
		CFF151-19C3	A	-	-	-	-	-	-	-
152	CCR prox	CFF152-19D1	B1	-	+	-	-	-	-	+
		CFF152-19D12	B2	+	NA	+	+	<i>cnf1</i>	-	-
153	CCR prox	CF153-19 ^{F5}	A	-	-	-	-	-	-	-

Clones de *E. coli* isolés de patients CCR (côlon distal) :

Patient	Localisation	Souche de <i>E. coli</i>	Phylogroupe	Effets cytopathiques				Gènes codant une CM			
				hémolyse	pks-cif	cdt-cnf	comètes	<i>pks</i>	<i>cnf</i>	<i>cdt</i>	<i>cif</i>
1	CCR dist ¹	CFF1-7G2	B2	+	NA ²	+	NA	+	<i>cnf1</i>	-	-
		CFF1-7G1	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
		CFF1-7G4	A	-	-	-	-	-	-	-	-
3	CCR dist	CFF3-1F8	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
8	CCR dist	CFF8-2D5	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
		CFF8-2D8	A	-	-	-	+	-	-	-	-
		CFF8-2D9	B1	-	-	+	ND ²	-	<i>cnf2</i>	<i>cdtIII</i>	-
		CFF8-2D10	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		CFF8-2E2	A	-	-	-	-	-	-	-	-
14	CCR dist	CFF14-1C12	B2	+	NA	+	NA	+	<i>cnf1</i>	-	-
		CFF14-1D2	B2	-	-	-	ND	+	-	-	-
18	CCR dist	CFF18-3D2	D	-	-	-	-	-	-	-	-
		CFF18-4B7	A	-	-	-	ND	-	-	-	-
		CFF18-3D5	A	-	-	-	+	-	-	-	-
31	CCR dist	CFF31-6G11	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
		CFF31-6G2	D	-	-	-	-	-	-	-	-
		CFF31-6G9	D	-	-	-	-	-	-	-	-
		CFF31-6G8	B2	+	NA	+	NA	+	<i>cnf1</i>	-	-
		CFF31-6G10	B2	-	-	+	ND	-	-	<i>cdtIV</i>	-
32	CCR dist	CFF32-6A8	B2	+	NA	+	NA	+	<i>cnf1</i>	-	-
53	CCR dist	CFF53-8A1	D	-	-	-	+	-	-	-	-
		CFF53-8A9	B2	+	NA	-	NA	+	-	-	-
		CFF53-8A10	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
68	CCR dist	CFF68-10E8	D	-	-	-	+	-	-	-	-
		CFF68-10E9	B2	+	NA	+	NA	+	<i>cnf1</i>	-	-
117	CCR dist	CFF117-17G2	D	-	-	-	+	-	-	-	-
		CFF117-17G3	B2	+	NA	+	NA	-	<i>cnf1</i>	-	-
		CFF117-17G7	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
142	CCR dist	CFF142-18B1	A	-	-	-	-	-	-	-	
150	CCR dist	CFF150-19A4	D	-	-	-	-	-	-	-	
158	CCR dist	CFF158-19G1	B2	-	+	-	ND	+	-	-	-
159	CCR dist	CFF159-19H2	B2	+	NA	+	NA	+	<i>cnf1</i>	<i>cdtIV</i>	-
		CFF159-19H4	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
162	CCR dist	CFF162-20B4	D	-	-	-	-	-	-	-	-
		CFF162-20B6	B2	+	NA	+	NA	+	<i>cnf1</i>	-	-
163	CCR dist	CFF163-20C1	A	-	+	-	ND	-	-	-	+
		CFF163-20C3	B2	-	+	+	ND	+	-	<i>cdtI</i>	-
164	CCR dist	CFF164-20D5	B2	+	NA	-	NA	+	-	-	-

Clones de *E. coli* isolés de patients DIV :

Patient	Localisation	Souche de <i>E. coli</i>	Phylogroupe	Effets cytopathiques			Gènes codant une CM			
				hémolyse	pks-cif	cdt-cnf	<i>pks</i>	<i>cnf</i>	<i>cdt</i>	<i>cif</i>
5	DIV ⁴	CFF5-3B1	A	-	-	-	-	-	-	-
		CFF5-3B3	D	-	-	-	-	-	-	-
13	DIV	CFF13-1A9	D	-	-	-	-	-	-	-
17	DIV	Aucun								
22	DIV	CFF22-1D5	B2	-	-	-	-	-	-	-
29	DIV	Aucun								
30	DIV	CFF30-3F4	A	-	-	-	-	-	-	-
		CFF30-3E12	D	-	-	-	-	-	-	-
42	DIV	CFF42-4D5	B2	+	NA	+	+	<i>cnf1</i>		-
		CFF42-3F11	A	-	-	-	-	-	-	-
49	DIV	CFF49-4E5	D	-	-	-	-	-	-	-
		CFF49-4E12	A	-	-	-	-	-	-	-
51	DIV	CFF51-7E8	A	-	-	-	-	-	-	-
		CFF51-7E11	D	-	-	-	-	-	-	-
63	DIV	CFF63-9D7	B2	-	-	-	-	-	-	-
		CFF63-9D5	D	-	-	-	-	-	-	-
65	DIV	CFF65-9F1	B2	-	-	-	-	-	-	-
		CFF65-9F4	B2	-	-	-	-	-	-	-
67	DIV	CFF67-9H1	D	-	-	-	-	-	-	-
		CFF67-9H5	D	-	-	-	-	-	-	-
73	DIV	CFF73-12H1	B2	-	-	-	+	-	-	-
		CFF73-12H2	A	-	-	-	-	-	-	-
		CFF73-12H11	D	-	-	-	-	-	-	-
74	DIV	Aucun								
77	DIV	CFF77-11C4	A	-	-	-	-	-	-	-
79	DIV	CFF79-11D3	D	-	-	-	-	-	-	-
		CFF79-11D9	B2	+	NA	+	+	<i>cnf1</i>	-	-
96	DIV	CFF96-18E2	B1	-	-	-	-	-	-	-
		CFF96-18E6	B2	+	NA	-	+	<i>cnf1</i>	-	-
99	DIV	CFF99-13D1	B2	+	NA	+	+	<i>cnf1</i>	-	-
		CFF99-13D5	A	-	-	-	-	-	-	-
103	DIV	CFF103-13E3	A	-	-	-	-	-	-	-
		CFF103-13E6	A	-	-	-	-	-	-	-
		CFF103-13E9	A	-	-	-	-	-	-	-
		CFF103-13E11	A	-	-	-	-	-	-	-

109	DIV	Aucun								
110	DIV	CFF110-17C1	B2	-	-	-	-	-	-	-
		CFF110-17C7	A	-	-	-	-	-	-	-
112	DIV	CFF112-17F2	B2	-	-	-	-	-	-	-
113	DIV	CFF113-17E1	B2	-	-	-	-	-	-	-
116	DIV	Aucun								
121	DIV	CFF124-15C1	B2	-	-	-	-	-	-	-
		CFF124-15F5	D	-	-	-	-	-	-	-
124	DIV	CFF124-16G2	B1	-	-	-	-	-	-	-
		CFF124-17H1	B1	+	-	-	-	-	-	-
125	DIV	Aucun								
126	DIV	CFF126-15H2	A	-	-	-	-	-	-	-
127	DIV	CFF127-16A4	B2	-	+	-	+	-	-	-
		CFF127-16A8	B2	-	-	-	-	-	-	-
147	DIV	CFF147-18G3	A	-	-	-	-	-	-	-
		CFF147-18G9	A	-	-	-	-	-	-	-
154	DIV	CFF154-20E2	A	-	-	-	-	-	-	-

¹, CCR de localisation distale; ², Non applicable; ³, CCR de localisation proximale ; ⁴ diverticulose

Annexe 6 : publication n°1 (soumise) :

**High prevalence of cyclomodulin- and genotoxin-producing *E. coli*
associated with colon tumors**

Dubois D.^{1,2*}, Buc E.^{1,3*}, Sauvanet P.^{1,3}, Delmas J.^{1,2}, Darfeuille-Michaud A.¹, Pezet D.^{1,3*}
and Bonnet R.^{1,2*}

1. Microbes, intestin, inflammation et susceptibilité de l'hôte (M2iSH), UMR Inserm U1071, Clermont Université, USC-INRA 2018, Clermont-Ferrand, France
2. Laboratoire de Bactériologie, Faculté de Médecine, Centre Hospitalier Universitaire, Clermont-Ferrand, France
3. Service de Chirurgie digestive, Faculté de Médecine, Centre Hospitalier Universitaire, Clermont-Ferrand, France

*, These authors contributed equally to this work

Abstract

Some *Escherichia coli* isolates produce toxins (Colibactin, CDT, CNF and Cif) designated cyclomodulins (CMs) which interfere with the eukaryotic cell cycle of host cells, suggesting a possible link between these bacteria and cancers as previously observed for *Helicobacter pylori* producing the cyclomodulin CagA. However, no data are available about the colonization of tumors and cyclomodulin-producing and genotoxic *E. coli*. We did a quantitative and phylogenetic analysis of *E. coli* isolates harboring cyclomodulin-encoding genes from distal (n=17) and proximal (n=21) colon tumors from patients with colorectal cancer and from mucosa of controls (n = 31). The functionality of these genes was investigated on cell cultures and the genotoxic activity of strains devoid of known CM-encoding gene was investigated by single-cell gel electrophoresis. Results showed a higher prevalence of B2 phylogroup *E. coli* harboring the Colibactin-producing genes and CNF1- or CDT-encoding genes in biopsies of patients with colorectal cancer than in those of controls ($p \leq 0.01$), especially in those collected from distal colon tumor. Functional analysis revealed that the majority of these virulence genes were functional. In addition, 23.8% *E. coli* strains isolated from distal colon tumors induced DNA damage *in vitro* although no known genotoxin-encoding genes were detected within. Surprisingly, these strains did not belong to B2 phylogroup but to D or A *E. coli* phylogroups. Overall, the present epidemiologic study shows that cyclomodulin-producing and genotoxic *E. coli* colonize the colonic mucosa of patients with colorectal cancer. Although most known cyclomodulins are observed in *E. coli* strains belonging to B2 phylogroup, *E. coli* strains of A and D phylogroup may not be harmless and deserve further studies since they could also be involved in carcinogenesis.

Introduction

Colorectal cancer is currently the third most common cancer in men and women, and the fourth leading cause of cancer death worldwide, with 1.2 million estimated cases and 609,000 estimated deaths in 2008¹. Colorectal cancer mainly occurs sporadically and its hereditary or family trait is found in only 5% of cases². Colorectal cancer is therefore thought to be strongly associated with environmental exposures including bacteria that contribute significantly to the colonic environment. Evidence has accumulated showing that the composition of human intestinal microbiota influences host health status. Microbial dysbiosis is observed in colorectal cancer patients and evidence of bacterial interactions in colorectal cancer has been reported for *Streptococcus bovis*, *Helicobacter pylori*, *Bacteroides spp.* and *Escherichia coli* (for a review Collins et al. 2011³). Various studies clearly demonstrate a link between mucosally adherent *E. coli* and colon cancer. Studies on cancer patients in the UK and Germany revealed that mucosa-associated bacteria are more frequently identified in colon tissue from patients with adenocarcinomas than in controls^{4,5}. Swidsinski *et al.* reported that only 3% of colon mucosa biopsies from asymptomatic controls tested were positive for bacteria. In contrast, biopsies from 92% of patients with colonic adenomas or carcinomas held bacteria, with *E. coli* being predominant in 70% of patients⁴. Similarly, Martin *et al.* found that 70% of colorectal cancer patients had mucosa-associated bacteria, and that a significant proportion of the bacterial isolates belonged to the *E. coli* species⁵. Whether the relationship between abnormally high numbers of *E. coli* and colorectal cancer is a cause or effect of carcinogenesis is an important question that is yet to be resolved. Indeed cellular proliferation might be triggered by *E. coli* strains producing cyclomodulins⁶ or bacterial toxins, as shown for toxigenic *Bacteroides fragilis*^{7,8}.

E. coli is the predominant aero-anaerobic Gram-negative species of the normal intestinal flora and participates in promoting the stability of the luminal microbial flora and maintaining

normal intestinal homeostasis⁹. As a commensal, *E. coli* coexists with its mammalian host in good harmony and rarely causes disease. However, some strains carry a combination of virulence genes enabling them to cause intestinal (InPEC) and extra-intestinal (ExPEC) infections (for reviews see¹⁰⁻¹²). The *E. coli* population includes four major phylogroups (A, B1, B2, and D). Pathogenic strains belong mainly to groups B2 and D, while most fecal isolates belong to groups A and B1. Strains of groups B2 and D often carry virulence factors that are lacking in group A and B1 strains¹³⁻¹⁶.

Among *E. coli* virulence factors, several toxins called cyclomodulins are attracting growing attention because they are genotoxic and/or modulate cellular differentiation, apoptosis, and proliferation (for a review³). Cytotoxic necrotizing factor (CNF) activates Rho GTPases, which leads to cytoskeletal alterations and affects the cell cycle. The cycle-inhibiting factor (CIF) target NEDD8-conjugated cullins to hijack host-cell signaling pathways^{17,18}. The genotoxin Colibactin is a hybrid polyketide-non ribosomal peptide compound¹⁹. Its biosynthesis machinery is encoded by the *pks* genomic island, which causes DNA double-strand breaks and a chromosomal instability in human eukaryotic cells upon infection^{19,20}. The protein cytolethal distending toxins (CDT) also induce DNA damage probably through DNase activity, and a close related enzyme produced by *Helicobacter hepaticus* promotes the progression of infectious hepatitis to pre-malignant, dysplastic lesions and increased proliferation of hepatocytes, providing the first evidence that CDT has carcinogenic potential *in vivo*²¹⁻²³. These cyclomodulins are mainly produced by *E. coli* strains belonging to the B2 phylogroup.

In the present study, our aim was to characterize the *E. coli* population associated with colonic mucosa of patients with colorectal cancer and that of controls in order to define whether a different *E. coli* population is associated with colorectal cancer. We also investigated for the presence of *E. coli* cyclomodulin-encoding genes and *E. coli*-mediated

cytopathic effect on host cells of whom DNA damage induced by *E. coli* devoid of known genotoxin.

Material and methods

Patients. Sixty-nine patients were studied between March 2007 and November 2009 at the university hospital of Clermont-Ferrand, France, 39 with colorectal cancer, and 30 control patients with diverticulosis. Sex ratio was 1.05 and 0.72 for colorectal cancer and diverticulosis patients respectively. The age range was 35-95 years for cancer patients (median age, 71 years and average age, 67 years) and 34-81 years for controls (median age, 58 years and average age, 60 years). Biopsies were taken at resection. The colorectal cancer series comprised 21 proximal colon samples and 17 distal colon samples. Bowel preparation was by oral sodium picosulfate or oral polyethylene glycol. All resection patients had received cefoxitin (2 g intravenously) at the time of incision and none had received antibiotics in the 4 weeks before sampling. Ethical approval for the study was granted by the Clermont-Ferrand Research Ethics Committee.

Biopsy treatment. The mucosal biopsy specimens were placed in 10 mL of sterile phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) and transported on ice to the laboratory. The samples were weighed (50 to 100 mg each) and washed three times in 10 mL PBS, crushed (Ultra-Turrax, IKA) and incubated for 15 minutes in the presence of Triton 0.1X. Tenfold dilutions of the lysate were then plated on Drigalski agar and chromogenic agar chromID CPS3® (bioMérieux). The colony forming units (CFUs) were counted after 24 hours of incubation at 37°C. The corresponding bacteria were identified using the chromogenic agar chromID® CPS3 (bioMérieux, France) and the automated Vitek II® (bioMérieux) system as second line. The isolates were subcultured for 24 hours at 37°C in 96-well plates in Luria Bertani medium, supplemented with 15% glycerol and then stored at -80°C. At least 10 *E. coli* isolates per sample were collected for subsequent studies.

Molecular typing and phylogenetic grouping. Two genotyping methods were used for determining clonality of *E. coli* isolates: an “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus” sequence (ERIC)-PCR using primer ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3 ') and a “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD)-PCR using primer 1283 (5'-GCG ATC CCC A-3 ')^{24,25}. For each clone, one representative isolate was subsequently analysed and stored at -80°C in Luria-Bertani medium supplemented with 15% glycerol. *E. coli* strains were then classified according to the *E. coli* Reference Collection (ECOR) system²⁶ into phylogenetic groups A, B1, B2, and D using a multiplex PCR technique²⁷. Strain RS218, which harbors all the genes targeted by the multiplex PCR, was used as positive control.

Detection and identification of cyclomodulin-producing genes. Cyclomodulin-encoding genes were detected by dot-blot DNA hybridization experiments. The probes were obtained by PCR as previously described²⁸ using the PCR DIG probe synthesis kit (Roche Applied Sciences, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Two-microgram DNA samples were fixed onto positively charged nylon membranes by UV illumination for 20 min. Hybridization was performed using the Roche labeling and detection kit (Roche Applied Sciences) as indicated by the manufacturer. Each spot was checked with a 16S rRNA gene probe. The *pks* island, which contains the colibactin-producing gene cluster, was screened with a probe overlapping the *clbK* and *clbJ* genes. The *cnf* genes were detected with a mixture of probes specific to *cnf1*, *cnf2*, and *cnf3*. The *cdtB* genes were detected by two hybridization experiments with the *cdtB-II-cdtB-III* and *cdtB-I-cdtB-IV* probe mixtures. The *cif* gene was detected using an internal specific probe. The sensitivities and specificities of the probes were checked on each membrane by spotting DNA extracts of all cyclomodulin control strains. Positive hybridizations with a cyclomodulin probe were subjected to confirmatory PCR assays as previously reported²⁸. The reaction mixture contained 50 ng DNA sample, 0.2 mM each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.4 μM each primer, 3 mM MgCl₂, and 1.0 U

RedGoldStar DNA polymerase (Eurogentec, Belgium) in the corresponding reaction buffer. Primers located in the 5' and 3' regions of the pks island (the *clbA* and *clbQ* genes) were used to confirm the full presence of the colibactin-producing island.

Cytopathic assays. The cytopathic effects of CNF and CDTs were investigated in all strains, and those of colibactin and Cif were investigated in non-hemolytic strains, as previously described²⁹. Briefly, the effects of CDT and CNF were detected by a cell-lysate-interacting test. After a 48-h culture at 37°C with shaking in Luria-Bertani broth medium, bacterial cells were sonicated and sterile filtered separately using 0.22- μ m-pore-size filters. HeLa cells were treated with the sterile sonicated lysates until analysis. The effects of colibactin and Cif were detected by a cell-bacterium-interacting test, which was based on the interaction between HeLa cells and bacteria. Overnight Luria-Bertani broth cultures of *E. coli* were diluted in interaction medium, and HeLa cell cultures were infected at multiplicities of infection (MOI, numbers of bacteria per cell at the onset of infection) of 100 and 200. Cells were washed 4 h after inoculation and were incubated in cell culture medium with 200 μ g/ml gentamicin until analysis. After 72 h of incubation at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere, the medium was removed by several washes of the HeLa cell monolayers. The morphological changes characteristic of CDT, CNF, colibactin, and Cif were observed after staining with Giemsa stain. The detection of alpha-hemolysin was performed for all strains studied by overnight growth at 37°C on Columbia sheep blood (5%) agar (Oxoid, Dardilly, France). *E. coli* 25922 (ATCC) was used as the reference strain.

Single-cell gel electrophoresis. HeLa cell cultures were infected at MOI of 500 with *E. coli* cultured overnight in Luria-Bertani broth. Cells were washed twice 3 h after inoculation and were incubated overnight in cell culture medium with 200 μ g/ml gentamicin at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. The cells were washed with PBS medium and combined with 0.5% low-melting-point agarose (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France) dissolved in sterile PBS at

37°C. The cell-agarose mixture was applied to a microscope slide precoated with 1.5% normal-melting-point agarose (Molecular Biology Grade, Bio-Rad) dissolved in sterile PBS at 37°C. A cover slip was applied and allowed to solidify at 4°C for 60 min. Slides were then placed in 50 mL lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA containing 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) for 2h at 4°C in the dark. Slides were immersed in electrophoresis buffer (1mM EDTA 300 mM NaOH pH 13) for 1h at 4°C and an electric field was applied (1V/cm) for 40 minutes. The slides were neutralized with 400mM Tris-HCl pH 7.5 and dried. 40µl of a 1:10,000 dilution of SybrGreen was applied directly to the slide. Individual cells or comets were viewed by Zeiss Axioplan2 fluorescence microscope. The B2 *E. coli* strain IHE3034 and *E. coli* DH10β pBACpks were used as positive controls¹⁹. The B2 *E. coli* strain IHE3034 Δ*clbP* and *E. coli* DH10β pBAC were used as negative controls¹⁹.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using the Fisher exact and chi-square tests. For multiple-group comparisons, an initial chi-square test for heterogeneity was done, and only if this yielded a P value of <0.05 were the individual pairwise comparisons tested.

Results

E. coli isolates in colon tumors and control samples

The analysis of *E. coli* associated with the colonic mucosa of patients with colorectal cancer and those of controls indicated that the number of samples without *E. coli* isolate in our study was significantly higher in controls than in patients with colorectal cancer (19.4% versus 2.6%, $p = 0.04$, table 1). Most *E. coli* clones isolated from tumors belonged to the B2 phylogroup in contrast to those isolate from controls (73.7% versus 41.9%, $p < 0.01$, table 2). No difference in *E. coli* phylogroup distribution was observed for the strains isolated from proximal and distal colon tumors (82.4% versus 66.7% B2 *E. coli*, $p=0.23$, table 2). This suggests that *E. coli* isolates belonging to the B2 phylogroup colonize colon tumors more frequently than control samples. Of note, many colonic specimens harbored only one *E. coli* clone. This was observed in 42.1% of colonic specimens from patients with colorectal cancer and only 25.8% of specimens from controls but the difference was not significant ($p=0.12$, table 1).

Distribution of CM-encoding genes according to E. coli phylogenetic groups

The distribution of CM-encoding genes in *E. coli* isolates is shown in table 3 and the supplemental tables 4 to 6. The most frequent trait was *pks* island (80% of CM-producing *E. coli* and 23.2% of total *E. coli* isolates). Compared to B2 *E. coli* strains isolated from urinary tract infection harboring the *pks* island²⁸, all strains associated with the colonic mucosa of patients with colorectal cancer or controls harboring the *pks* island belonged to phylogroup B2 ($p < 0.001$ for group B2 versus groups A, B1 and D, individual or combined). In addition, 16.4% of colonic isolates possessed the *cnf* gene; of these only one was *cnf2*-positive and none was *cnf3*-positive, indicating that these strains were not of animal origin^{30,31}. All *cnf1*-

harboring strains belonged also to phylogroup B2, and accounted for 36.7% of isolates of this phylogroup. As for the *pks* island, the association *cnf1* with phylogroup B2 was strong ($p < 0.001$ for group B2 *versus* groups A, B1 and D, individual or combined) and 33% of B2 isolates possessed both the *pks* island and the *cnf1* gene ($p < 0.001$ for group B2 *versus* groups A, B1 and D, individual or combined), as previously observed^{28,32}. All but three strains harboring *cnf1* gene exhibited the alpha-hemolytic phenotype. The three non-hemolytic *cnf1*-positive isolates harbored nevertheless *hlyC* gene. The *cdt* genes were observed in 5.2% of colonic isolates. Although 66.7% of *cdt*-positive strains belonged to phylogroup B2, no significant association with a particular phylogenetic group was observed, even with the different *cdtB* gene subtypes. *cdtB-I/cdtB-IV* genes (n=5) were more frequently observed than those of the *cdtB-II/cdtB-III/cdtB-V* gene group (n=1). The only *cdt-III*-positive isolate also harbored the *cnf2* gene, a combination of genes frequently reported in the pVir plasmid and mainly seen in isolates of bovine origin^{30,33}. The *cdtB* genes showed no particular association with the *pks* island or the *cnf1* gene. Since *cdt* genes have been extensively studied in Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strains³⁴⁻³⁶, it was decided to investigate *cdtB*-positive strains for *stx* and *eae* genes. No *stx* or *eae* gene was detected in *cdtB*-positive isolates. The *cif* gene was detected in three strains that belonged to phylogroups A (n = 1) and B1 (n = 2) and harbored no other CM-encoding genes. CIF is an effector of the type 3 secretion system encoded by the locus of enterocyte effacement (LEE) observed in EPEC and EHEC^{37,38} and the three positive isolates in this study possessed the *eae* gene but neither *stx1* nor *stx2* genes, and therefore belonged to the EPEC pathotype.

Phenotypic detection of cyclomodulins

The cytopathic phenotypes induced by CMs was identified for all isolates including those harboring CM combinations, except for one strain containing the *pks* island and the *cdt-I*

gene. CMs encoded by *pks* island or *cdt-I* gene induce similar cytopathic effects in bacterial-cell culture interaction test. Thus, we were not able to assert that the *pks* island or *cdt* genes of this strain were functional. In contrast, the strain harboring *cnf2* and *cdt-III* genes exhibited a characteristic cytopathic effect of both CNF and CDT toxins (cell multinucleation and wide megalocytosis, respectively). A characteristic cytopathic effect of CIF was observed for the two isolates harboring the cognate gene. The results are given in table S4. We were not able to investigate the cytopathic phenotypes induced by a large number of *cdt*- and/or *pks*-harboring strains because of alpha-hemolysin production. However, three strains harboring a *pks* island isolated from control, distal and proximal colon specimens were nonfunctional and two *cdt*-positive strains showed no characteristic cytopathic effect. One strain isolated from a control had a nonfunctional *cnf1* gene. Overall, all strains inducing cytopathic effect harbored a gene encoding a CM and most CM-encoding genes were functional, notably *cnf* and *cif* (93% and 100% respectively).

Presence of CM-encoding genes and E coli-induced host cell genotoxicity

The distribution of CM-encoding genes was analyzed according to the physiological context (supplemental tables 4 to 6 and table 7). CM-positive *E. coli* were preferentially observed in colon tumors (65.8% versus 19.4% for controls, $p < 0.01$), especially in distal colon tumors (76.5% versus 57.1% for proximal colon tumors). The *pks* island and, to a lesser extent, *cnf* and *cdt* genes were significantly more prevalent in the colon tumors than in the control samples (55.3% versus 19.3%, $p < 0.01$, 39.5% versus 12.9%, $p = 0.01$ and 15.8% versus 0.0%, $p = 0.02$ respectively). This difference was mainly due to the high prevalence of CM-positive *E. coli* in the distal colon tumors (*pks* prevalence: 64.7% versus 19.3% $p < 0.01$; *cnf* prevalence: 52.9% versus 12.9% $p < 0.01$ and *cdt* prevalence: 23.5% versus 0.0%, $p = 0.01$). In contrast, the prevalence of *cnf* and *cdt* in proximal colon tumors and controls was not significantly different (28.6% versus 12.9% $p = 0.28$ and 23.5% versus 0% $p = 0.16$,

respectively). Altogether, these results indicate that CM-positive *E. coli* distribution is different according to the physiological context, i.e. proximal or distal colon.

Because CM-encoding genes were observed in *E. coli* of the B2 phylogroup isolated mainly from distal colon tumors, we investigated whether *E. coli* devoid of known CM-encoding genes and belonging to the others phylogroups (A, D and B1) can also induce DNA damage in host cells. Using HeLa cultured cells, we performed a single-cell gel electrophoresis assay (or comet assay), the state-of-the-art technique for detecting DNA damage caused by chemical genotoxins. The *E. coli* strains DH10 β pBACpks and IHE3034 harboring the genotoxic-mediated gene *pks* were used as positive control, and the defective isogenic mutant IHE3034 Δ *clbP* and *E. coli* DH10 β pBAC as negative controls. Interestingly, *E. coli* strains devoid of known CM-encoding genes induced the formation of comets with a distinct head, comprising intact DNA and a tail, which consisted of broken pieces of DNA (Figure 1). Such comets, which are typical of host cell DNA damage were observed in 23.8% of *E. coli* strains (n=5/21). Interestingly, in contrast to most other CM-producing *E. coli* strains, which belong mainly to the B2 phylogroup, these comet positive strains belonged to D (n=3/8) and A (n=2/6) phylogroups (supplemental table S4).

Discussion

The study of colonic mucosa-associated *E. coli* from patients with colorectal cancer or from controls indicated that (i) *E. coli* isolates belonging to the B2 phylogroup colonized colon tumors more frequently than control samples, (ii) the CM-encoding genes were overrepresented in tumors, especially *pks* island, *cnf1* and *cdt* gene, (iii) the distal colon tumors were more frequently colonized by B2 *E. coli* producing CMs than the control samples, and (iv) 23.8% of *E. coli* isolated from the distal colon tumors induced host cell DNA damage despite being devoid of known CM-encoding genes.

The *E. coli* strains of the B2 phylogroup are mostly involved in extra-intestinal infections, such as urinary tract infections. They produce numerous virulence factors notably pili adhesins, which favor colonization of the urinary tract. We can speculate that such adhesins or adhesins specifically found in B2 *E. coli* may also favor the colonization of colon tumors. Accordingly, Martin et al previously reported that *E. coli* strains isolated from colorectal tumors frequently expressed hemagglutinins, which favor adhesion to intestinal embryonic cell cultures (I407), and to colon adenocarcinoma cells (HT29)⁵. One explanation of the high prevalence of B2 *E. coli* in tumors could be that changes in the host mucosa receptor repertoire have an effect on the bacterial population associated with mucosa. A higher level of colonization with B2 *E. coli* has also been observed in inflammatory bowel disease (IBD)³⁹. In Crohn's disease patients, such colonization was accompanied to increased ileal expression of the glycoprotein CEACAM6, which acts as a receptor for type 1 pili produced by *E. coli*^{40,41}. Interestingly, Crohn's disease-associated B2 *E. coli* strains can induce the expression of CEACAM6 in intestinal epithelial cells, and yet CEACAM6 is a human tumor marker, whose overexpression has been observed in colonic tumors^{42,43}. The higher prevalence of B2 *E. coli*

strains in patients with colorectal cancer is associated to increased expression of CEACAM6 (Buc *et al.* manuscript in preparation).

The high prevalence of CM-encoding genes in colon tumors suggests a possible role of CM-encoding *E. coli* in the development of colon tumor. It is well established that *pks*-harboring *E. coli* strains are mutagenic and genotoxic *in vitro* and *in vivo*^{19,20}. In addition, transient infection of human cell lines by such strains induces anchorage-independent colony formation²⁰, a process involved in colorectal cancer metastases. Because of these mutagenic and cell transformation activities, *E. coli* strains harboring the *pks* island may affect carcinogenesis at different stages. Cdt also induces DNA breaks in eukaryotic cells²³. The presence of *cdt* positive strains have already been associated with some lymphomas of the small intestine and can promote the development of hepatic and colon tumors^{22,44-47}. CNF promotes cell proliferation by activating the Rho-GTPases and stimulates the transition from G₁ to S phases⁴⁸. In addition, CNF1 inhibits apoptosis and alters tight junction structure and epithelial barrier function⁴⁹⁻⁵¹, processes that could favor carcinogenesis. Maddocks *et al* have shown that EPEC are more frequent in the colon adenocarcinoma tissues than in matched normal colon tissues, with a prevalence of 25% and 0% respectively⁵². EPEC inject into host cells bacterial effectors, which has an effect on DNA damage repair and the cytoskeleton^{52,53}. One effector is the product of the *cif* gene, which alters the ubiquitination process and thus the degradation of proteins involved in many cellular processes such as cell cycle regulation and cytoskeleton^{18,38}. In addition, the murine EPEC-like pathogen, *Citrobacter rodentium*, which harbors the LEE locus, is the etiology of transmitting colonic hyperplasia⁵⁴, reduces the latency period of chemically induced tumors⁵⁵ and promotes colonic adenoma formation in APC/Min mice⁵⁶.

The distal colon tumors were more frequently colonized by B2 *E. coli* encoding CMs than the proximal colon tumors or control samples, suggesting that the production of CMs provides a

selective advantage for the colonization of distal colon tumors. This finding could be explained by major differences in the embryologic origin and physiology of the distal and proximal colons. The proximal colon derives from midgut whereas the distal colon develops from hindgut. The epithelial metabolism in the distal colon mainly involved butyrate, and in the proximal epithelium, acetate. Similarly, bacterial populations are qualitatively and quantitatively different in the proximal and distal colons⁵⁷. Most CM-producing strains harbor *pks* island or the combination of *cnf* genes with *pks* island (79% of CM-producing *E. coli*), suggesting an important role of *pks* island in the distribution of CM-producing *E. coli*. Nougayrède *et al.* proposed that the presence of *pks* can favor the colonization of the intestinal tract¹⁹. The effector produced by *pks* island is colibactin, a PK-NRP-type compound, which requires specific precursors belonging to the bacterial secondary metabolism. The physiological features of the distal and proximal colons could modify *E. coli* metabolism and therefore the synthesis of PK-NRP compounds such as colibactin. Consequently, the efficiency of *pks* in promoting colonization may be affected and play a role in the distribution of CM-producing *E. coli*.

Interestingly, the proximal and distal colons also differ by certain aspects of their molecular physiopathology. The genomic instability associated with the microsatellite instability (MSI) phenotype is a hallmark of proximal colon cancer⁶⁰. In contrast, chromosomal instability (CIN) is a major feature of distal colon cancers⁶⁰. The *pks*-harboring *E. coli* induce major chromosomal damage and genetic instability²⁰. Moreover, the CNF1-encoding gene, which is frequently associated with *pks* island, induces abnormal chromosome segregation. These CM-encoding *E. coli* isolates may therefore have an impact on the development of colon cancers. Cancers of the proximal and distal colon also exhibit well-known distinct features. For example, a history of cholecystectomy increases the risk of developing proximal colon cancer

via over-exposure to biliary salts⁵⁸ whereas tobacco use and type 2 diabetes are risk factors for distal colon⁵⁹.

The B2 phylogenetic group of *E. coli* is attracting attention because it contains strains responsible for severe infections and their genetic background is adapted to the arrival and/or maintenance of numerous virulence factors¹⁵. However, the *E. coli* strains belonging to the A and D phylogroups represent a large proportion (40% to 55%) of the *E. coli* isolates in the intestinal tract^{14,61}. Surprisingly, some distal tumor-associated *E. coli* strains belonging to A (33.3%) and D (37.5%) subgroups were able to induce DNA damage, suggesting that these strains have acquired unknown genotoxin(s).

The mechanism by which CM-producing *E. coli* strains can promote carcinogenesis is perhaps not only due to the bacteria alone, and can involve a susceptibility of host. DNA repair plays a pivotal role in maintaining genomic integrity with over 130 genes involved in various repair pathways that include base excision repair, nucleotide excision repair, double strand break repair and DNA mismatch repair⁶², and polymorphisms within repair process genes are widely reported to be associated with an extensive range of malignancies that include colorectal cancer⁶³⁻⁶⁵. These polymorphisms can decrease their efficiency and explain susceptibility to the repeated aggressions of host DNA by resident *E. coli* producing genotoxins.

In conclusion, our study showed a high prevalence of CM-producing B2 *E. coli* in biopsies of distal colon cancers, but not in specimens collected from proximal colon cancers or from control samples. It suggests therefore a possible role of CM-producing *E. coli* in colon cancers. This could be investigated in a longitudinal observational study to clarify the role of CMs in colorectal carcinogenesis. It also emerged that the different endogenous features of the proximal and distal colons and their different responsiveness to exogenous factors probably lead to the emergence of specific bacterial populations which can affect

carcinogenesis. As previously reported for ExPEC, cyclomodulins are mostly found in *E. coli* of the B2 phylogroup. However, we observed that colonic mucosa-associated *E. coli* belonging to the phylogroups A and D and devoid of known CM exhibit host cell genotoxic activity and should be considered as harmful.

Table 1. Number of *E. coli* clones collected from tumor and control samples.

Number of <i>E. coli</i> clones per sample	Percentage (number) of samples containing <i>E. coli</i> clones			
	Control (n=31)	Colon cancer (n=38)	Proximal colon cancer (n=21)	Distal colon cancer (n=17)
0	19.4 (6)	2.6 (1)	4.8 (1)	0.0 (0)
1	25.8 (8)	42.1 (16)	47.6 (10)	35.2 (6)
>1	54.8 (17)	55.3 (21)	47.6 (10)	64.7 (11)

Table 2. Distribution of *E. coli* phygroups (A, B1, B2 and D) in control and tumor specimens.

	Percentage (number) of samples containing <i>E. coli</i>			
	A	B1	B2	D
Control (n=31)	41.9 (13)	6.5 (2)	41.9 (13)	32.2 (10)
Colon cancer (n=38)	28.9 (11)	23.7 (9)	73.7 (28)	26.3 (10)
Distal colon cancer (n=17)	29.4 (5)	17.6 (3)	82.3 (14)	41.1 (7)
Proximal colon cancer (n=21)	28.5 (6)	28.6 (6)	66.7 (14)	14.3 (3)

Table 3. Distribution of CM-encoding genes in *E. coli* and its phylogroups (A, B1, B2 and D).

	Percentage of <i>E. coli</i> belonging to the phylogroup				
	A (n=33)	B1 (n=12)	B2 (n=49)	D (n=22)	All (n=116)
<i>pks</i>	0.0	0.0	57.1	0.0	23.2
<i>cnf</i>	0.0	8.3	36.7	0.0	16.4
<i>cdt</i>	3.0	8.3	8.2	0.0	5.2
<i>cif</i>	6.1	8.3	0.0	0.0	2.6
<i>cm</i> ¹	9.1	16.7	63.3	0.0	30.2

¹, cyclomodulin-encoding gene

Supplemental table S4. *E. coli* clones isolated from distal colonic tumors.

Patient	<i>E. coli</i> Strain	Phylogroup	Cytopathic effect				CM-encoding gene			
			Hly	pks-cif	cdt-cnf	comet	<i>pks</i>	<i>cnf</i>	<i>cdt</i>	<i>cif</i>
1	CFF1-7G2	B2	+	NA ¹	+	NA	+	<i>cnf1</i>	-	-
	CFF1-7G1	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
	CFF1-7G4	A	-	-	-	-	-	-	-	-
3	CFF3-1F8	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
8	CFF8-2D5	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
	CFF8-2D8	A	-	-	-	+	-	-	-	-
	CFF8-2D9	B1	-	-	+	ND ²	-	<i>cnf2</i>	<i>cdtIII</i>	-
	CFF8-2D10	A	-	-	-	-	-	-	-	-
	CFF8-2E2	A	-	-	-	-	-	-	-	-
14	CFF14-1C12	B2	+	NA	+	NA	+	<i>cnf1</i>	-	-
	CFF14-1D2	B2	-	-	-	ND	+	-	-	-
18	CFF18-3D2	D	-	-	-	-	-	-	-	-
	CFF18-4B7	A	-	-	-	ND	-	-	-	-
	CFF18-3D5	A	-	-	-	+	-	-	-	-
31	CFF31-6G11	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
	CFF31-6G2	D	-	-	-	-	-	-	-	-
	CFF31-6G9	D	-	-	-	-	-	-	-	-
	CFF31-6G8	B2	+	NA	+	NA	+	<i>cnf1</i>	-	-
	CFF31-6G10	B2	-	-	+	ND	-	-	<i>cdtIV</i>	-
32	CFF32-6A8	B2	+	NA	+	NA	+	<i>cnf1</i>	-	-
53	CFF53-8A1	D	-	-	-	+	-	-	-	-
	CFF53-8A9	B2	+	NA	-	NA	+	-	-	-
	CFF53-8A10	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
68	CFF68-10E8	D	-	-	-	+	-	-	-	-
	CFF68-10E9	B2	+	NA	+	NA	+	<i>cnf1</i>	-	-
117	CFF117-17G2	D	-	-	-	+	-	-	-	-
	CFF117-17G3	B2	+	NA	+	NA	-	<i>cnf1</i>	-	-
	CFF117-17G7	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
142	CFF142-18B1	A	-	-	-	-	-	-	-	-
150	CFF150-19A4	D	-	-	-	-	-	-	-	-
158	CFF158-19G1	B2	-	+	-	ND	+	-	-	-
159	CFF159-19H2	B2	+	NA	+	NA	+	<i>cnf1</i>	<i>cdtIV</i>	-
	CFF159-19H4	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
162	CFF162-20B4	D	-	-	-	-	-	-	-	-
	CFF162-20B6	B2	+	NA	+	NA	+	<i>cnf1</i>	-	-
163	CFF163-20C1	A	-	+	-	ND	-	-	-	+
	CFF163-20C3	B2	-	+	+	ND	+	-	<i>cdtI</i>	-
164	CFF164-20D5	B2	+	NA	-	NA	+	-	-	-

¹, Not applicable; ², Not determined (strains harboring CM-encoding genes).

Supplemental table S5. *E. coli* clones isolated from proximal colon tumors.

Patient	<i>E. coli</i> Strain	Phylogroup	Cytopathic effect			CM-encoding gene			
			Hly	pks-cif	cdt-cnf	<i>pks</i>	<i>cnf</i>	<i>cdt</i>	<i>cif</i>
15	CFF15-3C4	B1	-	-	-	-	-	-	-
	CFF15-4A9	B2	-	-	-	-	-	-	-
16	CFF16-2F8	B2	+	NA ¹	+	+	<i>cnf1</i>	<i>cdtIV</i>	-
	CFF16-2G3	B1	-	-	-	-	-	-	-
	CFF16-2G5	A	-	-	-	-	-	-	-
37	CFF37-2G2	B2	+	NA	-	-	-	-	-
43	CFF43-6B1	B1	-	-	-	-	-	-	-
44	CFF44-6C12	A	-	-	-	-	-	-	-
	CFF44-6C10	A	-	-	-	-	-	-	-
56	CFF56-8F1	B2	+	NA	+	-	<i>cnf1</i>	-	-
	CFF56-8F8	A	-	-	-	-	-	-	-
62	CFF62-10C5	A	-	-	+	-	-	<i>cdtIV</i>	-
	CFF62-10D8	D	+	NA	-	-	-	-	-
	CFF62-10D12	B2	-	+	-	+	-	-	-
82	CFF82-11F1	B2	-	-	-	-	-	-	-
83	CFF83-11G5	B2	-	+	-	+	-	-	-
85	CFF85-11H5	D	-	-	-	-	-	-	-
87	CFF87-12B1	B2	+	NA	+	+	<i>cnf1</i>	-	-
107	CFF107-13H2	B2	+	NA	+	+	<i>cnf1</i>	-	-
	CFF107-13H4	B1	+	NA	-	-	-	-	-
119	CFF119-14G4	D	-	-	-	-	-	-	-
120	CFF120-14H2	B1	-	-	-	-	-	-	-
	CFF120-14H2	B2	-	-	-	+	-	-	-
130	CFF130-16C1	B2	-	+	-	+	-	-	-
138	CFF138-18C3	B2	+	NA	+	+	<i>cnf1</i>	-	-
	CFF138-18C5	B2	-	-	-	-	-	-	-
144	None								
149	CFF149-18H5	B2	-	+	-	+	-	-	-
151	CFF151-19B8	A	-	+	-	-	-	-	+
	CFF151-19C3	A	-	-	-	-	-	-	-
152	CFF152-19D1	B1	-	+	-	-	-	-	+
	CFF152-19D12	B2	+	NA	+	+	<i>cnf1</i>	-	-
153	CF153-19E5	A	-	-	-	-	-	-	-

¹, Not applicable

Supplemental table S6. *E. coli* clones isolated from control samples.

Patient	<i>E. coli</i> Strain	Phylogroup	Cytopathic effect			CM-encoding gene			
			Hly	pks-cif	cdt-cnf	<i>pks</i>	<i>cnf</i>	<i>cdt</i>	<i>cif</i>
5	CFF5-3B1	A	-	-	-	-	-	-	-
	CFF5-3B3	D	-	-	-	-	-	-	-
13	CFF13-1A9	D	-	-	-	-	-	-	-
17	None								
22	CFF22-1D5	B2	-	-	-	-	-	-	-
29	None								
30	CFF30-3F4	A	-	-	-	-	-	-	-
	CFF30-3E12	D	-	-	-	-	-	-	-
42	CFF42-4D5	B2	+	NA	+	+	<i>cnf1</i>	-	-
	CFF42-3F11	A	-	-	-	-	-	-	-
49	CFF49-4E5	D	-	-	-	-	-	-	-
	CFF49-4E12	A	-	-	-	-	-	-	-
51	CFF51-7E8	A	-	-	-	-	-	-	-
	CFF51-7E11	D	-	-	-	-	-	-	-
63	CFF63-9D7	B2	-	-	-	-	-	-	-
	CFF63-9D5	D	-	-	-	-	-	-	-
65	CFF65-9F1	B2	-	-	-	-	-	-	-
	CFF65-9F4	B2	-	-	-	-	-	-	-
67	CFF67-9H1	D	-	-	-	-	-	-	-
	CFF67-9H5	D	-	-	-	-	-	-	-
73	CFF73-12H1	B2	-	-	-	+	-	-	-
	CFF73-12H2	A	-	-	-	-	-	-	-
	CFF73-12H11	D	-	-	-	-	-	-	-
74	None								
77	CFF77-11C4	A	-	-	-	-	-	-	-
79	CFF79-11D3	D	-	-	-	-	-	-	-
	CFF79-11D9	B2	+	NA	+	+	<i>cnf1</i>	-	-
96	CFF96-18E2	B1	-	-	-	-	-	-	-
	CFF96-18E6	B2	+	NA	-	+	<i>cnf1</i>	-	-
99	CFF99-13D1	B2	+	NA	+	+	<i>cnf1</i>	-	-
	CFF99-13D5	A	-	-	-	-	-	-	-
103	CFF103-13E3	A	-	-	-	-	-	-	-
	CFF103-13E6	A	-	-	-	-	-	-	-

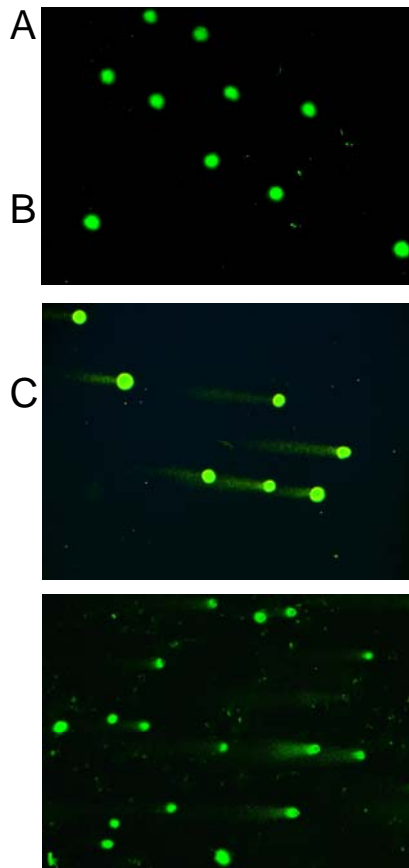
	CFF103-13E9	A	-	-	-	-	-	-	-
	CFF103-13E11	A	-	-	-	-	-	-	-
109	None								
110	CFF110-17C1	B2	-	-	-	-	-	-	-
	CFF110-17C7	A	-	-	-	-	-	-	-
112	CFF112-17F2	B2	-	-	-	-	-	-	-
113	CFF113-17E1	B2	-	-	-	-	-	-	-
116	None								
121	CFF124-15C1	B2	-	-	-	-	-	-	-
124	CFF124-15F5	D	-	-	-	-	-	-	-
	CFF124-16G2	B1	-	-	-	-	-	-	-
	CFF124-17H1	B1	+	-	-	-	-	-	-
125	None								
126	CFF126-15H2	A	-	-	-	-	-	-	-
127	CFF127-16A4	B2	-	+	-	+	-	-	-
	CFF127-16A8	B2	-	-	-	-	-	-	-
147	CFF147-18G3	A	-	-	-	-	-	-	-
	CFF147-18G9	A	-	-	-	-	-	-	-
154	CFF154-20E2	A	-	-	-	-	-	-	-

Table 7. Distribution of CM-encoding genes in control and tumor specimens.

	Percentage of specimens exhibiting CM-encoding genes				
	<i>pks</i>	<i>cnf</i>	<i>cdt</i>	<i>cif</i>	<i>cm</i> ¹
Control (n=31)	19.3	12.9	0.0	0.0	19.4
Colon tumor (n=39)	53.8	38.5	15.4	7.7	64.6
Distal colon tumor (n=17)	64.7	52.9	23.5	5.9	76.5
Proximal colon tumor (n=21)	47.8	28.6	9.5	9.5	57.1

¹, cyclomodulin-encoding gene

Figure 1. DNA damage was detected by the comet assay in HeLa cells exposed to *E. coli* for 3 h. DNA damage was not detected in HeLa cells infected with the *E. coli* strain IHE3034 Δ *clbP* harboring a defective *pks* island (A). Comet assay was positive in HeLa cells infected with the *E. coli* strain IHE3034 harboring *pks* island (B) or with *E. coli* devoid of known cyclomodulin-encoding genes (C).



References

1. Karsa LV, Lignini TA, Patnick J, Lambert R, Sauvaget C. The dimensions of the CRC problem. *Best practice & research* 2010;24(4):381-96.
2. Kwak EL, Chung DC. Hereditary colorectal cancer syndromes: an overview. *Clinical colorectal cancer* 2007;6(5):340-4.
3. Collins D, Hogan AM, Winter DC. Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *The lancet oncology* 2011;12(5):504-12.
4. Swidsinski A, Khilkin M, Kerjaschki D, et al. Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998;115(2):281-6.
5. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, et al. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 2004;127(1):80-93.
6. Nougayrede JP, Taieb F, De Rycke J, Oswald E. Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends in microbiology* 2005;13(3):103-10.
7. Wu S, Morin PJ, Maouyo D, Sears CL. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology* 2003;124(2):392-400.
8. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nature medicine* 2009;15(9):1016-22.
9. Leser TD, Molbak L. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environmental microbiology* 2009;11(9):2194-206.
10. Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140(6):1720-28.
11. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature reviews* 2009;8(1):26-38.

12. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature reviews 2004;2(2):123-40.
13. Picard B, Garcia JS, Gouriou S, et al. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. Infection and immunity 1999;67(2):546-53.
14. Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, haventr. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. In: Soc General Microbiol; 2001:1671-.
15. Escobar-Paramo P, Clermont O, Blanc-Potard AB, Bui H, Le Bouguenec C, Denamur E. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. Molecular biology and evolution 2004;21(6):1085-94.
16. Escobar-Paramo P, Grenet K, Le Menac'h A, et al. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. Applied and environmental microbiology 2004;70(9):5698-700.
17. Taieb F, Nougayrede JP, Watrin C, Samba-Louaka A, Oswald E. *Escherichia coli* cyclomodulin Cif induces G2 arrest of the host cell cycle without activation of the DNA-damage checkpoint-signalling pathway. Cellular microbiology 2006;8(12):1910-21.
18. Jubelin G, Taieb F, Duda DM, et al. Pathogenic bacteria target NEDD8-conjugated cullins to hijack host-cell signaling pathways. PLoS pathogens 2010;6(9):e1001128.
19. Nougayrede JP, Homburg S, Taieb F, et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. Science (New York, NY 2006;313(5788):848-51.
20. Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrede JP. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 2010:11537-42.

21. De Rycke J, Oswald E. Cytolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation? *FEMS microbiology letters* 2001;203(2):141-8.
22. Ge Z, Rogers AB, Feng Y, et al. Bacterial cytolethal distending toxin promotes the development of dysplasia in a model of microbially induced hepatocarcinogenesis. *Cellular microbiology* 2007;9(8):2070-80.
23. Ge Z, Schauer DB, Fox JG. *In vivo* virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cellular microbiology* 2008;10(8):1599-607.
24. Versalovic J, Koeth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research* 1991;19(24):6823-31.
25. Wang G, Whittam TS, Berg CM, Berg DE. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic acids research* 1993;21(25):5930-3.
26. Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 1990;172(11):6175-81.
27. Bidet P, Metais A, Mahjoub-Messai F, et al. Detection and identification by PCR of a highly virulent phylogenetic subgroup among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* B2 strains. *Applied and environmental microbiology* 2007;73(7):2373-7.
28. Dubois D, Delmas J, Cady A, et al. Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology* 2010;48(6):2122-9.
29. Peres SY, Marches O, Daigle F, et al. A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Molecular microbiology* 1997;24(5):1095-107.

30. De Rycke J, Milon A, Oswald E. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Veterinary research* 1999;30(2-3):221-33.
31. Orden JA, Dominguez-Bernal G, Martinez-Pulgarin S, et al. Necrotoxigenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the eae and ehxA genes. *Int Microbiol* 2007;10(1):47-55.
32. Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA, Nougayrede JP, Oswald E. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. *Journal of clinical microbiology* 2008;46(12):3906-11.
33. Johnson TJ, DebRoy C, Belton S, et al. Pyrosequencing of the Vir plasmid of necrotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary microbiology* 2010;144(1-2):100-9.
34. Pandey M, Khan A, Das SC, et al. Association of cytolethal distending toxin locus cdtB with enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with acute diarrhea in Calcutta, India. *Journal of clinical microbiology* 2003;41(11):5277-81.
35. Bielaszewska M, Fell M, Greune L, et al. Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infection and immunity* 2004;72(3):1812-6.
36. Orth D, Grif K, Khan AB, Naim A, Dierich MP, Wurzner R. The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2007;59(3):235-42.
37. Loukiadis E, Nobe R, Herold S, et al. Distribution, functional expression, and genetic organization of Cif, a phage-encoded type III-secreted effector from enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 2008;190(1):275-85.

38. Marches O, Ledger TN, Boury M, et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Molecular microbiology* 2003;50(5):1553-67.
39. Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* 2007;56(5):669-75.
40. Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *The Journal of clinical investigation* 2007;117(6):1566-74.
41. Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, et al. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *The Journal of experimental medicine* 2009;206(10):2179-89.
42. Scholzel S, Zimmermann W, Schwarzkopf G, Grunert F, Rogaczewski B, Thompson J. Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *The American journal of pathology* 2000;156(2):595-605.
43. Jantschkeff P, Terracciano L, Lowy A, et al. Expression of CEACAM6 in resectable colorectal cancer: a factor of independent prognostic significance. *J Clin Oncol* 2003;21(19):3638-46.
44. Lecuit M, Abachin E, Martin A, et al. Immunoproliferative small intestinal disease associated with *Campylobacter jejuni*. *The New England journal of medicine* 2004;350(3):239-48.

45. Nagamine CM, Rogers AB, Fox JG, Schauer DB. *Helicobacter hepaticus* promotes azoxymethane-initiated colon tumorigenesis in BALB/c-IL10-deficient mice. *International journal of cancer* 2008;122(4):832-8.
46. Nagamine CM, Sohn JJ, Rickman BH, Rogers AB, Fox JG, Schauer DB. *Helicobacter hepaticus* infection promotes colon tumorigenesis in the BALB/c-Rag2(-/-) Apc(Min/+) mouse. *Infection and immunity* 2008;76(6):2758-66.
47. Fox JG, Feng Y, Theve EJ, et al. Gut microbes define liver cancer risk in mice exposed to chemical and viral transgenic hepatocarcinogens. *Gut* 2010;59(1):88-97.
48. Lemonnier M, Landraud L, Lemichez E. Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS microbiology reviews* 2007;31(5):515-34.
49. Fiorentini C, Matarrese P, Straface E, et al. Toxin-induced activation of Rho GTP-binding protein increases Bcl-2 expression and influences mitochondrial homeostasis. *Experimental cell research* 1998;242(1):341-50.
50. Hopkins AM, Walsh SV, Verkade P, Boquet P, Nusrat A. Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function. *Journal of cell science* 2003;116(Pt 4):725-42.
51. Malorni W, Fiorentini C. Is the Rac GTPase-activating toxin CNF1 a smart hijacker of host cell fate? *Faseb J* 2006;20(6):606-9.
52. Maddocks OD, Short AJ, Sonnenberg MS, Bader S, Harrison DJ. Attaching and effacing *Escherichia coli* downregulate DNA mismatch repair protein in vitro and are associated with colorectal adenocarcinomas in humans. *PloS one* 2009;4(5):e5517.
53. Vogelmann R, Amieva MR. The role of bacterial pathogens in cancer. *Current opinion in microbiology* 2007;10(1):76-81.

54. Schauer DB, Zabel BA, Pedraza IF, O'Hara CM, Steigerwalt AG, Brenner DJ. Genetic and biochemical characterization of *Citrobacter rodentium* sp. nov. *Journal of clinical microbiology* 1995;33(8):2064-8.
55. Barthold SW, Jonas AM. Morphogenesis of early 1, 2-dimethylhydrazine-induced lesions and latent period reduction of colon carcinogenesis in mice by a variant of *Citrobacter freundii*. *Cancer research* 1977;37(12):4352-60.
56. Newman JV, Kosaka T, Sheppard BJ, Fox JG, Schauer DB. Bacterial infection promotes colon tumorigenesis in Apc(Min/+) mice. *The Journal of infectious diseases* 2001;184(2):227-30.
57. Bleday R, Braidt J, Ruoff K, Shellito PC, Ackroyd FW. Quantitative cultures of the mucosal-associated bacteria in the mechanically prepared colon and rectum. *Diseases of the colon and rectum* 1993;36(9):844-9.
58. Lagergren J, Ye W, Ekblom A. Intestinal cancer after cholecystectomy: is bile involved in carcinogenesis? *Gastroenterology* 2001;121(3):542-7.
59. Oh SW, Kim YH, Choi YS, et al. The comparison of the risk factors and clinical manifestations of proximal and distal colorectal cancer. *Diseases of the colon and rectum* 2008;51(1):56-61.
60. Gervaz P, Cerottini JP, Bouzourene H, et al. Comparison of microsatellite instability and chromosomal instability in predicting survival of patients with T3N0 colorectal cancer. *Surgery* 2002;131(2):190-7.
61. Zhang L, Foxman B, Marrs C. Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *Journal of clinical microbiology* 2002;40(11):3951-5.
62. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. Human DNA repair genes. *Science* (New York, NY 2001;291(5507):1284-9.

63. An Y, Jin G, Wang H, et al. Polymorphisms in hMLH1 and risk of early-onset lung cancer in a southeast Chinese population. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2008;59(2):164-70.
64. Hirata H, Hinoda Y, Kawamoto K, et al. Mismatch repair gene MSH3 polymorphism is associated with the risk of sporadic prostate cancer. *The Journal of urology* 2008;179(5):2020-4.
65. Koessler T, Oestergaard MZ, Song H, et al. Common variants in mismatch repair genes and risk of colorectal cancer. *Gut* 2008;57(8):1097-101.