



**HAL**  
open science

# Rôle de l'autophagie dans la réponse de l'hôte suite à l'infection par des *Escherichia Coli* producteurs de colibactine isolés de patients atteints d'un cancer colorectal

Cécily Lucas

► **To cite this version:**

Cécily Lucas. Rôle de l'autophagie dans la réponse de l'hôte suite à l'infection par des *Escherichia Coli* producteurs de colibactine isolés de patients atteints d'un cancer colorectal. Cancer. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAS016 . tel-02095733

**HAL Id: tel-02095733**

**<https://theses.hal.science/tel-02095733>**

Submitted on 10 Apr 2019

**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.

*ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ,  
AGRONOMIE & ENVIRONNEMENT*

*Thèse*

Présentée à l'Université Clermont Auvergne  
pour l'obtention du grade de **Docteur d'Université**  
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : **Microbiologie cellulaire**

Soutenue le 23 novembre 2018

LUCAS Cécily

---

Rôle de l'autophagie dans la réponse de l'hôte suite à l'infection par  
des *Escherichia coli* producteurs de colibactine isolés de patients  
atteints d'un cancer colorectal

---

**Rapporteurs**

Mme. MERCIER-BONIN Muriel, Chargée de Recherche INRA, Toxalim UMR INRA 1331, Université de Toulouse.  
Mme. PATTINGRE Sophie, Chargée de Recherche INSERM, U1194, IRCM, Université de Montpellier.  
M. FAURE Mathias, Professeur des Universités, CIRI INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS-Lyon, UCB-Lyon1.

**Examineurs**

M. MARTINEZ Antoine, Directeur de Recherche CNRS, UMR6293, INSERM U1103, GReD, Université Clermont Auvergne.  
M. FAFOURNOUX Pierre, Directeur de Recherche CNRS, UMR 1019 de Nutrition Humaine, INRA de Clermont-Ferrand/Theix.

**Directrice de Thèse**

Mme. NGUYEN Hang, Chargée de Recherche INSERM, M2iSH, UMR1071, Université Clermont Auvergne.

Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte (M2iSH)  
Université Clermont Auvergne, UMR1071 INSERM, INRA USC-2018  
28 Place Henri Dunant – 63001 Clermont-Ferrand Cedex

*A ma maman...*

# Sommaire

<b>Résumé</b> .....	1
<b>Abréviations</b> .....	2
<b>Index des figures</b> .....	5
<b>Index des tableaux</b> .....	7
<hr/>	
<b>Synthèse bibliographique</b> .....	<b>8</b>
<b>Partie I. Homéostasie du tube digestif</b> .....	<b>8</b>
I.1. La paroi intestinale .....	8
I.1.1 Organisation de la paroi intestinale .....	8
I.1.1.1. Organisation macroscopique .....	8
I.1.1.2. Les cellules de la muqueuse intestinale .....	9
I.1.2. Le système immunitaire du tube digestif .....	10
I.1.2.1. L'immunité intestinale innée .....	10
I.1.2.2. L'immunité intestinale adaptative .....	11
I.2. Le microbiote intestinal .....	12
I.2.1. Les différentes fonctions du microbiote intestinal .....	13
I.2.1.1. Développement et maturation du tractus digestif et fonction de barrière intestinale .....	13
I.2.1.2. Protection contre la colonisation par des pathogènes .....	14
I.2.1.3. Maturation et mise en place du système immunitaire .....	14
I.2.1.4. Métabolisme des nutriments .....	14
I.2.2. Les facteurs influençant la composition du microbiote intestinal .....	15
I.2.2.1. La naissance .....	15
I.2.2.2. La génétique .....	16
I.2.2.3. L'âge .....	16
I.2.2.4. L'alimentation .....	17
I.2.2.5. Les infections bactériennes .....	18
I.2.2.6. La prise de médicaments .....	18
I.2.2.7. La pratique d'une activité physique .....	19
I.2.2.8. Le tabagisme actif .....	19
I.3. Les processus cellulaires de maintien de l'homéostasie intestinale .....	20
I.3.1. Les points du contrôle du cycle cellulaire .....	20
I.3.2. Les systèmes de réparation de l'ADN .....	20
I.3.2.1. La réparation par les systèmes BER, NER et MMR .....	20
I.3.2.2. La réparation par recombinaison .....	21
Le système HR .....	21
Le système NHEJ .....	22
I.3.3. La mort cellulaire par l'apoptose .....	22
I.3.3. La sénescence cellulaire .....	23
<b>Partie II. Le cancer colorectal</b> .....	<b>24</b>
II.1. Epidémiologie .....	24
II.2. Le diagnostic du cancer colorectal .....	24
II.3. Les facteurs de pronostique .....	24
II.3.1. Facteurs histologiques .....	25
II.3.1. Facteurs moléculaires et sériques .....	25

II.4. La prise en charge thérapeutique .....	25
II.5. La séquence adénome-cancer .....	26
II.5.1. Mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogénèse colorectale.....	27
II.5.1.1. Principales voies de signalisation impliquées dans la carcinogénèse colorectale .....	27
II.5.1.1.1. La voie WNT/ $\beta$ -caténine.....	27
II.5.1.1.2. La voie HDM2/p53 .....	28
II.5.1.1.3. La voie TGF- $\beta$ /SMAD .....	28
II.5.1.1.4. La voie RAS/MAPK .....	29
II.5.1.1.5. La voie PI3K/AKT/Mtor.....	30
II.5.1.1.6. La voie NOTCH.....	31
II.5.1.1.7. Régulation épigénétique et microARN .....	32
II.5.1.2. Les différents phénotypes de la carcinogénèse colorectale .....	32
II.5.1.2.1. Phénotype CIN (instabilité chromosomique).....	33
II.5.1.2.2. Phénotype MSI (instabilité microsatellitaire) .....	33
II.5.1.2.3. Le phénotype méthylateur des îlots CpG (CIMP).....	34
II.5.1.3. Evènements moléculaires associés aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et rôle de l'inflammation dans le CCR .....	34
II.6. Etiologie des CCR .....	36
II.6.1. Les maladies génétiques prédisposantes.....	36
II.6.1.1. La polypose adénomateuse familiale .....	36
II.6.1.2. Le syndrome de Lynch.....	36
II.6.1.3. La polypose juvénile .....	37
II.6.2. Les maladies inflammatoires chroniques prédisposantes .....	37
II.6.3. Les CCR sporadiques.....	38
II.6.3.1. Impact de l'alimentation .....	38
II.7.3.2. Impact de la consommation d'alcool .....	39
II.7.3.3. Impact du tabagisme actif .....	39
II.7.3.4. Impact de l'activité physique .....	39
II.7.3.5. Implication du microbiote intestinal .....	40
Partie 3. Rôle du microbiote intestinal dans la carcinogénèse colorectale ...	41
III.1. Généralités.....	41
III.2. Microbiote intestinal et CCR.....	41
III.2.1 Les mécanismes d'action mis en jeu par le microbiote intestinal .....	44
III.2.1.1. L'inflammation chronique .....	44
III.2.1.2. Modification des métabolites en composés carcinogènes .....	45
III.2.1.3. Stress oxydatif .....	47
III.2.1.4. Toxines et autres facteurs de virulence.....	48
III.3. La carcinogénèse induite par des bactéries intestinales spécifiques .....	49
III.3.1. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	49
III.3.2. <i>Bacteroides fragilis</i> .....	50
III.3.3. <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	52
III.3.4. <i>Streptococcus bovis/galloyticus</i> .....	53

III.3.5. <i>Clostridium septicum</i> .....	54
III.3.6. <i>Escherichia coli</i> .....	55
III.3.6.1. Cell cycle-inhibiting factor .....	56
III.3.6.2. Cytotoxic necrotizing factor .....	57
III.3.6.3. Cytolethal distending toxin.....	58
III.3.6.4. Colibactine .....	59
III.3.6.4.1. Biosynthèse de la colibactine : l'îlot <i>pks</i> .....	59
III.3.6.4.2. Régulation de la synthèse de la colibactine .....	60
III.3.6.4.3. Impacts cellulaires de la colibactine .....	61
III.3.6.4.3.1. Colibactine et activité génotoxique.....	61
III.3.6.4.3.2. Colibactine et activité pro-inflammatoire .....	62
III.3.6.4.3.3. Colibactine, sénescence et prolifération cellulaire.....	62
III.3.6.4.3.4. Colibactine et carcinogénèse colorectale .....	64
III.4. Stratégies diagnostiques et thérapeutiques utilisant le microbiote intestinal .....	64
III.4.1. Les marqueurs microbiens : détection et pronostic du CCR .....	64
III.4.2. Les thérapies ciblant le microbiote .....	65
Partie 4. Le processus autophagique : physiologie et pathologie .....	69
IV.1. L'autophagie : Généralités .....	69
IV.2. Les différentes formes d'autophagie .....	69
IV.2.1. La micro-autophagie .....	69
IV.2.2. L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes .....	70
IV.2.3. L'ADN/ARN autophagie .....	71
IV.2.4. La macro-autophagie .....	71
IV.2.4.1. Les étapes de la macro-autophagie .....	71
IV.2.4.1.1. L'initiation .....	71
IV.2.4.1.2. L'élongation .....	72
IV.2.4.1.3. La maturation de l'autophagosome et la fusion de l'autophagosome avec le lysosome .....	73
IV.2.4.1.4. La dégradation du contenu dans l'autolysosome .....	74
IV.3. Les signaux d'activation de l'autophagie.....	74
IV.3.1. Les récepteurs autophagiques.....	75
IV.3.2. Les voies et les facteurs de régulation de l'autophagie .....	77
IV.3.2.1. La voie mTOR .....	77
IV.3.2.2. Le complexe Beclin1-BCL-2 .....	78
IV.3.2.3. La signalisation p53.....	78
IV.3.2.4. Régulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle et post- traductionnelle .....	79
IV.3.3. Les signaux de stress régulant l'autophagie .....	79
IV.3.3.1. Le stress métabolique .....	79
IV.3.3.2. Le stress du réticulum endoplasmique .....	80
IV.3.3.3. Les mitochondries endommagées.....	80
IV.3.3.4. L'hypoxie et l'anoxie .....	81

IV.3.3.5. L'infection par des pathogènes.....	81
IV.3.3.5.1. Les bactéries contrôlées par l'autophagie .....	82
IV.3.3.5.2. Les bactéries qui bloquent et échappent à la machinerie autophagique .....	83
IV.3.3.5.3. Les bactéries qui se servent de l'autophagie à leur avantage .	84
IV.4. Rôles de l'autophagie dans l'immunité innée et adaptative.....	85
IV.4.1. Autophagie, immunité innée et inflammation.....	85
IV.4.2. Autophagie et immunité adaptative.....	86
IV.5. Implication de l'autophagie dans les cancers.....	88
IV.5.1. L'autophagie et la suppression tumorale.....	88
IV.5.1.1. Autophagie et stabilité génomique .....	88
IV.5.1.2. Autophagie et inflammation .....	89
IV.5.1.3. Autophagie et sénescence cellulaire .....	90
IV.5.2. L'autophagie, un acteur pro-tumoral.....	90
IV.5.2.1. Autophagie et adaptation métabolique .....	90
IV.5.2.2. Autophagie, prolifération cellulaire et angiogenèse .....	91
IV.5.2.3. Autophagie et dormance tumorale.....	91
IV.5.2.4. Autophagie et métastases .....	92
IV.5.2.5. Autophagie et maintien des cellules souches cancéreuses .....	92
IV.4.3. Processus autophagique et CCR.....	93
IV.4.4. La modulation de l'autophagie dans les cancers : stratégies thérapeutiques ...	96

Revue « Microbiota, inflammation and colorectal cancer » .....	97
--	----

---

**Travail expérimental..... 98**

Contexte scientifique.....	98
----------------------------	----

Résultats expérimentaux .....	99
-------------------------------	----

Article « Autophagy suppresses protumoral effects of colibactin genotoxin-producing *Escherichia coli*, inhibiting colorectal carcinogenesis »

**Discussion et perspectives..... 102**

1) Etablir une corrélation entre l'infection par des souches d' <i>E. coli</i> portant l'îlot <i>pks</i> et l'expression des gènes de l'autophagie .....	102
2) Etude des mécanismes de régulation de la réponse autophagique suite à l'infection par les souches d' <i>E. coli/pks+</i> .....	103
a) <i>Etude des récepteurs autophagiques responsables de l'adressage des souches d'E. coli/pks+ à l'autophagosome.....</i>	<i>103</i>
b) <i>Identification des régulateurs et/ou des voies de régulation impliqués dans l'activation de l'autophagie suite à l'infection par les E. coli/pks+.....</i>	<i>103</i>
3) Etude des mécanismes par lesquels l'autophagie est impliquée dans la mise en place des réparations des dommages à l'ADN.....	105
4) Etude du rôle de l'autophagie dans la tumorigénèse colorectale induite par les souches d' <i>E. coli/pks+</i> .....	107
5) Etude des mécanismes par lesquels l'autophagie inhibe la carcinogénèse colorectale induite par la souche 11G5 .....	109
a) <i>Analyse de la sénescence in vivo .....</i>	<i>109</i>

b) Analyse de la composition du microbiote intestinal.....	110
c) Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal.....	110
d) Analyse de l'expression de la colibactine.....	111
e) Analyse de la réponse immunitaire.....	112
6) Etude du rôle de l'autophagie dans les cellules immunitaires suite à l'infection par les souches d' <i>E. coli/pks+</i> .....	112
7) Impact de l'induction de l'autophagie sur la carcinogénèse colorectale induite par les <i>E. coli/pks+</i> .....	113
8) Etude du rôle de l'autophagie dans le contrôle des souches d' <i>E. coli</i> associées au CCR productrices d'autres cyclomodulines que la colibactine.....	114

**Conclusion générale ..... 115**

**Valorisation scientifique ..... 116**

**Bibliographie ..... 117**

**Annexe ..... 132**

Article « AIEC infection triggers modification of gut microbiota composition in genetically predisposed mice, contributing to intestinal inflammation »



## Résumé

La muqueuse des patients atteints de cancer colorectal (CCR) est anormalement colonisée par des souches d'*Escherichia coli* porteuses de l'îlot pathogène *pks* (*E. coli/pks+*), responsable de la synthèse de la génotoxine colibactine. Les *E. coli/pks+* induisent des cassures double brin de l'ADN, l'accumulation d'aberrations chromosomiques ainsi que la sénescence, et favorise le développement tumoral dans des modèles murins de CCR. L'autophagie est un processus des cellules eucaryotes qui permet la dégradation d'éléments cytoplasmiques par les lysosomes et est activé pour permettre l'adaptation des cellules en réponse à un stress. Un dysfonctionnement de l'autophagie est associé à plusieurs pathologies humaines, notamment les cancers.

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier le rôle de l'autophagie dans la défense de l'hôte suite à l'infection par les *E. coli/pks+*. Nous avons montré une augmentation de l'expression des gènes de l'autophagie dans la muqueuse colique des patients atteints de CCR colonisée par des *E. coli/pks+* comparativement à celle colonisée par des *E. coli* ne portant pas l'îlot *pks*. L'infection des cellules épithéliales intestinales humaines HCT-116 par des souches d'*E. coli* isolées de patients atteints de CCR entraîne l'activation de l'autophagie de façon dépendante de la présence de l'îlot *pks*. Les cellules déficientes pour l'autophagie présentent une augmentation des dommages à l'ADN induits par les *E. coli/pks+*, associée à un défaut de recrutement au niveau du noyau de la protéine de réparation des dommages à l'ADN, RAD51, ainsi qu'une augmentation de la sénescence et de la prolifération cellulaire induites par ces souches. Dans un modèle murin de CCR, le modèle de souris *Apc<sup>Min/+</sup>*, déficient pour le gène de l'autophagie *Atg16l1* spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales, nous avons montré un rôle complexe de l'autophagie dans la carcinogenèse colorectale. En effet, en condition non infectée, chez les souris *Apc<sup>Min/+</sup>*, l'autophagie joue un rôle pro-tumoral. Cependant, suite à l'infection par la souche d'*E. coli/pks+*, 11G5, les souris déficientes pour l'autophagie présentent une augmentation de la tumorigénèse, accompagnée par une augmentation des dommages à l'ADN, de la prolifération cellulaire et de l'inflammation. Ces résultats suggèrent que l'autophagie est nécessaire pour inhiber les effets pro-tumoraux des souches d'*E. coli/pks+* et ainsi limiter la carcinogenèse colorectale induite par ces dernières.

De nombreuses perspectives d'études sur les mécanismes sous-jacents impliqués dans la progression tumorale induite par les souches d'*E. coli/pks+* feront suite à ce projet. Notamment, l'impact du microenvironnement immunitaire et du microbiote sur la carcinogenèse colorectale seront analysés. Plus largement, cette étude permettra de mieux comprendre le rôle de l'autophagie dans la défense de l'hôte pour lutter contre les *E. coli* associés au CCR. A plus long terme, ce travail pourrait également contribuer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur la modulation de l'autophagie chez les patients présentant une colonisation par les souches d'*E. coli/pks+*.

## Abréviations

<b>4-HNE</b>	4-Hydroxy-2-nonenal	<b>CIMP</b>	CpG island methylator phenotype
<b>ACE</b>	Antigène carcino-embryonnaire	<b>CIN</b>	Chromosomal instability
<b>AIEC</b>	Adherent and invasives <i>E. coli</i>	<b>Cib</b>	Colibactine
<b>AIM2</b>	Absent in melanoma 2	<b>CLR</b>	C-type leptin-like receptor
<b>AKT</b>	AKT8 virus oncogene cellular homolog	<b>CMA</b>	Chaperone-mediated autophagy
<b>Ambra1</b>	Activating molecule in beclin1 related autophagy 1	<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>AMPK</b>	AMP-activated protein kinase	<b>c-Myc</b>	Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
<b>AOM</b>	Azoxyméthane	<b>CNF</b>	Cytotoxic necrotizing factor
<b>APAF-1</b>	Apoptotic peptidase activating factor 1	<b>COX-2</b>	Cyclooxygenase-2
<b>APC</b>	Adenomatous polyposis coli	<b>CSC</b>	Cellules souches cancéreuses
<b>ARH</b>	ADP-ribosylarginine hydrolase	<b>CTLA4</b>	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
<b>ARP2/3</b>	Actin-related protein 2/3	<b>CXCR</b>	C-X-C motif chemokine receptor
<b>ASC</b>	Apoptosis-associated speck-like protein	<b>DAEC</b>	Diffusely-adherent <i>E. coli</i>
<b>ATF</b>	Activating transcription factor	<b>DAPK</b>	Death Associated Protein Kinase
<b>ATG</b>	Autophagy-related	<b>DCA</b>	Désoxycholic acid
<b>ATM</b>	Ataxia telangiectasia mutated	<b>DCLK</b>	Double cortin like kinase
<b>BAX</b>	BCL-2 associated X protein	<b>DDCP</b>	DNA damage check point
<b>BCL</b>	B-cell lymphoma	<b>DDIT3</b>	DNA-damage inducible transcript 3
<b>BECN1</b>	Beclin1	<b>Deptor</b>	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
<b>BER</b>	Base excision repair	<b>DFCP1</b>	Double FYVE domain-containing protein 1
<b>BfPAI</b>	<i>B. fragilis</i> pathogenicity island	<b>DMH</b>	Diméthylhydrazine
<b>BFT</b>	<i>Bacteroides fragilis</i> toxin	<b>DNA-PKc</b>	Protéine kinase ADN dépendante
<b>BH3</b>	BCL-2 Homology domain 3	<b>DNMT</b>	DNA methyltransferase
<b>BMP4</b>	Bone morphogenetic protein 4	<b>DON</b>	Deoxynivalenol
<b>BNIP3</b>	Bcl-2 adenovirus E1 19kDa interacting protein 3	<b>DR5</b>	Death receptor 5
<b>BRAF</b>	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B	<b>DRAM</b>	Damage-regulated modulator of autophagy
<b>BRCA</b>	Breast cancer	<b>DSS</b>	Dextran sulfate sodium
<b>CAC</b>	Colitis-associated cancer	<b>EAEC</b>	Enteroggregatives <i>E. coli</i>
<b>CagA</b>	Cytotoxin-associated gene A	<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>CCR</b>	Cancer colorectal	<b>EHEC</b>	Enterohémorragique <i>E. coli</i>
<b>CD</b>	Cluster of differentiation	<b>EIEC</b>	Enteroinvasif <i>E. coli</i>
<b>Cdc25c</b>	Cyclin-dependent kinase phosphatase C	<b>Eif2<math>\alpha</math></b>	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha
<b>CDK</b>	Cyclin-dépendant kinase	<b>Eif2ak4</b>	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4
<b>CDT</b>	Cytolethal distending toxin	<b>EPEC</b>	Enteropathogenic <i>E. coli</i>
<b>CEACAM</b>	Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule	<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinase
<b>CEBPB</b>	CCAAT enhancer-binding protein beta	<b>ESCRT</b>	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
<b>Chk</b>	Check point kinase	<b>ETBF</b>	Enterotoxinogen <i>B. fragilis</i>
<b>CHOP</b>	CCAAT-enhancer-binding protein homolog protein	<b>ETEC</b>	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>
<b>ciAP2</b>	Cellular inhibitor of apoptosis protein 2	<b>ExPEC</b>	Extra-intestinal <i>Pathogenic E. coli</i>
<b>CIF</b>	Cell cycle-inhibiting factor	<b>FAS</b>	First apoptotic signal

<b>FAK</b>	Focale adhesion kinase	<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>FDA</b>	Food and drug administration	<b>MCP</b>	Mitotic check point
<b>FGF</b>	Fibroblaste growth factor	<b>MDV</b>	Mitochondrial-derived vesicles
<b>FI200</b>	FAK family interacting protein of 200 kDa	<b>MEK</b>	MAPK-ERK-kinase
<b>FOXO</b>	Forkhead box O	<b>MGMT</b>	Methylguanine DNA Methyltransferase
<b>GABARAP</b>	GABA type A receptor-associated protein	<b>MiARN</b>	MicroARN
<b>GALT</b>	Gut-associated lymphoid tissues	<b>MICI</b>	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
<b>GAS</b>	Group A <i>Streptococcus</i>	<b>MIN</b>	Multiple intestinal neoplasia
<b>GATA1</b>	Globin transcription factor 1	<b>MLH</b>	MutL homolog
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte macrophages-colony stimulating factor	<b>MMR</b>	Mismatch repair
<b>GPR</b>	G-protein coupled receptor	<b>MSH</b>	MutS homolog
<b>GRB2</b>	Growth factor receptor-bound protein 2	<b>MSI</b>	Microsatellite instability
<b>GSK</b>	Glycogen synthase kinase	<b>mLST8</b>	mTOR associated protein LTS8 homolog
<b>HDM2</b>	Human double minute 2	<b>MSS</b>	Microsatellite stable
<b>HGF</b>	Hepatocyte growth factor	<b>mTOR</b>	Mammalian Target of Rapamycin
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxia-inducible factor 1 alpha	<b>MUTYH</b>	MuY homolog
<b>HNPCC</b>	Hereditary non-polyposis colorectal cancer	<b>MYD88</b>	Myeloid differentiation primary response 88
<b>HR</b>	Homologous recombinaison	<b>NECD</b>	NOTCH extracellular domain
<b>HSP</b>	Heat shock protein	<b>NER</b>	Nucleotide excision repair
<b>iBMK</b>	Immortalized Baby Mouse Kidney	<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>Ig</b>	Immunoglobuline	<b>NHEJ</b>	Non-homologous end joining
<b>IPS-I</b>	IFN-beta promoter stimulator I	<b>NICD</b>	NOTCH intracellular domain
<b>IKK</b>	Inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase	<b>NLR</b>	NOD-like receptor
<b>IL</b>	Interleukine	<b>NLRC4</b>	NLR family card domain containing 4
<b>INF</b>	Interferon	<b>NLRP3</b>	NOD-like receptor family pyrin domain containing 3
<b>InPEC</b>	Intestinal pathogenic <i>E. coli</i>	<b>NMEC</b>	Neonatal Meningitis <i>E. coli</i>
<b>IRE</b>	Inositol requiring enzyme	<b>NOD</b>	Nucleotide oligomerization domain
<b>IRGM</b>	Immunity-related GTPase family M protein	<b>NRPS</b>	Non ribosomal peptide
<b>Isc</b>	Iron-sulfure cluster protein	<b>NTBF</b>	Non toxinogen <i>B. fragilis</i>
<b>KLF</b>	Kruppel-like factor	<b>OCT-4</b>	Octamer-binding transcription factor 4
<b>KRAS</b>	Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog	<b>PAF</b>	Polypose Adenomateuse familiale
<b>LAMP</b>	Lysosome associated membrane protein	<b>PAMP</b>	Pathogen associated molecular pattern
<b>LB</b>	Lymphocyte B	<b>PCNA</b>	Proliferating cell nuclear antigen
<b>LBD</b>	LIR binding domain	<b>PDL1</b>	Programmed cell death ligand 1
<b>LC3</b>	Light chain 3	<b>PE</b>	Phosphatidyl éthanolamine
<b>LEF</b>	Lymphoid enhancer-binding factor	<b>PERK</b>	Protein RNA-like endoplasmic reticulum kinase
<b>LIR</b>	LC3-interacting region	<b>PGE2</b>	Prostaglandin E2
<b>LLO</b>	Listeriolysin O	<b>PI3K</b>	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
<b>LOH</b>	Loss of heterozygosity	<b>PI3P/PtdIns3P</b>	PhosphatidyInositol-3-Phosphate
<b>LT</b>	Lymphocyte T	<b>PIDD</b>	p53-induced death domain-containing protein
<b>M</b>	Microfold	<b>Pks</b>	Polyketide synthase
<b>MAM</b>	Méthylazoxyméthanol	<b>PMS</b>	Post-meotic segregation
<b>MAM</b>	Mitochondria associated membrane	<b>Pol</b>	Polymérase
<b>MAMP</b>	Microbes associated molecular pattern	<b>PRAS40</b>	Proline-rich Akt substrate of 40kDa

<b>PRR</b>	Pattern recognition receptor	<b>UPEC</b>	UroPathogenic <i>E. coli</i>
<b>PTEN</b>	Phosphatase and tensin homolog	<b>UPR</b>	Unfolded protein response
<b>RAF</b>	Rapidly accelerated fibrosarcoma	<b>UTR</b>	Untranslated region
<b>Raptor</b>	Regulatory associated protein of mTOR	<b>UVRAG</b>	UV radiation Resistance- associated Gene protein
<b>RAS</b>	Rat sarcoma	<b>VacA</b>	Vacuolating cytotoxin A
<b>RCP</b>	Replication check point	<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>RE</b>	Reticulum endoplasmique	<b>VSP34</b>	Vacuolar protein sorting 34
<b>RIG</b>	Retinoic acid-inducible gene	<b>WIPI</b>	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein
<b>RLR</b>	RIG-I-like receptor	<b>XRCC</b>	X-ray repair cross-complementing
<b>RNF168</b>	Ring finger protein 168	<b>ZKSCAN3</b>	Zinc finger protein with krab and scan domains 3
<b>RNS</b>	Reactive nitrogen species	<b>ZO-1</b>	Zonula occludens-1
<b>ROS</b>	Reactive oxygene species		
<b>RPA</b>	Replicative protein A		
<b>SASP</b>	Senescence-associated secretory phenotype		
<b>SCV</b>	<i>Salmonella</i> containing vacuole		
<b>SEN1</b>	Sentrin-specific protease 1		
<b>SLC10A2</b>	Solute carrier family 10 member 2		
<b>SLO</b>	Streptolysine O		
<b>SLR</b>	Sequestosome-like receptor		
<b>SMAD</b>	Small mothers against decapentaplegic		
<b>SNARE</b>	Soluble N-éthylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor		
<b>SOS</b>	Son of sevenless		
<b>SOX2</b>	Sry-box transcription factor 2		
<b>SQSTM1</b>	Sequestosome 1		
<b>SREBF/B</b>	Sterol regulatory element-binding transcription factor/protein		
<b>SSTIII</b>	Système de sécrétion de type III		
<b>STAT3</b>	Signal transducer and activator of transcription 3		
<b>STEAEC</b>	Shiga-toxin-producing enteroaggregative <i>E. coli</i>		
<b>STING</b>	Stimulator of interferon genes		
<b>TBK1</b>	TANK-binding kinase 1		
<b>TCF</b>	T-cell factor		
<b>Tdt</b>	Terminal-transferase		
<b>TFEB</b>	Transcription factor EB		
<b>TGF- β</b>	Transforming growth factor-beta		
<b>Th</b>	T helper		
<b>TLR</b>	Toll-like receptor		
<b>TNBS</b>	2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid		
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor		
<b>TNM</b>	Tumor, node, metastasis		
<b>TORC1</b>	Target of rapamycin complex 1		
<b>TSC2</b>	Tuberous sclerosis complex-2		
<b>UBA</b>	Ubiquitin-associated		
<b>ULK</b>	UNC-51-kinase		

## *Index des figures*

- Figure 1 :** La paroi du tube digestif de l'intestin grêle et du côlon.
- Figure 2 :** Les cellules de l'épithélium intestinal.
- Figure 3 :** L'immunité du tube digestif.
- Figure 4 :** Répartition de la quantité de bactéries de long du tractus digestif.
- Figure 5 :** Schéma de l'arbre phylogénétique du microbiote intestinal.
- Figure 6 :** Les différentes fonctions du microbiote intestinal.
- Figure 7 :** La régulation du cycle cellulaire.
- Figure 8 :** Le système de réparation de l'ADN par recombinaison homologue.
- Figure 9 :** Le système de réparation de l'ADN par recombinaison non homologue.
- Figure 10 :** Incidence et mortalité du CCR dans le monde.
- Figure 11 :** Les différents stades du CCR selon la classification « TNM ».
- Figure 12 :** La séquence adénome-cancer.
- Figure 13 :** La voie Wnt/ $\beta$ -caténine.
- Figure 14 :** La voie p53/HDM2.
- Figure 15 :** La voie TGF- $\beta$ /SMAD.
- Figure 16 :** Les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR.
- Figure 17 :** La voie NOTCH.
- Figure 18 :** Implication des oncomiRs et miARNs suppresseurs de tumeurs dans le CCR.
- Figure 19 :** Répartition des différentes formes de CCR.
- Figure 20 :** Modèle « driver-passenger » dans le CCR.
- Figure 21 :** Mécanismes par lesquels le microbiote intestinal module la carcinogenèse colorectale.
- Figure 22 :** Rôle pro-carcinogène d'*Enterococcus faecalis* dans le CCR.
- Figure 23 :** Rôle pro-carcinogène de *Bacteroides fragilis* entérotoxigène dans le CCR.
- Figure 24 :** Rôle pro-carcinogène de *Fusobacterium nucleatum* dans le CCR.
- Figure 25 :** Rôle pro-carcinogène de *Streptococcus bovis* dans le CCR.
- Figure 26 :** Rôle pro-carcinogène de *Clostridium septicum* dans le CCR.
- Figure 27 :** Tropisme des différents pathovars d'*Escherichia coli*.
- Figure 28 :** Mécanismes d'action de la cyclomoduline « Cell cycle inhibiting factor » ou CIF.
- Figure 29 :** Mécanismes d'action de la cyclomoduline « Cytotoxic necrotizing factor » ou CNF.
- Figure 30 :** Mécanismes d'action de la cyclomoduline « Cytolethal distending toxin » ou CDT.
- Figure 31 :** Organisation de l'îlot génomique *pks*.
- Figure 32 :** Mécanismes d'action de la colibactine.

- Figure 33** : Les différentes formes d'autophagie.
- Figure 34** : Les étapes principales de la macro-autophagie.
- Figure 35** : Origine du phagophore et initiation de l'autophagie.
- Figure 36** : L'étape d'élongation du phagophore.
- Figure 37** : L'étape de maturation et fusion de l'autophagosome avec les lysosomes.
- Figure 38** : L'autophagie sélective.
- Figure 39** : Les récepteurs impliqués dans l'autophagie sélective.
- Figure 40** : Régulation de l'autophagie par la voie mTOR.
- Figure 41** : Régulation de l'autophagie par la complexe Beclin1.
- Figure 42** : Régulation de l'autophagie par la voie p53.
- Figure 43** : Les bactéries contrôlées par l'autophagie.
- Figure 44** : Les bactéries qui échappent à l'autophagie.
- Figure 45** : Autophagie et immunité.
- Figure 46** : Contribution de l'autophagie dans la présentation des antigènes.
- Figure 47** : Rôle complexe de l'autophagie dans les cancers.
- Figure 48** : Mécanismes pro-tumoraux de l'autophagie dans le CCR décrit par Lévy et al., 2015.
- Figure 49** : Modèle proposé pour le rôle de l'autophagie dans la carcinogenèse colorectale suite à l'infection par des *E. coli pks+*.
- Figure 50** : L'infection des cellules épithéliales intestinales par les souches d'*E. coli/pks+* induit la sécrétion de ROS.
- Figure 51** : Hypothèse de l'implication de la sénescence dans la prolifération des cellules épithéliales intestinales.
- Figure 52** : Mise au point du protocole du test  $\beta$ -galactosidase à pH 6.
- Figure 53** : Prévalence des *E. coli* portant des cyclomodulines.

## *Index des tableaux*

**Tableau 1** : Les enzymes impliquées dans la biosynthèse de la colibactine.

**Tableau 2** : Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'autophagie.

**Tableau 3** : Tableau répertoriant les modulateurs de l'autophagie, leur mode d'action et leur statut clinique.

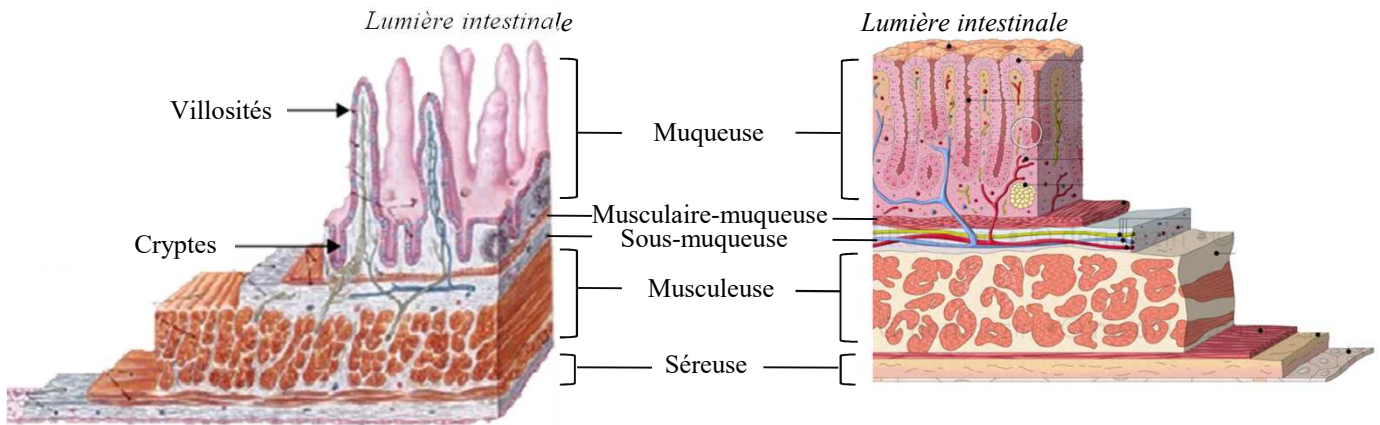
# Synthèse bibliographique

---



### Paroi de l'intestin grêle

### Paroi du côlon



**Figure 1 : La paroi du tube digestif de l'intestin grêle et du côlon.**

La paroi intestinale est composée de cinq couches concentriques nommées, de la lumière intestinale vers les couches les plus profondes, la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculaire-muqueuse, la musculature et la séreuse. Les villosités sont caractéristiques de la muqueuse de l'intestin grêle.

(Modifiées d'après <http://www.corpshumain.ca> et <http://www.medillus.com/portfolio/histologie/> )

## Partie I. Homéostasie du tube digestif

---

### **I.1. La paroi intestinale**

#### **I.1.1 Organisation de la paroi intestinale**

##### **I.1.1.1. Organisation macroscopique**

Au niveau anatomique, le tube digestif est composé successivement de l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le gros intestin (ou côlon) puis le rectum. Au niveau macroscopique, la paroi intestinale est composée de cinq enveloppes bien distinctes nommées de la couche la plus interne vers la lumière intestinale (Ensari and Marsh, 2018) (**figure 1**) :

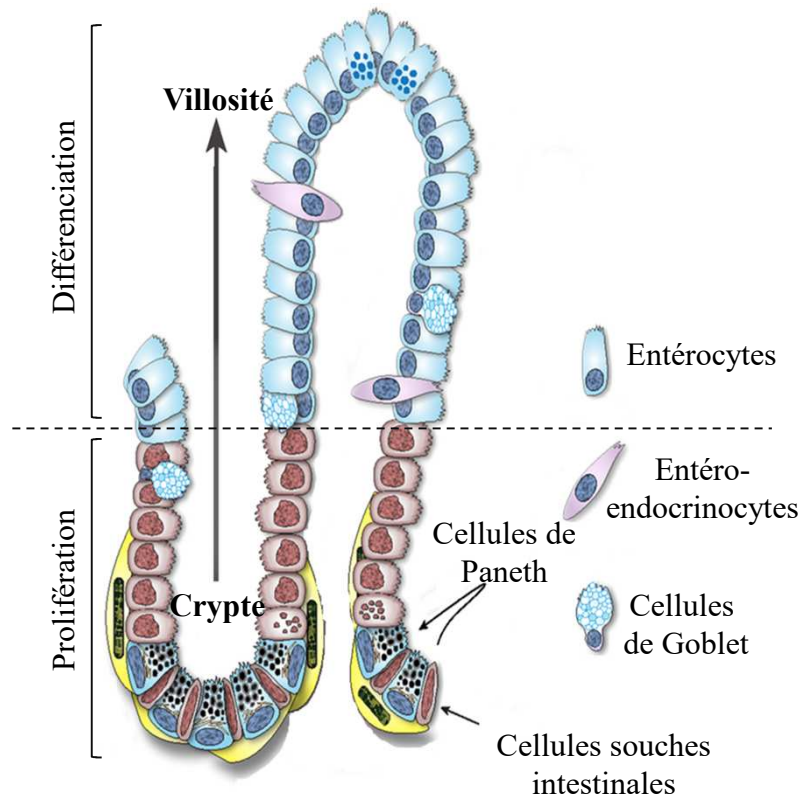
La **tunique externe** ou séreuse, ayant un rôle protecteur aux extrémités du tube digestif.

La **tunique musculieuse**, composée de deux couches de tissus musculaires lisses circulaire interne et longitudinale externe.

La **sous-muqueuse**, composée de tissu conjonctif ainsi que de vaisseaux sanguins et lymphatiques pour la muqueuse.

La **musculaire-muqueuse**, constituée d'une fine couche de tissu musculaire lisse. Cette couche est absente aux extrémités du tube digestif (au niveau supérieur de l'œsophage et au niveau du canal anal).

La **muqueuse** ou tunique interne, composée d'un tissu conjonctif riche en tissus lymphoïdes diffus et follicules lymphoïdes, et d'une couche de cellules correspondant à l'épithélium intestinal et qui assure les échanges entre la lumière du tube digestif et l'intérieur de l'organisme. La structure de la muqueuse est la plus complexe du tube digestif et on constate des particularités d'organisation de la muqueuse en fonction de la localisation le long du tube digestif, notamment entre l'intestin grêle et le côlon. En effet, la muqueuse de l'intestin grêle est composée d'une succession de replis appelés « villosités » et d'invaginations nommées « cryptes de Lieberkühn ». Cette organisation permet à l'intestin grêle d'augmenter la surface de la muqueuse afin d'optimiser l'absorption intestinale. Les villosités sont caractéristiques de cette partie du tube digestif puisqu'ils sont absents au niveau du côlon, qui présente un épithélium de surface plat. Les cryptes de Lieberkühn jouent un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie cellulaire au sein de l'épithélium intestinal (Ensari and Marsh, 2018) (**figure 1**).



**Figure 2 : Les cellules de l'épithélium intestinal.**

Au cours du renouvellement cellulaire de l'épithélium, les cellules souches intestinales se trouvant au niveau des cryptes intestinales se différencient et remontent le long de la crypte, pour donner les différentes cellules épithéliales intestinales différenciées telles que les cellules de Goblet, les entérocytes et les cellules entéro-endocrines. Seules les cellules de Paneth, présentes uniquement au sein des cryptes de l'intestin grêle, ne remontent pas le long de la crypte et gardent un lien étroit avec les cellules souches intestinales.

(Modifiée d'après Eugeria et al., 2009)

### I.1.1.2. Les cellules de la muqueuse intestinale

L'épithélium intestinal est composé de 6 populations cellulaires différentes qui dérivent des cellules souches pluripotentes (**figure 2**). Les villosités de l'épithélium sont exclusivement composées de cellules différenciées telles que les cellules absorbantes ou **entérocytes** qui représentent la majorité des cellules de l'épithélium intestinal (80%) et dont la fonction principale est l'absorption sélective des nutriments au niveau de l'intestin grêle et l'absorption de l'eau au niveau du côlon (Ensari and Marsh, 2018).

Les cellules sécrétrices sont représentées par 4 types cellulaires majeurs : les cellules entéro-endocrines, les cellules de Gobelet, les cellules de Paneth et les cellules de Tuft. Bien que **les cellules entéro-endocrines** ne représentent qu'une faible proportion des cellules épithéliales intestinales (~1%), elles font de l'épithélium intestinal le principal organe endocrine. Ces cellules sont réparties dans une quinzaine de sous-types différents selon le type d'hormone sécrétée (gastrine, ghréline, sécrétine,...). Les hormones sécrétées par les cellules entéro-endocrines régulent la digestion en favorisant les sécrétions pancréatiques et biliaires, mais également en contrôlant la motilité intestinale (Gunawardene et al., 2011). Ces cellules jouent un rôle majeur dans la physiologie de l'épithélium intestinal puisqu'environ la moitié des souris déficientes pour les cellules entéro-endocrines meurent après seulement quelques semaines de vie. Les souris qui survivent présentent des cryptes intestinales atrophiées et un renouvellement épithélial accéléré (Mellitzer et al., 2010). Les **cellules de Gobelet**, ou cellules calciformes, représentent 5% des cellules épithéliales intestinales. Elles sont réparties de façon très hétérogène le long du tube digestif où elles représentent 4% des cellules épithéliales du duodénum et jusqu'à 16% des cellules épithéliales coliques (Karam, 1999). Ce sont des cellules de formes allongées, spécialisées dans la synthèse et la sécrétion du mucus afin de protéger la surface de l'épithélium contre le contenu de la lumière intestinale, notamment des microorganismes. Ce mucus joue également le rôle important de lubrificateur du tube digestif (Deplancke and Gaskins, 2001). Les **cellules de Paneth**, se trouvent exclusivement au niveau du fond des cryptes intestinales au contact direct des cellules souches (Karam, 1999) (**figure 2**). Elles possèdent, au niveau de leur partie apicale, des granules de sécrétion éosinophiles, qui contiennent des molécules anti-microbiennes (lysosymes, phospholipase A2 et défensines) et qui constituent la première ligne de défense en cas d'invasion par des micro-organismes. Plus récemment, les études ont mis en évidence un rôle des cellules de Paneth dans le maintien, la régulation et le renouvellement des cellules souches présentes à la base des cryptes (Sato et al., 2011). Les **cellules Tuft** représentent seulement 0,4% des cellules épithéliales intestinales. Ces cellules jouent le rôle de cellules

sécrétrices de la  $\beta$ -endorphine régulant la motilité intestinale, la sécrétion et la douleur (Gerbe et al., 2012).

Les **cellules M** (cellules Microfold) sont localisées au niveau des structures lymphoïdes de l'intestin, les plaques de Peyer, et jouent un rôle important dans la physiologie de l'épithélium intestinal. En effet, ces cellules épithéliales intestinales sont spécialisées dans l'endocytose d'antigènes, de molécules ou encore de microorganismes présents dans la lumière intestinale et présentent les antigènes endocytés au système immunitaire sous-jacent (Kucharzik et al., 2000). Ces cellules peuvent également être utilisées par des pathogènes tels que les *Escherichia coli* entéro-hémorragiques (Etienne-Mesmin et al., 2011), les *Escherichia coli* adhérents et invasifs associés à la maladie de Crohn (Chassaing et al., 2011) et *Salmonella* Typhimurium (Jones et al., 1994), leur permettant de transloquer à travers l'épithélium au niveau des plaques de Peyer.

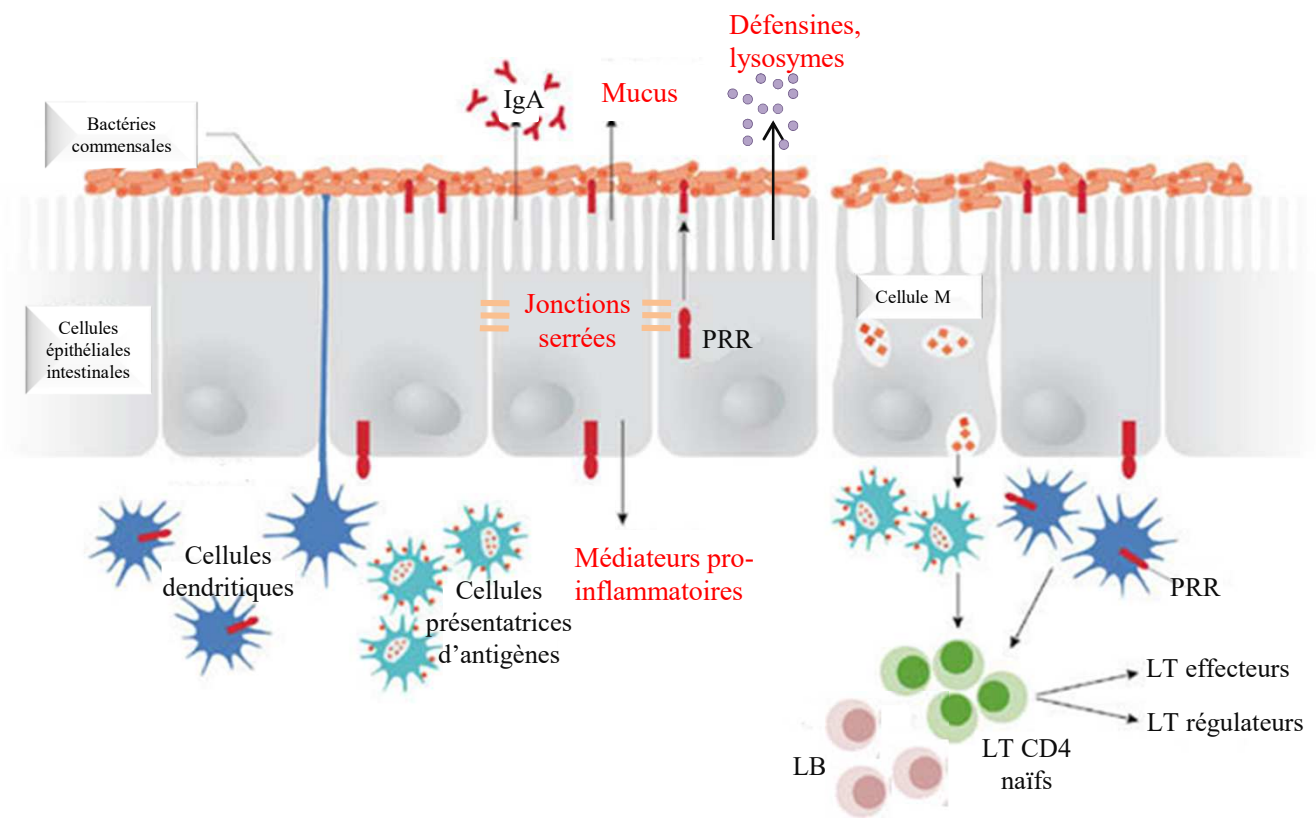
Les cellules souches intestinales situées à la base des cryptes jouent un rôle majeur dans le renouvellement de l'épithélium intestinal. Au cours du renouvellement cellulaire (tous les 4 à 5 jours chez l'Homme) (Umar, 2010), les cellules souches intestinales donnent naissance à des cellules progénitrices, qui après plusieurs divisions se différencient et remontent le long de la crypte, pour donner les différentes cellules épithéliales intestinales décrites précédemment. En arrivant au sommet de la crypte, ces cellules sont ensuite éliminées dans la lumière intestinale par anoikis, une apoptose spontanée (Marshman et al., 2002). Seules les cellules de Paneth ne remontent pas le long de la crypte et gardent un lien étroit avec les cellules souches intestinales (**figure 2**).

### I.1.2 Le système immunitaire du tube digestif

La muqueuse intestinale héberge un système de défense complexe lui permettant une protection contre les pathogènes auxquels elle peut être confrontée. Le système immunitaire intestinal peut être séparé en deux catégories : l'immunité innée opérée par les cellules épithéliales intestinales et par les cellules présentatrices d'antigènes, et l'immunité adaptative incarnée par les lymphocytes.

#### I.1.2.1. L'immunité intestinale innée

L'épithélium intestinal constitue la première ligne de défense du tube digestif en réponse à une agression par un pathogène. D'une part, l'épithélium constitue une barrière physique grâce à la présence de jonctions serrées empêchant la propagation de pathogènes et/ou de molécules microbiennes issues de la lumière intestinale. La couche de mucus ainsi



**Figure 3 : L'immunité du tube digestif.**

Suite à la détection d'un pathogène, les entérocytes sécrètent des médiateurs de l'immunité en réponse aux antigènes, tels que des peptides antimicrobiens (défensines, lysosymes), des immunoglobulines A et des cytokines et chimiokines. Les cellules M transportent et délivrent les antigènes aux cellules présentatrices d'antigène activant ainsi la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes B et T.

Les cellules dendritiques surveillent et échantillonnent le microenvironnement. Les PRR exprimés par les cellules dendritiques et les entérocytes servent à la détection des antigènes bactériens, et les cellules dendritiques modulent une réponse immunitaire ou une tolérance en activant soit les lymphocytes T effecteurs soit les T régulateurs.

(Modifiée d'après O'Hara et Shanahan, 2006)

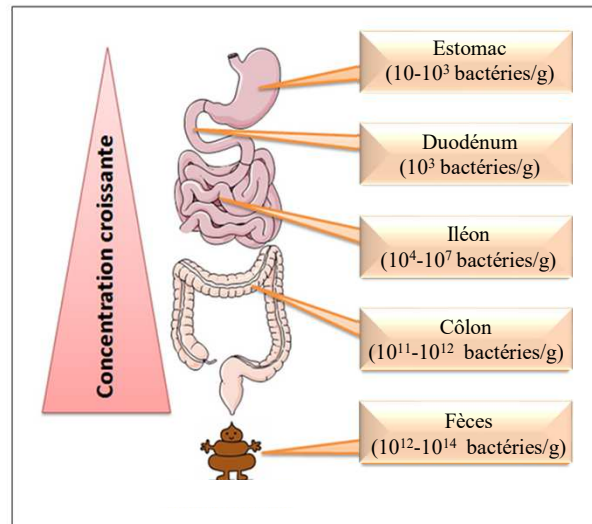
que le renouvellement rapide de l'épithélium participent aussi au maintien de cette barrière physique (Capaldo et al., 2017). D'autre part, les cellules épithéliales sécrètent des molécules antimicrobiennes (défensines, lysosymes) de manière constitutive ou induite par la détection d'un pathogène aboutissant à la dégradation de ce dernier (McCormick and Weinberg, 2010) (**figure 3**).

Les motifs associés aux pathogènes ou PAMP (pathogen-associated molecular pattern) sont des motifs à la surface des micro-organismes qui permettent leur détection et leur reconnaissance par les récepteurs de l'immunité innée ou PRR (pattern recognition receptor) (Takeuchi and Akira, 2010). Les PRR peuvent être de différents types : les TLRs (Toll-like receptors) présents à la surface des cellules, les NLRs [NOD (Nucleotide oligomerization domain)-like receptors], récepteurs intracellulaires dont le rôle majeur est de détecter les PAMP cytoplasmiques, les RLRs [RIG (Retinoic acid-inducible gene)-I-like receptors] reconnaissent exclusivement les pathogènes viraux, et les CLR (C-type leptin-like receptors) reconnaissent essentiellement les motifs hydrocarbonés présents à la surface des pathogènes (Kawai and Akira, 2009 ; Hoving et al., 2014).

L'activation des PRR suite à la reconnaissance d'un pathogène conduit à l'activation d'une cascade de signalisation ayant pour conséquence l'activation de la réponse immunitaire notamment via la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, de molécules antimicrobiennes, ainsi que le recrutement des cellules immunitaires telles que les neutrophiles et les macrophages (Fukata and Arditi, 2013). Les neutrophiles vont alors pénétrer le site inflammatoire et assurer la phagocytose des agents pathogènes, ainsi que des cellules infectées. Les macrophages, eux, vont à leur tour libérer des substances actives, participer à la phagocytose et initier la réponse immunitaire de type spécifique avec d'autres cellules présentatrices d'antigène.

#### I.1.2.2. L'immunité intestinale adaptative

La capture des antigènes présents dans la lumière intestinale met en jeu plusieurs mécanismes immunitaires. Les constituants majeurs de l'immunité adaptative sont les GALT (Gut-associated lymphoid tissues) ou tissus lymphoïdes associés au tube digestif tels que les plaques de Peyer et les nodules lymphoïdes isolés (Holleran et al., 2017). Ces deux médiateurs de l'immunité adaptative sont notamment composés de cellules M au sein de leur épithélium qui sont capables de capter les particules antigéniques qui arrivent à leur contact. Ces particules sont alors présentées par les cellules M, au microenvironnement immunitaire activant ainsi la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes B et T (**figure 3**).



**Figure 4 : Répartition de la quantité de bactéries de long du tractus digestif.**

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

(Modifiée d'après <https://www.museum.toulouse.fr/-/le-microbiote-intestinal-un-organe-a-part-entiere>)



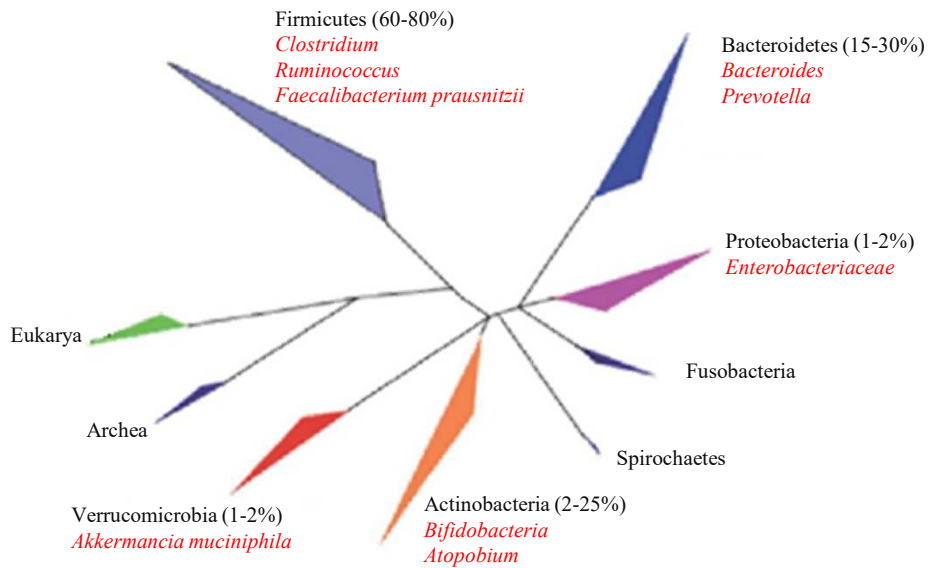
Les lymphocytes B activés arrivent à maturation au niveau des muqueuses et sont capables de produire des immunoglobulines (Ig) A spécifiques de l'antigène qui les a activées. Un phénomène de transcytose permet aux IgA présentes au niveau basolatéral d'être internalisées et libérées au niveau apical sous forme d'IgA sécrétoires. Ces IgA sécrétoires tapissent la muqueuse et captent les antigènes qui se présentent à elles, empêchant ainsi leur entrée dans le tissu.

Les lymphocytes T CD4+ auxiliaires (ou T helper) sont des acteurs essentiels de l'immunité adaptative. Lorsqu'un antigène est présenté par les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD4+ naïfs sont activés, ce qui induit leur prolifération et leur différenciation en lymphocytes T auxiliaires. Ces derniers ont la capacité de se différencier en plusieurs sous-populations de lymphocytes T caractérisées par la sécrétion de cytokines différentes et adaptées à l'agent infectieux mis en cause. Ainsi, les lymphocytes T auxiliaires peuvent notamment sécréter selon le type de pathogènes, de l'interféron (IFN)- $\gamma$  qui favorise l'activité antimicrobienne des macrophages, ou de l'interleukine (IL)- 17 qui induit le recrutement et l'activation des neutrophiles, eux aussi impliqués dans l'élimination des pathogènes (Bouladoux et al., 2013).

Dans le tube digestif, le système immunitaire est activé de façon constitutive et doit rapidement détecter les pathogènes afin d'activer une réponse immunitaire adaptée tout en garantissant une réponse immunitaire réduite envers les bactéries commensales non pathogènes.

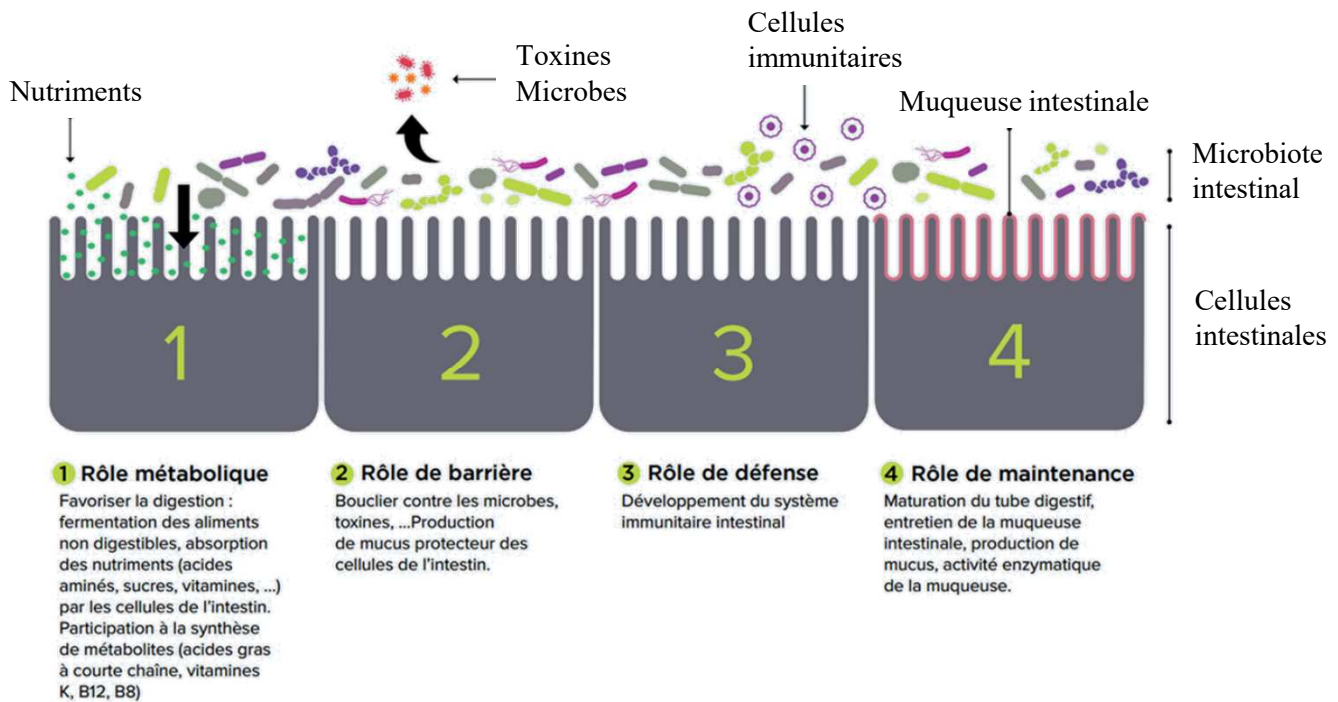
## **I.2. Le microbiote intestinal**

Le microbiote intestinal représente toute la communauté de micro-organismes présents au niveau du tube digestif comprenant les bactéries, les virus, les archées ainsi que les protistes. A l'heure actuelle, il a été estimé que près de 1000 espèces bactériennes cohabitent au sein du tractus digestif et la densité de cette flore bactérienne évolue tout au long du tube digestif où l'on peut trouver  $10^8$  à  $10^9$  bactéries par gramme de tissu au niveau de l'estomac et du duodénum, entre  $10^4$  et  $10^7$  bactéries par gramme de tissu au niveau de l'intestin grêle et jusqu'à  $10^{11}$  à  $10^{12}$  bactéries par gramme de tissu au niveau du côlon distal (Sartor, 2008) (**figure 4**). Chez l'adulte, trois phyla rassemblent la plupart des espèces bactériennes dominantes du tube digestif, les *Firmicutes* (60-80%), les *Bacteroidetes* (15-30%) et les *Actinobacteria* (2-25%) (Cheng et al., 2013). Le phylum des protéobactéries, constitué notamment de l'espèce *Escherichia coli* représente moins de 2% des espèces détectées. Les autres phyla bactériens présents au niveau du côlon sont les *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*,



**Figure 5 : Schéma de l'arbre phylogénétique du microbiote intestinal.**

Les Firmicutes, Actinobactéries et Bacteroidetes représentent les trois phylum majoritaires du microbiote intestinal. La proportion des différents phyla au sein du microbiote intestinal total est précisé entre parenthèse. Les genres et espèces bactériens ayant un impact important sur la santé humaine sont indiqués en rouge. (Modifiée d'après Cheng et al., 2013)



**Figure 6 : Les différentes fonctions du microbiote intestinal.**

Le microbiote intestinal entretient une relation symbiotique avec l'hôte et exerce plusieurs fonctions physiologiques majeures afin de garantir l'homéostasie de l'intestin telles qu'un rôle métabolique via l'absorption des nutriments et la synthèse de vitamine, un rôle de barrière contre les pathogènes présents dans la lumière intestinale, un rôle dans la maturation du système immunitaire et un rôle dans le développement et la maturation du tractus digestif.

(Modifiée d'après <https://www.biocodexmicrobiotainstitute.com/intestinal>)

*Cyanobacteria* et *Spyrochaetes* (**figure 5**) (Cheng et al., 2013). Cette population microbienne entretient une relation symbiotique avec l'hôte et exerce des fonctions physiologiques indispensables telles que (1) le développement et la maturation du tractus intestinal, (2) une fonction de barrière et de protection contre la colonisation par des pathogènes, (3) la mise en place et la maturation du système immunitaire, ainsi que (4) le métabolisme des nutriments (Lucas et al., 2017) (**figure 6**). Ainsi, une dérégulation de la composition du microbiote intestinal, appelée dysbiose, est associée à plusieurs pathologies humaines telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, l'obésité, le diabète, l'autisme, et certains cancers (DeGruttola et al., 2016).

### I.2.1. Les différentes fonctions du microbiote intestinal

#### I.2.1.1. Développement et maturation du tractus digestif et fonction de barrière intestinale

La fonction principale de l'épithélium intestinal est de former une barrière afin de protéger le tube digestif de l'environnement extérieur, de réguler l'absorption de nutriments, d'électrolytes et d'eau venant de la lumière intestinale et de maintenir l'homéostasie entre l'environnement intestinal et l'hôte. Pour cela, l'épithélium est composé de deux éléments largement influencés par le microbiote intestinal : le mucus et les jonctions serrées. Chez des souris dépourvues du microbiote intestinal (souris axéniques), la couche de mucus protectrice de l'épithélium n'est pas bien développée (Johansson et al., 2008). Les bactéries commensales participent au développement de l'épithélium intestinal en stimulant la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales intestinales. En absence du microbiote intestinal, le renouvellement de l'épithélium et la migration des cellules différenciées vers le pôle apical des cryptes sont ainsi largement réduits (Park et al., 2016).

Par ailleurs, les acides gras à chaîne courte produits par le microbiote intestinal, notamment le butyrate, permettent de renforcer la barrière intestinale en diminuant la perméabilité membranaire via l'augmentation de l'expression des protéines de jonctions serrées ; claudine-1 et ZO-1 (zonula occludens-1) (Wang et al., 2012). Le butyrate a aussi un impact sur la production de mucus puisqu'il augmente l'expression de la mucine (Gaudier et al., 2004). Les souris axéniques ou traitées avec un cocktail d'antibiotiques présentent des dysfonctionnements de la barrière intestinale due à une diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées et une faible expression des protéines du mucus (Hernández-Chirlique et al., 2016). Ces souris développent donc une susceptibilité augmentée à la colite

induited chimiquement par le DSS (dextran sodium sulfate), confirmant le rôle majeur du microbiote dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium.

#### I.2.1.2. Protection contre la colonisation par des pathogènes

Les études ont mis en évidence que les souris traitées avec l'antibiotique à large spectre, néomycine, sont plus sensibles à l'infection par *Clostridium difficile* comparées aux souris non traitées (Lawley et al., 2009), montrant l'importance des bactéries commensales dans la défense de l'hôte contre les pathogènes. Les mécanismes par lesquels le microbiote intestinal inhibe la colonisation par les pathogènes impliquent une relation de compétition entre les bactéries du microbiote et les bactéries pathogènes pour l'accès aux récepteurs de l'hôte ainsi que pour l'accès aux nutriments disponibles, la sécrétion de molécules antimicrobiennes et l'activation de l'immunité innée ainsi que l'acidification du milieu ou la disponibilité en oxygène afin de rendre le milieu inadapté aux bactéries pathogènes (Lucas et al., 2017).

#### I.2.1.3. Maturation et mise en place du système immunitaire

Le microbiote intestinal est impliqué dans la mise en place et la maturation des GALT puisqu'il favorise le recrutement des cellules immunitaires vers la muqueuse (Macpherson and Harris, 2004). Les études ont mis en évidence que les GALTs sont peu développés chez les souris axéniques. Chez les souris axéniques, les plaques de Peyer présentent moins de cellules M et moins de lymphocytes T, acteurs majeurs de l'immunité adaptative (Yamanaka et al., 2003).

Les bactéries décrites comme ayant le plus d'impact sur le système immunitaire sont les bactéries filamenteuses segmentées. Ces bactéries apparentées au genre *Clostridium* entretiennent une relation symbiotique avec l'hôte puisqu'elles adhèrent à la surface de l'épithélium au niveau des plaques de Peyer afin de profiter des nutriments disponibles (Schnupf et al., 2015). Pour l'hôte, ce contact permet la stimulation du système immunitaire et favorise le développement des tissus lymphoïdes.

#### I.2.1.4. Métabolisme des nutriments

Un autre rôle majeur du microbiote intestinal est la dégradation des composés alimentaires en nutriments. Le microbiote intestinal a la capacité de métaboliser de nombreuses substances d'origine endogène ou exogène (issues du bol alimentaire), telles que les glucides, protéines, lipides et gaz, dont la prise en charge et la transformation aboutissent à la formation de nouveaux métabolites, tels que les vitamines B et K et les acides gras à chaîne courte, bénéfiques à la fois pour l'hôte et pour le microbiote intestinal lui-même.

Par exemple, les acides gras à chaîne courte, tels que le butyrate, le propionate et l'acétate, sont les produits majoritaires synthétisés au cours de la fermentation des carbohydrates par les bactéries et leur rôle bénéfique pour l'hôte est largement étudié. Ils ont notamment un rôle énergétique majeur puisqu'ils sont la source majeure d'énergie pour les cellules du côlon (Sun and O'Riordan, 2013). De plus, les acides gras à chaîne courte possèdent des propriétés anti-inflammatoires et anti-tumorales et ont la capacité de renforcer la fonction de la barrière épithéliale ainsi que de réduire le stress oxydatif (van der Beek et al., 2017).

De nombreuses bactéries du microbiote intestinal exercent une activité protéolytique et hydrolysent les protéines en petits peptides. Ces peptides sont métabolisés par certaines bactéries en acides aminés et deviennent une source d'énergie ou d'azote pour d'autres bactéries.

Par ailleurs, le microbiote entraîne la synthèse de vitamines, notamment les vitamines K et B, qui sont importantes pour le métabolisme bactérien mais qui jouent aussi un rôle physiologique pour l'hôte. Par exemple, les rats axéniques soumis à un régime non supplémenté en vitamine K ont des taux de prothrombine faible et sont victimes d'hémorragies. De façon intéressante, lorsque ces mêmes rats sont mono-colonisés avec des souches d'*Escherichia coli* isolées de rats conventionnels, portant un microbiote intestinal, la déficience en vitamine K n'est plus observée soulignant l'importance majeure du microbiote dans la santé de l'hôte (Gustafsson et al., 1962).

### I.2.2. Les facteurs influençant la composition du microbiote intestinal

Certains facteurs internes ou externes peuvent influencer la composition et l'activité métabolique du microbiote intestinal tels que la génétique, l'âge, le type d'alimentation, la prise répétée de prébiotiques, probiotiques et antibiotiques ainsi que la pratique d'une activité physique. Plus récemment, les études ont mis en évidence une modification du microbiote intestinal par les additifs et les contaminants alimentaires (Roca-Saavedra et al., 2018).

#### I.2.2.1. La naissance

*In utéro*, l'intestin du bébé est stérile et le microbiote intestinal se met en place dès les premiers contacts du bébé avec l'environnement. Cette période de colonisation bactérienne est cruciale puisqu'elle va influencer l'état de santé de l'individu, tout au long de sa vie. Au moment de la naissance, la mise en place du microbiote est influencée notamment par le

temps de gestation et le mode d'accouchement. Les études ont rapporté que la composition du microbiote intestinal est différente chez les nourrissons nés par césarienne par rapport à ceux nés par accouchement par voie vaginale. Les nourrissons nés par accouchement par voie vaginale sont exposés aux bactéries de la mère à la naissance, ce qui influence la mise en place de leur microbiote et stimule les globules blancs et d'autres composants du système immunitaire. De plus, chez les nouveau-nés prématurés a été mise en évidence une composition microbienne différente comparativement aux nouveau-nés à terme, et ceci pourrait être expliqué par l'immaturation du système immunitaire et de l'épithélium intestinal au moment de la naissance (Yang et al., 2016).

#### I.2.2.2. La génétique

L'influence de la génétique sur la colonisation bactérienne a été mise en évidence suite à l'observation que les membres d'une même famille ont un microbiote plus similaire que les individus non apparentés. De plus, le microbiote intestinal est plus similaire chez des jumeaux monozygotes que chez des jumeaux dizygotes (van de Merwe et al., 1983). Une étude récente a montré que les gènes de l'hôte modulent 8,8% des microbes (Goodrich et al., 2016). Cette même étude a permis d'identifier des espèces bactériennes héréditaires liées aux préférences alimentaires, au métabolisme et au système immunitaire. Par exemple, les personnes présentant un variant spécifique du gène *LCT* codant pour la lactase, donc intolérantes au lactose, présentent une augmentation de l'abondance en *Bifidobactérie* dans les fécès par rapport aux sujets tolérants au lactose (Goodrich et al., 2016).

#### I.2.2.3. L'âge

Plusieurs études ont mis en évidence un changement de la composition du microbiote intestinal entre les bébés, les enfants, les adultes et les personnes âgées (Conlon and Bird, 2014). De façon générale, la composition du microbiote se diversifie beaucoup jusqu'à l'âge de 3 ans environ et reste stable pour une grande partie de la vie. Au cours du vieillissement, la diversité microbienne diminue. Plusieurs études ont rapporté une diminution de *Clostridia*, l'un des deux groupes majoritaires appartenant au phylum des *Firmicutes*, chez les personnes âgées (Biagi et al., 2010; Mäkituokko et al., 2010). Le ratio entre les *Bacteroidetes* et les *Firmicutes* est souvent considéré comme un paramètre informatif de l'état général du microbiote intestinal. Des études ont rapporté que le rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* était inférieur chez les personnes âgées comparativement à des jeunes adultes (Mariat et al., 2009).

#### I.2.2.4. L'alimentation

Les études sur le microbiote intestinal d'enfants allaités *versus* enfants nourris avec des formules infantiles ont mis en évidence l'impact de l'alimentation sur la mise en place précoce du microbiote intestinal. En effet, le microbiote des enfants allaités est dominé par les *Bifidobactéries* et les *Lactobacilles*, tandis que les *Enterobacteriaceae* prédominent chez les enfants nourris avec des formules infantiles. L'alimentation joue donc un rôle déterminant dans l'implantation du microbiote intestinal (Bezirtzoglou et al., 2011).

Les études ont montré une diminution de la diversité microbienne chez les souris nourries avec un régime riche en lipides et en sucre comparativement aux souris nourries avec un régime conventionnel (Everard et al., 2013).

Plus récemment, les études se sont intéressées à l'impact des composés alimentaires sur la composition du microbiote intestinal. Notamment, les polyphénols contenus dans les fruits, les légumes, les graines/céréales, le café et le thé peuvent moduler la composition du microbiote intestinal en inhibant les bactéries potentiellement pathogènes au profit des bactéries bénéfiques. Plusieurs de ces composés phénols ont des caractéristiques bactériostatiques et/ou bactéricides et peuvent moduler l'abondance des espèces ou genres bactériens (Roca-Saavedra et al., 2018). D'autres composés peuvent avoir un impact sur la composition du microbiote intestinal. Notamment, l'acide linoléique augmente l'abondance d'*Akkermancia muciniphila* chez des souris adultes nourries avec un régime riche en lipides et en sucre. Les auteurs mettent en évidence un effet prébiotique de l'acide linoléique pour sa capacité à moduler l'abondance de certaines espèces bactériennes. Par ailleurs, l'acide linoléique induit l'expression des gènes codant pour des protéines gastriques améliorant ainsi le métabolisme (Chaplin et al., 2015).

L'utilisation d'additifs alimentaires augmente de plus en plus, et très peu d'études chez l'Homme ont analysé l'effet des additifs alimentaires sur la composition du microbiote intestinal. Chez les souris, les études ont montré que la consommation d'émulsifiants alimentaires et d'édulcorants altère la composition du microbiote intestinal, entraînant des perturbations intestinales accompagnées d'une inflammation. Les émulsifiants sont responsables d'une diminution de la diversité microbienne, d'une perturbation de l'interaction entre l'hôte et le microbiote et semble contribuer à la survenue des maladies inflammatoires dans les pays industrialisés (Roca-Saavedra et al., 2018). Notamment, deux émulsifiants couramment utilisés, le polysorbate-80 et le carboxyméthylcellulose, sont responsables d'une altération de la composition du microbiote associée à une inflammation à bas bruit, qui peut favoriser la survenue de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin telles que la colite

ulcéreuse. Le polysorbate-80 est aussi capable d'augmenter la translocation des *E. coli* au travers des cellules M, augmentant ainsi les risques d'infections (Chassaing et al., 2015; Roca-Saavedra et al., 2018).

Enfin, les contaminants alimentaires tels que les métaux lourds et les produits chimiques, comme par exemple les pesticides ou herbicides, peuvent avoir un impact négatif sur la composition du microbiote intestinal. Les études ont mis en évidence que le polluant 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran induit une forte modification de la composition du microbiote des rats avec notamment un déséquilibre du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*, accompagné par des désordres métaboliques liés à des dérèglements de la lipogenèse, la gluconéogenèse et de la glycolyse (Zhang et al., 2015). *In vitro*, le glyphosate, un herbicide, entraîne la réduction de l'abondance de genres bactériens bénéfiques tels que *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*. L'administration du Chlorpyrifos, un pesticide, à des rats, induit un déséquilibre de la composition du microbiote intestinal avec une augmentation des *Bacteroidetes* et une diminution des *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Joly et al., 2013).

#### I.2.2.5. Les infections bactériennes

La composition et la diversité du microbiote intestinal sont largement influencées par l'infection par des pathogènes. En effet, une étude a mis en évidence l'apparition d'une dysbiose intestinale avec notamment une diminution de l'abondance des *Lactobacilles* chez des souris infectées par *Citrobacter rodentium*. De plus, une étude a montré que des patients porteurs de *Clostridium difficile* ont une diversité et une richesse microbiennes diminuées par rapport aux sujets sains (Seekatz et al., 2016). La transplantation du microbiote intestinal de donneurs sains à des patients infectés par *Clostridium difficile* augmente la richesse et la diversité microbienne des patients receveurs (Gianotti and Moss, 2017). Ces données confirment que les infections bactériennes peuvent être à l'origine d'une dysbiose intestinale.

#### I.2.2.6. La prise de médicaments

De plus en plus d'études mettent en évidence que la prise de médicaments a un impact sur le microbiote intestinal. Les antibiotiques sont couramment utilisés contre les infections mais ont un large impact sur le microbiote « normal » de l'hôte. La prise répétée d'antibiotique est notamment associée à une diminution de la diversité bactérienne (Bonnemaison et al., 2003). Les antibiotiques à large spectre diminuent la diversité bactérienne, augmentent l'abondance des bactéries opportunistes et diminuent l'abondance des bactéries bénéfiques (Modi et al., 2014). La prise d'antibiotiques chez les enfants peut



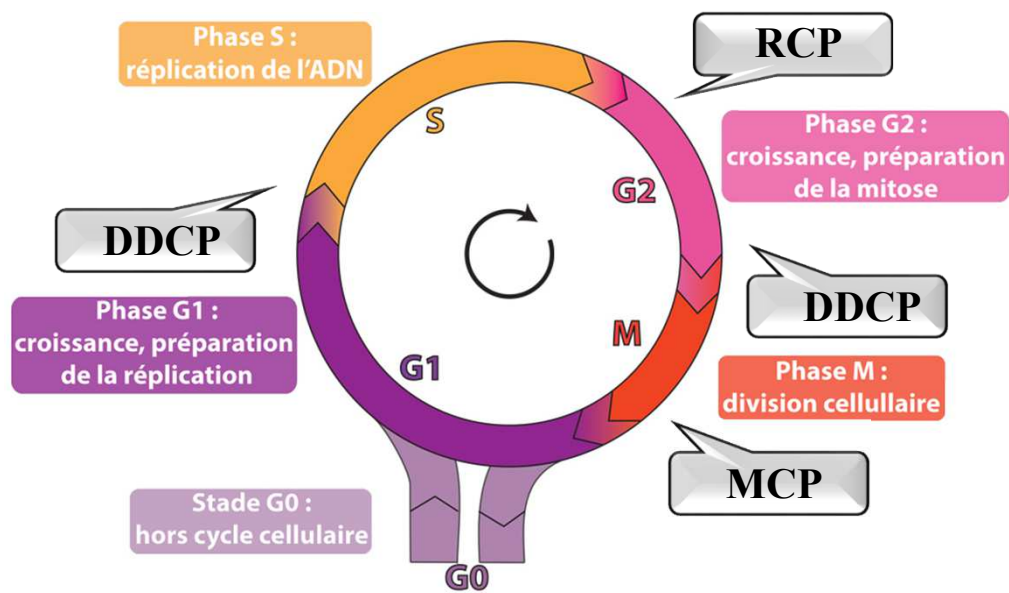
entraîner une dysbiose intestinale, qui est un facteur prédisposant aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Shaw et al., 2010).

#### I.2.2.7. La pratique d'une activité physique

Les premières études sur l'effet de la pratique d'un exercice physique sur la composition du microbiote ont été conduites chez les rats. Il a été montré que les rats pratiquant une activité physique ont une composition du microbiote intestinal modifiée, qui est associée à une augmentation de la concentration en butyrate (Matsumoto et al., 2008). De plus, Evans et collaborateurs ont mis en évidence que la pratique d'une activité physique prévenait l'apparition de l'obésité chez les souris nourries avec un régime riche en lipides et en sucre. Ceci était accompagné d'un changement de l'abondance des différents phyla majeurs du microbiote intestinal (Evans et al., 2014). Récemment, Codella et al., ont répertorié l'ensemble des études de l'impact de l'activité physique sur la composition du microbiote, conduites chez l'animal et chez l'Homme (Codella et al., 2018). Ces études montrent un rôle bénéfique de la pratique d'une activité physique sur la composition du microbiote avec notamment une augmentation de la diversité microbienne et une augmentation de l'abondance en bactéries dites bénéfiques (Codella et al., 2018).

#### I.2.2.8. Le tabagisme actif

Les effets du tabagisme actif sur la composition du microbiote intestinal ont été mis en évidence dans plusieurs études chez l'Homme (Benjamin et al., 2012; Biedermann et al., 2013, 2014; Savin et al., 2018; Stewart et al., 2018). Deux études ont mis en évidence une modification de la composition du microbiote intestinal après l'arrêt de la consommation de cigarette (Biedermann et al., 2013, 2014). En effet, après 9 semaines sans consommation de cigarette, les sujets présentaient une augmentation de l'abondance des *Firmicutes* et des *Actinobacteries* alors que l'abondance des *Bacteroides* et *Proteobacteries* diminuait de moitié. De plus, la diversité bactérienne était augmentée après 9 semaines sans consommation de cigarette. Aucune modification de la composition du microbiote n'a été détectée chez les sujets qui ne fument pas et chez ceux qui n'ont pas cessé de fumer pendant l'étude (Biedermann et al., 2013). Plus récemment, une étude a mis en évidence une diminution de l'abondance relative des *Bacteroides* et une augmentation de l'abondance relative des *Prevotella* chez les fumeurs comparés aux sujets non-fumeurs (Stewart et al., 2018). Ces études montrent que le tabagisme actif joue un rôle néfaste pour la composition du microbiote.



**Figure 7 : La régulation du cycle cellulaire.**

Le cycle cellulaire est composé de 5 phases appelées phases G0, G1, S, G2 et M. Lorsqu'elles ne se divisent pas, les cellules sont en phase de quiescence, ou phase G0. La phase G1 prépare la réplication de l'ADN réalisée au cours de la phase S. Intervient ensuite la phase G2 de préparation à la mitose puis la phase M. Le cycle cellulaire est régulé par 3 points de contrôle, le DDCP activé lors des phases G1/S et G2/M, le RCP activé lors de la transition S/M et le MCP, activé au cours de la mitose.

(Modifiée d'après [https://rnbio.upmc.fr/bio-cell\\_cycle-cellulaire\\_introduction](https://rnbio.upmc.fr/bio-cell_cycle-cellulaire_introduction))

### **I.3. Les processus cellulaires de maintien de l'homéostasie intestinale**

Au niveau cellulaire, plusieurs processus contribuent à l'homéostasie intestinale, tels que le contrôle fin du cycle cellulaire, la mise en place des systèmes de réparation de l'ADN et l'entrée en apoptose ou en sénescence des cellules.

#### **I.3.1. Les points du contrôle du cycle cellulaire**

Les effecteurs de la régulation du cycle cellulaire jouent un rôle au niveau de points de contrôle qui peuvent arrêter l'avancée du cycle cellulaire pour permettre la fin d'une étape et/ou la réparation des erreurs ou des altérations survenues au cours du cycle cellulaire. Trois points de contrôle majeurs assurent la surveillance du cycle cellulaire (**figure 7**) :

- Le DDCP (DNA damage check point) est activé lors de la transition des phases G1/S et G2/M. Il est important dans le contrôle de l'intégrité du génome en bloquant l'avancée du cycle cellulaire pendant que les éventuelles erreurs ou cassures de l'ADN sont recherchées.
- Le RCP (Replication check point) joue un rôle au niveau de la transition S/M puisqu'il vérifie l'achèvement de la réplication avant l'entrée en mitose.
- Le MCP (Mitotic check point) contrôle le bon positionnement des chromosomes au niveau du fuseau mitotique avant la ségrégation des chromatides au cours de la mitose.

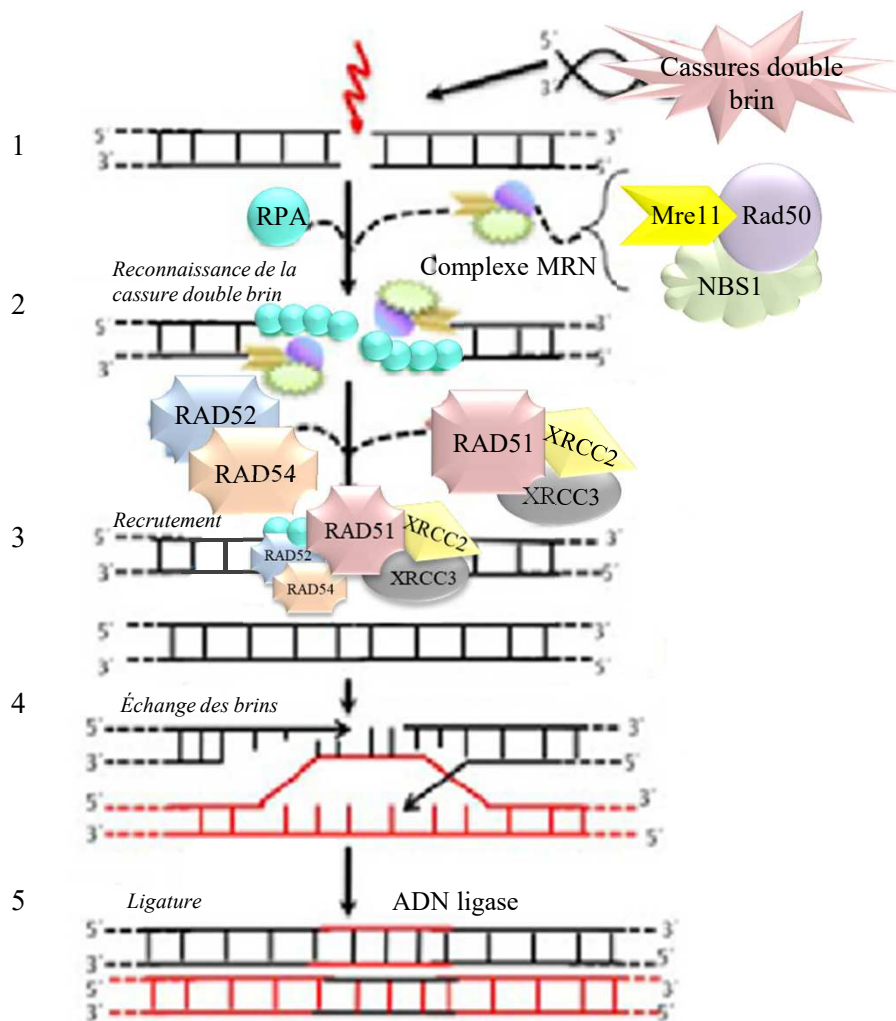
#### **I.3.2. Les systèmes de réparation de l'ADN**

Des erreurs peuvent survenir au cours de la réplication de l'ADN et peuvent contribuer à une instabilité génomique. De plus, l'ADN peut se trouver en contact avec des agents qui altèrent l'ADN et peuvent induire des lésions. Afin d'éviter l'apparition et la transmission de ces erreurs et/ou lésions, les cellules mettent en place des systèmes de réparation qui peuvent être différents selon l'origine des dommages.

##### **I.3.2.1. La réparation par les systèmes BER, NER et MMR**

Les systèmes BER (Base excision repair), NER (Nucleotide excision repair) et MMR (Mismatch repair) reposent tous sur la reconnaissance des lésions, l'excision et le remplacement des nucléotides altérés ou mal appariés.

Le système BER est utilisé pour réparer les modifications chimiques survenues au niveau d'une base seule. Cette erreur est réparée par élimination de la base par l'ADN glycosylase. Une ADN polymérase synthétise ensuite un nouveau brin d'ADN intact remplaçant le nucléotide endommagé. Enfin, une ADN ligase suture le brin réparé.



**Figure 8 : Le système de réparation de l'ADN par recombinaison homologue.**

(1) Les cassures double brin sont détectées par le complexe MRN composé des protéines Mre11, Rad50 et NBS1 qui possèdent une activité endonucléase et 3'-5' exonucléase. Le déroulement des brins est assisté par la protéine Rad50. (2) L'extrémité simple brin qui résulte de la cassure en 3' est coâtée par la protéine RPA. (3) RPA facilite la mise en place des filaments Rad51-ADN médiée par les nucléoprotéines XRCC2, XRCC3, Rad51. La protéine Rad52 interagit avec Rad51 afin de faciliter la recherche d'homologie et l'échange des brins et l'ATPase ADN-dépendante, Rad54 interagit aussi avec Rad51 est favorise son activité. (4) L'échange des brins est suivi par la synthèse d'un nouveau brin d'ADN utilisant l'ADN complémentaire intacte. (5) Les extrémités néo-formées sont ligaturées par l'ADN ligase 1.

(Modifiée d'après Mazumber et al., 2014)

Le système NER permet de réparer principalement les lésions étendues qui déforment l'ADN de façon importante comme les pontages. Ce système est caractérisé par la reconnaissance de la région endommagée, l'intervention des hélicases afin d'ouvrir le duplexe d'ADN et l'intervention des endonucléases afin de cliver l'ADN en 5' et en 3' de la lésion. Après le clivage, une ADN polymérase synthétise un nouveau brin en prenant exemple sur le brin intact. Enfin, une ADN ligase suture le brin réparé.

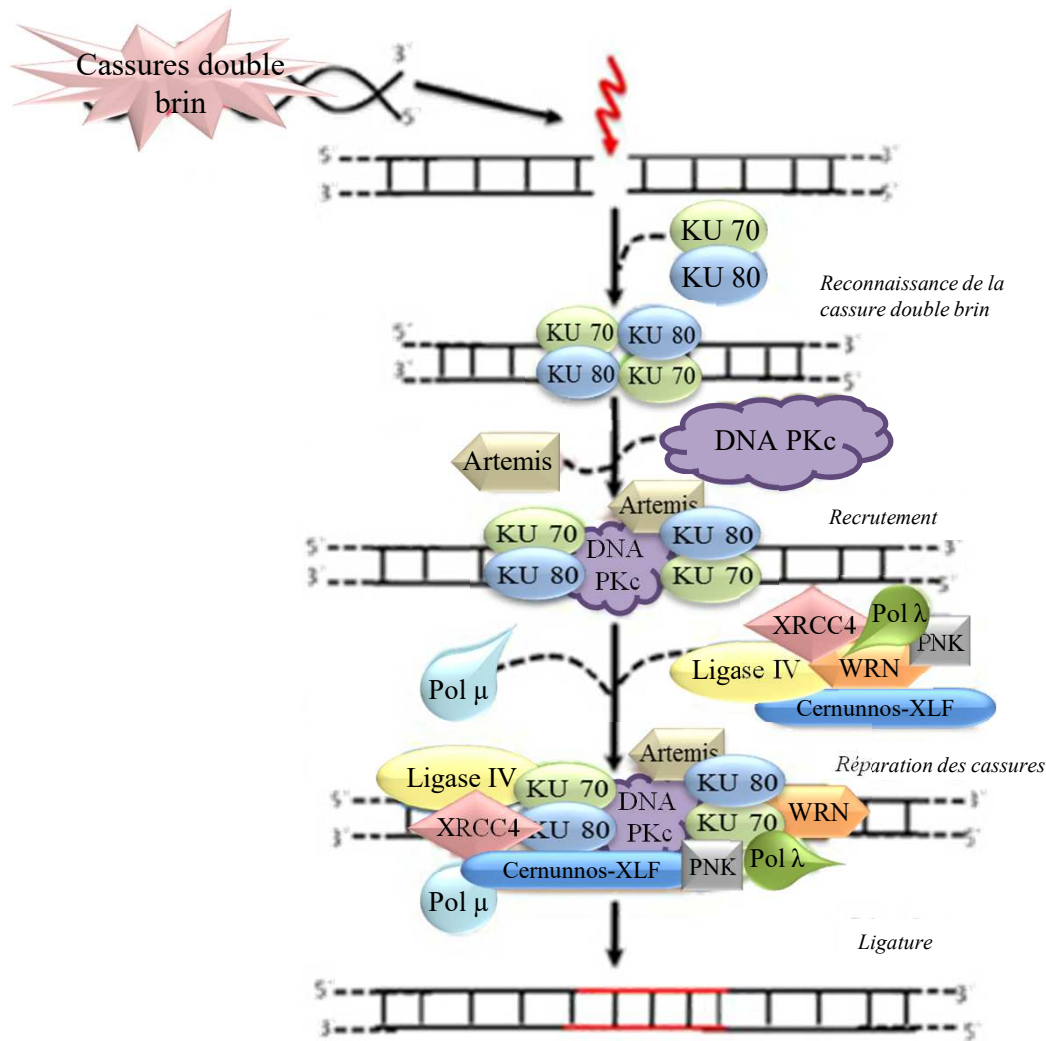
Le système MMR repose sur la réparation des mésappariements de l'ADN générés au cours de la réplication. Tout d'abord, les mésappariements sont reconnus par le complexe MSH (mutS homolog)-2/MSH6/MLH (mutL homolog)-1. Cela permet le recrutement d'enzymes qui vont cliver le brin porteur du mésappariement en 5' et 3', puis le dégrader. La double hélice est reconstruite par l'ADN polymérase qui utilise le brin intact comme matrice. Enfin, la ligature des extrémités par l'ADN ligase rétablit l'intégrité de la molécule d'ADN.

#### I.3.2.2. La réparation par recombinaison

La réparation par recombinaison prend en charge les cassures double brin de l'ADN. Il y a deux types de réparation par recombinaison, la recombinaison homologue (ou HR ; homologous recombination) ou la recombinaison non homologue (ou NHEJ ; non-homologous end-joining).

##### - Le système HR

Suite à la détection de la cassure double brin de l'ADN par le complexe MRN composé des protéines MRE11, RAD50 et NBS1, celui-ci vient se fixer sur le site de la cassure afin de maintenir les extrémités des brins attachées (**figure 8**). Ce complexe entraîne le recrutement de la protéine ATM (ataxia telangiectasia mutated). La protéine ATM présente sous forme de dimère inactif s'autophosphoryle au niveau de la sérine 1981 entraînant son activation. ATM phosphoryle ensuite l'histone H2AX. La phosphorylation de l'histone H2AX constitue donc un marqueur des cassures double brin de l'ADN. En parallèle, le complexe ATM phosphoryle et active l'exonucléase EXO-1 qui clive l'extrémité de l'un des brins d'ADN au niveau de la cassure. La protéine RPA coate l'extrémité 3' du brin simple brin résultant de la cassure et facilite la mise en place des filaments RAD51-ADN par les nucléoprotéines XRCC (X-ray repair cross-complementing)-2 et XRCC-3. Ces filaments catalysent l'appariement et l'échange de brins entre les séquences homologues. La réaction d'appariement et d'échange de brin est stimulée par la protéine RAD52 et RAD54. L'échange des brins homologues est suivi par la synthèse d'un nouveau brin d'ADN en utilisant le brin homologue intact comme matrice. Les brins néo-formés sont ligaturés par l'ADN ligase I



**Figure 9: Le système de réparation de l'ADN par recombinaison non homologue**

La détection des cassures double brin de l'ADN entraîne le recrutement du complexe hétérodimérique KU70/KU80 au site de la cassure. Ce complexe protéique interagit avec les deux extrémités d'ADN résultant de la cassure. Le complexe KU recrute ensuite une protéine kinase ADN dépendante (DNA-PKc). La DNA-PKc s'autophosphoryle et phosphoryle d'autres protéines impliquées dans la réparation telles que Artemis, XRCC4, l'ADN ligase IV, XLF (ou Cernunnos), les ADN polymérase  $\mu$  et  $\lambda$ , PNK et WRN. La protéine Artemis possède une activité endonucléase et 5'-3' exonucléase en présence de la DNA-PKc et de l'ATP. PNK possède une activité 3' ADN phosphatase et 5' ADN kinase et interagit avec XRCC4. WRN interagit avec Ku et XRCC4 ou avec le complexe XRCC4/ADN ligase IV. Enfin, les ADN polymérase  $\mu$  et  $\lambda$  sont recrutées au niveau des cassures doubles brins de l'ADN via l'interaction du complexe Ku avec XRCC4/ADN ligase IV, afin de réparer les dommages. L'activité de l'ADN ligase IV est favorisée par le facteur XLF. Le complexe MRN composé des protéines Mre11, Rad50 et NBS1 et impliqué dans les réparations HR peut aussi intervenir dans la réparation NHEJ si les extrémités résultant de la cassure ont besoins d'être réséqués avant la ligation.

(Modifiée d'après Mazumber et al., 2014)

(Mazumder et al., 2014). D'autres protéines participent également aux réparations de l'ADN via le système HR telles que BRCA (Breast cancer) 1 et 2, Chk (Check point kinase) 1 et 2. Le rôle de BRCA2 serait de transporter RAD51 dans le noyau et de moduler l'activité de fixation à l'ADN de RAD51 (Davies et al., 2001). La fonction de BRCA1 serait de reconnaître et de signaler les cassures double brin, alors que le rôle des protéines Chk1 et 2 est d'activer les points de contrôle de l'ADN afin d'arrêter le cycle cellulaire pendant la réparation.

- Le système NHEJ

Le système NHEJ est un mécanisme non conservatif, c'est-à-dire qu'il ne restaure pas la séquence initiale de l'ADN (**figure 9**). La réparation par le système NHEJ conduit donc à un changement de l'information génétique, dans la majorité des cas une délétion, et peut potentiellement faire apparaître des mutations si la cassure intervient à l'intérieur d'un gène.

Le système NHEJ fait intervenir le complexe protéique Ku70/80 qui interagit avec les deux extrémités de l'ADN résultant de la cassure. Le complexe KU70/80 recrute ensuite une protéine kinase ADN dépendante (DNA-PKc). La DNA-PKc s'autophosphoryle et phosphoryle d'autres protéines impliquées dans la réparation telles que Artemis, XRCC4, l'ADN ligase IV, XLF (ou Cernunnos), les ADN polymérases  $\mu$  et  $\lambda$ , PNK et WRN. Lorsque les extrémités de la cassure ne sont pas nettes, la protéine Artemis, qui possède une activité endonucléase, supprime quelques bases. Lorsque l'hybridation de l'extrémité des brins est possible, la jonction est stabilisée et il en résulte une cassure simple brin qui sera alors réparée par les ADN polymérases  $\mu$  et  $\lambda$  qui prennent comme matrice le brin d'ADN qui vient d'être réparé par le complexe protéique KU. Les brins sont alors ligaturés par l'ADN ligase IV (Mazumder et al., 2014).

### I.3.3. La mort cellulaire par l'apoptose

Lorsque le stress ne peut pas être contrôlé par les mécanismes décrits précédemment, les cellules eucaryotes peuvent entrer en apoptose. Ce processus s'effectue par le biais des caspases qui déclenchent la mort cellulaire en dégradant les substrats cellulaires nucléaires et cytoplasmiques. L'activation des caspases dites initiateuses entraîne l'activation séquentielle des caspases dites effectrices. Deux voies d'activation principales de l'apoptose sont décrites, la voie extrinsèque, qui repose sur l'activation des récepteurs à domaines de mort (Fas ; first appoptotic signal et TNF ; tumor necrosis factor) entraînant la cascade d'activation des

caspases. La deuxième voie est la voie intrinsèque mitochondriale. Cette voie est sous le contrôle des protéines intracellulaires de la famille de BCL (B-cell lymphoma)-2. Les différentes protéines de cette famille sont pro- ou anti-apoptotiques. Lorsque la cellule reçoit des signaux pro-apoptotiques, l'équilibre pro- et anti-apoptotique est rompu. Par conséquent, le cytochrome C mitochondrial est libéré dans le cytosol, s'associe à APAF-1 (apoptotic peptidase activating factor 1) afin de former l'apoptosome. L'apoptosome active en cascade la caspase 9 initiateur puis la caspase 3 activateur afin d'entraîner la mort de la cellule.

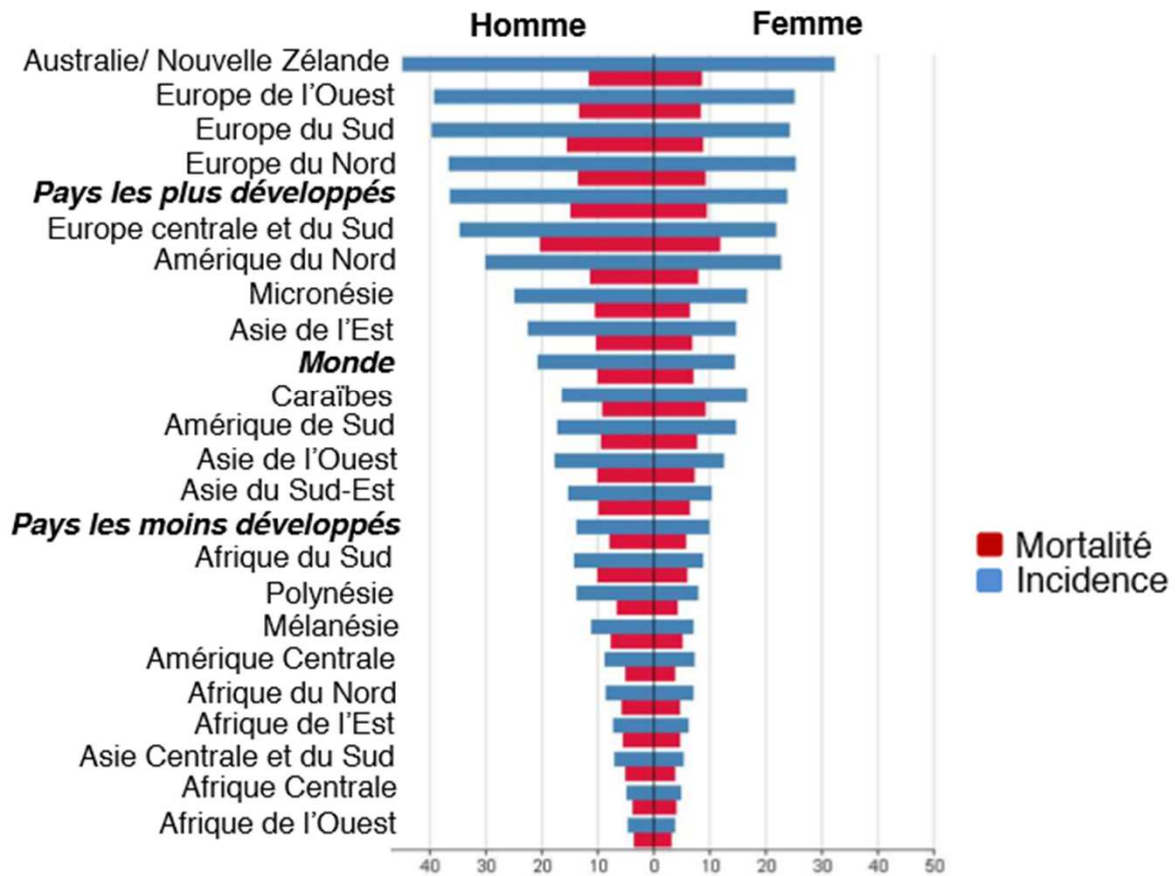
#### I.3.4. La sénescence cellulaire

Un mécanisme alternatif à l'apoptose, la sénescence cellulaire, peut être choisi par la cellule. Ce processus est caractérisé par un arrêt de la croissance et un blocage du cycle cellulaire souvent irréversible. Deux types de sénescence cellulaire ont été identifiés à ce jour, la sénescence répllicative et la sénescence induite par un stress.

La sénescence répllicative permet de réguler le nombre de réplication de chaque cellule eucaryote. Elle est déclenchée par le raccourcissement, jusqu'à épuisement, des télomères après un nombre défini de réplications. Alors, les extrémités télomériques présentent des dommages persistants apparentés à des cassures double brin de l'ADN. Les mécanismes qui détectent les cassures double brin de l'ADN sont activés et entraînent le blocage du cycle cellulaire en phase G1.

La sénescence induite par un stress peut être activée suite à l'exposition des cellules à des agents alkylants de l'ADN ou le stress oxydatif mais aussi suite à la surexpression d'oncogènes ou la perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeur. La sénescence induite par un stress est régulée par deux voies distinctes, la voie p53/p21<sup>Cip</sup> en cas de dommages à l'ADN et la voie p16<sup>ink4a</sup>/Rb dans le cas de l'activation d'oncogènes.





**Figure 10 : Incidence et mortalité du CCR dans le monde.**

L'incidence et la mortalité du CCR, chez l'homme ainsi que chez la femme, sont plus importantes dans les pays industrialisés comparativement aux pays en voie de développement. Les résultats sont exprimés pour 100 000 personnes.

(Modifiée d'après l'organisation mondiale de la santé, chiffres de 2012, [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx?cancer=colorectal](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal)).

## Partie II. Le cancer colorectal

---

### **II.1. Epidémiologie**

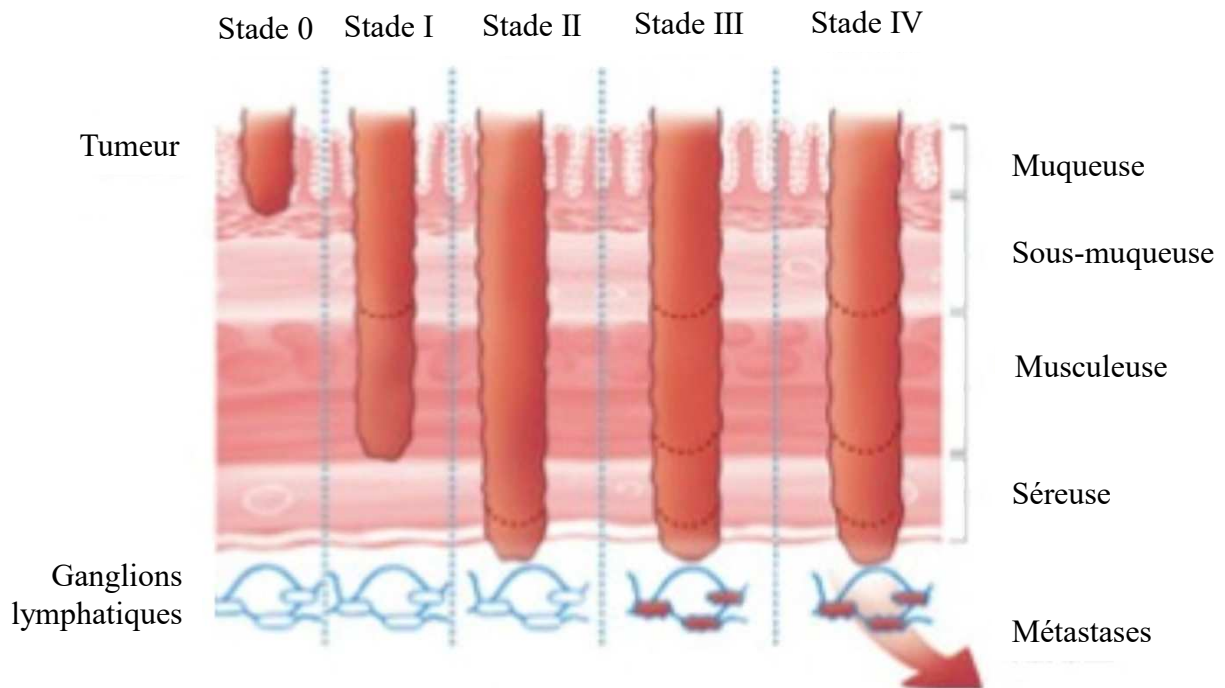
Avec 1,65 millions de nouveaux cas et 835 000 décès dans le monde au cours de l'année 2015, le CCR (cancer colorectal) est le 3<sup>ème</sup> cancer le plus fréquent chez l'homme après le cancer de la prostate et le cancer du poumon, et le 2<sup>ème</sup> cancer le plus fréquent chez la femme après le cancer du sein (Global Burden of Disease Cancer Collaboration, 2017). Il y a une forte disparité de l'incidence et de la mortalité dans le monde où l'on constate des taux plus élevés en Australie, en Nouvelle-Zélande, en Europe et en Amérique du Nord. Les taux les plus faibles sont constatés en Amérique centrale, en Afrique et dans le sud de l'Asie (**figure 10**). Avec 44 872 nouveaux cas estimés en 2017, la France présente le 18<sup>ème</sup> taux d'incidence le plus élevé chez l'homme et le 12<sup>ème</sup> chez la femme parmi les pays Européens. Depuis 1980, la mortalité tend à diminuer avec tout de même 17 684 décès estimés en France en 2017 (selon l'Institut de veille sanitaire). Cette diminution de mortalité peut être expliquée par une amélioration de la prise en charge des patients mais aussi une amélioration des techniques de dépistage. En effet, le devenir des patients dépend largement du stade de la maladie au moment du diagnostic, et le CCR peut être prévenu par un diagnostic précoce des lésions bénignes précancéreuses.

### **II.2. Le diagnostic du cancer colorectal**

Depuis 2009, un test de dépistage du CCR, le test Hémocult© ou test au Gaiac, est systématiquement proposé aux patients âgés de plus de 50 ans, puisque l'âge constitue un facteur de risque. Ce test est à réaliser tous les deux ans et permet de détecter la présence de sang dans les selles et donc la présence éventuelle d'une lésion colique cancéreuse. Depuis 2015, ce test a été remplacé par un nouveau test immunologique plus sensible qui permet une meilleure détection des cancers et des lésions précancéreuses. En cas de test positif, une coloscopie doit être réalisée systématiquement (selon l'Institut de veille sanitaire).

### **II.3. Les facteurs de pronostique**

De nombreux facteurs tels que l'âge, le sexe, le statut TNM (Tumor nodes and metastasis), les taux sériques de l'albumine, de la protéine réactive C, de l'antigène carcino-embryonnaire ou les complications post-opératoires influencent le pronostic d'un CCR.



**Figure 11 : Les différents stades du CCR selon la classification « TNM ».**

Les stades du CCR sont déterminés à partir de la classification « TNM » prenant en compte la taille de la tumeur (T), la présence ou non d'atteinte ganglionnaire (N) et la présence ou non de métastases (M).

**Stade 0** : la tumeur est in situ, elle ne touche que la muqueuse.

**Stade I** : la tumeur envahit la sous-muqueuse ou la musculéuse.

**Stade II** : les cellules cancéreuses ont traversé plusieurs couches de la paroi colorectale.

**Stade III** : les cellules cancéreuses ont envahi les ganglions lymphatiques voisins.

**Stade IV** : le cancer s'est propagé au-delà du côlon ou du rectum, via des métastases, généralement hépatiques ou pulmonaires.

*(Modifiée d'après INCa, 2013)*

Néanmoins, le facteur pronostique le plus important reste le stade d'avancement de la maladie au moment du diagnostic déterminé notamment grâce à la classification TNM.

### II.3.1. Facteurs histologiques

La classification TNM selon l'Union Internationale Contre le Cancer et l'American Joint Committee on Cancer prend en compte l'extension tumorale (T), le statut ganglionnaire (N) ainsi que le statut métastatique (M). Ainsi sont répertoriés 5 niveaux d'extension tumorale (T0 à T4), 3 niveaux d'extension ganglionnaire (N0, N1, N2) et la présence ou non de métastases (M0, M1). Cinq stades tumoraux sont définis à partir du statut TNM : TNM0, TNM I, TNM II, TNM III et TNM IV sur lesquels sera basé le traitement (**figure 11**). Le stade 0 est le stade le plus précoce de la maladie. A ce stade, les cellules cancéreuses sont localisées uniquement dans la muqueuse de la paroi intestinale. Au stade I, la tumeur envahit les couches de tissu qui entourent la muqueuse, la sous-muqueuse et la musculuse. Au stade II, les cellules cancéreuses envahissent toutes les couches de la paroi intestinale sans toucher d'autres organes. Le stade III correspond à l'envahissement des ganglions lymphatiques voisins par les cellules cancéreuses. Enfin, le stade IV correspond à un cancer propagé au delà du côlon via des métastases, dans la plupart des cas, hépatiques ou pulmonaires (**figure 11**) (selon la fondation ARC, mis à jour le 03/2018).

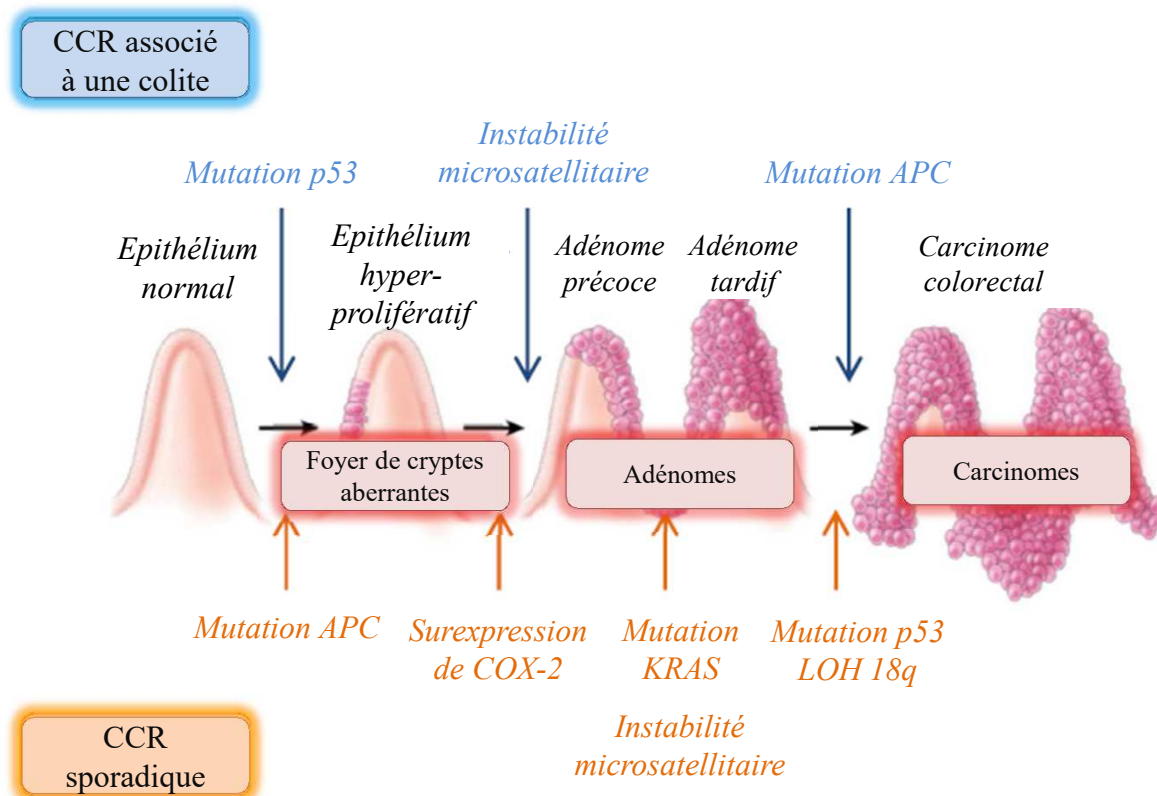
La survie à 5 ans dépend directement du stade. A titre d'exemple, les patients présentant des tumeurs de stade I ont une survie à 5 ans > 90%, alors que les patients ayant des tumeurs de stade IV ont une survie à 5 ans de moins de 20% (Ferlay et al., 2015).

### II.3.2. Facteurs moléculaires et sériques

Le dosage sérique des taux d'ACE (antigène carcino-embryonnaire) est utilisé couramment comme facteur de pronostic du CCR. Un taux d'ACE préopératoire élevé est un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de CCR et est associé à un volume tumoral plus important ainsi qu'à un risque de développer des métastases (Dixon et al., 2003; Wang et al., 2002). D'autres facteurs non spécifiques du CCR existent, tels que les dosages de l'albumine sérique et de la protéine C-réactive.

## **II.4. La prise en charge thérapeutique**

En fonction des stades d'évolution de la maladie, le traitement envisagé diffère. Le traitement préférentiel des stades précoces de la maladie (TNM I et II) est la résection chirurgicale. Elle consiste en l'ablation du segment atteint (colostomie), d'un drainage des



**Figure 12 : La séquence adénome-cancer.**

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

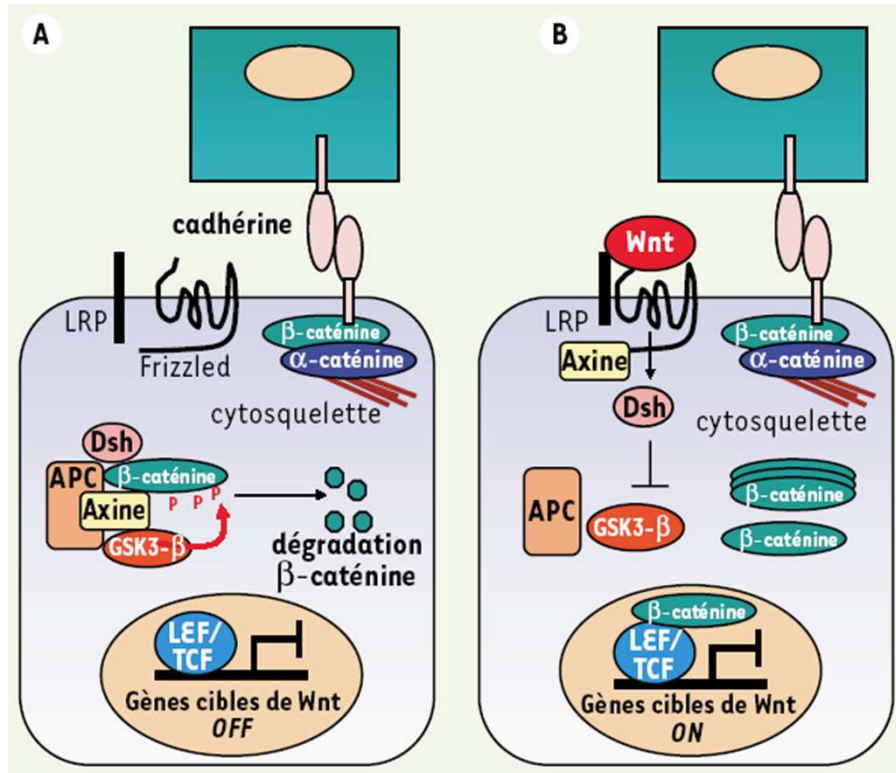
(Modifiée d'après Terzic et al., 2010)

ganglions lymphatiques, et au rétablissement de la continuité du tube digestif (anastomose). Pour ces stades, l'efficacité d'une chimiothérapie adjuvante n'a pas été démontrée.

La chimiothérapie est envisagée pour les tumeurs de stades TNM II, III, ou IV. En fonction du projet thérapeutique établi, il peut s'agir d'une chimiothérapie adjuvante (administrée après la chirurgie, afin d'éliminer les cellules tumorales résiduelles et donc de diminuer le risque de récurrence), néo-adjuvante (dont le but est de réduire la taille de la tumeur, pour ensuite pouvoir proposer une chirurgie), ou palliative (quand la chirurgie n'est pas envisageable en raison d'une tumeur trop avancée ou de l'état général du patient trop précaire). Les principales drogues de chimiothérapies utilisées dans le CCR dépendent, là encore, du stade de la tumeur. L'action recherchée va être l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales. Pour les stades non métastatiques, la chimiothérapie est composée principalement de l'oxaliplatine, le 5-fluoro-uracile et l'acide folinique, comme c'est le cas par exemple du protocole FOLFOX4, protocole de référence pour les stades II et III. Dans le cas de stades métastatiques, la chimiothérapie peut être associée à des traitements ciblés à base d'anticorps monoclonaux bloquant le récepteur de l'EGF (Epidermal growth factor), tels que cétuximab et panitumumab, ou le récepteur du VEGF (Vascular endothelial growth factor) (bévécizumab). Dans ces cancers métastasés, la chirurgie n'étant plus indiquée, si ce n'est en cas de tumeurs symptomatiques, et la chimiothérapie devient le traitement de choix.

## **II.5. La séquence adénome-cancer**

La séquence adénome-cancer a été décrite par Vogelstein et Fearon en 1990 et représente la chronologie des événements de mutations génétiques et de modifications épigénétiques qui entraînent la transformation d'un épithélium sain en un carcinome colorectal en passant par des stades d'épithélium hyper-prolifératif, adénome précoce et adénome tardif sur une période de 10 à 15 ans d'évolution (**figure 12** ; Fearon and Vogelstein, 1990). Ces altérations génétiques et épigénétiques entraînent l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs favorisant la survenue du CCR (**figure 12**). Le premier événement du processus de la carcinogenèse colorectale correspond à la mutation du gène suppresseur de tumeur *APC* (adenomatous polyposis coli). En effet, des altérations de ce gène ont été observées dès le 1<sup>er</sup> stade du processus au niveau de foyers de cryptes aberrantes. Le développement d'adénomes précoces et tardifs requiert, respectivement, une surexpression de *COX-2* (cyclooxygenase-2) et des mutations de l'oncogène *KRAS* (kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog). Enfin les altérations de *tp53*, impliqué dans les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire, sont retrouvées à des stades tardifs de la carcinogenèse colorectale et sont



**Figure 13 : La voie Wnt/β-caténine.**

- A) En absence de stimulation des récepteurs Frizzled par un ligand WNT, la β-caténine est phosphorylée par les kinases GSK3β et CK1α, dans un complexe de destruction dont font également partie l'axine et la protéine APC. Cette phosphorylation la conduit vers l'ubiquitine-ligase, β-TRCP, et vers le protéasome où elle est dégradée.
- B) En présence d'un ligand WNT sur le récepteur Frizzled, la protéine Dishevelled est recrutée, ce qui permet la phosphorylation du co-récepteur LRP5/6 par la CK1γ et la GSKβ, et le recrutement de l'axine à la membrane. Le complexe de destruction est dissocié, la β-caténine n'est plus phosphorylée ni dégradée et peut transloquer dans le noyau où elle s'associe à un ensemble de molécules impliquées dans la transcription, en particulier les facteurs TCF/LEF. La levée de la répression permet la transcription de nombreux gènes de prolifération, donc le gène c-myc et celui de la cycline D1, tous deux impliqués dans la prolifération cellulaire.

(D'après Andreu et al., 2006)

observées dans 40 à 70% des carcinomes invasifs. Ils sont accompagnés d'une perte d'hétérozygotie au locus 18q (Jänne and Mayer, 2000).

### II.5.1. Mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogenèse colorectale

L'analyse moléculaire des CCR a permis de définir différents phénotypes de tumeur (Bond et al., 2012a; Bond et al., 2012b; Jass, 2007; Pritchard and Grady, 2011): le phénotype CIN (chromosomal instability), le phénotype MSI (microsatellite instability), et le phénotype CIMP (CpG island methylator phenotype). Selon ces phénotypes, différentes instabilités génomiques sont observées et différentes voies de signalisation régulant des processus comme la prolifération, la survie, la migration ou encore l'invasion sont altérées.

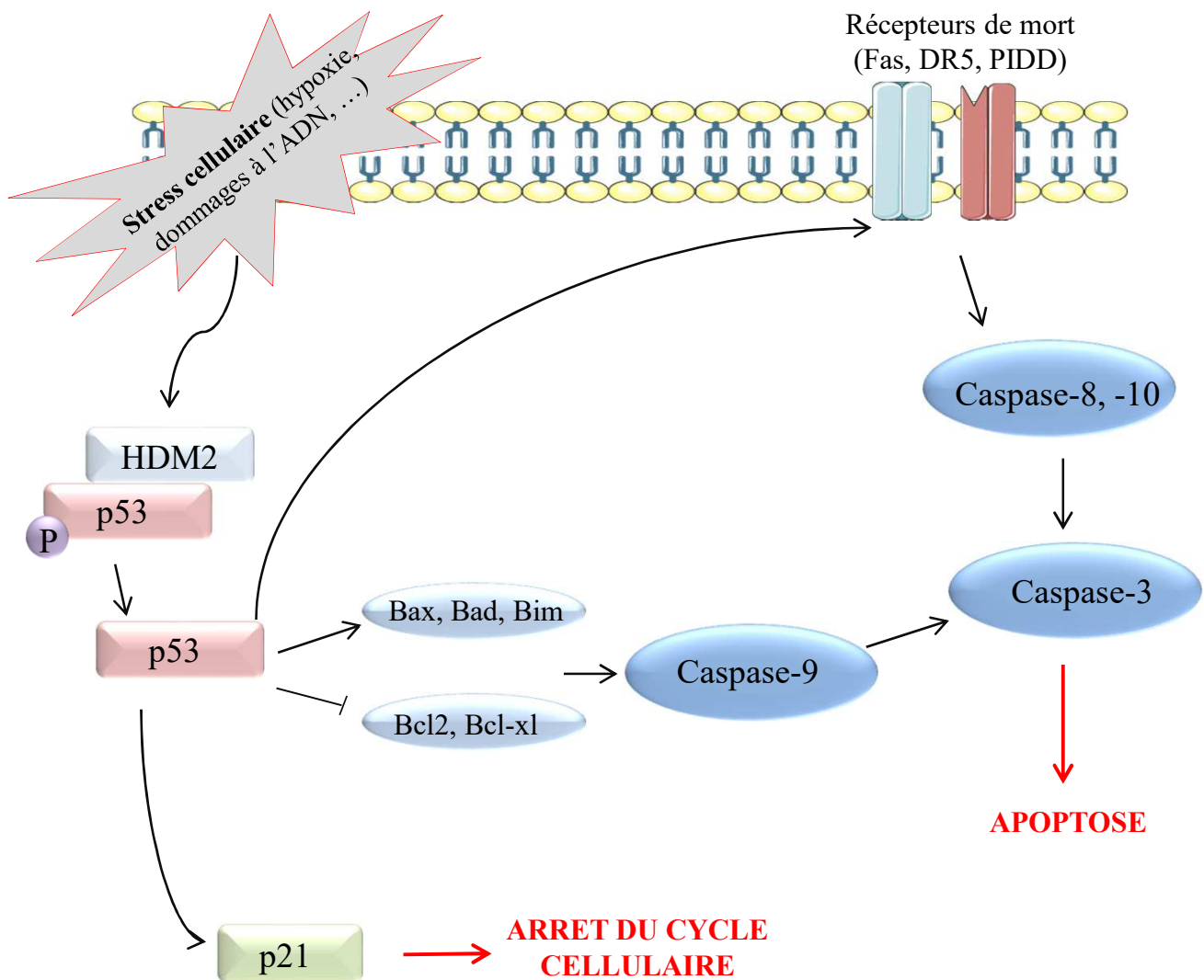
#### II.5.1.1. Principales voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse colorectale

##### II.5.1.1.1. La voie WNT/ $\beta$ -caténine

La voie WNT/ $\beta$ -caténine est une voie majeure impliquée dans la carcinogenèse colorectale. Cette voie est activée suite à la fixation d'un ligant Wnt sur les récepteurs Frizzle, ce qui conduit à la phosphorylation de la protéine Dishevelled (**figure 13**). La protéine Dishevelled active la voie Jun kinase et dissocie le complexe APC/Axine/GSK (glycogen synthase kinase)-3 en se fixant à l'Axine. Ce complexe dissocié ne phosphoryle plus la  $\beta$ -caténine. Alors que la  $\beta$ -caténine phosphorylée est envoyée à la dégradation par le protéasome 26S, la forme non phosphorylée est transportée au noyau où elle va interagir avec les facteurs de transcription TCF (T-cell factor)/LEF (lymphoid enhancer-binding factor) pour activer la transcription des gènes cibles impliqués dans les phénomènes de prolifération cellulaire, inflammation, apoptose et sénescence cellulaire (**figure 13**) (MacDonald et al., 2009).

Dans le CCR, les mutations du gène suppresseur de tumeur *APC* sont très fréquentes et entraînent souvent la formation d'une protéine APC tronquée incapable d'interagir avec le complexe Axine/GSK3. Le complexe est donc incapable de phosphoryler la  $\beta$ -caténine. Cette dernière n'est donc pas dégradée par le protéasome. La voie se trouve donc constitutivement active même en absence de ligand. Dans 15% des tumeurs sporadiques avec une protéine APC intacte, il peut s'agir de mutations au niveau des séquences répétées du gène de l'Axine, au niveau des sites de phosphorylation de la  $\beta$ -caténine ou encore au niveau des gènes codant les TCF (notamment TCF-4 au niveau du côlon) (MacDonald et al., 2009).





**Figure 14 : La voie p53/HDM2.**

La voie de signalisation p53/HDM2 est activée en réponse à différents stress cellulaires tels que des dommages à l'ADN, l'hypoxie ou encore l'activation d'oncogènes. P53 module l'expression des protéines appartenant à la famille Bcl-2. notamment, p53 favorise l'expression des protéines pro-apoptotiques Bax, Bad et Bim et inhibe l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x1. L'augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques entraîne aboutissant à la mort cellulaire par apoptose. En parallèle, p53 interagit avec les récepteurs de mort Fas, DR5 et PIDD entraînant la mise en place de la cascade d'activation des caspases. Par ailleurs, p53 active p21, un inhibiteur du cycle cellulaire, entraînant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

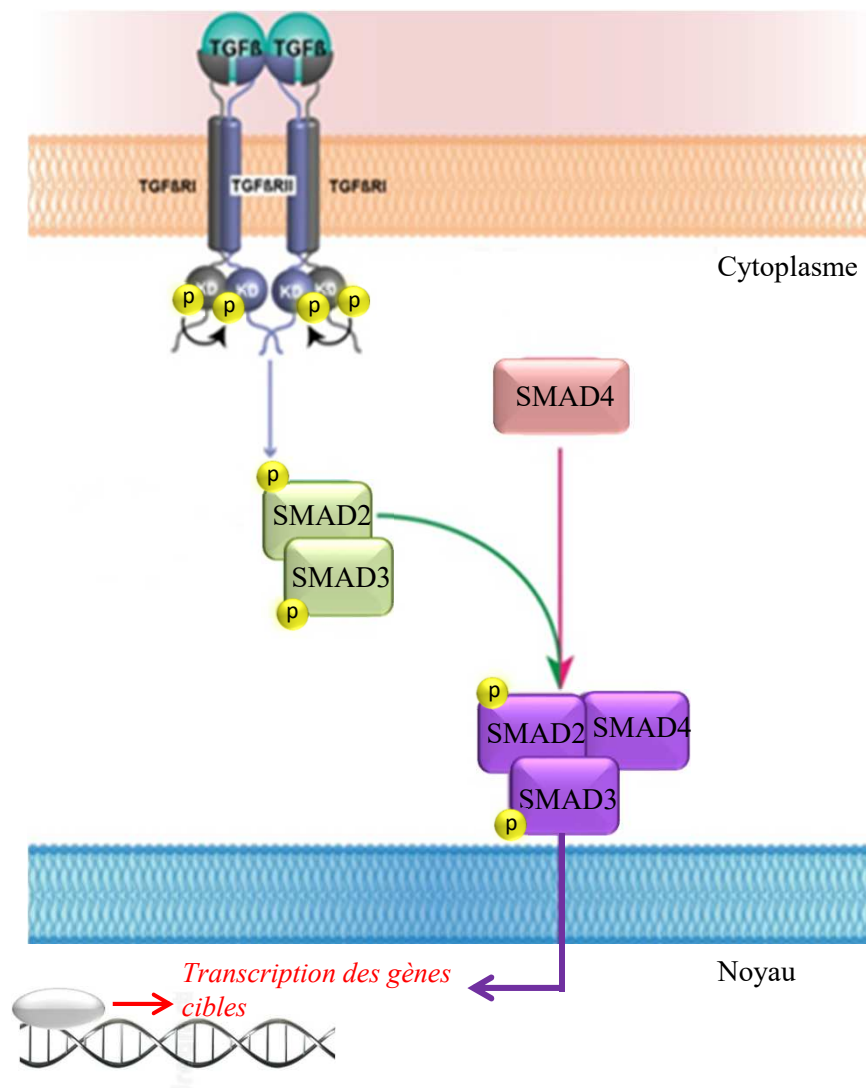
#### II.5.1.1.2. La voie HDM2/p53

La protéine p53, un suppresseur de tumeur, est un facteur de transcription inductible par différents stress cellulaires, tels que l'hypoxie, les dommages à l'ADN, ou l'activation d'oncogènes. p53 est constituée de 4 sous-unités et possède un domaine de liaison à l'ADN qui lui permet de se lier et de réguler un grand nombre de gènes en aval pour exercer une fonction dans de multiples processus tels que l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, ou la sénescence cellulaire (Manfredi, 2010) (**figure 14**). Notamment, p53 induit l'expression des protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2, initie la cascade d'activation des caspases et active l'expression des récepteurs de mort Fas, DR5 (death receptor 5) et PIDD (P53-induced protein with death domain), ayant pour conséquence l'apoptose de la cellule. De plus, p53 régule l'expression de la protéine p21<sup>WAF1</sup>, un inhibiteur des cyclines et des kinases dépendantes des cyclines impliquées dans la progression du cycle cellulaire. En réponse à un stress cellulaire, en augmentant le taux d'expression de p21, p53 induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 mais aussi un arrêt au point de contrôle G2/M (Li et al., 2015c). Le régulateur majeur de l'expression de p53 est l'onco-protéine HDM2 (human double minute 2) qui régule l'ubiquitination et par conséquent la dégradation de p53. De ce fait, HDM2 contribue à maintenir un niveau d'expression de p53 très faible dans les cellules saines.

La prévalence des mutations dans le gène codant pour p53 est très élevée dans les CCR et atteint 34% des tumeurs coliques proximales et 45% des tumeurs coliques distales et rectales (Russo et al., 2005). La majorité des mutations dans le gène codant pour p53 apparaissent au niveau du site de liaison à l'ADN, provoquant ainsi la perturbation de l'interaction de p53 avec ses gènes cibles. Les différentes mutations du gène codant pour p53 sont des déterminants majeurs de l'évolution du CCR. En effet, les mutations du gène codant pour p53 sont associées à l'invasion lymphatique et vasculaire, la capacité à établir des métastases et à la résistance à la chimiothérapie. Ceci fait du statut de p53 un facteur de pronostic (Li et al., 2015a).

#### II.5.1.1.3. La voie TGF-β/SMAD

La voie TGF-β/SMAD (transforming growth factor-beta/small mothers against decapentaplegic) est impliquée dans la croissance et la différenciation cellulaire, la synthèse de la matrice extracellulaire, la réponse immunitaire et l'angiogenèse et est considérée comme une voie « suppresseur de tumeur » dans le côlon. La fixation d'un ligand TGF-β sur son récepteur permet l'activation de ce dernier par phosphorylation. Le récepteur activé phosphoryle différentes protéines SMAD (SMAD 2 et 3/ SMAD 1, 5 et 8) en fonction du



**Figure 15 : La voie TGF-β/SMAD.**

La fixation du ligand TGF- β sur son récepteur permet l'activation de ce dernier par phosphorylation. Le récepteur activé phosphoryle différentes protéines SMAD (SMAD 2 et 3/ SMAD 1, 5 et 8) en fonction du couple ligand/récepteur formé. Les protéines SMAD phosphorylées s'associent avec la protéine SMAD4. Les complexes SMAD/SMAD4 sont alors transloqués au noyau où ils vont pouvoir activer la transcription des gènes cibles tels que les initiateurs de l'apoptose ou les inhibiteurs principaux du cycle cellulaire (p15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup> et p21<sup>Cip</sup>).

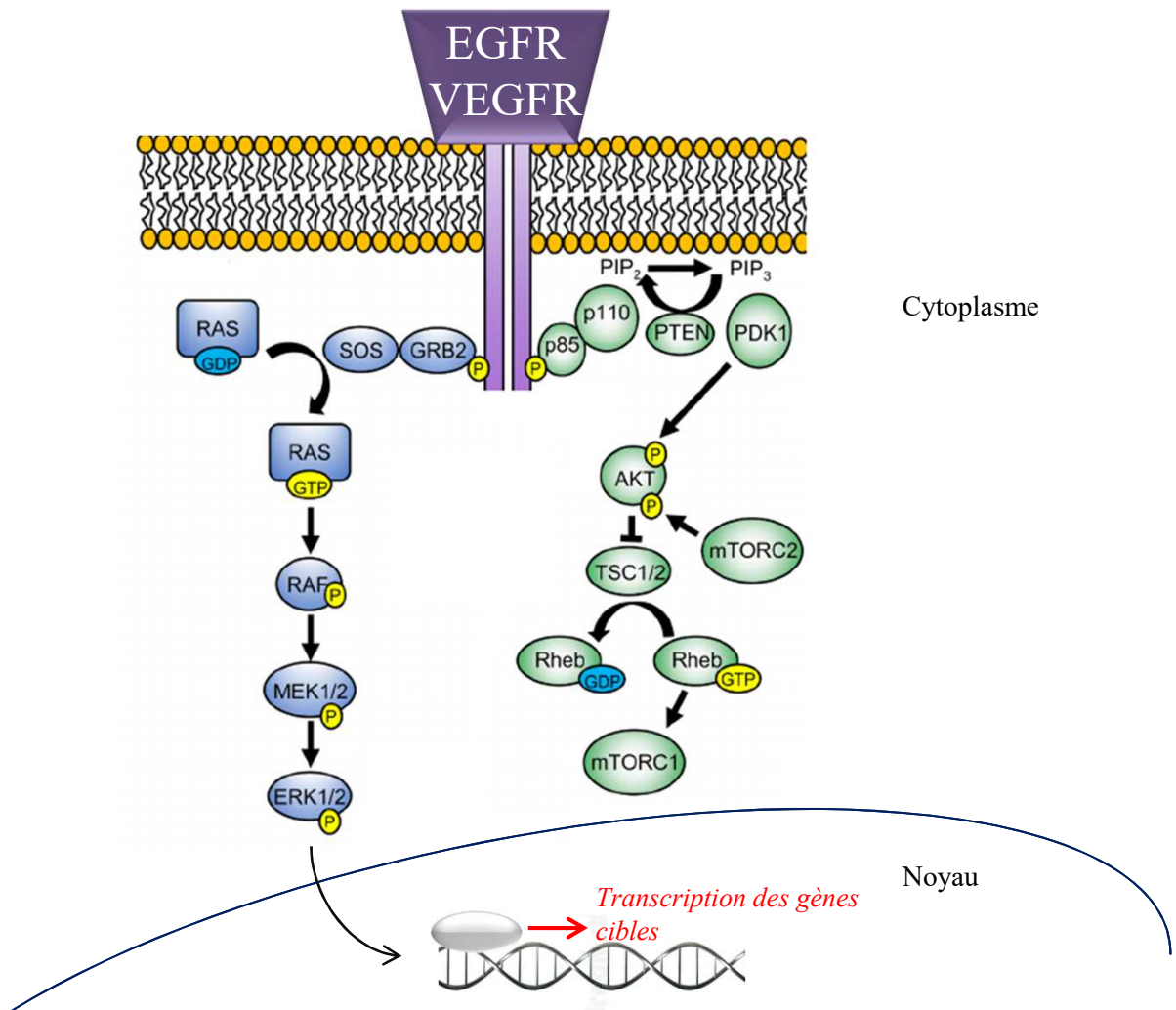
(Modifiée de <https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/pathways/TGF-beta-signaling>)

couple ligand/récepteur formé. Les protéines SMAD phosphorylées s'associent avec la protéine SMAD4 (**figure 15**). Les complexes SMAD/SMAD4 sont alors transloqués au noyau où ils peuvent activer la transcription des gènes cibles tels que les initiateurs de l'apoptose ou les inhibiteurs principaux du cycle cellulaire (p15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup> et p21). Lorsqu'un constituant de cette voie de signalisation est muté ou sous exprimé, les gènes inhibiteurs du cycle cellulaire ne sont plus activés, la prolifération cellulaire devient alors incontrôlée, favorisant ainsi le développement de tumeurs (**figure 15**).

Chez les patients atteints de CCR, ont été retrouvées des mutations inactivatrices du récepteur au TGF- $\beta$  (TGFBR2) (Bellam and Pasche, 2010). Dans 20 à 30 % des CCR de phénotype CIN, présentant une instabilité chromosomique (voir partie II.5.1.2.), cette voie est affectée par une mutation du gène codant pour la protéine SMAD4, aboutissant à une protéine instable ne pouvant pas être phosphorylée ou à la perte du bras chromosomique 18q où ce gène est situé (Eppert et al., 1996). Il a été montré que la perte de l'expression de la protéine SMAD4 est associée avec les métastases ganglionnaires (Tanaka et al., 2008). L'expression de la protéine SMAD2, dont le gène est aussi situé sur le chromosome 18q, est altérée dans 6% des CCR.

#### II.5.1.1.4. La voie RAS/MAPK

La voie de signalisation RAS/MAPK (rat sarcoma/mitogen-activated protein kinase) joue un rôle important dans la régulation de la prolifération, la survie, la différenciation et la migration cellulaire, ainsi que l'angiogenèse (McCubrey et al., 2007). La voie RAS/MAPK transmet des signaux mitogènes via des récepteurs à tyrosine kinase comme l'EGFR ou VEGFR. La fixation du ligand sur le récepteur entraîne le rapprochement des 2 parties du récepteur, leur dimérisation, et l'activation par transphosphorylation de leur partie intracellulaire, par le biais de modifications conformationnelles, correspondant à l'activation du domaine tyrosine-kinase. La protéine d'amarrage GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) se lie aux résidus phosphotyrosine du récepteur activé d'une part, et au facteur d'échange de nucléotide guanine, SOS (son of sevenless), d'autre part (**figure 16**). La protéine SOS transforme la forme RAS-GDP inactive en forme RAS-GTP active. L'activation et le recrutement à la membrane de RAS entraînent la phosphorylation et l'activation de la protéine RAF (Rapidly accelerated fibrosarcoma) qui, à son tour, active par phosphorylation la kinase MEK (MAPK-ERK-Kinase). MEK active alors de manière très spécifique, par double phosphorylation, ERK (extracellular signal-regulated kinase), ce qui entraîne sa translocation au niveau du noyau et la transcription des gènes codant pour des facteurs de transcription c-FOS et autres, tels que c-MYC, c-JUN ou JUNB, qui stimulent l'expression



**Figure 16 : Les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR.**

L'activation de la voie de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR débute par la fixation d'un ligand sur un récepteur à tyrosine kinases tels que EGFR ou VEGFR.

**La voie RAS/MAPK:** La protéine GRB2 se lie aux résidus phosphotyrosine du récepteur d'une part, et au facteur d'échange de nucléotide guanine, SOS d'autre part. La protéine SOS transforme la forme RAS-GDP inactive en forme RAS-GTP active. Ceci entraîne la phosphorylation et l'activation de la protéine RAF qui, à son tour, active par phosphorylation la kinase MEK. À son tour, MEK par double phosphorylation, ERK, entraînant sa translocation au noyau et l'expression des cibles de la voie.

**La voie PI3K/AKT/mTOR :** La partie intracellulaire du récepteur phosphorylée sert de station d'amarrage à la sous-unité régulatrice de PI3K, p85. L'activation de la PI3-kinase conduit au recrutement de la kinase AKT à proximité de la membrane plasmique où elle est phosphorylée. AKT est un proto-oncogène, qui a de nombreuses cibles en aval dont mTOR. mTOR est régulée par la kinase AKT de manière indirecte par inactivation de TSC2. La protéine mTOR joue différents rôles selon les protéines qu'elle active ou inhibe, tels que la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose, la prolifération cellulaire, l'angiogenèse ainsi que la régulation de la disponibilité en nutriments.

(D'après Lièvre et Laurent-Puig, 2010)

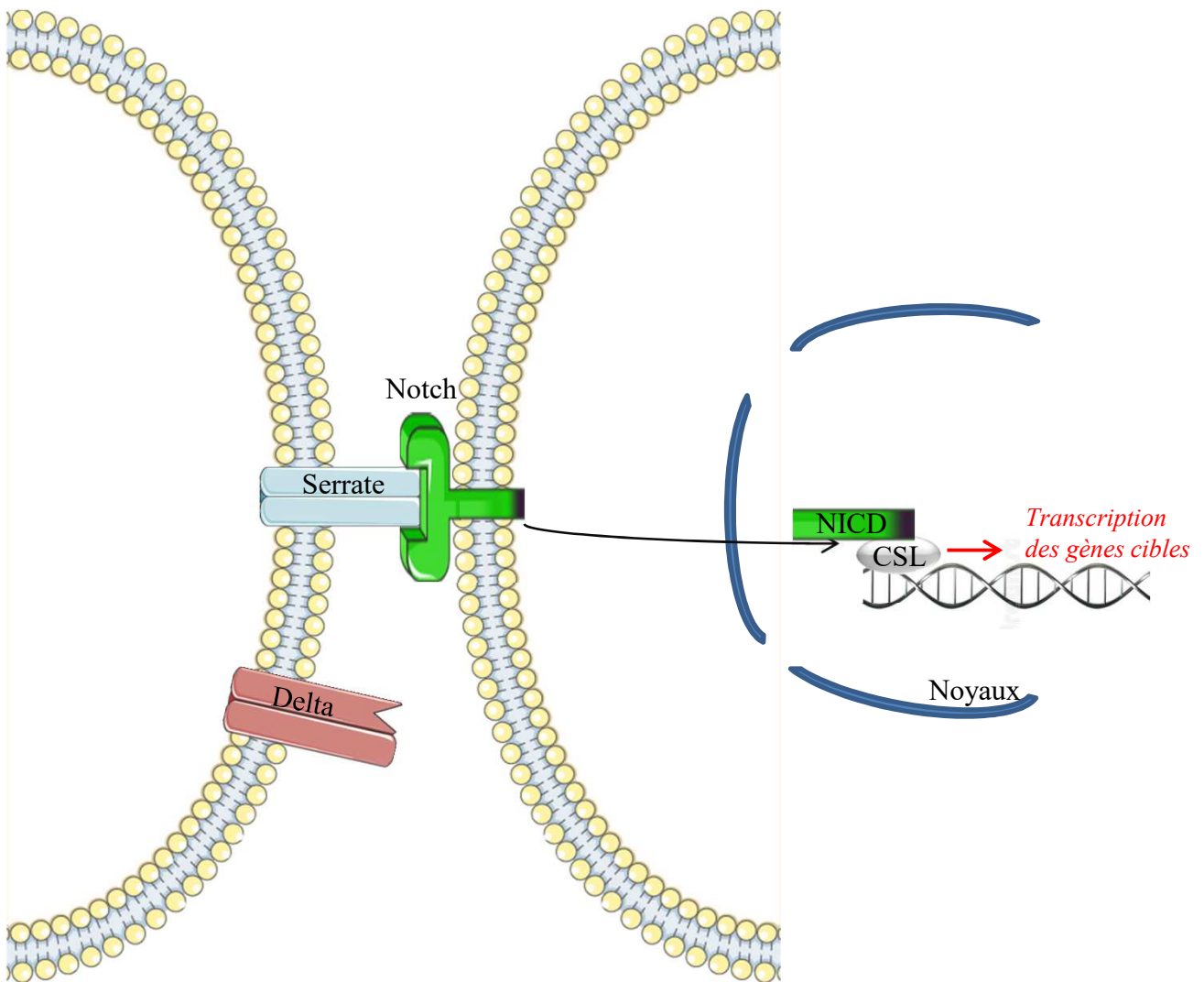
d'un grand nombre de gènes, en particulier ceux de la cycline D1 et de cdk (cyclin-dépendant kinase)-6 ayant un rôle majeur dans l'initiation du cycle cellulaire en phase G1.

Chez l'Homme, on retrouve 3 protéines RAS : H-RAS, K-RAS, N-RAS. Chez les patients atteints de CCR, on retrouve des mutations de *K-RAS* qui entraînent l'activation constitutive de la voie RAS/MAPK. Ces mutations sont retrouvées dans 50% des tumeurs de phénotype CIN. L'activation de la voie RAS/MAPK peut aussi être associée à la surexpression des récepteurs des facteurs de croissance, tels que l'EGFR qui est surexprimé dans 30 à 70% des CCR (Markman et al., 2010).

#### II.5.1.1.5. La voie PI3K/AKT/mTOR

La voie PI3K/AKT/mTOR (phosphoinositide 3 kinase/ AKT8 virus oncogene cellular homolog / mammalian target of rapamycin) joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la régulation du métabolisme cellulaire, la prolifération, la survie et la migration cellulaire. Cette voie transmet, comme la voie RAS/MAPK, des signaux provenant de nombreux récepteurs à tyrosine kinase. Lorsqu'un ligand se fixe sur son récepteur, celui-ci se dimérise, et s'active par transphosphorylation de sa partie intracellulaire, correspondant à l'activation du domaine tyrosine-kinase. La partie intracellulaire phosphorylée du récepteur sert alors de station d'amarrage à certaines protéines intracellulaires, comme par exemple p85, la sous-unité régulatrice de PI3K (**figure 16**). L'activation de la PI3K conduit au recrutement de la sérine/thréonine kinase, AKT, à proximité de la membrane plasmique où elle est phosphorylée. AKT est un proto-oncogène, qui a de nombreuses cibles en aval dont mTOR. mTOR est régulée par la kinase AKT de manière indirecte par phosphorylation et inactivation de TSC2 (tuberous sclerosis complex 2). La protéine mTOR joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la prolifération cellulaire, l'angiogenèse ainsi que la régulation de la disponibilité en nutriments selon les protéines qu'elle active ou inhibe (Dreyer et al., 2009).

La voie PI3K/AKT/mTOR est fréquemment dérégulée dans les cellules cancéreuses, la plupart des protéines la constituant pouvant être mutées, délétées ou surexprimées selon les cas. Dans les CCR, la plupart des mutations de la voie affectent le gène PIK3CA codant pour la sous unité catalytique alpha de la PI3K. Cependant, dans 40% des cas de CCR sporadique, des mutations sont observées au niveau des acteurs de la voie PI3K/AKT tels que PTEN (phosphatase and tensin homolog), un inhibiteur de l'activation de PI3K, AKT2 un isoforme de AKT, ou encore p85 (Samuels and Ericson, 2006).



**Figure 17 : La voie NOTCH.**

La voie NOTCH est activée par la liaison du récepteur NOTCH avec l'un de ses ligands, les familles de protéines Delta et Serrate, situées à la surface des cellules voisines. Suite à son interaction avec son ligand, le récepteur NOTCH subit une série de clivages protéolytiques, conduisant au relargage du domaine extracellulaire de NOTCH, NECD. Une fois libéré dans le cytoplasme, le fragment intracellulaire du récepteur NOTCH, NICD, migre jusqu'au noyau et se lie au complexe CSL entraînant la transcription des gènes cibles de NOTCH.

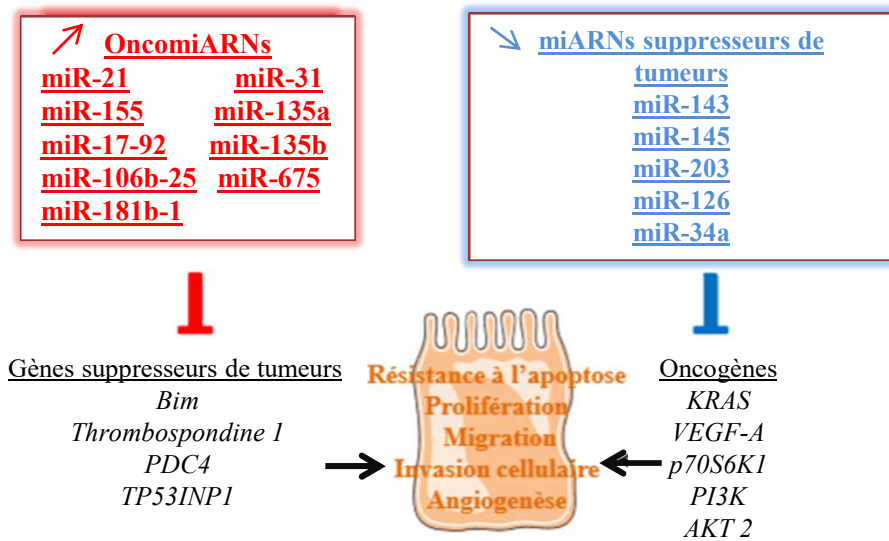
Les voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/MAPK sont souvent dérégulées simultanément dans le CCR. Leur activation simultanée est associée à la progression du CCR et à une survie plus faible. L'activation de ces deux voies favorise la progression métastatique du CCR (Ye et al., 2014).

#### II.5.1.1.6. La voie NOTCH

La voie NOTCH est impliquée dans l'embryogenèse, la morphogenèse, le renouvellement et la prolifération ainsi que l'apoptose. Elle joue également un rôle majeur dans l'orientation des cellules souches au cours de leur différenciation (Brahmi et al., 2017). C'est une voie de signalisation juxtacrine entre deux cellules au contact l'une de l'autre. La voie NOTCH est activée par la liaison du récepteur NOTCH avec l'un de ses ligands, les familles de protéines Delta et Serrate, situées à la surface des cellules voisines (**figure 17**). Suite à son interaction avec son ligand, le récepteur NOTCH subit une série de clivages protéolytiques, conduisant au relargage du domaine extracellulaire de Notch, NECD (NOTCH extracellular domain). Une fois libéré dans le cytoplasme, le fragment intracellulaire du récepteur Notch, NICD (NOTCH intracellular domain), migre jusqu'au noyau et se lie au complexe CSL, entraînant la transcription des gènes cibles de NOTCH. La fixation du domaine intracellulaire de NOTCH sur l'ADN est régulée par deux enzymes cdk-8 et l'ubiquitine ligase Fbxw7. Celles-ci vont entraîner par phosphorylation puis ubiquitination, la dégradation protéasomale du domaine intracellulaire de NOTCH et inactiver la voie.

Des dérégulations de la voie NOTCH ont été rapportées dans le cancer. Cependant son rôle exact, oncogénique ou suppresseur de tumeur, dépend du contexte cellulaire. Notamment, l'expression de Jagged-1, un ligand de NOTCH, est dérégulée dans le CCR, ayant pour conséquence une augmentation de Notch-1. Les études ont montré que l'augmentation de l'expression de Notch-1 est positivement corrélée à la progression tumorale, au grade tumoral et à la survenue de métastases, ce qui peut être directement lié à une inhibition de l'apoptose par Notch-1. De plus, un autre médiateur de la voie, HES1, se trouvant en aval de Notch, a la capacité d'inhiber KLF (Kruppel-like factor)-4, un répresseur transcriptionnel qui peut inhiber la prolifération des cellules cancéreuses coliques (Vinson et al., 2016). Notch-1 est donc associée à un mauvais pronostic. Notch-3 est surexprimée dans les CCR primaires et métastatiques et est associée à un phénotype agressif de la maladie dans un modèle de xénogreffe (Serafin et al., 2011). Enfin, des études ont également montré que la voie de signalisation Notch peut être dérégulée en absence d'altération des gènes impliqués dans la





**Figure 18 : Implication des oncomiRs et miARNs suppresseurs de tumeurs dans le CCR.**

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

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

voie mais par l'interaction de cette voie avec d'autres voies de signalisation telles que la voie WNT/ $\beta$ -caténine (Brahmi et al., 2017).

#### II.5.1.1.7. Régulation épigénétique et microARN

Dans le CCR, il existe une hypométhylation globale du génome, qui peut entraîner la réactivation de gènes normalement réprimés en condition saine. La méthylation de l'ADN est sous la dépendance des ADN méthyltransférases (DNMT, DNA Methyltransferase). L'une des DNMT la plus étudiée dans le CCR est la DNMT-1 qui a une activité 200 fois supérieure dans le CCR que dans le tissu sain (Zhu et al., 2007). Dans environ 12% des cas de CCR, une hyperméthylation des îlots CpG présents dans les promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs pourrait être à l'origine de l'instabilité génétique observée (Goel and Boland, 2010). Les tumeurs présentant une hyperméthylation au niveau des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs sont plus fréquemment de localisation proximale, d'architecture festonnée et retrouvées chez les patients âgés et définissent le phénotype de tumeur appelé CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) (Vatandoost et al., 2015).

Les microARN (miARN) sont de petits ARNs non codants dont la fonction principale est de réguler l'expression des gènes de manière post-transcriptionnelle en se fixant sur la région 3'-UTR (Untranslated region) des ARN messagers, ce qui conduit à leur dégradation ou l'inhibition de leur traduction (Goel and Boland, 2010). La surexpression des miARN ayant un rôle oncogénique, appelés ainsi les oncomiRs, tels que miR-21, miR-155 et les clusters miR-17-92 et miR-106b-25, et la diminution de l'expression des miARN suppresseurs de tumeurs, tels que miR-143, miR-145 et miR-34a, peuvent participer au développement tumoral en modulant les processus de prolifération et d'apoptose cellulaire, de migration et d'angiogenèse (Raisch et al., 2013) (**figure 18**).

#### II.5.1.2. Les différents phénotypes de carcinogenèse colorectale

Il est décrit deux principaux phénotypes de la carcinogenèse colorectale, tous deux résultant d'une instabilité génétique : l'un au niveau chromosomique (instabilité chromosomique ; CIN (Chromosomal instability) et le second à l'échelon des nucléotides (instabilité des locus microsatellites ; MSI (Microsatellite instability) (Grady and Markowitz, 2015). Un troisième phénotype, celui de l'hyperméthylation des îlots CpG, est caractérisé par une hyperméthylation globale du génome, résultant en la perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs ou autres gènes associés au développement tumoral.

L'hyperméthylation globale du génome peut être associée aux deux autres phénotypes de la carcinogenèse colorectale puisqu'elle peut influencer des gènes impliqués dans l'un ou l'autre des phénotypes.

#### II.5.1.2.1. Phénotype CIN (instabilité chromosomique)

Ce mécanisme moléculaire de carcinogenèse est le plus fréquent dans le CCR. En effet, il concerne 75 à 85 % des CCR sporadiques et est observé dans 100% des carcinomes développés dans le cadre d'un CCR faisant suite à la polypose adénomateuse familiale. Ces cancers sont caractérisés par des pertes alléliques fréquentes correspondant à des régions de gènes majeurs tels qu'*APC* sur le chromosome 5q, *TP53* sur le chromosome 17p, *KRAS* sur le chromosome 12 et *SMAD2/4* sur le chromosome 18q (Pino and Chung, 2010).

#### II.5.1.2.2. Phénotype MSI (instabilité microsatellitaire)

Le MSI est associé à environ 15 % des CCR sporadiques et à la quasi-totalité des cancers héréditaires sans polype (ou HNPCC, Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer) (Müller et al., 2004). Ce phénotype est caractérisé par des altérations dans de courtes séquences répétées, les séquences micro-satellitaires (Heinimann, 2013). Les cellules cancéreuses présentent une défaillance du mécanisme de réparation des mésappariements de l'ADN, appelé système MMR. Ce système est composé des gènes *MLH1* (MutL homolog 1), *MSH* (MutS homolog)-2, 3 et 6, *PMS* (Post-meiotic segregation)-1 et 2, codant pour des protéines qui interagissent entre elles pour identifier puis corriger les mésappariements de l'ADN.

Les CCR présentant de tels défauts sont dits de type MSI et sont classés en 3 groupes selon le degré d'instabilité des microsatellites :

- Les **cancers MSI-H** (High ; à haut niveau d'instabilité) quand le nombre de séquences touchées est supérieur à 2. Pour les CCR sporadiques MSI-H, le défaut de MMR est principalement dû à une hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* (Coppede, 2014).
- Les **cancers MSI-L** (Low ; à faible niveau d'instabilité) quand une seule séquence microsatellite est touchée. Ces défauts sont dus à un mécanisme différent des tumeurs MSI-H. L'instabilité est créée par l'hyperméthylation du gène codant pour l'enzyme de la réparation de l'ADN, MGMT (methylgaanine DNA methyltransferase), ce qui

aboutit à sa perte d'expression. Il en résulte une accumulation de mésappariements non réparés provoquant des erreurs de séquences au niveau de certains gènes conduisant au profil MSI-L (Minoo, 2013).

- Les **cancers MSS** (microsatellite stable) sans instabilité.

#### II.5.1.2.3. Le phénotype méthylateur des îlots CpG (CIMP)

L'hyperméthylation des îlots CpG est décrite comme un phénomène majeur de la carcinogenèse colorectale. En effet, la méthylation des cytosines permet une régulation très fine de l'expression des gènes cibles. Des études ont mis en évidence l'hyperméthylation de plusieurs gènes impliqués dans la progression du CCR, notamment des hyperméthylations au niveau des promoteurs de certains gènes suppresseurs de tumeur. Plusieurs études ont montré que la perte d'expression du gène *APC* est due à une hyperméthylation du promoteur de ce gène selon une fréquence variant de 10 à 50% (Chen et al., 2005; Esteller et al., 2000). De plus, les tumeurs CIMP à forte hyperméthylation, sont souvent associées à des mutations fréquentes et précoces de *BRAF* (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B) (Leggett and Whitehall, 2010). Au contraire, les tumeurs CIMP à hyperméthylation plus faible sont plutôt associées à la mutation du gène *KRAS* et possèdent moins de gènes méthylés (Barault et al., 2008a; Tanaka et al., 2010).

Le gène *MLH1*, dont la mutation constitutionnelle est responsable du syndrome HNPCC, a été retrouvé inactivé par hyperméthylation de son promoteur dans 10 à 50% des cas (Esteller and Herman, 2002; Iacopetta et al., 2006). L'hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* est associée au phénotype MSI-H. Ces tumeurs présentent donc le double phénotype MSI-H et CIMP.

#### II.5.1.3. Evènements moléculaires associés aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et rôle de l'inflammation dans le CCR

Les étapes majeures du développement du CCR, de la mise en place d'un épithélium hyperprolifératif jusqu'à l'apparition d'un carcinome colorectal, sont similaires entre les CCR sporadiques et les CCR associés aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

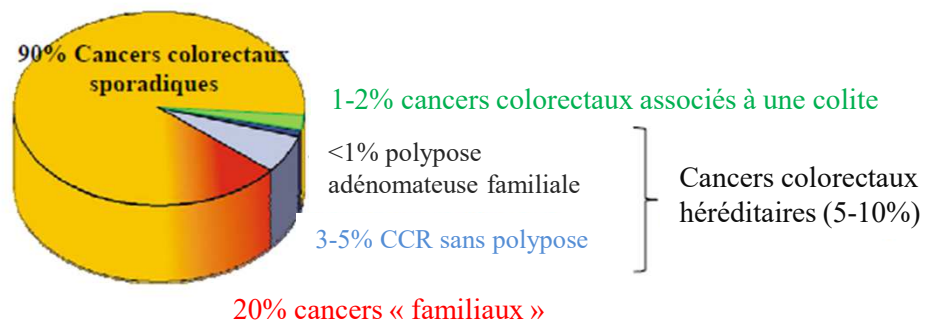
Cependant, la chronologie des altérations moléculaires dans les CCR associés aux MICI diffère par rapport à celle des formes sporadiques, et l'inflammation chronique pourrait participer à la progression de la séquence adénome-cancer (**figure 12**) (Rhodes and Campbell,

2002). En effet, les altérations du gène *TP53* constituent un évènement précoce alors que celles du gène *APC* interviennent plus tardivement dans le développement des CCR associés aux MICI. La susceptibilité augmentée des patients atteints de MICI à développer un CCR (Cunningham et al., 2010) ainsi que la diminution de 40 à 50% du risque de développer un CCR observée chez les patients qui utilisent à long terme (10-15 ans) des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Chan et al., 2007; Flossmann et al., 2007; Rostom et al., 2007) sont des arguments forts en faveur d'une implication de l'inflammation dans le CCR.

Il est intéressant de noter que les CCR sporadiques non associés aux MICI présentent une infiltration inflammatoire robuste ainsi qu'une forte expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (Atreya and Neurath, 2008; Clevers, 2004). Au cours du développement tumoral, les cellules de l'immunité innée telles que les macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques sont recrutées au niveau de la tumeur. Les cellules de l'immunité adaptative telles que les lymphocytes T et B sont aussi recrutées au niveau des tumeurs et peuvent jouer un rôle pro- ou anti-tumoral. Notamment, les lymphocytes T exercent un rôle dans la progression tumorale mais sont aussi impliqués dans l'immunité anti-cancer (Terzić et al., 2010).

Dans les cas de CCR sporadiques, le recrutement des cellules immunitaires intervient après la formation de la tumeur. L'inflammation chronique qui en résulte peut favoriser l'accumulation de mutations génétiques et de modifications épigénétiques favorisant ainsi la progression du CCR. En effet, l'activation et le recrutement des cellules immunitaires entraînent la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène (ROS ; reactive oxygen species) et de l'azote (RNS ; reactive nitrogen species) ayant un fort pouvoir génotoxique (Meira et al., 2008), la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance (Francescone et al., 2015).

La production de ces médiateurs pro-inflammatoires est médiée par plusieurs acteurs majeurs tels que NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B), STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), PI3K/AKT et COX-2/PGE2 (prostaglandin E2) impliqués dans de nombreux processus cellulaires notamment les phénomènes de prolifération, angiogenèse, invasion et métastases (Francescone et al., 2015). Ce microenvironnement inflammatoire est très similaire au microenvironnement tumoral suggérant l'implication des mêmes médiateurs dans les MICI et dans le CCR (Francescone et al., 2015).



**Figure 19 : Répartition des différentes formes de CCR.**

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

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

## **II.6. Etiologie des CCR**

Seulement 5 à 10% des CCR font intervenir des prédispositions génétiques se présentant sous deux formes, la polypose adénomateuse familiale et le cancer héréditaire sans polype. Dans la majorité des cas (environ 90% des cas), les CCR sont dits sporadiques sans prédispositions génétiques dont 20% surviennent au sein de « familles à risques », sans qu'une anomalie génétique précise ne soit identifiée. Enfin, 1 à 2% des CCR surviennent quant à eux dans le cadre des MICI (Terzić et al., 2010; Weitz et al., 2005) (**figure 19**).

### **II.6.1. Les maladies génétiques prédisposantes**

#### **II.6.1.1. La polypose adénomateuse familiale**

La PAF (polypose adénomateuse familiale), représentant environ 1% des CCR, est une maladie héréditaire rare à transmission autosomique dominante. La PAF est caractérisée par l'apparition de milliers de petits polypes au niveau du côlon et du rectum dès le plus jeune âge de l'individu et qui évolue en CCR vers l'âge de 40 ans. Elle est due, dans 80% des cas, à une mutation germinale au niveau du gène suppresseur de tumeur *APC*. De nombreuses mutations différentes de ce gène ont été rapportées comme étant impliquées dans la PAF, entraînant toutes l'apparition d'un codon stop prématuré aboutissant à la synthèse d'une protéine APC tronquée (Jasperson et al., 2010). En absence de la protéine APC, la  $\beta$ -caténine n'est plus dégradée par le protéasome, et la voie WNT/  $\beta$ -caténine est alors constitutivement active, ce qui entraîne la transcription des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. De rares cas de PAF, souvent sous forme atténuée, ne sont pas dues à la mutation du gène *APC* mais à une mutation biallélique au niveau du gène *MUTYH* (mutY homolog) impliqué dans les réparations des dommages à l'ADN par excision de base (Jasperson et al., 2010).

#### **II.6.1.2. Le syndrome de Lynch**

Le syndrome de Lynch ou cancer héréditaire sans polype (HNPCC, hereditary non-polyposis colorectal cancer) est plus fréquent que la PAF puisqu'il représente 2 à 4% des cas de CCR (Jasperson et al., 2010). Chez les patients atteints du syndrome de Lynch, le développement des tumeurs est causé par une instabilité microsatellitaire, où l'on retrouve dans 45 à 70% des cas des mutations au niveau des gènes *MLH1* et *MSH2* impliqués dans les systèmes de réparation des mésappariements générés au cours de la réplication (Jasperson et al., 2010). Ce défaut de réparation s'exprime sur les séquences microsatellites, courtes

séquences répétées de 1 à 5 nucléotides. Le syndrome de Lynch prédispose les patients à d'autres cancers hors du tube digestif (cancers de l'endomètre, estomac, pancréas, voies biliaires,...) (Jasperson et al., 2010).

### II.6.1.3. La polypose juvénile

La polypose juvénile est caractérisée par le développement de multiples polypes chez les adolescents ou les jeunes adultes majoritairement au niveau du côlon et du rectum. Elle est transmise de façon autosomique dominante et résulte de l'altération du gène *SMAD4* dans 20 à 50% des cas (Larsen Haidle and Howe, 1993). Même si la polypose juvénile est considérée comme bénigne, elle prédispose les patients au développement de cancers (côlon, estomac, intestin grêle, pancréas). Chez les patients atteints de la polypose juvénile, le risque de développer un CCR est de 39% tous âges confondus (Brosens et al., 2007).

### II.6.2. Les maladies inflammatoires chroniques prédisposantes

Le CCR associé à une colite (ou CAC, colitis-associated cancer) désigne le développement d'un CCR faisant suite à des MICI et représente 1 à 2% des cas de CCR. Les patients atteints des MICI ont un risque de développer un CAC plus élevé comparé à la population générale. En effet, une méta-analyse prenant en compte 116 études indépendantes réalisées dans le monde a permis d'établir une prévalence du CCR s'élevant à 3,7% chez les patients atteints de la réctocolite hémorragique, une forme de MICI (Eaden et al., 2001). Chez les patients atteints de la maladie de Crohn, une autre forme de MICI, le risque relatif de développer un CCR est 0,8 à 20 fois plus élevé que dans la population générale (Averboukh et al., 2011; Canavan et al., 2006). En 2017, une étude incluant 44 278 individus a montré une augmentation de la prévalence des adénomes colorectaux chez les individus consommant un régime alimentaire à un haut potentiel inflammatoire (Haslam et al., 2017).

Le syndrome métabolique est reconnu depuis longtemps comme une maladie inflammatoire chronique, qui de ce fait pourrait favoriser le développement du CCR (Ishino et al., 2013). Le syndrome métabolique est défini par l'association de plusieurs pathologies, telles qu'une obésité, une résistance à l'insuline, une hyperglycémie, une dyslipidémie (une quantité anormale de lipides) qui augmentent le risque de développer un diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires. Les patients atteints de syndrome métabolique présentent un risque de développer un CCR augmenté de 2 à 10 fois par rapport à la population générale (Ishino et al., 2013; Tal et al., 2014). Plus de 60% des patients atteints de syndrome métabolique présentent une obésité également connue comme étant un facteur de risque du



CCR puisqu'elle est estimée être à l'origine de 14% des décès par cancer chez l'homme et 20% chez la femme (Berger, 2014). Une méta-analyse incluant 9 millions de participants venant de différents pays a montré que les patients en surpoids ont un risque de développer un CCR augmenté de 1,3 fois par rapport aux patients contrôles (Ma et al., 2013). De plus, un indice de masse corporel élevé est associé à un risque accru de développer un CCR, surtout chez l'homme (Bardou et al., 2013; Chen and Iverson, 2012). En revanche, une réduction de la masse corporelle est associée à une diminution de 40 à 60% de l'incidence des CCR chez les personnes obèses (Adams et al., 2007; Bardou et al., 2013).

### II.6.3. Les CCR sporadiques

La majorité des cas de CCR sont dits « sporadiques », sans prédispositions génétiques ou historique familial de CCR. Plusieurs facteurs de risque ont été décrits tels que l'âge, puisque près de 80% des CCR sont diagnostiqués chez des individus de plus de 50 ans. Au-delà des facteurs de risque indépendant de l'individu, certains facteurs de risque liés au mode de vie ont été décrits. En 2012, une étude a mis évidence une disparité d'incidence du CCR selon le statut socio-économique avec une augmentation de l'incidence lorsque le statut socio-économique était plus faible comparé à un statut plus élevé. Cette étude a montré que l'augmentation de l'incidence du CCR chez ces individus était due à une forte prévalence des comportements à risque tels que la consommation d'alcool, la consommation de cigarettes, un régime alimentaire non adapté, et l'absence d'activité physique (Doubeni et al., 2012). Plus récemment, les études ont montré que le microbiote intestinal constitue un nouveau facteur de risque du CCR.

#### II.6.3.1. Impact de l'alimentation

L'alimentation joue un rôle important dans la survenue du CCR puisqu'il est estimé qu'un mauvais régime alimentaire est impliqué dans 30 à 50% des CCR dans le monde. Les études ont montré qu'une alimentation riche en viande rouge et pauvre en fibre, en calcium, et en vitamine D peut augmenter le risque de développer un CCR (Ryan-Harshman and Aldoori, 2007). En effet, la consommation de viande rouge est associée à une augmentation de 17% du risque de développer un CCR (La Vecchia et al., 1996; Sandhu et al., 2001). Les propriétés carcinogéniques des amines hétérocycliques produits au cours de la cuisson de la viande rouge pourraient être responsables de l'augmentation du risque de développer un CCR. En revanche, le calcium et la vitamine D sont associés à une diminution du risque de développer un CCR de par leur capacité à limiter la prolifération cellulaire et à favoriser la différenciation

cellulaire (Peters et al., 2001). Enfin, une étude a mis en évidence un risque de développer un CCR diminué environ de 40% chez les individus qui consomment le plus de fibre *versus* ceux qui en consomment le moins (Bingham et al., 2003).

#### II.6.3.2. Impact de la consommation d'alcool

Il est suspecté que la consommation d'alcool pourrait être impliquée dans le développement du CCR puisque l'un des composants résultant du métabolisme de l'alcool, l'acétaldéhyde, possède des propriétés mutagènes et cancérigènes (Boffetta and Hashibe, 2006). Une étude sur 8 cohortes a mis en évidence l'impact de façon dose-dépendant de la consommation d'alcool sur la survenue du CCR. En effet, la consommation d'une dose de 30g d'éthanol par jour ou plus augmente le risque de développer un CCR de 16%, et la consommation de 45g d'éthanol par jour augmente le risque de 41% (Cho et al., 2004). Bien que le rôle de l'alcool dans la carcinogenèse colorectale ne soit pas bien défini, les études montrent qu'il pourrait faire intervenir sa capacité à réduire les folates, modifier la composition des acides biliaires, induire des méthylations anormales de l'ADN et à retarder la réparation de l'ADN (Kune and Vitetta, 1992; Pericleous et al., 2013; Seitz and Becker, 2007).

Au contraire, la consommation quotidienne de vin rouge aurait un rôle protecteur sur la survenue du CCR via les polyphénols qu'il contient, connus pour leurs effets anti-oxidants, inhibiteurs de la prolifération cellulaire ou anti-angiogéniques (Pericleous et al., 2013).

#### II.6.3.3. Impact du tabagisme actif

Le tabagisme actif a aussi été mis en évidence comme un facteur de risque du CCR de façon temps- et dose- dépendante. En 2008, une méta-analyse a montré que les fumeurs actifs ont un risque de développer un CCR augmenté de 18% comparativement aux sujets non-fumeurs (Botteri et al., 2008). Il a également été mis en évidence dans un modèle murin de xénogreffe une augmentation du volume des tumeurs suite à une exposition à la nicotine (Wong et al., 2007).

#### II.6.3.4. Impact de l'activité physique

Le risque de développer un CCR est diminué par la pratique d'une activité physique (Walter et al., 2017). En effet, les individus ne pratiquant aucune activité physique ont un risque de développer un CCR plus élevé de 27% comparé à des individus pratiquant une activité physique (Golshiri et al., 2016). La pratique d'une activité physique régulière diminue

le risque de développer un CCR de 40 à 50% (Ghafari et al., 2016). Bien que l'action de l'activité physique sur le CCR soit mal définie, il a été proposé que la pratique d'une activité physique pourrait être bénéfique en diminuant le tissu adipeux central, en modulant les taux d'hormones métaboliques, en réduisant l'inflammation et en améliorant la fonction immunitaire (Kruk and Czerniak, 2013).

#### II.6.3.5. Implication du microbiote intestinal

Il a été suggéré que la survenue du CCR pouvait être influencée par le microbiote intestinal puisque le tube digestif est en constante exposition avec ce dernier. De plus, le CCR affecte préférentiellement le côlon, où la densité bactérienne est la plus forte ( $10^{12}$  bactéries par gramme de tissu *versus*  $10^2$  bactéries par gramme de tissu dans l'intestin grêle ; Tjalsma et al., 2012). Plusieurs études ont mis en évidence une modification de la composition du microbiote associé à la muqueuse colique chez les patients atteints de CCR comparativement aux sujets contrôles (Chen et al., 2012; Gao et al., 2015; Lu et al., 2016). De plus, dans des modèles animaux prédisposés au développement de CCR (génétiquement prédisposé ou induit chimiquement), les animaux axéniques développent moins de tumeurs que ceux portant un microbiote conventionnel. Ces données suggèrent que le microbiote intestinal est un acteur important dans la carcinogenèse colorectale. Les mécanismes par lesquels le microbiote intestinal peut influencer le CCR sont développés dans la partie 3 de ce manuscrit.

# Partie 3. Rôle du microbiote intestinal dans la carcinogenèse colorectale

---

## **III.1. Généralités**

En 2012, sur la totalité des 14 millions de nouveaux cas de cancers, 2,2 millions étaient attribués aux agents infectieux (Plummer et al., 2016). Une revue regroupant les études épidémiologiques et pathologiques depuis l'année 2000 a montré que la proportion des cas de cancers attribués aux agents infectieux représente plus de 20% des cas de cancers. Ces proportions varient largement dans le monde de 5% dans les pays les plus développés à plus de 50% dans les pays d'Afrique Subsaharienne où 90% des cas de cancers liés à une infection sont causés par *Helicobacter pylori* (770 000 cas), *Papillomavirus* (640 000 cas), virus de l'hépatite B (420 000 cas), virus de l'hépatite C (170 000 cas) et le virus d'Epstein-Barr (120 000 cas) (Plummer et al., 2016; Schottenfeld and Beebe-Dimmer, 2015).

Puisque 99% de la masse microbienne est localisée au niveau du tube digestif, le microbiote intestinal est le microbiote le plus étudié. De nombreuses études, sur des animaux axéniques, mettent en évidence le rôle pro-tumoral du microbiote dans différents modèles murins prédisposés au développement du CCR (Dove et al., 1997; Li et al., 2012b; Vannucci et al., 2008). De manière intéressante, certaines études utilisant des traitements antibiotiques ont noté une réduction du développement du CCR chez les souris (Chen et al., 2008).

De façon générale, la tumorigénèse peut être influencée par le microbiote intestinal de deux façons différentes : soit par l'action d'un pathogène spécifique, soit par une modification globale de la composition microbienne, appelée dybiose.

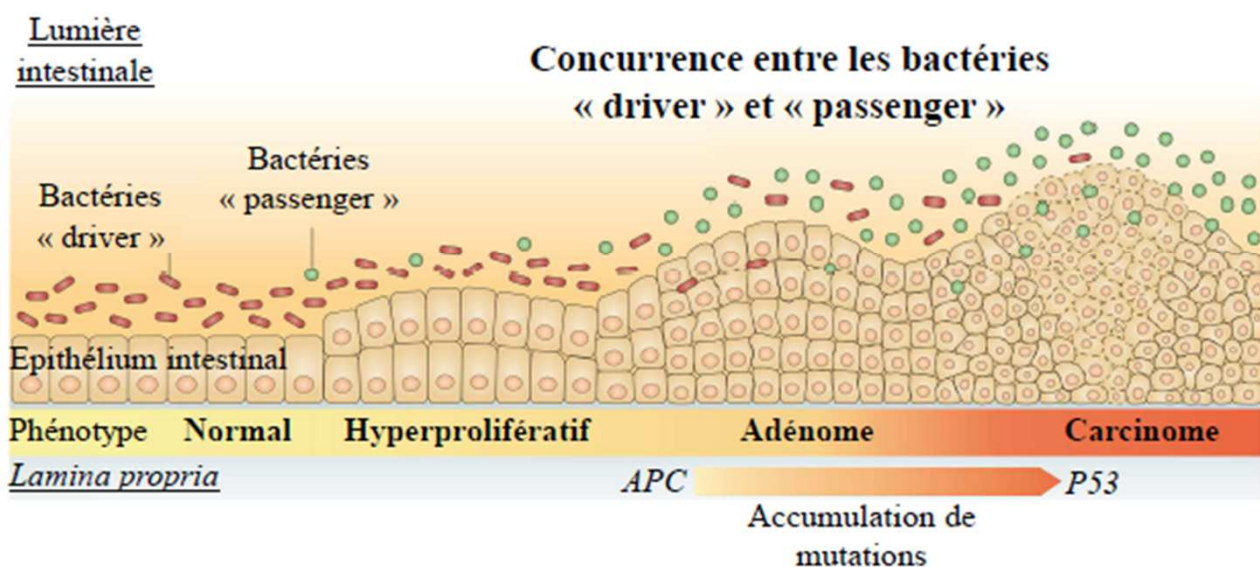
## **III.2. Microbiote intestinal et CCR**

Plusieurs études ont montré un lien entre une modification de la composition du microbiote intestinal et le CCR. En 1995, une étude a mis en évidence 15 espèces bactériennes associées avec un risque augmenté de développer un CCR, tels que 2 espèces de *Bacteroides* (*Bacteroides vulgatus* et *Bacteroides stercoris*), 2 espèces de *Bifidobacteries* (*Bifidobacterium longum* et *Bifidobacterium angulatum*), 5 espèces d'*Eubacteries* (*Eubacterium rectale* 1 et 2, *Eubacterium eligens* 1 et 2, *Eubacterium cylindroides*) et 3 espèces de Ruminocoque (*Ruminococcus torques*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus gnavus*) ainsi que *Streptococcus hansenii*, *Fusobacterium prausnitzii* et *Peptostreptococcus*

*productus 1* (Moore and Moore, 1995). Les auteurs ont par ailleurs mis en évidence 5 espèces bactériennes associées à une diminution du risque de développer un CCR notamment des *Eubactéries*, un *Lactobacille* (*Lactobacillus S06*), *Peptostreptococcus* DZ2 et *Fusobacterium* AB (Moore and Moore, 1995).

L'analyse de la composition du microbiote au niveau de différents compartiments chez 46 patients atteints de CCR et 56 volontaires sains, a montré que la composition bactérienne associée à la muqueuse colique est significativement différente chez les patients atteints de CCR par rapport aux volontaires sains (Chen et al., 2012). En effet, les espèces de *Fusobacteries*, *Porphyromonas*, *Peptostreptocoque*, *Gemella*, *Mogibacteries* et *Klebsiella* sont augmentées alors que celles de *Feacalibacteries*, *Blautie*, *Lachnospires*, *Bifidobacteries* et *Anaerostipes* sont réduites chez les patients atteints de CCR comparativement aux sujets sains (Chen et al., 2012). De plus, les auteurs ont mis en évidence une diminution de la diversité microbienne dans les tissus cancéreux comparativement aux tissus sains (Chen et al., 2012). Viljoen et collaborateurs ont montré une augmentation des *Fusobacteries* dans les tissus tumoraux comparés aux tissus de la muqueuse adjacente saine, et ceci est associé avec des stades plus tardifs de la maladie (Viljoen et al., 2015). Plus récemment, une analyse sur 526 échantillons provenant de plusieurs cohortes de Chine, Autriche, Amérique, Allemagne et France, a mis en évidence 7 populations bactériennes enrichies chez les patients atteints de CCR : *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Alistipes finegoldii*, et *Thermanaerovibrio acidaminovorans* (Dai et al., 2018). L'altération de la composition du microbiote intestinal a aussi été rapportée dans les modèles animaux prédisposés au CCR (Lucas et al., 2017).

Une étude a montré que les souris conventionnelles traitées avec l'agent carcinogène AOM (azoxyméthane) puis gavées avec les échantillons fécaux de patients atteints de CCR ont développé plus de polypes macroscopiques dans le côlon que celles recevant les fèces de sujets sains (Wong et al., 2017a). De plus, les souris traitées avec un cocktail d'antibiotiques puis gavées avec les échantillons fécaux de patients atteints de CCR présentaient une augmentation du nombre de cellules coliques en prolifération comparativement aux souris gavées avec des échantillons fécaux d'individus sains (Wong et al., 2017a). Les souris (conventionnelles ou traitées avec l'antibiotique) gavées avec les échantillons de patients atteints de CCR présentaient une composition microbienne différente avec notamment une diminution de la diversité par rapport aux souris gavées avec les échantillons issus de patients contrôles. Suite au gavage des souris avec les échantillons fécaux des patients atteints de CCR, les auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'expression de plusieurs



**Figure 20 : Modèle « driver-passenger » dans le CCR.**

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

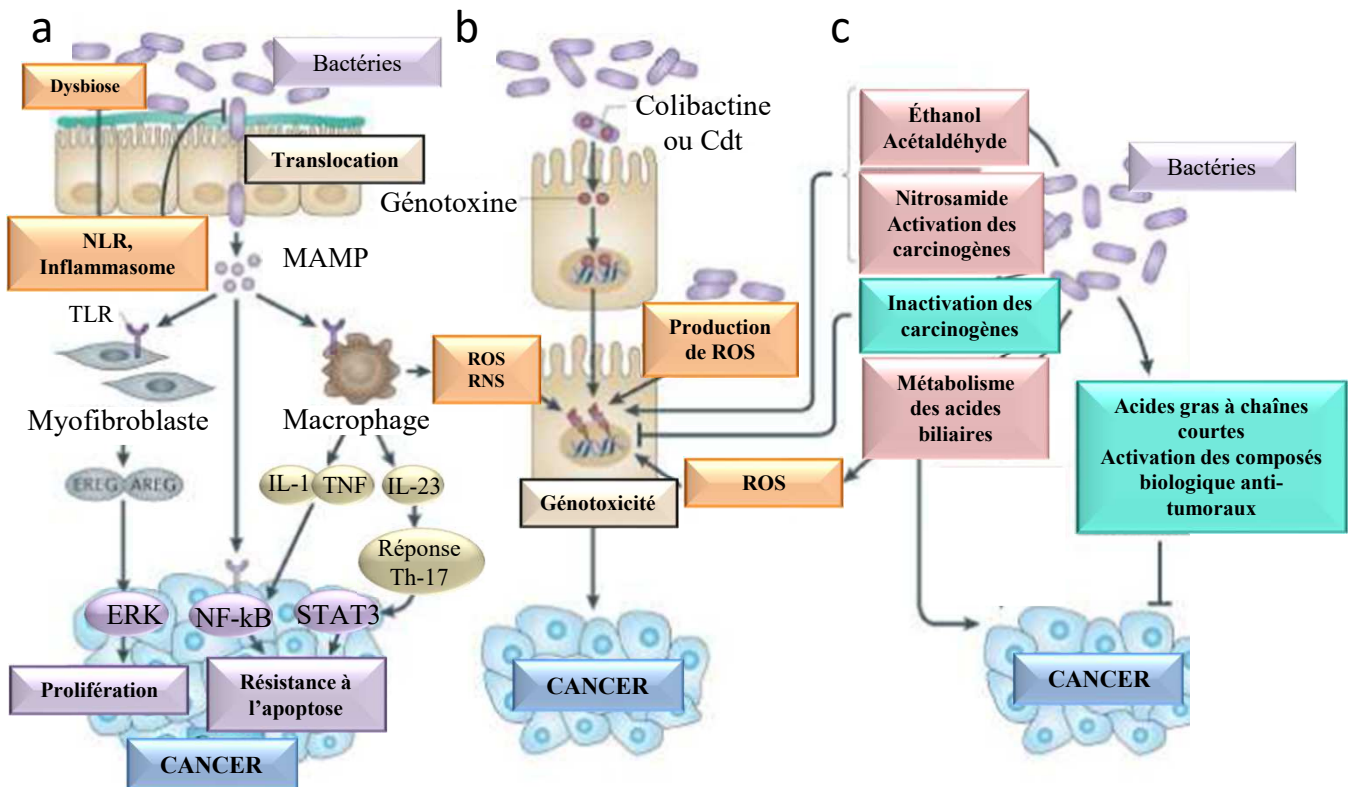
(Modifiée d'après Tjalsma et al., 2012)

cytokines, CXCR (C-X-C motif chemokine receptor)-1, CXCR-2, IL-17A, IL-22, et IL-23A, mais aussi une augmentation des cellules T-helper (Th) 1 et Th17 comparativement aux souris gavées avec les échantillons issus de sujets sains. Enfin, cette même étude a mis en évidence une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, l'apoptose, la dédifférenciation, l'angiogenèse, l'invasivité et la mise en place des métastases chez les souris gavées avec les échantillons fécaux issus de patients atteints de CCR (Wong et al., 2017a). Cette étude confirme que le microbiote fécal des patients atteints de CCR peut favoriser la progression du CCR.

L'un des modèles les plus connus pour l'étude du CCR est le modèle de souris *Apc<sup>Min/+</sup>* (Min, multiple intestinal neoplasia), qui possède une mutation du gène *APC* induisant la formation d'un codon stop. Ces souris développent de multiples adénomes au niveau de l'intestin et du côlon (Moser et al., 1990). Une étude a montré que les souris *Apc<sup>Min/+</sup>il10<sup>-/-</sup>* axéniques ne développaient que très peu de tumeurs comparées aux souris *Apc<sup>Min/+</sup>il10<sup>-/-</sup>* portant un microbiote conventionnel, indiquant le rôle prépondérant du microbiote dans le CCR associé à une colite (Tomkovich et al., 2017).

L'ensemble des études sur le microbiote intestinal associé au CCR a permis l'émergence de 2 hypothèses pour expliquer l'implication des bactéries dans la progression du CCR : (1) la présence d'une communauté microbienne ayant des caractéristiques pro-carcinogènes et pro-inflammatoires, (2) le modèle « driver-passenger » selon lequel la muqueuse colique serait colonisée par des bactéries dites « driver » ayant une activité pro-inflammatoire chronique et/ou une activité génotoxique et induisant la prolifération cellulaire, l'accumulation de dommages à l'ADN et de mutations génétiques (**figure 20**).

Parmi les bactéries « driver » sont décrites les espèces *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli* (Sears and Garrett, 2014; Tjalsma et al., 2012). Les modifications du microenvironnement au niveau de la tumeur et initiées par les bactéries « driver » pourraient exercer une pression de sélection favorisant l'émergence de bactéries dites « passenger » telles que *Fusobacterium nucleatum* et *Streptococcus gallolyticus*. L'expansion, au site tumoral, de bactéries ayant des propriétés oncogéniques et la diminution de l'abondance des bactéries aux propriétés « suppresseurs de tumeurs » pourraient ainsi participer à la promotion tumorale.



**Figure 21 : Mécanismes par lesquels le microbiote intestinal module la carcinogénèse colorectale.**

Le microbiote intestinal est impliqué dans la carcinogénèse colorectale à travers des mécanismes variés.

**a)** Des phénomènes de dysbiose et la modulation des défenses de l'hôte pourraient favoriser des translocations bactériennes responsables de l'induction de phénomènes inflammatoires, favorisant la prolifération cellulaire et régulant l'apoptose. Des motifs antigéniques particuliers de ces micro-organismes, les MAMPs sont reconnus par les TLRs de nombreux types cellulaires tels que les macrophages, les myofibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules tumorales.

**b)** Des génotoxines bactériennes, telles que la colibactine ou la CDT, produites par les bactéries, sont internalisées, créant des dommages sur l'ADN et modulant le cycle cellulaire. Les ROS et RNS, produites par les cellules immunitaires en réponse à l'infection et/ou par les bactéries elles-mêmes, peuvent également être génotoxiques.

**c)** Le métabolisme microbien participe à la conversion, à la production et à l'activation de composés pro-carcinogènes tels que l'acétaldéhyde, des nitrosamines, et des acides biliaires secondaires. Il participe toutefois également à des processus anti-néoplasiques tels que l'inactivation de certains carcinogènes, la production d'acides gras à chaînes courtes et l'activation de composés phytochimiques protecteurs.

(Modifiée d'après Schwabe et al., 2013)



### III.2.1 Les mécanismes d'action mis en jeu par le microbiote intestinal

Plusieurs hypothèses ont été proposées concernant les mécanismes mis en jeu par les bactéries dans la carcinogenèse colorectale, notamment l'induction de l'inflammation, la production de toxines ou la transformation de nutriments en composés pro-carcinogènes (**figure 21**). Toutefois, il est toujours difficile de différencier les dommages cellulaires causés directement par les bactéries de ceux induits par la réponse cellulaire de l'hôte. L'ensemble des interactions entre l'inflammation chronique, la production de toxines et les réponses cellulaires de l'hôte aboutirait à la création d'un environnement pro-tumoral (Boleij and Tjalsma, 2012; Schwabe and Jobin, 2013).

#### III.2.1.1. L'inflammation chronique

Une réponse inflammatoire aberrante d'origine infectieuse ou non dans le tractus digestif pourrait conduire à une dysbiose intestinale en faveur de pathobiontes qui peuvent faire basculer un état inflammatoire physiologique vers un état inflammatoire pathologique par l'induction d'une boucle pro-inflammatoire auto-entretenu. Un argument fort de l'implication de l'inflammation dans les mécanismes de carcinogenèse colorectale liés au microbiote intestinal est la mise en évidence de dysbioses intestinales chez les patients atteints de MICI. Ces patients présentent un risque augmenté de développer un CCR comparativement à la population générale (Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2011; Cunningham et al., 2010 ; Manichanh et al., 2012 ; Kaakoush et al., 2012).

De plus, il a été observé, que le microbiote des souris *il10<sup>-/-</sup>* traitées à l'AOM est similaire à celui observé chez les souris *il10<sup>-/-</sup>* non traitées à l'AOM, suggérant que les altérations du microbiote intestinal seraient la conséquence d'une inflammation. Par ailleurs, une étude a relevé une modification de la composition du microbiote intestinal après chaque cycle de traitement au DSS, par rapport à celle relevée juste après un traitement à l'AOM (Zackular et al., 2013), soutenant l'hypothèse d'un remodelage du microbiote en condition inflammatoire. Une autre étude réalisée sur un modèle murin de MICI (souris TGF- $\beta^{-/-}$ ) a mis en évidence que les souris élevées en condition axénique développent une inflammation réduite sans développement de tumeurs.

Toutefois, l'inflammation peut également être liée à la réponse immunitaire induite par les bactéries dans le CCR. En effet, Wu et al. ont montré que la toxine sécrétée par *Bacteroides fragilis*, la *bft*, induisait une réponse pro-inflammatoire médiée par les lymphocytes Th17 chez les souris *APC<sup>Min/+</sup>* prédisposées au CCR, et que cette réponse pro-inflammatoire était retrouvée à des stades précoces de la carcinogenèse (Wu et al., 2009). De

plus, certaines bactéries telles que *Streptococcus bovis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli* augmentent significativement l'expression des médiateurs de l'inflammation selon des mécanismes propres à chaque bactérie et décrits dans la partie « III.2.2. La carcinogenèse induite par des bactéries intestinales spécifiques ».

L'interaction entre l'inflammation et le microbiote dans la carcinogenèse colique a aussi été observée dans des modèles murins d'inflammation chronique de l'intestin (souris *il10<sup>-/-</sup>*, *Nod2<sup>-/-</sup>*). Après traitement à l'AOM, ces modèles développent des tumeurs colorectales en nombre et en taille plus élevés chez les souris conventionnelles par rapport aux souris axéniques (Couturier-Maillard et al., 2013; Uronis et al., 2009). Ainsi, les pathobiontes induiraient une activation de l'inflammation via les NLR et des TLR permettant la biosynthèse d'effecteurs antimicrobiens, de cytokines et chimiokines inflammatoires et de prostaglandines. Cela a pour conséquence le recrutement des cellules immunitaires au niveau des foyers d'invasion et l'installation d'une inflammation chronique jouant un rôle dans la carcinogenèse.

#### III.2.1.2. Modification des métabolites en composés carcinogènes

Dans le côlon, il existe de nombreux substrats disponibles pour la flore colique : des substrats endogènes (mucus, cellules desquamées, sécrétions biliaires.....) et des substrats exogènes (nutriments non digérés, cellulose, xénobiotiques...) (Louis et al., 2014). A ce jour, il existe de nombreux arguments en faveur de l'implication du métabolisme bactérien dans le développement du CCR. Le métabolisme bactérien pourrait affecter la carcinogenèse colorectale à plusieurs niveaux *via* la régulation de la production d'acides biliaires pro-carcinogènes, l'activation ou l'inactivation d'autres composés pro-carcinogènes, la transformation d'agents phytochimiques et de xénobiotiques, la modulation du métabolisme hormonal et ou la régulation de voies de signalisation pro-inflammatoires (Louis et al., 2014; Schwabe and Jobin, 2013).

Des études ont mis en évidence que les patients à haut risque de développer un CCR et ceux atteints de CCR présentent une augmentation de 1,7 fois de l'activité de  $\beta$ -glucuronidase fécale, une enzyme exprimée par certaines bactéries du microbiote intestinal dont *E. coli*, comparativement aux patients contrôles (Kim and Jin, 2001). La  $\beta$ -glucuronidase pourrait jouer un rôle dans la carcinogenèse colorectale en participant à la synthèse de métabolites carcinogènes. A titre d'exemple, la diméthylhydrazine (DMH), un agent carcinogène présent dans le côlon, est habituellement métabolisé par le foie et de petites quantités de son

métabolite pro-carcinogène, le méthylazoxyméthanol (MAM) hautement mutagène, sont excrétées dans la bile et libérées dans le côlon. Par ailleurs, le DMH peut être hydrolysé par l'activité  $\beta$ -glucuronidase des bactéries coliques entraînant le relargage du MAM dans le côlon. Les animaux axéniques traités avec du DMH développent moins de tumeurs coliques que les animaux conventionnels traités avec du DMH, et l'administration d'un inhibiteur de la  $\beta$ -glucuronidase chez des rats traités avec de l'AOM induit une diminution du nombre de tumeurs. Ceci suggère l'importance de l'activité enzymatique microbienne dans la carcinogenèse colorectale (Gill and Rowland, 2002).

Le microbiote intestinal, et notamment les bactéries anaérobies à Gram positif, joue un rôle important dans le métabolisme des acides biliaires, via leur activité  $7\alpha$ -dehydroxylase, qui est augmentée chez les patients atteints de CCR comparativement aux sujets contrôles (Gill and Rowland, 2002). Les acides biliaires primaires cholique et chénodéoxycholique sont convertis par cette enzyme respectivement en acides biliaires secondaires désoxycholique ou DCA (deoxycholic acid) et lithocholique, les rendant plus hydrophiles (Zhu et al., 2013). Une corrélation positive entre la concentration fécale des acides biliaires et le risque augmenté de développer un CCR a été mise en évidence (Ajouz et al., 2014; Ocvirk and O'Keefe, 2017). En modèles murins, l'administration de DCA à des rats traités à l'AOM induit une augmentation de plus de 2 fois du nombre de foyers de cryptes aberrantes et une augmentation de la prolifération cellulaire au niveau de la muqueuse (Narahara et al., 2000; Seraj et al., 1997). De plus, Bernstein et al. ont rapporté une augmentation de l'incidence des tumeurs digestives dans un modèle murin exposé aux acides biliaires (Bernstein et al. 2009). Les propriétés carcinogènes du DCA ont été montrées par sa capacité à induire un stress oxydatif mitochondrial conduisant à la synthèse des ROS, à activer la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-8, à induire des dommages de l'ADN tels que des cassures double brin et à induire la dégradation de la protéine p53 par le protéasome (Mühlbauer et al., 2004; Payne et al., 2007; Qiao et al., 2001).

La fermentation microbienne des protéines entraîne la formation de métabolites potentiellement toxiques et/ou pro-carcinogènes impliqués dans le CCR, tels que les phénols, les sulfites, l'ammoniac et les nitrosamines (Ocvirk and O'Keefe, 2017; Schwabe and Jobin, 2013). Ces molécules pourraient exercer un effet pro-carcinogène par des mécanismes d'alkylation de l'ADN pouvant conduire à des mutations décrites dans les CCR, reliés au régime alimentaire occidental (Russell et al., 2014).

La consommation excessive et régulière d'alcool est décrite comme un facteur de risque du CCR (Seitz and Becker, 2007). Le métabolisme microbien pourrait favoriser cette

toxicité, notamment au niveau du tube digestif dans lequel certaines bactéries aérobies et anaérobies facultatives convertissent l'éthanol en acétaldéhyde, un composé pro-carcinogène responsable de dommages à l'ADN (Boffetta and Hashibe, 2006; Tsuruya et al., 2016). La conversion de l'éthanol en acétaldéhyde est inhibée par des antibiotiques ciblant les bactéries aérobies et anaérobies facultatives confirmant l'implication du microbiote (Homann et al., 2000).

### III.2.1.3. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est caractérisé par un déséquilibre entre la production de molécules pro-oxydantes (ROS et RNS) et l'activation des systèmes de défenses anti-oxydantes, (Klaunig et al., 2010). Ces ROS et RNS peuvent être générés par la cellule lors d'une infection afin de contribuer à l'élimination du pathogène ou directement par le microbiote intestinal (Irrazábal et al., 2014; Schwabe and Jobin, 2013). Les ROS et RNS possèdent des propriétés oxydantes et interagissent avec les substrats biologiques afin d'induire des cassures et lésions de l'ADN, des agrégats protéiques et un dysfonctionnement des membranes (Klaunig et al., 2010). Afin de limiter ces dégâts, l'organisme possède des systèmes de défense antioxydants, enzymatiques ou non, qui permettent de réguler la production des ROS/RNS et de réparer les dommages. Ces systèmes de défense sont altérés dans le CCR (Favier, 2006). Les études *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence que certains *Entérocoques*, notamment *E. faecalis*, peuvent générer la production de radicaux (Huycke et al., 1996, 2002). Ces radicaux hydroxyles ont la capacité d'induire des dommages à l'ADN, des mutations et une forte instabilité génomique. Par ailleurs, les études ont mis en évidence la capacité de certaines bactéries à moduler les systèmes de défense anti-oxydante, en particulier les mécanismes de réparation de l'ADN. Notamment, Maddocks et collaborateurs ont montré *in vitro* la capacité de certaines souches d'*E. coli* à inhiber le système de réparation de l'ADN, MMR, via l'induction de ROS (Maddocks et al., 2009, 2013). Cette inhibition du système MMR empêche la réparation des dommages à l'ADN induits par les ROS et conduit à l'apparition de mutations qui peuvent être impliquées dans la carcinogenèse colorectale (Maddocks et al., 2009, 2013; Piao et al., 2013).

Enfin, plusieurs études ont mis en évidence l'hyper-production des ROS par les mitochondries en réponse à l'infection par les souches d'*E. coli* productrices d'une génotoxine, la colibactine (Gagnière et al., 2017; Secher et al., 2013). Le stress oxydant qui en résulte est considéré comme un facteur d'inflammation et de mutagenèse pouvant favoriser la survenue et/ou la progression du CCR.

#### III.2.1.4. Toxines et autres facteurs de virulence

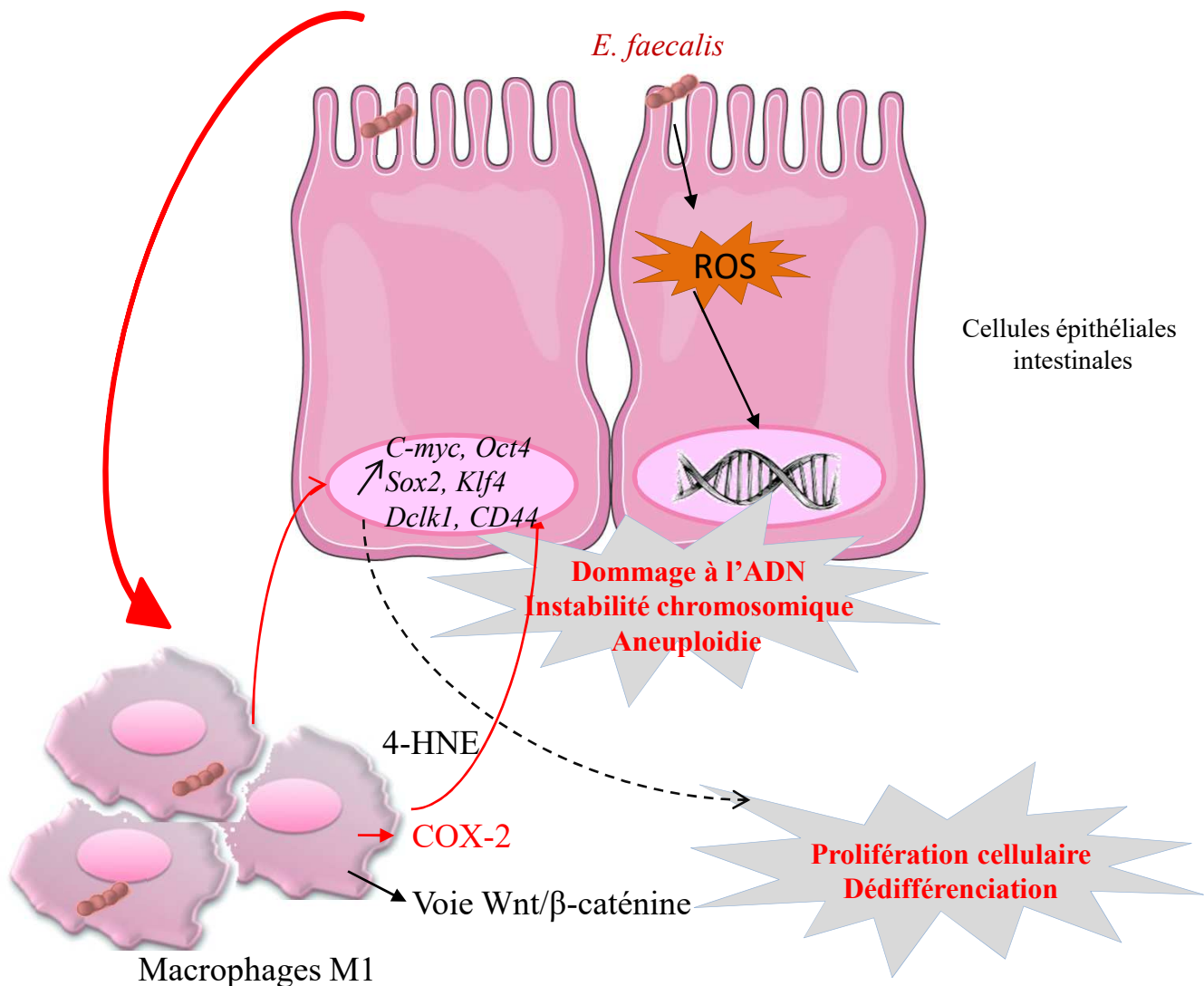
Certaines bactéries commensales ont progressivement acquis des facteurs de virulence leur conférant un pouvoir pathogène. Notamment, l'acquisition de flagelles, pili et adhésines permet aux bactéries de traverser la barrière du mucus, d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales (Maddocks et al., 2009; Prorok-Hamon et al., 2014). La majorité des atteintes bactériennes du tube digestif implique la présence de facteurs de virulence (Schwabe and Jobin, 2013). Ces facteurs pourraient être impliqués dans la carcinogenèse colorectale en ciblant la membrane de la cellule hôte, en interagissant avec des cibles intracellulaires ; soit en passant la membrane plasmique, soit en étant injectées directement à l'intérieur de la cellule. Par ces différents mécanismes, les toxines interfèrent avec le fonctionnement normal de la cellule eucaryote et modulent la prolifération, l'apoptose et la différenciation.

La toxine CagA (Cytotoxin-associated gene A), délivrée dans la cellule hôte par le système de sécrétion de type IV, est considérée comme une onco-protéine bactérienne. Cette toxine est produite par la bactérie *Helicobacter pylori* et est la première toxine bactérienne à avoir été associée avec les cancers (Hatakeyama, 2017). Suite à son entrée dans la cellule, CagA est phosphorylée par les kinases de la famille des SRC et mime les effets des tyrosines phosphorylées des protéines endogènes de la cellule. Par conséquent, CagA a un impact sur le réarrangement du cytosquelette et sur la mobilité cellulaire (Hagymási and Tulassay, 2014). CagA lorsqu'elle est non phosphorylée a aussi un impact sur la cellule hôte en activant la voie de signalisation ERK et certains facteurs de transcription impliqués dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et l'inflammation (NF- $\kappa$ B, c-FOS, c-JUN). De plus, CagA peut déstabiliser les jonctions cellulaires et déréguler la voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine (Franco et al., 2005; Hagymási and Tulassay, 2014).

*In vitro*, la toxine VacA (vacuolating cytotoxin A), elle aussi produite par *Helicobacter pylori*, induit la formation de pores, de canaux membranaires, la perturbation des fonctions endosomales et lysosomales ainsi que l'apoptose. VacA possède aussi un effet immunosuppresseur (Isomoto et al., 2010).

La toxine BFT (Bacteroides fragilis toxin) produite par *B. fragilis* se lie à un récepteur spécifique de l'épithélium colique conduisant à l'activation des voies de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine et NF- $\kappa$ B, entraînant une augmentation de la prolifération cellulaire, une altération de la barrière épithéliale, la mise en place d'une réponse pro-inflammatoire et l'accumulation des dommages à l'ADN.

Enfin, parmi les toxines, certaines sont capables de moduler le cycle cellulaire de la cellule hôte et sont appelées « cyclomodulines ». Quatre cyclomodulines sont décrites à ce



**Figure 22 : Rôle pro-carcinogène d'*Enterococcus faecalis* dans le CCR.**

Les bactéries appartenant à l'espèce *Enterococcus faecalis* est capable d'induire des cassures doubles brin de l'ADN en cellules épithéliales intestinales en produisant des ROS telles que des ions superoxydes  $O_2^-$ . Par ailleurs, les macrophages infectés par *E. faecalis* produisent une molécule réactive, le 4-Hydroxy-2-Nonenal (4-HNE) via le médiateur pro-inflammatoire, COX-2, induisant des cassures double brin de l'ADN au niveau des cellules épithéliales intestinales par des effets « bystander ». Ceci conduit à une augmentation de l'instabilité chromosomique. Les macrophages de phénotype M1, infectés par *E. faecalis*, induisent l'activation de la voie Wnt/β-caténine entraînant une augmentation de la prolifération cellulaire ainsi que la dédifférenciation cellulaire liée à une augmentation des marqueurs de cellules souches.

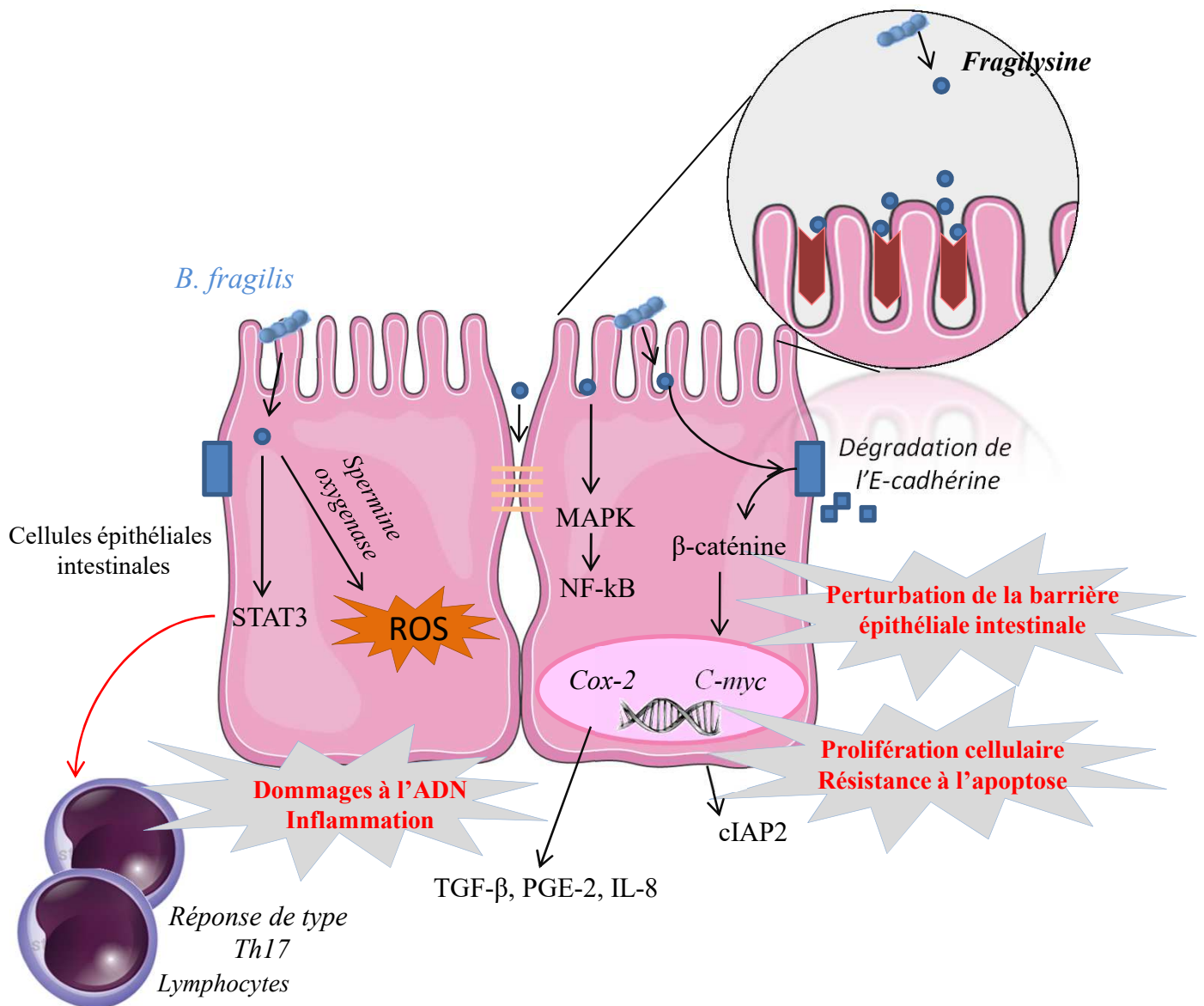
jour, la CIF (cell cycle-inhibiting factor), la CNF (cytotoxic necrotizing factor), la CDT (cytotoxic distending toxin) et la colibactine. Ces cyclomodulines sont capables de moduler le cycle cellulaire et peuvent moduler la carcinogenèse colorectale. Leur mode d'action sera détaillé dans la partie suivante (III.3.6).

### **III.3. La carcinogenèse induite par des bactéries intestinales spécifiques**

#### **III.3.1. *Enterococcus faecalis***

*E. faecalis* est une bactérie commensale Gram positive et anaérobie facultative qui est le plus souvent inoffensive pour l'Homme. Toutefois, des études ont mis en évidence une association entre *E. faecalis* et le CCR puisque cette bactérie a été trouvée enrichie dans les fèces des patients atteints de CCR comparés aux individus sains (Balamurugan et al., 2008) ainsi qu'au niveau des tumeurs ou du tissu adjacent sain des patients atteints de CCR comparés à la muqueuse des individus sains (Zhou et al., 2016). Plus récemment, une étude a rapporté le cas d'un homme caucasien de 86 ans atteint d'une bactériémie (présence de bactéries dans le sang) à *E. faecalis*. Cet homme présentait un saignement au niveau gastro-intestinal, plus tard identifié comme étant dû à un adénocarcinome colorectal par coloscopie (Amarnani and Rapose, 2017).

Chez les souris *il10<sup>-/-</sup>*, *E. faecalis* est capable d'induire et de maintenir une colite, d'induire une dysplasie et la formation de carcinomes rectaux (Balish and Warner, 2002). L'infection des souris sauvages par *E. faecalis* induit l'expression de la cytokine immunosuppressive TGF- $\beta$  dans les cellules épithéliales intestinales, activant ainsi la voie de signalisation SMAD (Ruiz et al., 2005). Ceci est associé à une perte d'expression de la protéine TLR2 et une inhibition des facteurs pro-inflammatoires associés à la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. Au contraire, suite à l'infection par les *E. faecalis*, les souris *il10<sup>-/-</sup>* présentent une absence d'inhibition de l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation dans les cellules épithéliales intestinales (Ruiz et al., 2006). Le potentiel pro-inflammatoire de *E. faecalis* pourrait être associé à sa capacité à produire des ROS (Huycke et al., 1996). Lorsque *E. faecalis* est administrée à des rats, cette bactérie est capable d'induire des dommages à l'ADN au niveau des cellules épithéliales coliques (Huycke et al., 2002). Une étude *in vitro* a montré que *E. faecalis* induit une augmentation de l'expression du médiateur pro-inflammatoire COX-2 dans les macrophages et favorise l'instabilité chromosomique dans les cellules épithéliales (Wang and Huycke, 2007). Plus récemment, il a été montré qu'une infection par *E. faecalis* entraîne la polarisation des macrophages selon le phénotype M1, qui



**Figure 23 : Rôle pro-carcinogène de *Bacteroides fragilis* entérotoxigène dans le CCR.**

Les bactéries appartenant à l'espèce *Bacteroides fragilis* entérotoxigènes (ETBF) colonisent la muqueuse colique et sécrètent la toxine « fragilysine ». Sa fixation sur un récepteur spécifique présent au niveau des cellules épithéliales intestinales induit l'activation des voies de signalisation MAPKineses, NF-κB, et COX-2 et conduit à l'expression et la sécrétion de chimiokines/cytokines telles que TGF-β et l'IL-8, et de PGE2. Le relargage de ces molécules dans la sous-muqueuse induit l'inflammation. Par ailleurs, la fragilysine induit l'activation de STAT3 responsable de la mise en place d'une réponse immunitaire de type Th17 favorisant l'apparition des tumeurs. De plus, la fixation de la fragilysine conduit également au clivage de l'E-cadhérine, induisant la libération de la β-caténine dans le cytoplasme, sa translocation nucléaire et l'activation de la transcription des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire tel que l'oncogène *c-Myc*. Par ailleurs, le clivage de l'E-cadhérine diminue la fonction de barrière de la muqueuse colique pouvant participer à une augmentation de l'inflammation colique. ETBF induit également l'expression de la spermine oxydase responsable de la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène à l'origine de cassures doubles brins de l'ADN.



est inflammatoire et microbicide. Ces derniers induisent des aneuploïdies ainsi qu'une instabilité chromosomique au niveau des cellules épithéliales coliques primaires, et sont couramment retrouvés dans les cancers (Wang et al., 2015). Lorsque des macrophages infectés par *E. faecalis* sont co-cultivés avec des cellules épithéliales coliques murines, cela augmente les niveaux d'expression des marqueurs de cellules souches et cellules progénitrices dans les cellules infectées tels que c-MYC (Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog), KLF-4, OCT-4 (Octamer-binding transcription factor-4), et SOX2 (Sry-box transcription factor 2) (Wang et al., 2015, 2017). Ces marqueurs sont associés à une reprogrammation et une dédifférenciation cellulaire. En outre, les auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'expression de DCLK (doublecortin like kinase)-1 et CD (Cluster of differentiation)-44, deux marqueurs de cellules souches intestinales, dans les cellules épithéliales intestinales mises en contact avec des macrophages infectés par *E. faecalis* (**figure 22**). L'ensemble de ces résultats pourraient expliquer les mécanismes par lesquels *E. faecalis* module la carcinogenèse colorectale.

En revanche, une étude récente n'a montré aucune association entre la colonisation par *E. faecalis* et le CCR (Viljoen et al., 2015). De plus, plusieurs études fonctionnelles ont mis en évidence un rôle anti-inflammatoire de *E. faecalis* via l'induction de l'expression d'IL-10, et l'inhibition de l'expression d'IL-8 (de Almeida et al., 2018).

### III.3.2. *Bacteroides fragilis*

*B. fragilis* est une bactérie commensale humaine anaérobie stricte qui représente une faible portion du microbiote intestinal (environ 0,1%). *B. fragilis* participe à la fermentation des sucres et la biotransformation des acides biliaires (Wexler, 2007). Il y a deux sous-types de *B. fragilis*, la *B. fragilis* non toxigène (NTBF) et la *B. fragilis* enterotoxigène (ETBF). Cette dernière, associée à des cas de diarrhée chez les animaux et chez les enfants, porte un îlot pathogène, *BfPAI* (*B. fragilis pathogenicity island*), qui lui permet la production d'une entérotoxine appelée la « fragilysine » ou BFT (Sears, 2001).

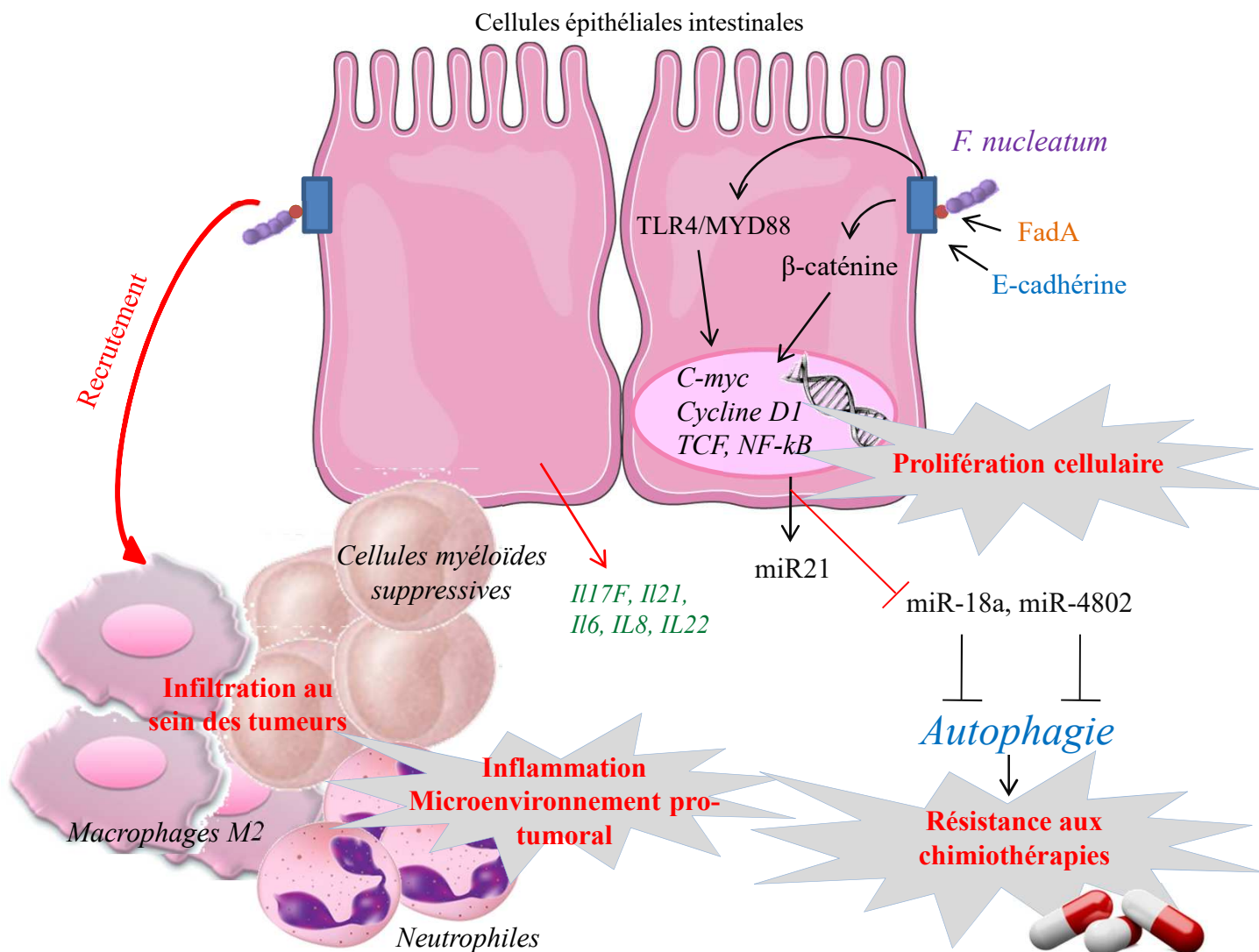
Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre *B. fragilis* et le CCR, puisque cette bactérie est enrichie dans les fèces des patients atteints de CCR comparés aux sujets sains (Sobhani et al., 2011; Wang et al., 2012c). Le gène *bft* codant pour la fragilysine a été détecté dans les fèces chez 38% des patients atteints de CCR contre seulement 12% des sujets contrôles (Toprak et al., 2006). De plus, la ETBF semble être associée à un stade plus tardif de la maladie, puisqu'elle est détectée dans 100% des tumeurs tardives contre 70% des

tumeurs précoces (Boleij et al., 2015). Toutefois, plus récemment, Purcell et collaborateurs ont décrit une association entre *B. fragilis* et les lésions cancéreuses précoces (Purcell et al., 2017). *In vitro*, la fragilysine présente une activité protéolytique, entraînant la dégradation des protéines de jonctions serrées telles que la ZO-1 (Obiso et al., 1997) (**figure 23**) conduisant par conséquent, à la perturbation de la barrière épithéliale intestinale et l'apparition de dommages au niveau des cryptes intestinales (Riegler et al., 1999; Wells et al., 1996). De plus, sa fixation sur un récepteur spécifique présent au niveau des cellules épithéliales intestinales induit l'activation des voies de signalisation MAPK, NF- $\kappa$ B, et COX-2 et conduit à l'expression et la sécrétion des médiateurs de l'inflammation tels que TGF- $\beta$  et l'IL-8, et de PGE2.

En 2003, Wu et collaborateurs ont montré que la molécule d'adhésion cellulaire, E-cadhérine, est dégradée dans les cellules épithéliales intestinales infectées par l'ETBF (Wu et al., 2003). L'E-cadhérine dégradée ne pouvant plus séquestrer la  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme, cette dernière est transportée au noyau pour induire l'expression de gènes cibles tels que l'oncogène *c-MYC*, ayant pour conséquence une prolifération cellulaire augmentée qui pourrait influencer le développement du CCR (Wu et al., 2003). De plus, les souches ETBF sont responsables de l'augmentation de l'expression de la protéine inhibitrice de l'apoptose, cIAP2 (cellular inhibitor of apoptosis protein 2) dans les cellules épithéliales coliques, et cela est associé à une résistance à l'apoptose (Kim et al., 2008). L'ETBF induit également l'expression de la spermine oxydase responsable de la synthèse de ROS à l'origine de cassures double brin de l'ADN (Goodwin et al., 2011).

Chez les souris *Apc<sup>Min/+</sup>*, la colonisation par l'ETBF entraîne une augmentation de l'épaisseur du côlon ainsi qu'une augmentation de l'inflammation et du nombre de tumeurs coliques, ce qui n'était pas observé lorsque les souris *Apc<sup>Min/+</sup>* étaient colonisées par une souche NTBF (Wu et al., 2009). De plus, l'ETBF entraîne l'activation de STAT3 au niveau des cellules épithéliales intestinales qui, par conséquent, induit une réponse inflammatoire de type Th17, responsable de l'apparition précoce de tumeurs colorectales (Wu et al., 2009) (**figure 23**). L'administration d'un anticorps dirigé contre l'IL-17 abolit l'effet d'ETBF sur la carcinogenèse colorectale, avec un nombre de tumeurs coliques significativement réduit. Ainsi, la mise en place d'une inflammation chronique par ces bactéries pourrait influencer la progression tumorale.

Plus récemment, une étude a obtenu des résultats opposés aux études préalablement menées sur le rôle de la BFT sur la carcinogenèse colorectale. En effet, l'administration d'une BFT recombinante à des souris traitées à l'AOM/DSS entraîne une diminution du nombre et



**Figure 24 : Rôle pro-carcinogène de *Fusobacterium nucleatum* dans le CCR.**

Les souches de *F. nucleatum* se lient aux cellules épithéliales intestinales au niveau de l'E-cadhérine via leur adhesine FadA. Cette interaction entraîne l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et par conséquent la transcription des gènes cibles, aboutissant à une augmentation de la prolifération cellulaire. Par ailleurs, l'infection par *F. nucleatum* entraîne l'infiltration de macrophages de type M2, de neutrophiles et de cellules myéloïdes au sein des tumeurs ainsi que la sécrétion de nombreux médiateurs pro-inflammatoires, installant un microenvironnement propice au développement du CCR. L'activation de la voie TLR4/MYD88/NF- $\kappa$ B entraîne l'inhibition des miR18a et mi-4802 ciblant des gènes de l'autophagie. L'autophagie ainsi activée favorise la résistance aux chimiothérapies.

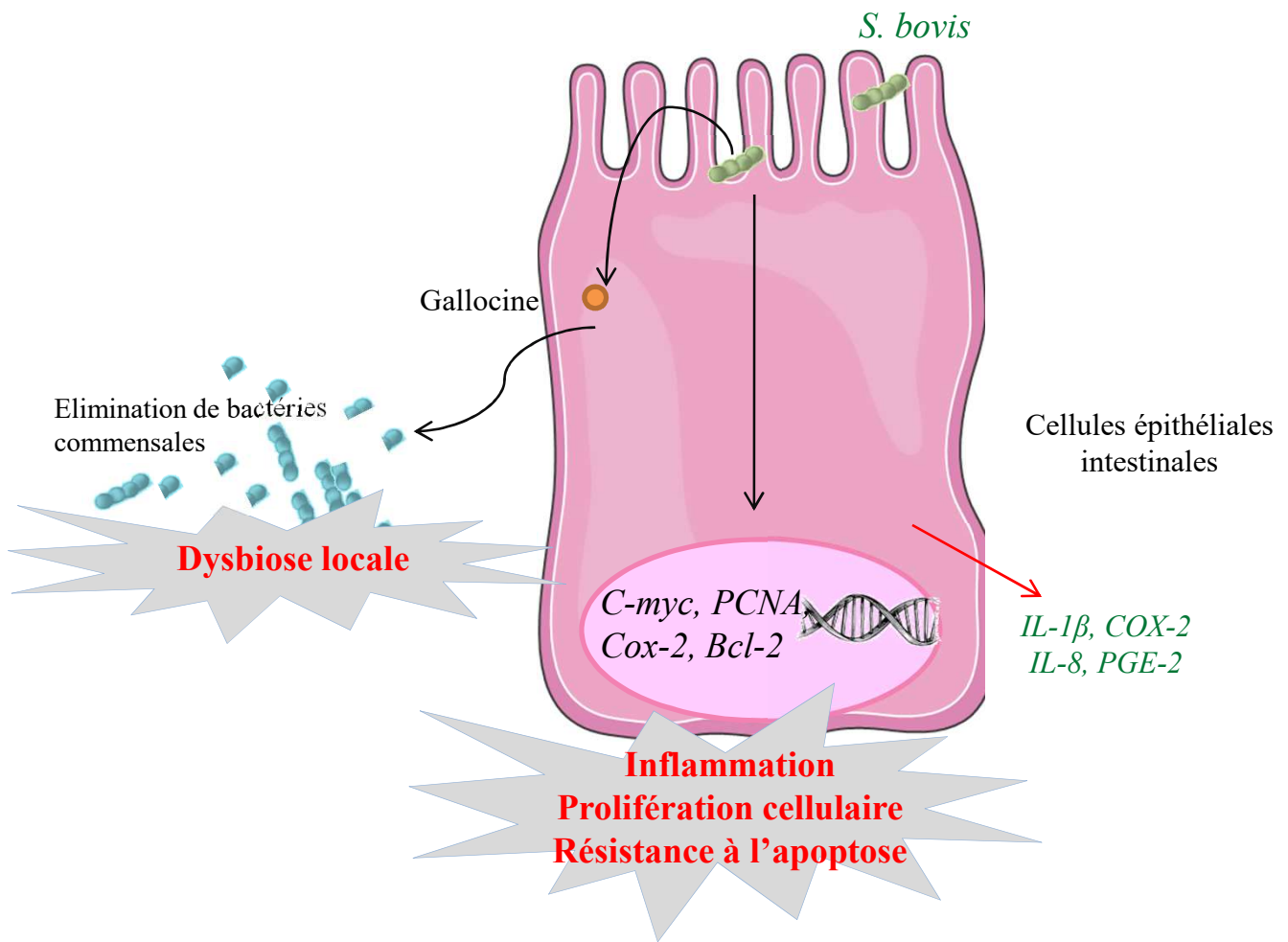
de la taille des tumeurs coliques via la capacité de la BFT à limiter la prolifération cellulaire et à induire l'apoptose (Lv et al., 2017). Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'administration de la BFT pourrait moduler le système immunitaire et rendre le microenvironnement immunitaire moins propice au développement tumoral (Lv et al., 2017).

### III.3.3. *Fusobacterium nucleatum*

*F. nucleatum* est une bactérie commensale opportuniste Gram négative anaérobie stricte qui peut être impliquée dans les maladies parodontales (Han, 2015). *F. nucleatum* est capable d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales et endothéliales par l'intermédiaire de l'adhésine FadA exprimée à la surface de la bactérie, ce qui facilite sa dissémination (Han, 2015; Han et al., 2000).

La prévalence de *F. nucleatum* est augmentée dans la muqueuse des patients atteints de CCR comparés aux sujets sains (McCoy et al., 2013), et cette bactérie est présente préférentiellement au niveau des tissus tumoraux comparés aux tissus sains adjacents (Castellarin et al., 2012; Li et al., 2016). L'administration de *F. nucleatum* aux souris *Apc<sup>Min/+</sup>* entraîne une augmentation du nombre et de la taille des tumeurs, une augmentation des ascites, des diarrhées, une dilatation du tube digestif, une splénomégalie ainsi qu'une survie diminuée. De plus, les tumeurs issues des souris *Apc<sup>Min/+</sup>* infectées par *F. nucleatum* expriment des taux élevés de PCNA (proliferating cell nuclear antigen), un marqueur des cellules en prolifération, comparativement aux souris *Apc<sup>Min/+</sup>* non infectées, indiquant un impact de cette bactérie sur la prolifération cellulaire (Yang et al., 2017). En outre, *F. nucleatum* entraîne, chez les souris *Apc<sup>Min/+</sup>*, une augmentation des niveaux des médiateurs de l'inflammation dans le sérum, ainsi que l'induction de l'expression du microARN 21, qui possède des propriétés oncogéniques (Medina et al., 2010; Yang et al., 2017). Une analyse de l'expression globale des gènes a mis en évidence l'activation de la voie de signalisation TLR4/MYD88 (Myeloid differentiation primary response 88)/NF-κB dans les cellules cancéreuses coliques et une analyse *in vitro* a confirmé que *F. nucleatum* régule l'expression du miR-21 *via* cette voie (Yang et al., 2017) (**figure 24**).

D'autres études utilisant les souris *Apc<sup>Min/+</sup>* ont montré que *F. nucleatum* induit une augmentation du développement tumoral sans induire de colite (Kostic et al., 2013). L'analyse du microenvironnement immunitaire au sein des tumeurs a mis en évidence une augmentation de la proportion des cellules myéloïdes, considérées comme permissives pour le développement tumoral, une augmentation des neutrophiles associés aux tumeurs, connus



**Figure 25 : Rôle pro-carcinogène de *Streptococcus bovis* dans le CCR.**

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

pour jouer un rôle dans la progression tumorale, ainsi qu'une augmentation des macrophages associés aux tumeurs, connus comme étant promoteurs de la carcinogenèse (Kostic et al., 2013).

Il a été montré que le facteur de virulence FadA est capable de se lier à l'E-cadhérine, induisant l'activation de la voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine, ce qui conduit à l'activation des facteurs de transcription tels que le TCF,  $\beta$ -caténine, NF- $\kappa$ B, c-MYC et CYCLINE D1, augmentant ainsi la prolifération des cellules cancéreuses coliques (Rubinstein et al., 2013) (**figure 24**). Ces résultats ont été confirmés dans un modèle de xéno greffe, où il a été montré que l'adhésine FadA est capable d'augmenter la croissance tumorale et d'induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, tout cela médié par l'E-cadhérine (Rubinstein et al., 2013). L'inhibition de FadA dans ce modèle permet de bloquer la prolifération des cellules tumorales (Rubinstein et al., 2013).

Enfin, une étude récente a mis en évidence une prévalence augmentée de *F. nucleatum* au sein de tissus coliques de patients en récurrence du CCR. La récurrence pourrait résulter d'une résistance aux chimiothérapies induite par *F. nucleatum* (Yu et al., 2017). De façon intéressante, *F. nucleatum* entraîne une chimiorésistance via l'inhibition de 2 microARN spécifiques, miR-18a et miR-4802, sous la dépendance de la voie de signalisation TLR4/MYD88, ainsi que l'activation du processus autophagique au sein des cellules cancéreuses (Yu et al., 2017) (**figure 24**). Le processus autophagique peut lui aussi affecter le CCR comme décrit dans la suite de ce manuscrit.

#### III.3.4. *Streptococcus bovis/gallolyticus*

*S. gallolyticus* sous-espèce *gallolyticus*, anciennement nommée *Streptococcus bovis* biotype I, est une bactérie commensale du tube digestif, anaérobie à Gram positif. Une association entre *S. gallolyticus* et le CCR a été évoqué en 1951 suite à l'observation de l'apparition de CCR chez 25 à 80% des patients atteints d'endocardites streptococcales (McCOY and Mason, 1951). En 1977, les souches *S. gallolyticus* ont été isolées à partir des échantillons fécaux chez 35 des 63 patients atteints de CCR comparés à seulement 11 des 105 sujets contrôles, mettant en évidence une prévalence élevée de cette bactérie dans le CCR (Klein et al., 1977). Abdulmir et ses collaborateurs ont mis en évidence un enrichissement de cette bactérie dans les échantillons fécaux et échantillons de muqueuse des patients atteints de CCR comparativement aux échantillons issus de sujets sains (Abdulmir et al., 2010). Depuis, de nombreuses études ont confirmé le lien entre *S. gallolyticus* et le CCR (Andres-Franch et al., 2017; Boleij et al., 2011; Corredoira-Sánchez et al., 2012).

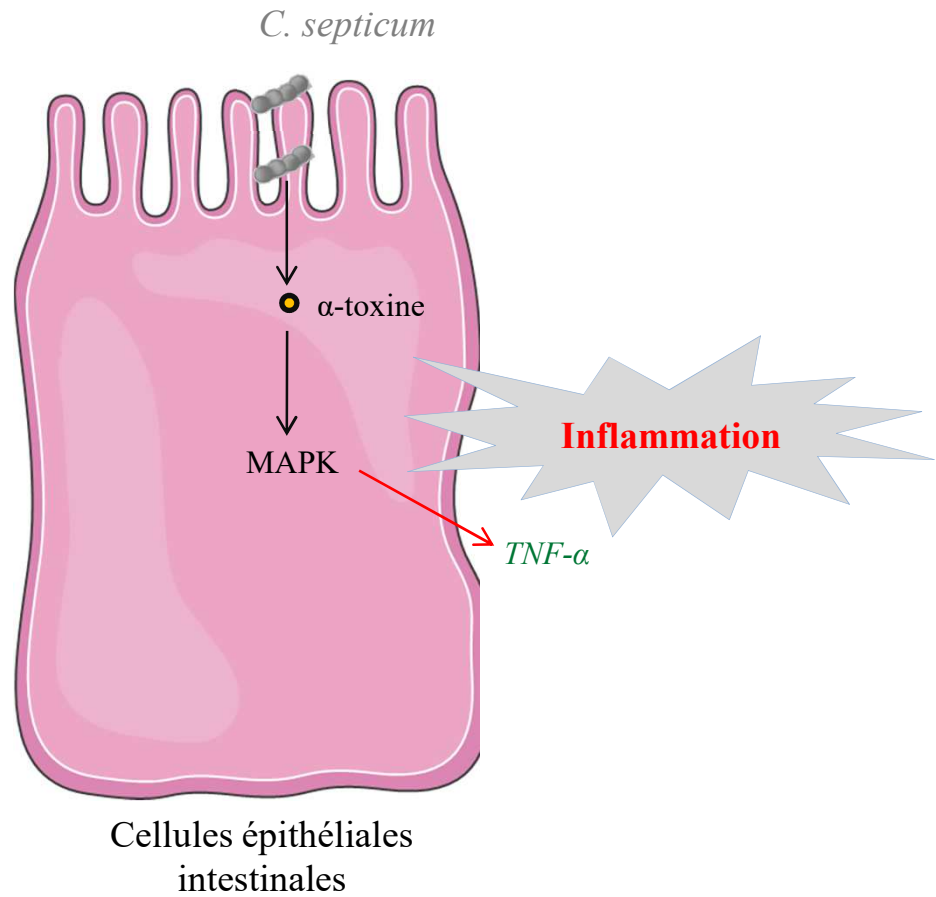
Les études fonctionnelles ont mis en évidence l'implication de *S. gallolyticus* dans de nombreuses modifications cellulaires et moléculaires qui pourraient être liées au développement du CCR. Notamment, une étude a mis en évidence une augmentation des taux d'expression des ARN messagers des médiateurs pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , COX-2 et IL-8) au sein des tissus infectés par *S. gallolyticus* comparativement aux tissus non infectés, mais aussi dans les tissus cancéreux comparativement aux tissus sains, montrant le rôle potentiel de *S. gallolyticus* dans le CCR associé à une colite (**figure 25**) (Abdulmir et al., 2010).

De plus, une étude *in vitro* a montré que l'infection par *S. gallolyticus* augmente l'expression des marqueurs de prolifération cellulaire au niveau de la muqueuse colique des rats traités à l'AOM (Ellmerich et al., 2000). Une autre étude a montré que l'infection des cellules épithéliales intestinales cancéreuses par *S. gallolyticus* entraîne une augmentation de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires, tels qu'IL-8 et COX-2, ainsi que la sécrétion de PGE2 (Biarc et al., 2004). Des expériences utilisant des rats traités à l'AOM ont confirmé la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, entraînant une augmentation du nombre de cryptes aberrantes hyperprolifératives suivant l'infection par *S. gallolyticus*. Trois des six rats traités à l'AOM ont développé des polypes suite à l'infection par *S. gallolyticus* alors que seulement un polype a été détecté chez les animaux traités à l'AOM et non infectés (Biarc et al., 2004).

Récemment, une étude a mis en évidence que le développement tumoral favorise la colonisation du tractus digestif par *S. gallolyticus*. En effet, dans les lésions précoces, l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine entraîne une inhibition du transporteur d'acide biliaire SLC10A2 (solute carrier family 10 member 2) ayant pour conséquence l'accumulation des acides biliaires. Cette accumulation entraîne la sécrétion d'un peptide antimicrobien, la Gallocine, par *S. gallolyticus*, permettant d'éliminer les bactéries commensales environnantes (**figure 25**) (Aymeric et al., 2018). Cette dysbiose locale provoquée par *S. gallolyticus* pourrait contribuer au développement du CCR.

### III.3.5. *Clostridium septicum*

*C. septicum* est un bacille Gram positif aéro-tolérant qui n'est généralement pas présent dans la flore intestinale humaine normale. *C. septicum* produit un facteur de virulence, l' $\alpha$ -toxine, qui est à la fois létal et hémolytique (Ballard et al., 1992). Quelques rares cas de bactériémie ont été attribués à *C. septicum* (1%) avec cependant un haut taux de mortalité (60%) (Kennedy et al., 2005). L'association de *C. septicum* et le CCR a été suggérée et



**Figure 26 : Rôle pro-carcinogène de *Clostridium septicum* dans le CCR.**

L' $\alpha$ -toxine est capable d'induire l'activation de la voie de signalisation de MAPK associée à la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$ , ce qui pourrait entretenir un environnement inflammatoire propice au développement du CCR.

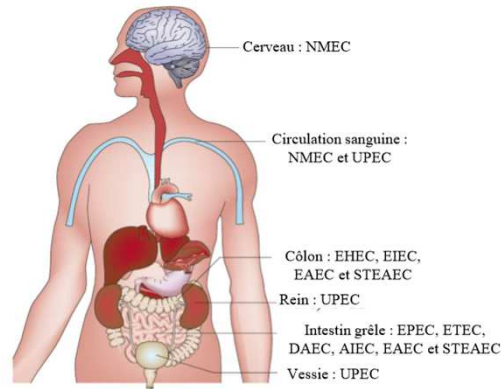


pourrait être expliquée par le fait que la germination des spores de *C. septicum* pourrait être favorisée par l'environnement tumoral acide et hypoxique (Chew and Lubowski, 2001; Corredoira et al., 2017; Mirza et al., 2009).

Cependant, les mécanismes exacts de la contribution de cette bactérie dans le CCR ne sont pas bien connus. En 2015, une étude a montré la capacité de l' $\alpha$ -toxine à induire l'activation de la voie de signalisation MAPK qui a été montrée dérégulée dans de nombreuses maladies, y compris les cancers. Cette activation est associée à la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  (Chakravorty et al., 2015), ce qui pourrait entretenir un environnement inflammatoire propice au développement du cancer (**figure 26**). Malgré ces études, le lien entre *C. septicum* et le CCR n'a à ce jour pas été établi.

### III.3.6. *Escherichia coli*

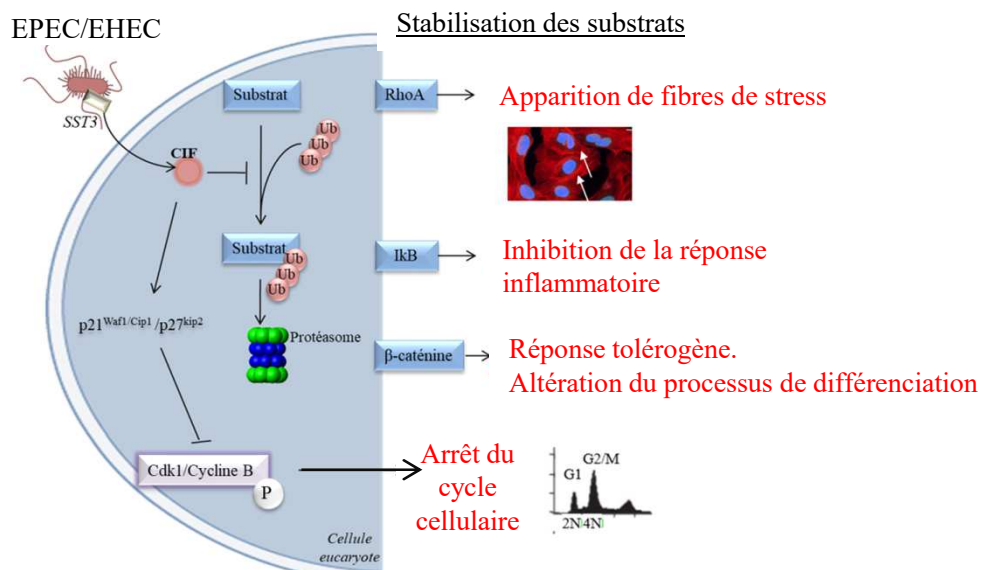
*E. coli* est une bactérie commensale à Gram négatif colonisant le tube digestif humain des nouveau-nés dès les premières heures après la naissance. Cette bactérie entretient une relation de symbiose avec son hôte et colonise de façon asymptomatique. Cependant, certaines souches d'*E. coli* ont acquis des propriétés pathogéniques qui leur permettent de coloniser le tube digestif et de favoriser la survenue de pathologies intra- et extra-intestinales (Clements et al., 2012). Les *E. coli* pathogènes peuvent ainsi être séparés en deux grands groupes en se basant sur le profil d'infection dont ils sont à l'origine : (i) les souches d'*E. coli* à l'origine de pathologies extra-intestinales sont regroupées sous le terme d'ExPEC (extra-intestinal pathogenic *E. coli*) et incluent les *E. coli* uropathogènes (UPEC, uropathogenic *E. coli*) responsables d'infections du tractus urinaire et les *E. coli* associés à des méningites néonatales (NMEC, neonatal meningitis *E. coli*) et (ii) le groupe des *E. coli* pathogènes induisant des pathologies intra-intestinales (InPEC, intestinal pathogenic *E. coli*) peut être divisé en 8 groupes selon leur profil pathogénique : les *E. coli* entéropathogènes (EPEC, enteropathogenic *E. coli*), les *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC, enterohemorrhagic *E. coli*), les *E. coli* entéro-invasifs (EIEC, enteroinvasive *E. coli*), les *E. coli* entéro-aggrégatifs (EAEC, enteroaggregative *E. coli*), les *E. coli* entéro-toxigéniques (ETEC, enterotoxigenic *E. coli*), les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC, diffusely-adherent *E. coli*), les *E. coli* adhérents et invasifs (AIEC, adherent-invasive *E. coli*) et les *E. coli* entéro-aggrégatifs producteurs de la Shiga toxine (STEAEC, Shiga-toxin-producing enteroaggregative *E. coli*) (**figure 27**) (Sousa, 2006).



**Figure 27 : Tropisme des différents pathovars d'*Escherichia coli*.**

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

(Modifiée d'après Croxen and Finlay, 2010)



**Figure 28 : Mécanismes d'action de la cyclomoduline « Cell cycle inhibiting factor » ou CIF.**

Après l'injection de CIF par le SST3, la toxine inhibe la voie ubiquitine/protéasome. L'accumulation des substrats non dégradés conduit à la formation progressive de fibres de stress, d'adhérences focales et un élargissement cellulaire ayant pour conséquence une altération de la prolifération cellulaire avec l'absence complète de la mitose. CIF a, par ailleurs, la capacité de moduler le système immunitaire en faveur d'une réponse tolérologène qui pourrait faciliter la dissémination du pathogène. De plus, l'injection de la toxine au sein de la cellule entraîne l'inhibition de la phosphorylation du complexe CDK 1 (pour cyclin dependent kinase 1)-Cycline B, entraînant le blocage du cycle cellulaire en phase G1/S ou G2/M selon le stade du cycle au moment de l'infection ainsi qu'une accumulation de deux inhibiteurs des CDK, p21<sup>Waf1/Cip1</sup> and p27<sup>kip2</sup>

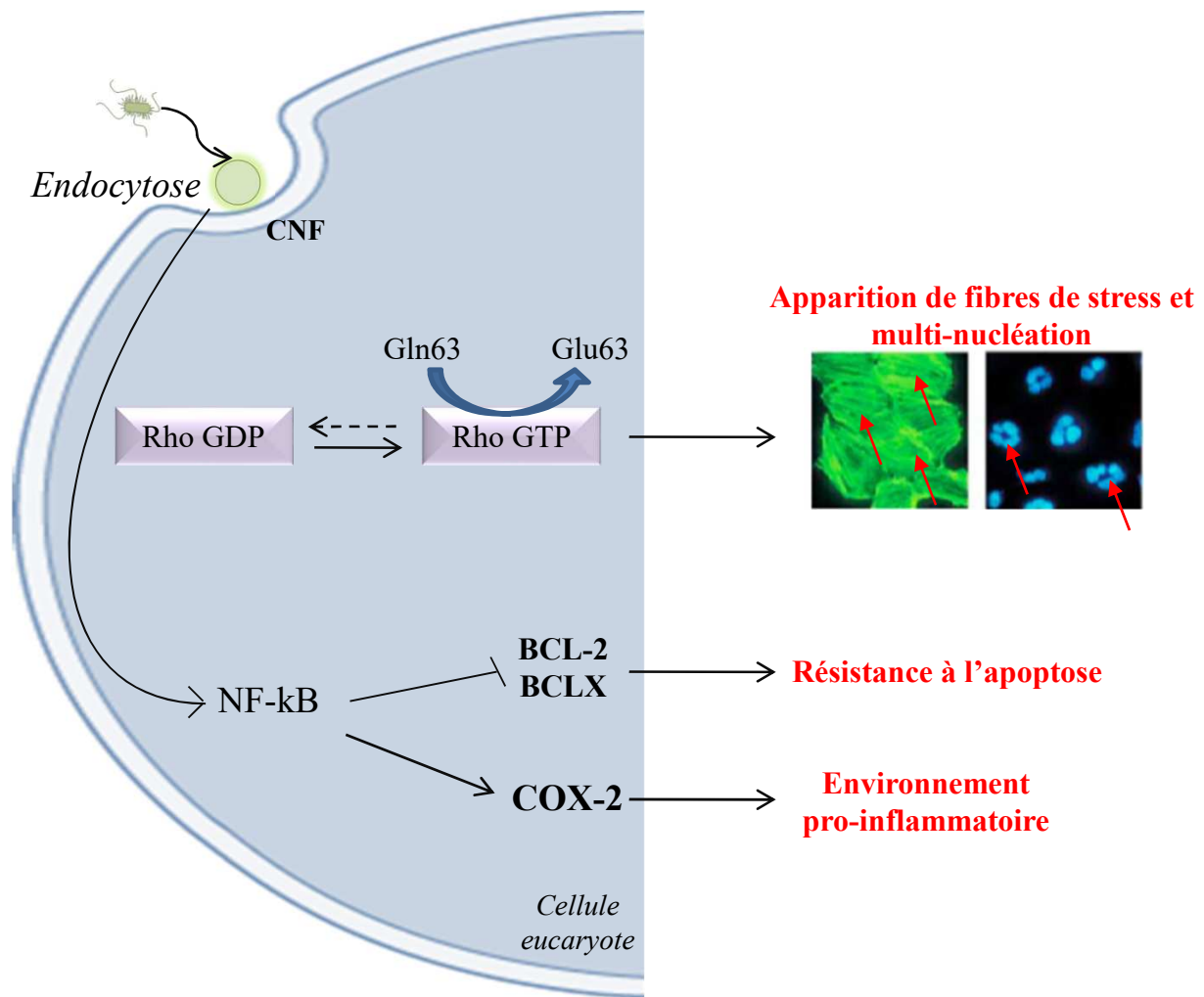
Les souches d'*E. coli* sont divisées en 5 groupes phylogénétiques principaux selon leurs polymorphismes électrophorétiques d'enzymes métaboliques : A, B1, B2, D et E. Les souches commensales appartiennent dans la plupart des cas aux groupes A et B1, alors que les souches pathogènes appartiennent le plus souvent aux groupes B2 et D (Escobar-Páramo et al., 2004). Certaines souches appartenant aux groupes B2 et D sont associées aux MICI, qui sont elles-mêmes un facteur de risque du CCR (Darfeuille-Michaud et al., 1998, 2004).

Plusieurs études indépendantes ont mis en évidence que les muqueuses et tumeurs des patients atteints de CCR sont anormalement colonisées par des souches d'*E. coli* de type B2 (Arthur et al., 2012; Buc et al., 2013; Maddocks et al., 2009; Martin et al., 2004; Prorok-Hamon et al., 2014; Swidsinski et al., 1998). Une augmentation du nombre d'*E. coli* associés aux tumeurs et internalisés dans les tumeurs a été mise en évidence chez les patients atteints de CCR comparativement au nombre d'*E. coli* associés à la muqueuse saine chez les mêmes patients ou chez les patients contrôles (Bonnet et al., 2014).

De manière intéressante, une forte prévalence de souches d'*E. coli* productrices de génotoxines, cyclomodulines au sein des biopsies des patients atteints de CCR a été montré. De plus, la prévalence de ces souches est augmentée dans les stades avancés du CCR (stade TNM III/IV) comparés au stade précoce (stade TNM I), suggérant que leur détection peut être utilisée comme un facteur de pronostic (Bonnet et al., 2014). Quatre génotoxines produites par les *E. coli* ont été intensément étudiées, notamment pour leurs propriétés carcinogéniques ; la CIF, la CNF, la CDT et la Colibactine.

#### III.3.6.1. Cell cycle-inhibiting factor

La toxine inhibitrice du cycle cellulaire, CIF, est présente chez moins de 2% des *E. coli* et produite essentiellement par deux pathovars des *E. coli* : les EPEC et les EHEC. Le gène codant cette toxine est porté par un prophage lambdaïde (Taieb et al., 2011). La toxine CIF est composée de deux domaines distincts : un domaine N-terminal qui porte un peptide d'adressage au système de sécrétion de type III (SSTIII), qui lui permet d'être injectée dans la cellule, et un domaine C-terminal qui porte l'activité enzymatique de la toxine. Cette toxine a été mise en évidence pour la première fois en 1997 pour son activité cytopathique sur des cellules Hela infectées avec une souche d'EPEC (De Rycke et al., 1997). Ces effets cytopathiques sont caractérisés par la formation progressive de fibres de stress, d'adhérences focales et un élargissement cellulaire ayant pour conséquence une altération de la prolifération cellulaire avec l'absence complète de mitose (Taieb et al., 2011) (**figure 28**).



**Figure 29 : Mécanismes d'action de la cyclomoduline « Cytotoxic necrotizing factor » ou CNF.**

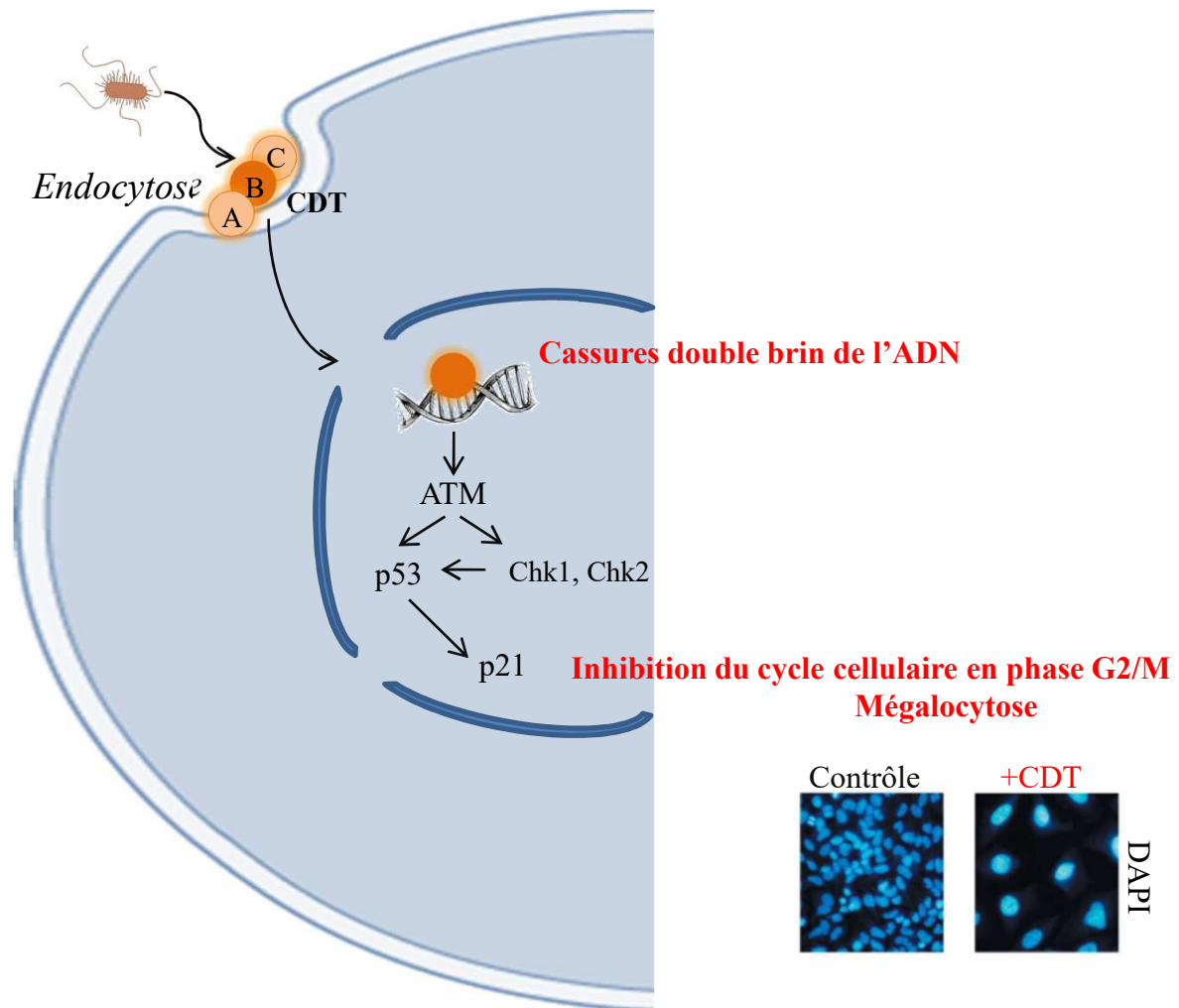
Après leur endocytose, les CNF exercent une activité transglutaminase et catalysent la désamination des protéines de la famille Rho GTPase sur la glutamine en position 63. Le blocage de l'hydrolyse de GTP entraîne l'activation des GTPases de façon constitutive et contribue à la progression du cycle cellulaire en interagissant avec des effecteurs protéiques spécifiques. Ainsi, la CNF favorise la transition G1/S en affectant la production de la cycline D1, et des inhibiteurs des cyclines, p21<sup>Waf1/Cip1</sup> et p27<sup>kip2</sup>. De plus, CNF entraîne un contournement du point de contrôle en phase G1, induit des altérations au niveau du fuseau mitotique et de la ségrégation des chromosomes et peut ainsi générer des aberrations chromosomiques telles que des aneuploïdies ou des endo-réplifications de l'ADN pouvant conduire à la transformation cellulaire. Les CNF ont des propriétés anti-apoptotiques par leur capacité à activer la voie NF-κB, ayant pour conséquence une surexpression des protéines pro-apoptotiques BCL-2 et BCL-XL. L'activation de la voie de signalisation NF-κB active, par ailleurs, le médiateur pro-inflammatoire COX-2.

Après l'injection de CIF par le SSTIII, la toxine inactive l'enzyme E2 du système d'ubiquitination, en désaminant la glutamine située en position 40, ayant pour conséquence l'inhibition de la voie ubiquitine/protéasome. L'injection de la toxine au sein de la cellule entraîne l'inhibition de la phosphorylation du complexe Cdk1-Cycline B, entraînant le blocage du cycle cellulaire en phase G1/S ou G2/M selon le stade du cycle au moment de l'infection ainsi qu'une accumulation de deux inhibiteurs des Cdk,  $p21^{Waf1/Cip1}$  and  $p27^{kip2}$  (Taieb et al., 2011). Enfin, certaines études ont mis en évidence la capacité de CIF à moduler le système immunitaire en faveur d'une réponse tolérante qui pourrait faciliter la dissémination du pathogène (Taieb et al., 2011) (**figure 28**).

La CIF est aussi produite par d'autres espèces bactériennes telles que les *Burkholderia pseudomallei*, *Photobacterium luminescens*, *Photobacterium asymbiotica* et *Yersinia pseudotuberculosis*.

#### III.3.6.2. Cytotoxic necrotizing factor

La CNF est une cyclomoduline sécrétée par certaines souches d'*E. coli* uropathogènes et entéro-pathogènes. Contrairement à la CIF, la CNF stimule l'avancée du cycle cellulaire. Cette toxine est détectée dans 39,5% des biopsies de patients atteints de CCR contre seulement 12,9% de patients contrôles (Bronowski et al., 2008; Buc et al., 2013). Il existe 3 variants de cette toxine chez les *E. coli* : CNF1, 2 et 3. CNF1 et CNF3 sont codées par des gènes chromosomiques, alors que CNF2 est codée par un gène plasmidique (Knust and Schmidt, 2011). Les toxines de la famille CNF sont des protéines d'environ 115 kDa organisées en trois domaines fonctionnels distincts. L'extrémité N-terminale contient un domaine de liaison au récepteur cellulaire laminine, le domaine central assure la translocation du domaine C-terminal dans le cytoplasme et enfin l'extrémité C-terminale contient le domaine enzymatique responsable de l'activité génotoxique. Après leur endocytose, les CNF exercent leur activité transglutaminase et catalysent la désamination des protéines de la famille Rho GTPase (Rho, Rac et Cdc42) sur la glutamine en position 63 (Boquet, 2001; Nougayrède et al., 2005). Le blocage de l'hydrolyse de GTP entraîne l'activation des GTPases de façon constitutive et contribue à la progression du cycle cellulaire en interagissant avec des effecteurs protéiques spécifiques (Nougayrède et al., 2005; Oswald et al., 2005). Ainsi, la CNF favorise la transition G1/S en affectant la production de la Cycline D1, et des inhibiteurs des Cyclines,  $p21^{Waf1/Cip1}$  et  $p27^{kip2}$  (Oswald et al., 2005). De plus, CNF entraîne un contournement du point de contrôle en phase G1, induisant des altérations au niveau du



**Figure 30 : Mécanismes d'action de la cyclomoduline « Cytotoxic distending toxin » ou CDT.**

La sous-unité CDT-B de la CDT est internalisée par endocytose et transportée vers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique puis transloquée dans le noyau. Elle provoque des cassures doubles brins de l'ADN, et un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M. Une exposition chronique des cellules à la CDT induit des aberrations chromosomiques ayant pour conséquence une augmentation de la fréquence des mutations.

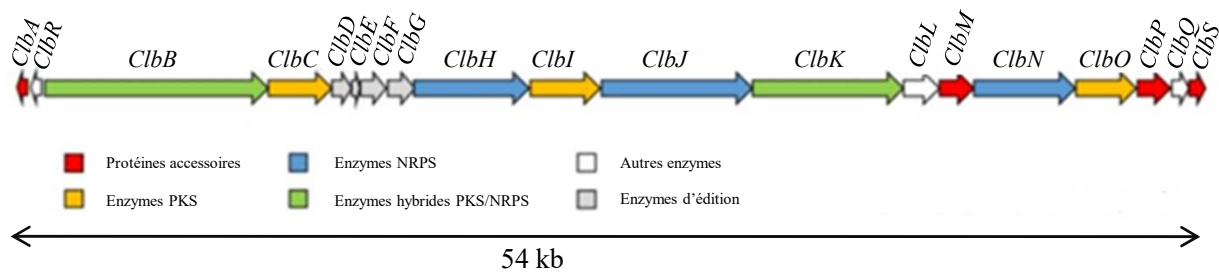
fuseau mitotique et de la ségrégation des chromosomes et peut ainsi générer des aberrations chromosomiques telles que des aneuploïdies ou des endo-réplifications de l'ADN. Ces derniers peuvent conduire à la transformation cellulaire (**figure 29**).

Enfin, les CNF ont des propriétés anti-apoptotiques par leur capacité à activer la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, acteur clé de la carcinogenèse colorectale, ayant pour conséquence une surexpression des protéines anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-XL (Miraglia et al., 2007). L'activation de la voie NF- $\kappa$ B active, par ailleurs, le médiateur pro-inflammatoire COX-2, un acteur de la carcinogenèse colorectale (**figure 29**). De par l'activation de ces facteurs, CNF semble introduire et maintenir un environnement pro-inflammatoire favorable au développement du CCR.

### III.3.6.3. Cytolethal distending toxin

La toxine CDT a été identifiée en 1988 à partir de souches d'*E. coli* isolées de patients diarrhéiques. La prévalence des *E. coli* producteurs de cette toxine est augmentée dans le CCR puisqu'ils ont été isolés chez 12,5% de patients atteints de CCR *versus* 0% des patients contrôles (Raisch et al., 2014). La CDT est retrouvée chez plusieurs espèces Gram négatives et est composée de trois sous unités distinctes codées par un opéron, CDT-A, CDT-B et CDT-C (Jinadasa et al., 2011). Les sous-unités A et C sont impliquées dans la liaison à la membrane plasmique de la cellule cible, alors que la sous-unité B porte une activité enzymatique comparable à celle de la DNase (Haghjoo and Galán, 2004). La sous-unité CDT-B est internalisée par endocytose et transportée vers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique puis transloquée dans le noyau (**figure 30**). Elle provoque des cassures double brin de l'ADN, et un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M (Comayras et al., 1997; Fedor et al., 2013; Frisan et al., 2003). Une exposition plus chronique des cellules à la CDT induit des aberrations chromosomiques, ayant pour conséquence une augmentation de la fréquence des mutations, soulignant le potentiel génotoxique de la CDT, favorable à la transformation cellulaire (Bezine et al., 2014; Guidi et al., 2013).

La CDT est également produite par de nombreuses espèces bactériennes dont les *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella* Typhimurium, et *Helicobacter hepaticus*.



**Figure 31 : Organisation de l'îlot génomique *pks*.**

L'îlot *pks* est un ensemble de 23 gènes codant essentiellement des enzymes et répartis sur 54kb. *NRPS*: Non ribosomal Peptide Synthase; *PKS*: polyketide synthase ; *PKS-NRPS*: hybride polyketide synthase-non ribosomal peptide synthase; *Clb*: Colibactine  
(Modifiée d'après Fais et al., 2018)

Protéines	Rôle dans la production de la colibactine
<b>ClbA</b>	Protéine accessoire : Phosphopantetheinyl transférase (active d'autres enzymes) Favorise le recrutement de cofacteur
<b>ClbR</b>	Probable protéine régulatrice
<b>ClbB</b>	Enzyme de synthèse: hybride NRPS-PKS
<b>ClbC</b>	Enzyme de synthèse : PKS
<b>ClbD</b>	Enzyme de synthèse : hydroxyl acyl coA déshydrogenase
<b>ClbE</b>	Enzyme de synthèse : Protéine porteuse d'acyle
<b>ClbF</b>	Enzyme de synthèse : $\alpha\beta$ déshydrogenase
<b>ClbG</b>	Enzyme de synthèse : Acyle transférase
<b>ClbH</b>	Enzyme de synthèse : NRPS
<b>ClbI</b>	Enzyme de synthèse : PKS
<b>ClbJ</b>	Enzyme de synthèse : NRPS
<b>ClbK</b>	Enzyme de synthèse : hybride PKS-NRPS
<b>ClbL</b>	Enzyme de synthèse : Amidase
<b>ClbM</b>	Protéine accessoire : transporteur MATE. Transporte la pré-colibactine au travers de la membrane plasmique
<b>ClbN</b>	Enzyme de synthèse : NRPS
<b>ClbO</b>	Enzyme de synthèse : PKS
<b>ClbP</b>	Protéine accessoire : peptidase fntA. Transporte la pré-colibactine du cytoplasme au périplasme et clive la pré-colibactine en colibactine active génotoxique
<b>ClbQ</b>	Enzyme de synthèse : Thioestérase
<b>ClbS</b>	Protéine accessoire : Inactive la colibactine afin de protéger la cellule bactérienne

**Tableau 1 : Les enzymes impliquées dans la biosynthèse de la colibactine.**

Récapitulatif du nom des enzymes de l'îlot *pks* et leur implication dans la biosynthèse de la colibactine.  
(Modifiée d'après Fais et al., 2018)



#### III.3.6.4. Colibactine

La colibactine est une toxine décrite en 2006 par Nougayrède *et al.*, dont la synthèse est sous le contrôle de l'îlot génomique *pks* (polyketide-synthase) (Nougayrède *et al.*, 2006). Une forte prévalence des *E. coli* producteurs de la colibactine est associée au CCR (Arthur *et al.*, 2012; Buc *et al.*, 2013). En effet, les données épidémiologiques montrent que les *E. coli* producteurs de la colibactine sont plus fréquemment trouvés dans les tumeurs de patients atteints de CCR (50-65%) que dans les biopsies de patients atteints de la maladie de Crohn (40%) ou ceux ne souffrant pas de MICI ni de cancer (20,8%) (Arthur *et al.*, 2012; Buc *et al.*, 2013). De plus, une étude clinique sur 88 patients atteints de CCR sporadique a montré que les *E. coli* producteurs de la colibactine sont préférentiellement retrouvés chez les patients atteints de CCR de type MSS par rapport aux patients atteints de CCR de type MSI (Gagnière *et al.*, 2017). Cependant, il a été noté une augmentation significative du nombre de bactéries *E. coli* productrices de colibactine dans les muqueuses coliques des patients atteints de CCR de type MSI (Gagnière *et al.*, 2017), suggérant que l'implication de ce pathogène dans le CCR pourrait dépendre du phénotype.

##### III.3.6.4.1. Biosynthèse de la colibactine : l'îlot *pks*

La colibactine est un composé hybride polykétide/peptide non ribosomal produit par une machinerie de biosynthèse complexe codée par un îlot pathogène de 54 kb, nommé l'îlot *pks* et qui est composé de 23 gènes (*clbA* à *clbS*) (Nougayrède *et al.*, 2006) (**figure 31, tableau 1**). Si la structure complète de la colibactine est encore mal décrite, plusieurs études ont identifié des intermédiaires de biosynthèse (Bian *et al.*, 2013, 2015; Brotherton and Balskus, 2013; Brotherton *et al.*, 2015; Vizcaino and Crawford, 2015; Vizcaino *et al.*, 2014; Zha *et al.*, 2016). Ainsi, le terme « colibactine » regrouperait en réalité plusieurs molécules.

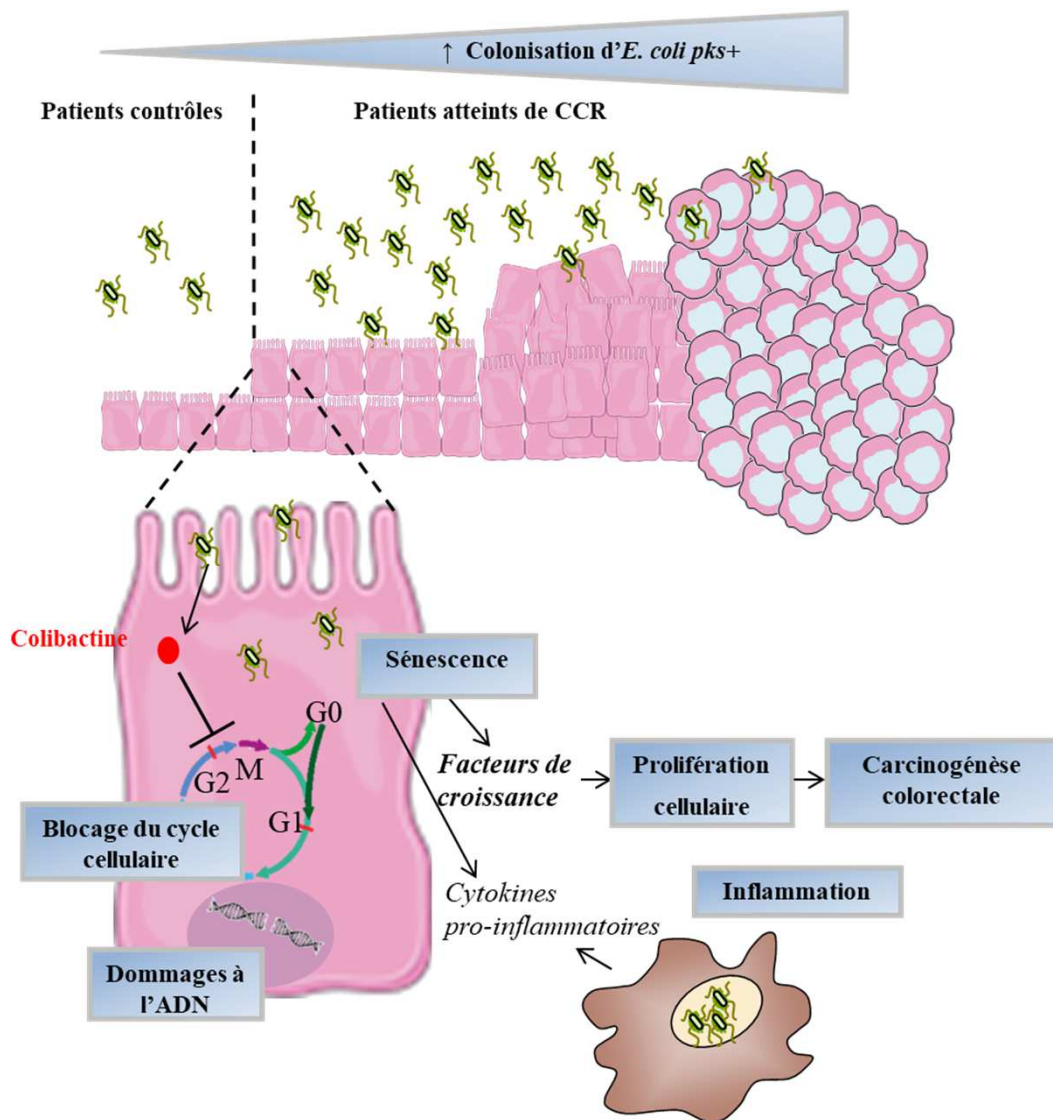
En premier lieu, la biosynthèse de la colibactine nécessite l'activation des mégasynthèses PKS/NRPS (non ribosomal peptides) par la phosphopantetheinyl transférase ClbA. Une fois activées, les mégasynthèses recrutent leurs monomères spécifiques. La première enzyme intervenant dans la synthèse est la ClbN, dont le substrat est l'asparagine (Asn). L'assemblage se poursuit ensuite avec l'intervention successive des enzymes ClbB-C-H-I-J-K qui utilisent divers substrats, conventionnels (malonyl-CoA, alanine, sérine, glycine, cystéine) ou non (acide aminocyclopropane-carboxylique), synthétisant la toxine sous forme de pré-colibactine. La pré-colibactine inactive est exportée au niveau du périplasme via ClbM

(Mousa et al., 2016). ClbM est une pompe à efflux insérée dans la membrane interne. Il semble que d'autres pompes à efflux complètent partiellement l'absence de ClbM (Mousa et al., 2016). La pré-colibactine est ensuite hydrolysée, entraînant la séparation du produit de clivage, ou N-myristoyl-D-asparagine et de la colibactine active. Cette réaction est effectuée par ClbP, une protéine ancrée à la membrane interne et qui possède une activité D-amino-peptidase. Cette stratégie de pré-colibactine inactive pourrait être un mécanisme de protection de la bactérie qui produit ces composés génotoxiques. La mutation de ClbP inhibe les effets génotoxiques de la colibactine. En 2016 a été identifié un second mécanisme de protection, la protéine ClbS, qui protégerait la bactérie productrice de la colibactine, par séquestration ou modification des molécules de colibactine présentes dans le cytoplasme (Bossuet-Greif et al., 2016).

#### III.3.6.4.2. Régulation de la synthèse de la colibactine

Plusieurs paramètres peuvent modifier la synthèse de la colibactine. *In vitro*, les conditions de culture bactérienne sont importantes puisque la culture sous agitation augmente la transcription des gènes *ClbA, B, C, D, E, F, G* et *H* (Homburg et al., 2007). La composition du milieu de culture joue aussi un rôle important puisqu'un milieu appauvri en fer induit une augmentation de la transcription du gène *ClbA* (Tronnet et al., 2016, 2017). Enfin, la protéine chaperonne de choc thermique d'*E. coli* Hsp90Ec (Heat shock protein 90 from *E*scheria *c*oli) est indispensable à la production de la colibactine (Garcie et al., 2016). Bien que son action soit mal comprise, les auteurs ont émis l'hypothèse que Hsp90Ec peut favoriser le repliement et la stabilité des différentes protéines Clb (Garcie et al., 2016).

*In vivo*, peu d'études ont analysé les taux de synthèse de la colibactine. Seules quelques études utilisant des souches d'*E. coli* isolées de cas d'infections urinaires et porteuses de l'îlot *pks* ont montré une augmentation de l'expression de l'îlot *pks* lorsque l'urine est utilisée comme milieu de culture (Hancock et al., 2008). En 2014, Arthur et collaborateurs ont montré que l'expression de 5 gènes de l'îlot *pks* (*ClbG, H, L, M, et S*) est augmentée au cours du développement tumoral de façon dépendante de l'inflammation (Arthur et al., 2014), suggérant que les variations du microenvironnement au cours du développement du CCR peuvent influencer la synthèse de la colibactine. Une étude récente a mis en évidence que la synthèse de la colibactine est modulée en présence du DON (deoxynivalenol), une mycotoxine produite par différents contaminants fongiques du genre *Fusarium*. Le DON seul n'a pas d'effet ni sur la croissance bactérienne, ni sur la composition du microbiote ou encore sur l'expression des gènes *Clb*. Cependant, le DON potentialise les



**Figure 32 : Mécanismes d'action de la colibactine.**

Les patients atteints de CCR présentent une colonisation anormale par des *E. coli pks+* capables d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales, de se multiplier en macrophages et d'induire une réponse pro-inflammatoire. Les *E. coli pks+* induisent également des dommages à l'ADN, un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et une entrée en sénescence des cellules infectées. Ces dernières vont acquérir un phénotype sécrétoire associé à la sénescence, qui s'accompagne de la production de facteurs de croissance ayant pour conséquence d'augmenter la prolifération des cellules non infectées ainsi que la carcinogénèse colorectale dans des modèles murins de CCR.

effets génotoxiques de la colibactine *in vitro* et *in vivo* (Payros et al., 2017). Cette étude montre que les facteurs environnementaux peuvent jouer un rôle important dans la production et la toxicité de la colibactine.

#### III.3.6.4.3. Impacts cellulaires de la colibactine

De nombreuses études ont analysé l'impact de la colibactine *in vitro* et *in vivo* et mis en évidence plusieurs effets pro-tumoraux et pro-inflammatoires de cette dernière (**figure 32**). Ces effets nécessitent l'infection par des *E. coli* portant l'îlot *pks* vivants et un contact entre les bactéries et les cellules (Nougayrède et al., 2006; Reuter et al., 2018).

##### III.3.6.4.3.1. Colibactine et activité génotoxique

Plusieurs études *in vitro* ont mis en évidence la capacité des souches d'*E. coli* productrices de la colibactine à induire des cassures double brin de l'ADN accompagnées par l'activation des systèmes de réparation de l'ADN médiée par la voie ATM. Cette activation est caractérisée par la phosphorylation d'ATM et l'apparition d'histones H2AX phosphorylés en position S139 (Bossuet-Greif et al., 2018; Nougayrède et al., 2006). La phosphorylation d'ATM induit l'activation d'une cascade de phosphorylation passant par les protéines Chk2 et Cdc25c (Cycline-dependent kinase phosphatase C). La phosphatase Cdc25c phosphorylée est alors séquestrée au niveau du cytoplasme entraînant un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M. L'analyse cytogénétique a révélé des signes de réparation des dommages incomplètes marqués par la présence d'aberrations chromosomiques importantes (chromosomes en anneaux, chromosomes dicentriques, cassures de chromatides, ...) pouvant entraîner une augmentation des mutations (Cuevas-Ramos et al., 2010). De manière intéressante, une étude réalisée au laboratoire a montré que l'infection des cellules épithéliales intestinales humaines T84 par les souches d'*E. coli* productrices de colibactine entraîne l'inhibition de l'expression de la protéine de réparation des dommages à l'ADN, MLH1 (Gagnière et al., 2017).

En 2015, des chercheurs chimistes ont purifié un composé « pré-colibactine » capable d'alkyler l'ADN et d'induire des liens inter-brin (Vizcaino and Crawford, 2015). Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que les cassures double brin de l'ADN observées lors de l'infection pourraient ne pas être induits directement par la colibactine mais seraient la conséquence d'une réponse des cellules infectées afin de réparer leur ADN. Plus récemment, une étude a mis en évidence la présence de liaisons croisées (ou crosslink) sur l'ADN des cellules infectées par des souches bactériennes productrices de colibactine telles que des souches

d'*Enterobacteriaceae* porteuses de l'îlot *pks*, des souches cliniques d'*E. coli*, *Citrobacter koseri*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Enterobacter aerogenes* (Bossuet-Greif et al., 2018).

#### III.3.6.4.3.2. Colibactine et activité pro-inflammatoire

En utilisant les macrophages, cellules majoritaires de l'infiltrat tumoral immunitaire, Raisch et collaborateurs ont montré que les souches d'*E. coli* productrices de la colibactine sont capables de survivre et de se multiplier au sein des macrophages contrairement aux souches d'*E. coli* commensales qui sont rapidement éliminées après l'infection (Raisch et al., 2014). Ces souches entraînent notamment la production du facteur pro-inflammatoire COX-2 indépendamment de la présence de l'îlot *pks* (Raisch et al., 2014). L'expression de la protéine COX-2 est, par ailleurs, retrouvée augmentée dans les tissus cancéreux des patients atteints de CCR et associée à un mauvais pronostic (Wang and DuBois, 2010) ainsi que la surexpression de PGE-2, un acteur majeur qui orchestre la réponse pro-tumorale des macrophages. Il a été montré chez les souris génétiquement modifiées (souris transgéniques CEABAC10 exprimant les CEACAM (carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule) humains que la souche d'*E. coli*, 11G5, productrice de la colibactine, colonise le tube digestif et entraîne la mise en place d'une inflammation colique (Raisch et al., 2014). De manière intéressante, les souches d'*E. coli* productrices de colibactine semblent avoir besoin de l'inflammation pour exercer leur pouvoir carcinogène. En effet, la mono-colonisation d'une souche d'*E. coli* productrice de colibactine dans un modèle murin de CCR (souris *il10*<sup>-/-</sup> traitées à l'AOM) entraîne une augmentation du développement tumoral. Cependant, des souris sauvages traitées à l'AOM et mono-colonisées avec la souche pathogène productrice de colibactine ne développent pas d'inflammation colique ni de dysplasie et/ou tumeurs, soulignant l'importance de l'inflammation dans le pouvoir carcinogène des souches productrices de colibactine (Arthur et al., 2012). Ces études montrent que l'infection par les souches d'*E. coli* pathogènes induit la mise en place d'une inflammation indépendamment de la présence de l'îlot *pks*. Cette inflammation est requise afin que les souches d'*E. coli* productrices de colibactine exercent leurs effets pro-tumoraux.

#### III.3.6.4.3.3. Colibactine, sénescence et prolifération cellulaire

Plusieurs études indépendantes ont montré que la colibactine induit la sénescence des cellules infectées (Cougnoux et al., 2014; Secher et al., 2013). La sénescence cellulaire est caractérisée par un arrêt irréversible du cycle cellulaire associé à des changements morphologiques et physiologiques importants. Suite à l'infection par les souches productrices

de la colibactine, les cellules en sénescence présentent des mégalytoses (*i.e.*, taille anormalement grande des cellules), une activité  $\beta$ -galactosidase lysosomale à pH 6, une accumulation des protéines p53 et p21 impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire, ainsi qu'une diminution de la peptidase SENP1 (Sentrin-specific protease 1) (Cougnoux et al., 2014) (**figure 32**).

Dans le cancer, la sénescence peut avoir un rôle anti- ou pro-tumoral selon le contexte (Rao and Jackson, 2016). Dans le cas de la sénescence induite par la colibactine, le ratio entre le nombre de bactéries et le nombre de cellules cancéreuses joue un rôle majeur. Il a été proposé que si le ratio bactéries/cellules est élevé, les bactéries pourraient avoir une activité anti-tumorale en induisant la sénescence de la majorité des cellules cancéreuses grâce au blocage du cycle cellulaire. En revanche, si ce ratio est faible et que les bactéries n'induisent la sénescence que d'un nombre limité de cellules cancéreuses, les bactéries pourraient avoir une activité paracrine pro-tumorale grâce au phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP, senescence-associated secretory phenotype). Le SASP est caractérisé par la sécrétion par les cellules sénescents d'un grand nombre de médiateurs pro-inflammatoires, tels que les cytokines et chimiokines IL-6 et IL-8, et de facteurs de croissance, tels que l'HGF (hepatocyte growth factor), le FGF (fibroblast growth factor), GM-CSF (granulocyte macrophages colony stimulating factor), BMP4 (bone morphogenetic protein 4) et VEGF (Cougnoux et al., 2014; Dalmaso et al., 2014). Parmi ces facteurs de croissance, seul le FGF, le GM-CSF et le HGF sont augmentés *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de xénogreffe suite à l'infection par la souche d'*E. coli* 11G5 productrice de la colibactine. L'HGF sécrété par les cellules infectées et sénescents stimule la prolifération des cellules adjacentes non infectées, favorisant le développement du CCR (Cougnoux et al., 2014) (**figure 32**). De manière intéressante, les biopsies de patients atteints de CCR et colonisées par des *E. coli* producteurs de colibactine présentent une augmentation de niveaux du marqueur des dommages à l'ADN,  $\gamma$ H2AX, et des marqueurs de la sénescence, de l'expression de l'ARN messager *HGF* ainsi que de l'activité du récepteur à l'HGF comparativement aux biopsies des patients colonisés par des souches d'*E. coli* ne possédant pas l'îlot *pks* (Cougnoux et al., 2014). Une autre étude menée au laboratoire a mis en évidence la capacité de la souche d'*E. coli* productrice de la colibactine, 11G5, à augmenter la prolifération cellulaire dans un modèle murin génétiquement modifié, les souris transgéniques CEABAC10 (Raisch et al., 2014).

#### III.3.6.4.3.4. Colibactine et carcinogène colorectale

Dans des modèles murins de CCR génétiquement modifiés (souris *il10<sup>-/-</sup>* traitées à l'AOM ou souris *Apc<sup>Min/+</sup>*) ou induits chimiquement (souris traitées à l'AOM/DSS), l'infection par des *E. coli* producteurs de colibactine induit une accélération du développement tumoral, comparativement aux conditions non infectées ou infectées par un mutant de ces souches ne produisant pas de colibactine (Arthur et al., 2012; Bonnet et al., 2014; Cougnoux et al., 2014). Dans ces modèles, l'administration d'un anticorps dirigé contre le facteur de croissance HGF abolit l'augmentation de la sénescence et de la prolifération cellulaire ainsi que l'augmentation de la carcinogène colorectale induites par des *E. coli* producteurs de colibactine (Cougnoux et al., 2014). Ceci démontre que le SASP est responsable de la carcinogène colorectale induite par ces derniers.

### **III.4. Stratégies diagnostiques et thérapeutiques utilisant le microbiote intestinal**

#### III.4.1. Les marqueurs microbiens : détection et pronostic du CCR

A l'heure actuelle, les marqueurs de pronostic du CCR présentent quelques limites. Par conséquent, il est nécessaire de développer d'autres outils efficaces de dépistage et de pronostic non invasifs pour remplacer ou compléter ceux actuellement utilisés, dans le but d'optimiser les stratégies de traitement, de prédire la réponse aux traitements et de réduire la mortalité due au CCR. L'étude du microbiote intestinal fournit de nouvelles pistes pour identifier de puissants bio-marqueurs.

De nombreuses études ont mis en évidence une diminution du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* chez les patients atteints de CCR, ce qui pourrait constituer un marqueur important de la dysbiose au sein des lésions précancéreuses. De plus, comme décrit précédemment, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis*, et *Escherichia coli* producteurs de colibactine sont associés à des stades TNM tardifs du CCR (Villéger et al., 2018). La détection de ces bactéries dans les tissus réséqués ou dans les fèces pourrait constituer un nouveau facteur de pronostic du CCR. Notamment, une étude a montré que la détection de *F. nucleatum*, *B. fragilis* et *Faecalibacterium prausnitzii* pourrait constituer un bio-marqueurs de pronostic du CCR (Wei et al., 2016). Une autre étude a montré que la quantification de *F. nucleatum* dans les fèces permet d'augmenter la performance de diagnostic du test immunochimique fécal non invasif, détectant la présence du sang dans les fèces (Wong et al., 2017b). Récemment, des chercheurs ont mis en évidence la détection des

bactéries porteuses de l'îlot *pks* et la présence de *F. nucleatum* dans les fèces comme des marqueurs non invasifs du CCR. La présence de ces marqueurs fécaux pourraient prédire le CCR avec une spécificité de 63,1% et une sensibilité de 84,6% (Eklöf et al., 2017).

D'autres études ont mis en évidence l'importance de l'étude des métabolites associés au microbiote pour la détection du CCR. La quantification des métabolites fécaux par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire a identifié de nouveaux marqueurs de pronostiques potentiels tels que les acides gras à chaîne courte et la composition en acides aminés (Monleón et al., 2009). Plus récemment, une étude a mis en évidence 41 métabolites fécaux dont la concentration était modifiée chez les patients atteints de CCR, tels que les hèmes, les peptides et les acides aminés, ainsi que les vitamines et leurs cofacteurs (Goedert et al., 2014). L'analyse des composés organiques fécaux volatils a mis en évidence 3 marqueurs potentiels afin de détecter le CCR, que sont le fructose, l'acide linoléique et l'acide nicotinique. Ces 3 composés ont, en effet, été détectés en plus faible quantité chez les patients atteints de CCR par rapport aux sujet sains (de Meij et al., 2014).

Enfin, les marqueurs microbiens peuvent permettre de prédire la réponse aux traitements du CCR. Plusieurs études ont mis en évidence la capacité du microbiote à moduler les réponses aux traitements du CCR. Notamment, l'Irinotecan, le traitement de chimiothérapie de choix contre les CCR métastatiques, provoque des effets secondaires largement influencés par la  $\beta$ -glucuronidase bactérienne (Guthrie et al., 2017; Wallace et al., 2010). De plus, comme décrit précédemment, certaines espèces bactériennes, notamment *F. nucléatum*, favorisent la survenue de résistances aux drogues de chimiothérapies (Yu et al., 2017).

L'étude du microbiote intestinal et de son métabolome est donc importante afin de prédire et diagnostiquer le CCR. Les informations métagénomiques et métabolomiques permettront de prédire et/ou d'éviter de potentiels effets secondaires ou résistances aux traitements.

#### III.4.2. Les thérapies ciblant le microbiote

Les traitements courant du CCR sont la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie et l'immunothérapie. Cependant, de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant ou visant à moduler le microbiote intestinal sont de plus en plus envisagées dans le traitement du CCR. Ces dernières années, plusieurs études indépendantes ont mis en évidence un impact positif de certaines bactéries sur l'efficacité des thérapies contre le CCR.



En 2010, Wallace et collaborateurs ont mis en évidence que l'utilisation d'un inhibiteur de l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase produite par le microbiote améliore la réponse à la drogue de chimiothérapie, l'Irinotecan. En effet, cette enzyme a la capacité de réactiver la drogue de chimiothérapie au sein du tube digestif entraînant de sévères diarrhées (Wallace et al., 2010). D'autres études ont mis en évidence le rôle du microbiote dans l'efficacité de plusieurs thérapies. Notamment, *Bifidobacterium* présente des effets anti-tumoraux. L'administration orale de *Bifidobacterium* favorise l'activation de l'immunité anti-tumorale et augmente l'efficacité de l'immunothérapie anti-PDL1 (programmed cell death ligand 1). En effet, les cellules tumorales peuvent échapper au système immunitaire en exprimant à leur surface une protéine appelée PD-L1. Cette protéine agit en se liant à des récepteurs appelés PD-1 et B7.1 situés à la surface des lymphocytes T. La liaison de PD-L1 avec l'un ou l'autre de ces récepteurs conduit à l'inactivation des lymphocytes T. L'immunothérapie anti-PD-L1 repose sur l'inhibition de l'interaction entre PD-1 et PD-L1, ce qui restaure une réponse lymphocytaire anticancéreuse (Sivan et al., 2015). Une étude plus récente a montré que la résistance aux immunothérapies pouvait être attribuée à une composition anormale du microbiote intestinal avec notamment une diminution de l'abondance de l'espèce *Akkermansia muciniphila* chez les patients ne répondant pas au traitement anti-PDL1 (Routy et al., 2018). La transplantation du microbiote fécal des patients répondeurs ou non répondeurs au traitement anti-PDL1 aux souris préalablement traitées avec un cocktail d'antibiotiques ou aux souris axéniques, a montré que les souris gavées avec les échantillons fécaux des patients non répondeurs devenaient résistantes au traitement anti-PDL1, ce qui n'était pas le cas des souris gavées avec les échantillons fécaux des patients répondeurs. L'administration de la bactérie *Akkermansia muciniphila* aux souris gavées avec les échantillons des patients non répondeurs a rétabli l'efficacité du traitement anti-PDL1 (Routy et al., 2018). Vétizou et collaborateurs ont étudié l'impact du microbiote sur une autre immunothérapie, l'anti-CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), basée sur le blocage de CTLA4 exprimé à la surface des lymphocytes T et dont le rôle majeur est de limiter l'activation de l'immunité anti-tumorale (Vétizou et al., 2015). Ces auteurs ont mis en évidence le rôle anti-tumoral de *Bacteroides fragilis* et *Bacteroides thetaiotaomicron* en faveur de l'efficacité de l'anti-CTLA4, via la mise en place d'une réponse des lymphocytes T. Les tumeurs traitées par un cocktail d'antibiotiques à large spectre ou les souris axéniques ne répondaient pas à l'anti-CTLA4, confirmant l'implication du microbiote. Ce défaut de réponse est annulé suite à l'administration de *B. fragilis*, de polysaccharides spécifiques de *B. fragilis* ou encore par le transfert de lymphocytes T cultivés *in vitro* et spécifiquement activés

par l'infection par *B. fragilis* (Vétizou et al., 2015). La transplantation du microbiote fécal de l'Homme chez les souris axéniques a montré que les souris ayant reçu un microbiote enrichi en *Bacteroides* répondait mieux au traitement anti-CTLA4 et développaient des xénogreffes plus petites comparativement au groupe recevant un microbiote enrichi en *Prevotella*. Enfin, une étude a rapporté l'efficacité de la transplantation du microbiote fécal dans un cas de maladie de Crohn sévère, qui constitue un facteur de risque du CCR, avec une rémission clinique maintenue pendant plus de 9 mois après le traitement (Zhang et al., 2013).

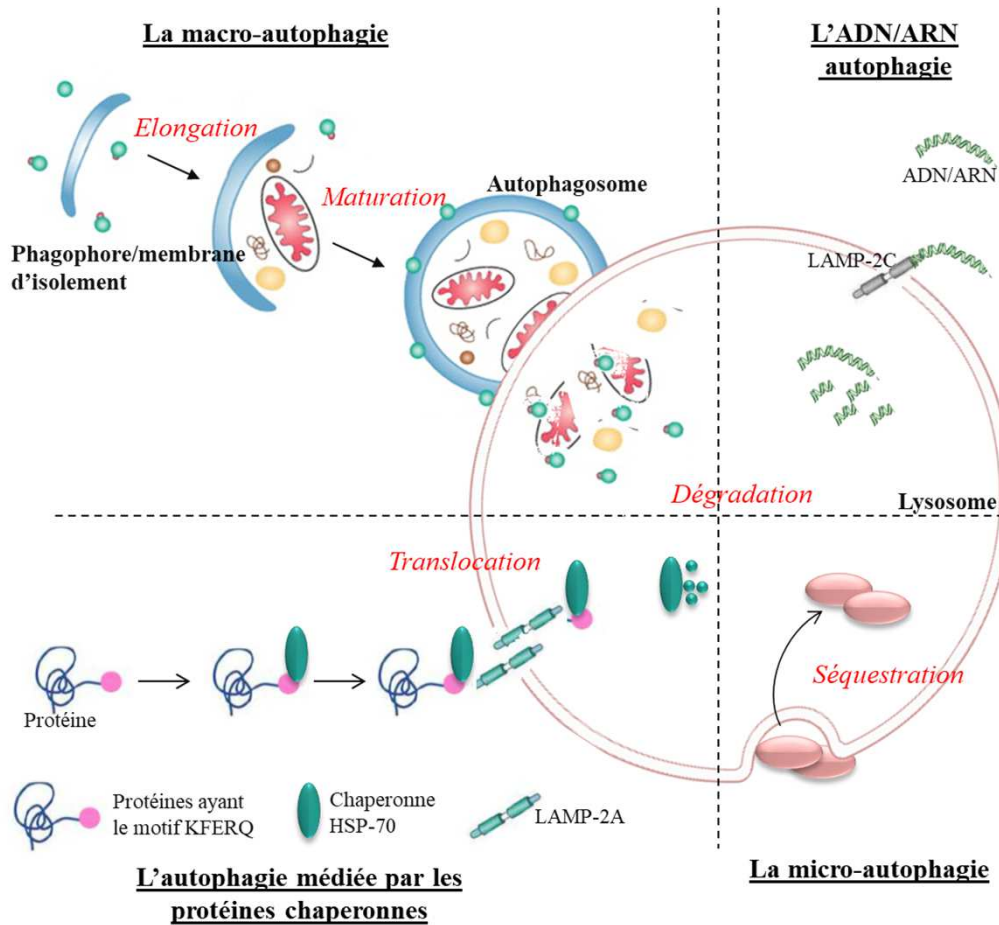
De plus, plusieurs bactéries probiotiques semblent avoir un impact positif sur la prévention du CCR. Notamment, les bactéries lactiques peuvent prévenir l'apparition des dommages à l'ADN induits par un agent mutagène, au niveau du côlon et du foie chez les rats (Zsivkovits et al., 2003). En 2017, une étude a montré l'implication de *Lactobacillus* dans l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses colorectales humaines, via l'augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique BAX (BCL-2-associated X protein), et la diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2, entraînant une inhibition de la prolifération cellulaire (Chen et al., 2017). La souche *Lactobacillus casei* BL23 a aussi été montrée comme pouvant diminuer le nombre de tumeurs coliques dans un modèle murin de CCR induit chimiquement par le 1,2-diméthylhydrazine (Lenoir et al., 2016). Son effet passait par la modulation de la réponse immunitaire de type Th17 et l'augmentation de l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Ces études suggèrent un impact bénéfique des bactéries productrices d'acide lactique afin d'inhiber l'environnement pro-inflammatoire associé au CCR.

Une étude récente a mis en évidence un changement de la composition du microbiote des patients suite à la prise répétée des probiotiques *Bifidobacterium lactis* BI-04 et *Lactobacillus acidophilus* NCFM, avec notamment une augmentation de la prévalence de bactéries productrices de butyrate, connu pour son effet bénéfique pour l'hôte (Hibberd et al., 2017). Une stratégie visant à la supplémentation en acides gras à chaîne courte pourrait d'ailleurs avoir des effets bénéfiques au niveau de la fonction de la barrière épithéliale, ou de la réponse immunitaire ainsi que des effets anti-inflammatoires et anti-tumoraux (van der Beek et al., 2017). L'administration des acides gras à chaîne courte à des souris traitées à l'AOM/DSS entraîne une diminution de l'inflammation, de l'expression des marqueurs de prolifération cellulaire et de la tumorigénèse colique (Tian et al., 2018).

Par ailleurs, deux prébiotiques, substances qui agissent sur l'activité des microorganismes, le galacto-oligosaccharide et l'inuline, sont capables de réduire le nombre de foyers de cryptes aberrantes au sein du côlon des rats Wistar (Qamar et al., 2016) et de réduire

les dommages à l'ADN induits par un agent carcinogène dans un modèle murin (Mauro et al., 2013).

Enfin, il a été montré par le laboratoire que deux composés capables de se fixer au niveau du site actif de l'enzyme ClbP inhibent les effets pro-tumoraux de la colibactine *in vitro*, réduisant ainsi la tumorigénèse dans un modèle de xénogreffe ainsi que dans un modèle murin de CCR, le modèle AOM/DSS (Cougnoux et al., 2016).



**Figure 33 : Les différentes formes d'autophagie.**

La **macroautophagie** correspond à la séquestration d'une portion de cytoplasme dans une vacuole à double membrane appelée autophagosome, qui va fusionner avec les lysosomes pour donner un compartiment de dégradation, l'autophagolysosome. **L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes** se caractérise par le transport actif de protéines possédant le motif penta-peptidique KFERZ dans les lysosomes par un complexe protéique composé des protéines LAMP-2 et HSP-70. La **microautophagie** correspond à l'internalisation d'une portion de cytoplasme par invagination directe de la membrane des lysosomes. **L'ADN/ARN autophagie** correspond au ciblage et au transport spécifique d'acides nucléiques présents dans le cytoplasme par la protéine LAMP-2C dans les lysosomes où ils seront dégradés.

# Partie 4. Le processus autophagique : physiologie et pathologie

---

## **IV.1. L'autophagie : Généralités**

Le terme « autophagie » vient du grec [auto (soi-même) et phagie (manger)] et signifie « se manger soi-même ». Le terme autophagie a été introduit par Christian de Duve en 1963. Le prix Nobel de physiologie/médecine 2016 a été attribué à Yoshinori Ohsumi pour ses découvertes sur les mécanismes moléculaires contrôlant l'autophagie chez la levure, soulignant l'importance de ce processus dans la physiologie humaine. Derrière le terme « autophagie », sont regroupés plusieurs mécanismes permettant aux cellules eucaryotes de dégrader et de recycler leurs composants intracellulaires, tels que les organites et les macromolécules cellulaires, par l'intermédiaire du lysosome. L'autophagie est activée suite à un stress qui peut être de nature variée (carence en nutriment ou en oxygène, infection par des pathogènes,...) afin de maintenir la cellule dans un état physiologique. De ce fait, l'autophagie est un processus clé pour le maintien de la physiologie de l'hôte et des perturbations de ce processus ont été décrites dans plusieurs maladies telles que les maladies infectieuses, les maladies neurodégénératives ainsi que les cancers (Beau et al., 2011).

## **IV.2. Les différentes formes d'autophagie**

A ce jour, 4 formes différentes d'autophagie sont décrites : (1) la micro-autophagie, (2) l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes, (3) l'ADN/ARN autophagie et (4) la macro-autophagie (**figure 33**).

### **IV.2.1. La micro-autophagie**

La micro-autophagie est décrite comme un processus majoritairement non sélectif de dégradation lysosomale caractérisée par une invagination de la membrane lysosomale, permettant la séquestration du contenu cytoplasmique à dégrader (Li et al., 2012a). Cette invagination, aussi appelée « tube autophagique », forme ensuite une vésicule dans la lumière du lysosome par scission membranaire (**figure 33**). La micro-autophagie peut être activée de manière constitutive ou bien suite à un stress cellulaire afin de dégrader spécifiquement des organites endommagés. Cette micro-autophagie sélective fut décrite chez la levure avec 3 cibles possibles : les peroxysomes avec la micropexophagie (dégradation sélective des

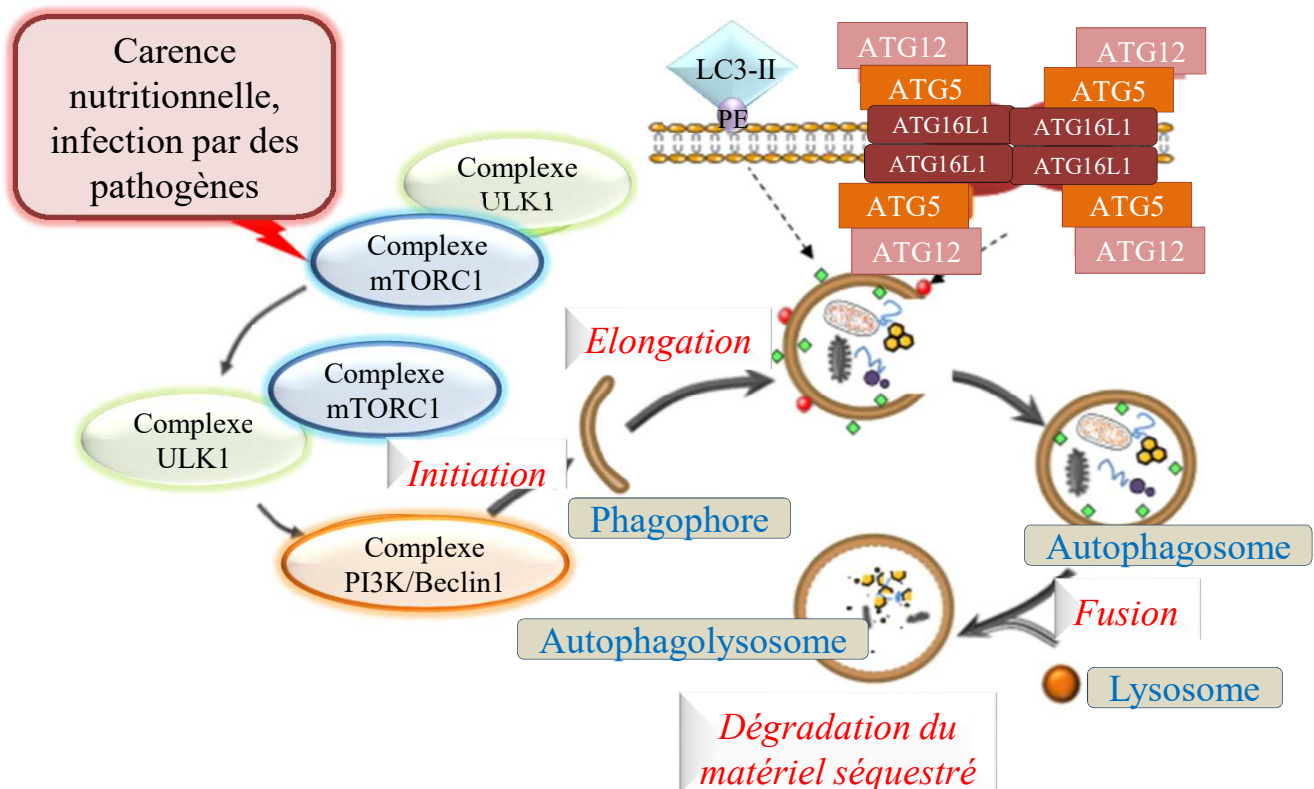
peroxisomes) (Sakai et al., 1998), la microautophagie « piecemeal » (dégradation sélective des portions du noyau) (Roberts et al., 2003) et enfin la micromitophagie (dégradation sélective des mitochondries) (Kissová et al., 2004). Tout comme la macro-autophagie, évoquée ci-après, la micro-autophagie est sous le contrôle du complexe TORC1 (target of rapamycin complex 1) (Dubouloz et al., 2005). La microautophagie reste peu étudiée chez les mammifères et ses mécanismes moléculaires sont mal décrits.

#### IV.2.2. L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes

L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes (ou la CMA, chaperone-mediated autophagy) est un type d'autophagie exclusivement sélectif décrit uniquement chez les eucaryotes. La CMA prend place au sein même de la membrane du lysosome et est régulée par la disponibilité en nutriments et/ou les stress cellulaires. Contrairement à la micro-autophagie, la CMA ne repose pas sur la formation d'une vésicule emprisonnant une portion de cytoplasme mais sur la translocation directe des protéines à dégrader au travers de la membrane du lysosome. Ce mécanisme de protéolyse reconnaît exclusivement les protéines ou agrégats de protéines portant le motif peptidique KFERQ (Lysine-Phénylalanine-Acide Glutamique-Arginine-Glutamine), soit environ 30% des protéines solubles cytosoliques et nucléaires. Ce motif est reconnu par la protéine chaperonne Hsc70 ce qui déclenche sa linéarisation en vue d'être adressée au lysosome (**figure 33**).

Les mécanismes de régulation de l'adressage des protéines contenant le motif KFERQ vers la voie de dégradation CMA restent mal connus, plusieurs hypothèses ont cependant été émises. L'une d'entre elles serait un changement de conformation des protéines révélant le motif KFERQ jusqu'alors caché par le repliement de la chaîne d'acides aminés (Kaushik and Cuervo, 2012). Une autre hypothèse impliquerait des modifications post-traductionnelles. En effet, il a été montré que l'acétylation et la phosphorylation du motif KFERQ peuvent déclencher la dégradation des protéines concernées par la CMA (Lv et al., 2011; Thompson et al., 2009). Enfin, il semblerait que le complexe KFERQ/Hsc70 soit adressé puis internalisé au niveau du lysosome de façon dépendante de la protéine transmembranaire LAMP (lysosome-associated membrane protein)-2A (Cuervo and Dice, 1996, 2000a, 2000b).

Des dérégulations de la CMA ont été observées dans certaines pathologies humaines telles que les maladies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, ou encore les maladies auto-immunes chroniques telles que le lupus (Cuervo and Wong, 2014; Muller, 2017).



**Figure 34 : Les étapes principales de la macro-autophagie.**

- 1) **L'initiation** : sous l'effet de différents stimuli, les complexes protéiques de régulation de l'autophagie mTORC1 et ULK1 se dissocient. Ce dernier induit l'activation du complexe PI3K/BECLIN-1 nécessaire pour la formation d'une membrane d'isolation, ou phagophore.
- 2) **L'élongation** : l'élongation du phagophore et la séquestration du matériel cytoplasmique sont sous le contrôle de 2 systèmes de conjugaison protéique. Le premier correspond au complexe protéique ATG12-ATG5-ATG16L1, qui est assemblé grâce à l'action d'ATG7 et d'ATG10. Le second implique la protéine LC3 qui est clivée par ATG4 donnant ainsi la forme active LC3-I. LC3-I est ensuite conjuguée à la PE grâce à l'action d'ATG7 et d'ATG3 formant ainsi LC3-II ou LC3-PE, qui s'insère alors dans la membrane du phagophore. L'élongation des extrémités du phagophore autour du contenu cytoplasmique séquestré conduit à la fermeture des membranes pour former l'autophagosome.
- 3) **La fusion** : l'autophagosome fusionne avec le lysosome, afin de former l'autophagolysosome, permettant la dégradation du contenu cytoplasmique séquestré.

(Modifiée d'après Mizushima et Komatsu, 2011).

### IV.2.3. L'ADN/ARN autophagie

L'ADN/ARN autophagie, décrite en 2013 par Fujiwara (Fujiwara et al., 2013a, 2013b), est un processus dépendant d'ATP qui permet le ciblage spécifique d'acides nucléiques présents dans le cytoplasme. Cette voie est caractérisée par l'interaction directe du matériel à dégrader avec la protéine de la membrane lysosomale, LAMP-2C, entraînant le passage de ces acides nucléiques dans le lysosome où ils seront dégradés par les endonucléases et exonucléases spécifiques (**figure 33**).

### IV.2.4. La macro-autophagie

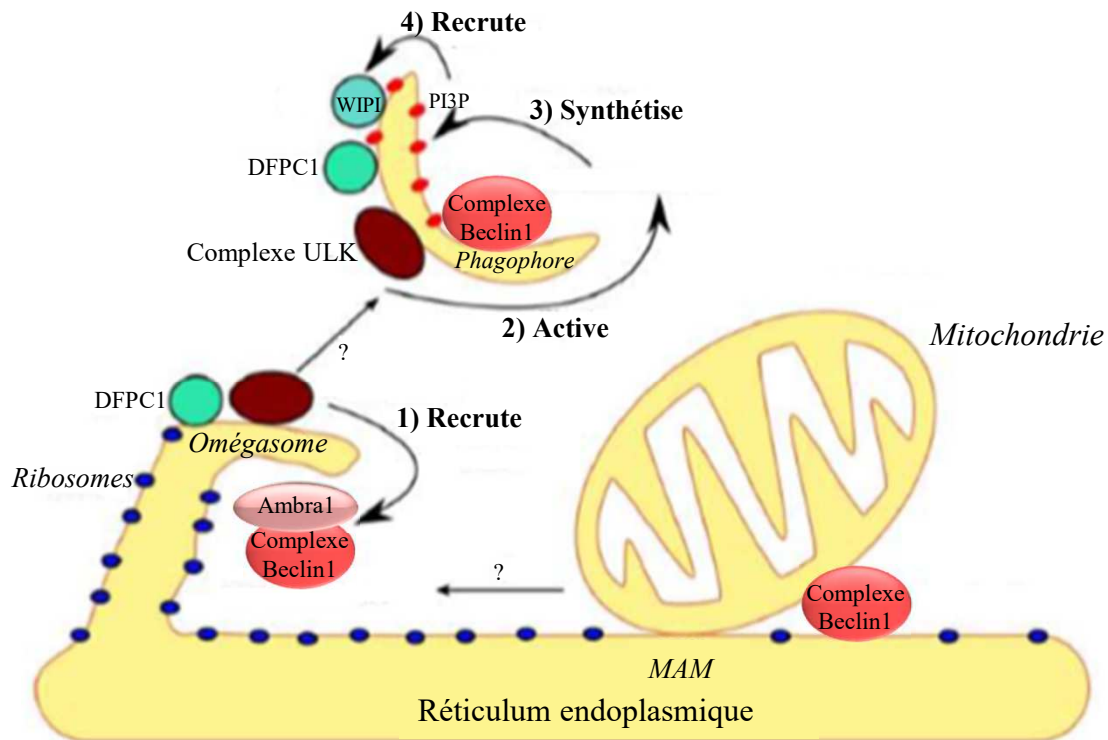
La macro-autophagie, appelée autophagie dans la suite du manuscrit, est la forme autophagique la mieux décrite dans la littérature. Elle implique la séquestration du contenu cytoplasmique dans une vacuole à double membrane appelée autophagosome (Mizushima, 2018) (**figure 33**) et est considérée comme une voie de dégradation massive par sa capacité à dégrader un nombre important de substrats de manière simultanée. Cette voie est activée en réponse à un stress cellulaire tel qu'une carence en acides aminés ou en facteurs de croissance, l'hypoxie ou encore les infections par des pathogènes (Huang and Brumell, 2014a; Mizushima, 2005). Cette voie ubiquitaire est très conservée chez les eucaryotes et est strictement régulée par des gènes appelées *ATG* (Autophagy-related) (Suzuki et al., 2004). Ces derniers contrôlent une succession d'étapes allant de la mise en place du processus jusqu'à la dégradation du substrat (**figure 34**).

#### IV.2.4.1. Les étapes de la macro-autophagie

##### IV.2.4.1.1. L'initiation

L'étape d'initiation se caractérise par la formation d'une membrane d'isolation appelée phagophore. L'origine des membranes du phagophore est encore aujourd'hui sujette à débat puisque différentes études lui attribuent des origines différentes. Le phagophore pourrait prendre origine au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et plus précisément au niveau des sous-domaines du réticulum nommés « omégasomes » (Hayashi-Nishino et al., 2009; Ylä-Anttila et al., 2009) (**figure 35**). Cependant, des études divergentes estiment que le phagophore pourrait prendre origine au niveau de la membrane nucléaire, des contacts mitochondrie-réticulum ou MAM (mitochondria associated membranes), de l'appareil de Golgi ou encore de la membrane plasmique (Rubinsztein *et al.*, 2012).





**Figure 35 : Origine du phagophore et initiation de l'autophagie.**

L'étape d'initiation permet la formation du phagophore, qui est la membrane initiale servant de matrice pour la formation de l'autophagosome. Le phagophore est issu de membranes préexistantes provenant de domaines particuliers du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie : l'omégasome et les MAM respectivement. Les premiers complexes recrutés sur ces domaines sont les complexes ULK et BECLIN-1 qui en coopération avec AMBRA1 permettent la séparation de l'organe source et l'émergence du phagophore selon un mécanisme encore inconnu à ce jour.

*(Modifiée d'après Mizushima et Komatsu, 2011).*

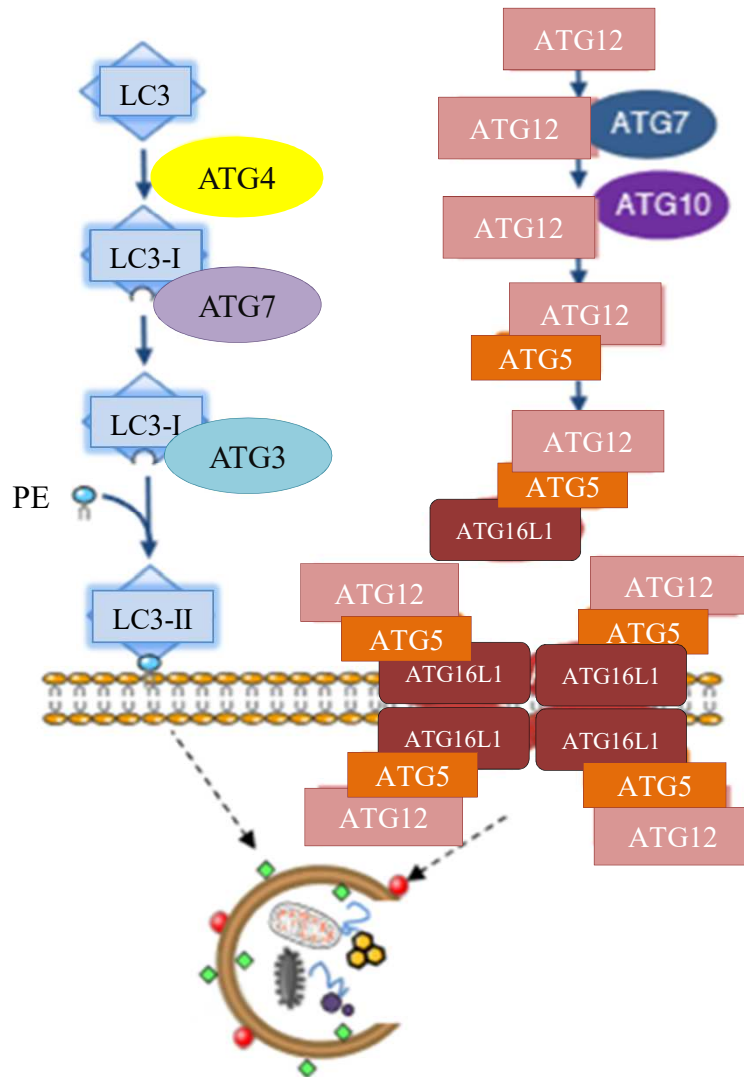
L'initiation de l'autophagie requiert l'activité du complexe ULK qui contient les protéines ULK1, ATG13, FIP200 et ATG101 (Ganley et al., 2009; Hara et al., 2008; Jung et al., 2009). Ce complexe est activé en amont par différents stress cellulaires (voir partie IV.3.3) entraînant l'inactivation du complexe mTOR. Les signaux activateurs de l'autophagie provoquent la déphosphorylation d'ULK1 qui peut ensuite phosphoryler les autres composants du complexe ULK. Ces phosphorylations activent le complexe ULK donc l'activité va ensuite permettre le recrutement du deuxième complexe impliqué dans l'initiation. Ce dernier est le complexe PI3K de classe III, plus communément appelé complexe BECLIN-1 et composé des protéines BECLIN-1, VPS34 (Vacuolar Protein Sorting 34), et ATG14 (Itakura et al., 2008). Lors de l'induction de l'autophagie, le recrutement du complexe BECLIN-1 vers le réticulum endoplasmique est dépendant de son interaction avec la protéine d'assemblage pro-autophagique AMBRA-1 (autophagy/BECLIN-1 regulator 1) phosphorylée par ULK1 (Di Bartolomeo et al., 2010; Fimia et al., 2007). Une fois en place, le complexe BECLIN-1 va phosphoryler des protéines pour l'instant non identifiées et VPS34 va provoquer la production de phosphatidyl-inositol-3-phosphate (PI3P) sur la membrane du phagophore (Kihara et al., 2001; Petiot et al., 2000). Le complexe ULK peut aussi phosphoryler BECLIN-1 et ainsi augmenter l'activité du complexe BECLIN-1-VPS34-ATG14 (Russell et al., 2013). La synthèse de PI3P permet ensuite le recrutement de protéines effectrices comme DFCP1 et WIPI (WD repeat domain Phosphoinositide-Interacting protein) mais aussi des complexes d'élongation nécessaires à la croissance du phagophore (Axe et al., 2008; Dooley et al., 2014; Proikas-Cezanne et al., 2004). Une fois ces complexes activés et recrutés sur le lieu de formation du phagophore, l'élongation peut avoir lieu grâce au recrutement de nouveaux complexes moléculaires.

#### IV.2.4.1.2. L'élongation

L'élongation du phagophore est régulée par deux complexes de conjugaison apparentés à celui de l'ubiquitinylation, (1) un premier impliquant un hétéro-trimère ATG5-ATG12-ATG16L1 et (2) un second impliquant la protéine LC3 (light chain 3) (Ohsumi, 2001).

- **Le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1 (figure 36)**

Dans ce premier système, la présence d'un résidu glycine, en C-terminale de la protéine ATG12 lui permet d'être directement activée par ATG7 (Tanida et al., 1999). Cette activation, ATP-dépendante, entraîne le transfert d'ATG12 vers ATG10. La glycine C-



**Figure 36 : L'étape d'élongation du phagophore.**

L'élongation du phagophore et la séquestration du matériel cytoplasmique à dégrader sont sous le contrôle de 2 systèmes de conjugaisons protéiques. Le premier correspond au complexe protéique ATG12-ATG5-ATG16L1, qui est assemblé grâce à l'action d'ATG7 et d'ATG10. Le second implique la protéine LC3 qui est clivée par ATG4 donnant ainsi la forme active LC3-I. LC3-I est ensuite conjuguée à la PE grâce à l'action d'ATG7 et d'ATG3 formant ainsi LC3-II ou LC3-PE, qui s'insère alors dans la membrane du phagophore. L'élongation des extrémités du phagophore autour du contenu cytoplasmique séquestré conduit à la fermeture des membranes pour former l'autophagosome. (Modifiée d'après Mizushima et Komatsu, 2011).

terminale d'ATG12 se lie, de façon covalente, à la lysine 149 de la protéine ATG5 libérant alors la protéine ATG10 (Mizushima et al., 1998) afin de former le conjugué ATG12-ATG5. La protéine ATG16L1 s'associe ensuite, de manière non covalente, à ce complexe néoformé entraînant la formation d'un complexe macromoléculaire homo-oligomérisé d'environ 800 kDa (Mizushima et al., 2003). Ce complexe ATG12-ATG5-ATG16 se situe au niveau de la membrane externe du phagophore et se dissocie dès la fermeture de ce dernier (Mizushima et al., 2003).

Ce complexe est essentiel dans le processus autophagique, toutefois une autophagie indépendante des protéines ATG5 et ATG7 a été décrite *in vitro* en réponse à des stress particuliers tels qu'une exposition des cellules à une molécule génotoxique, l'étoposide (Nishida et al., 2009).

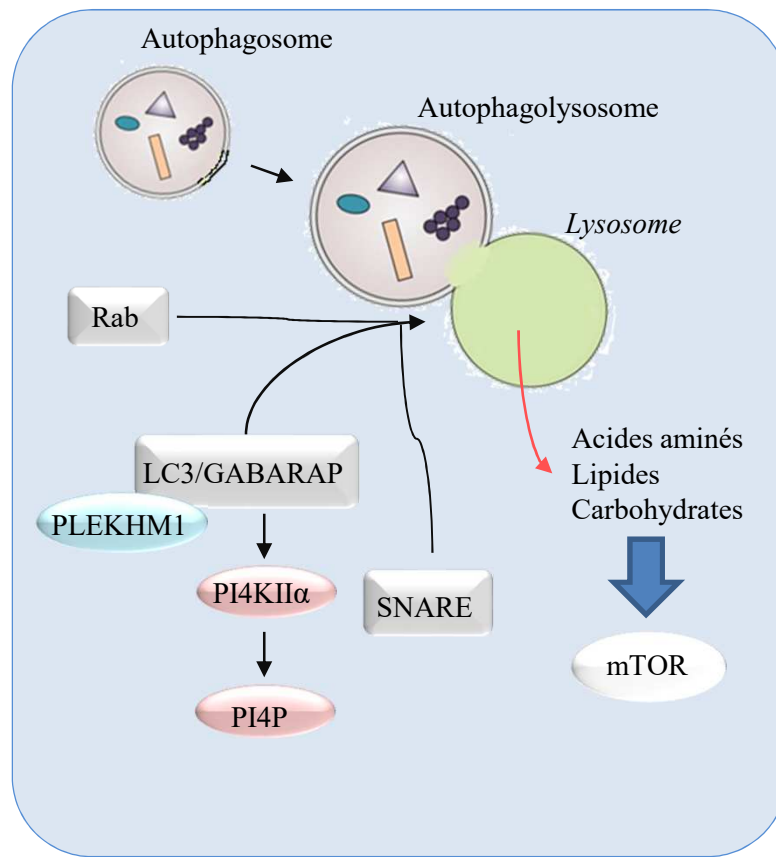
- **Le système de conjugaison LC3-PE (figure 36)**

Dans ce second système de conjugaison, la protéine LC3 présente sous forme non mature appelée pro-LC3 est clivée par la protéinase ATG4 exposant une glycine en C-terminal et donnant la forme cytosolique active LC3-I. Cette dernière est ensuite prise en charge par ATG7, puis ATG3 (Ichimura et al., 2000). La glycine en position 116 de LC3-I se lie à un phospholipide membranaire : le PE (phosphatidyl éthanolamine) afin de former le complexe LC3-PE ou LC3-II. Contrairement au complexe ATG12-ATG5-ATG16, le complexe LC3-II est présent aussi bien au niveau des membranes externes que des membranes internes du phagophore. De plus, ce complexe est primordial dans les dernières étapes de la formation du phagophore fermé (ou autophagosome). Contrairement au complexe ATG12-ATG5-ATG16, le complexe LC3-II ne se dissocie pas suite à la fermeture du phagophore et les complexes présents au niveau de la surface interne du phagophore seront dégradés lors de sa fusion avec les lysosomes. Ces caractéristiques font de LC3-II un marqueur de choix pour l'étude de l'autophagie (Klionsky et al., 2016).

Il existe une interdépendance entre ces 2 systèmes, puisqu'en l'absence d'ATG5, la forme LC3-II ne peut pas être générée (Mizushima et al., 2002) et réciproquement le niveau de LC3-II influe sur la formation du complexe ATG5-ATG12 (Hanada et al., 2007).

#### IV.2.4.1.3. La maturation de l'autophagosome et la fusion de l'autophagosome avec le lysosome

L'élongation des extrémités du phagophore conduit à la fermeture de la membrane pour donner un autophagosome, en général de 0,5 à 1,5 µm de diamètre (Mizushima et al.,



**Figure 37 : L'étape de maturation et fusion de l'autophagosome avec les lysosomes.**

L'étape de maturation et fusion de l'autophagosome avec le lysosome est médiée par plusieurs régulateurs. Notamment, les familles de protéines Rab et SNARE sont impliquées dans la régulation de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome. De plus, la fusion de l'autophagosome avec le lysosome est facilitée par la conjugaison de l'effecteur PLEKHM1 aux protéines de la famille GABARAP au niveau de l'autophagosome. Par ailleurs, GABARAP est aussi impliqué dans le recrutement de la PI4KII $\alpha$  qui génère des structures PI4P qui facilitent la fusion entre l'autophagosome et le lysosome. De façon générale, les protéines LC3/GABARAP jouent un rôle important dans l'étape de fusion. Suite à la fusion de l'autophagosome avec le lysosome, la dégradation du matériel séquestré génère la libération d'acides aminés, de lipides et de carbohydrates. Ceci entraîne une diminution de l'activation de mTOR et ainsi diminue l'activation du processus autophagique jusqu'à un niveau basal.

2002). La maturation de l'autophagosome requiert l'activité d'ATG4 pour dissocier le complexe LC3-II de la surface externe de l'autophagosome, sans quoi des autophagosomes incomplets et non fermés s'accumulent dans la cellule (Yu et al., 2012). Le mécanisme impliqué dans la fermeture du phagophore s'apparenterait à une scission membranaire puisque la face externe et interne de la double-membrane ne sont pas en contact lors de la fermeture (Knorr et al., 2015).

Lorsque les autophagosomes contenant le matériel cellulaire à dégrader sont matures, ils fusionnent avec des endosomes afin de former des amphisomes grâce aux protéines de la machinerie ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) (Rusten and Simonsen, 2008). Par la suite, les amphisomes fusionnent avec les lysosomes, grâce à l'intervention de la machinerie Rab-SNARE (soluble N-éthylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor), impliquée dans la fusion vésicule-vésicule (Stroupe, 2011) et des protéines LC3/GABARAP (GABA type A receptor-associated protein). Ceci conduit à la formation de l'autophagolysosome ou autolysosome (**figure 37**).

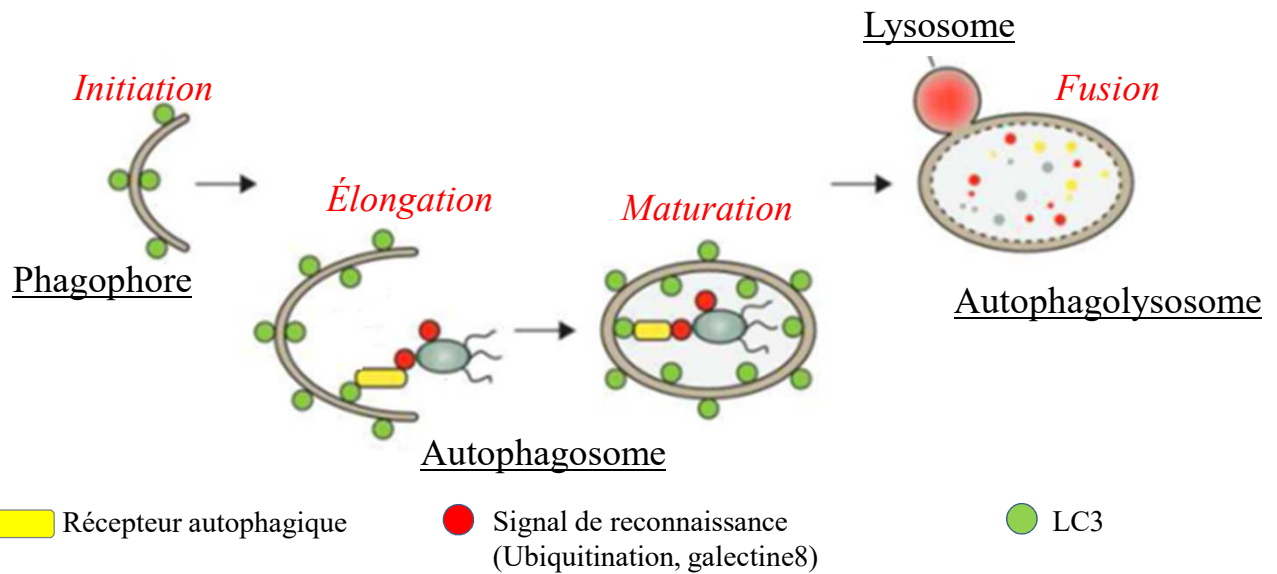
#### IV.2.4.1.4. La dégradation du contenu dans l'autolysosome

Cette dernière étape requiert la participation des hydrolases acides du lysosome, telles que les lipases, qui génèrent des acides gras à partir des lipides ; les protéases, qui dégradent les protéines en peptides ; les peptidases, qui dégradent ses derniers en acides aminés, ainsi que les nucléases, qui dégradent les acides nucléiques en nucléosides.

Ces produits de dégradation seront ensuite libérés dans le cytosol, grâce à des transporteurs lysosomaux et recyclés par la cellule (Teter et al., 2001). Une réactivation de la protéine kinase mTOR, régulateur négatif majeur de l'autophagie, serait alors nécessaire afin de recycler les lysosomes engagés dans la maturation de l'autophagosome (Yu et al., 2010).

### **IV.3. Les signaux d'activation de l'autophagie**

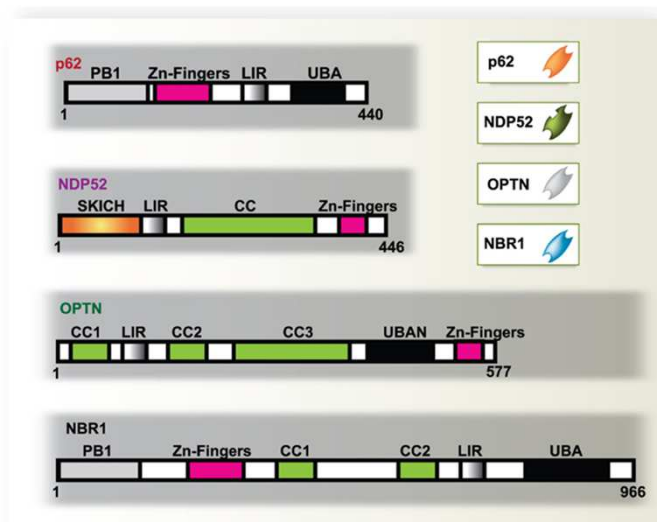
Le processus autophagique est activé de façon constitutive dans des conditions physiologiques normales. Cette activation basale non sélective est indispensable au maintien du contrôle de la qualité des protéines intracellulaires et au maintien de la qualité du cytoplasme mais joue également un rôle majeur au cours du développement embryonnaire en permettant la différenciation cellulaire, le remodelage tissulaire et la mise en place du système immunitaire (Jenzer et Legouis, 2017).



**Figure 38 : L'autophagie sélective.**

La spécificité de l'autophagie sélective repose sur une famille de protéines nommées récepteurs autophagiques. Ces récepteurs sont capable de reconnaître leurs substrat de manière directe ou indirecte mais aussi de se lier à LC3 par un domaine LIR sur l'autophagosome en formation. Ceci permet la formation de l'autophagosome autour du substrat et sa dégradation après maturation de l'autophagosome.

(Modifiée d'après Boyel et al., 2013)



**Figure 39 : Les récepteurs impliqués dans l'autophagie sélective.**

Représentation schématique des récepteurs p62, NDP52, Optineurine et NBR1. Ces récepteurs interagissent avec l'ubiquitine sur le substrat à dégrader et LC3 situé au niveau du phagophore, ce qui résulte en l'activation de l'autophagie.

(D'après Jo et al., 2013)

Le rôle primordial de l'autophagie basale a été mis en évidence chez des souris déficientes pour le gène *Atg7* spécifiquement au niveau du foie. Ces souris présentaient des hépatomégalies ainsi que des organites anormaux tels que des mitochondries déformées et une accumulation de réticulum endoplasmique au sein des hépatocytes. Ces anomalies entraînaient une mort cellulaire accrue (Komatsu et al., 2005). De manière intéressante, de nombreuses protéines ubiquitinées étaient détectées dans le foie des souris déficientes pour *Atg7* (Komatsu et al., 2005). Dans les neurones, le rôle majeur de l'autophagie a été mis en évidence grâce à l'utilisation de modèles murins déficients pour le gène *Atg5* ou *Atg7*. Ces souris déficientes pour l'autophagie présentent une accumulation progressive des protéines ubiquitinylées dans les neurones entraînant l'apparition de symptômes de neurodégénérescence.

Si l'autophagie est largement considérée comme un mécanisme non sélectif, les études ont montrées que l'autophagie pouvait dégrader des substrats cytoplasmiques spécifiques tels que les protéines mal repliées ou aggrégées, les organelles dégradées ou trop abondantes ainsi que les pathogènes intracellulaires. Pour cela, ce processus fait intervenir des récepteurs qui reconnaissent spécifiquement le substrat à présenter aux autophagosomes pour leur dégradation.

#### IV.3.1. Les récepteurs autophagiques

Les récepteurs autophagiques sont la clé de l'autophagie sélective (**figure 38**). Ils reconnaissent d'une part, le substrat à dégrader et d'autre part, la machinerie moléculaire de l'autophagie. Le substrat à dégrader peut être reconnu directement par le récepteur ou via un partenaire moléculaire comme l'ubiquitine. Le recrutement de la machinerie autophagique se fait via la liaison entre le récepteur et un membre de la famille LC3/GABARAP ancré dans la membrane du phagophore en élongation. Le récepteur permet ainsi la formation et la fermeture d'un autophagosome spécifiquement autour du substrat à dégrader.

Tous les récepteurs fonctionnent suivant le même principe et partagent des caractéristiques structurales (**figure 39**). Le premier domaine principal d'un récepteur autophagique est le domaine de reconnaissance du substrat de façon directe ou par un intermédiaire moléculaire. Ce processus est finement régulé et l'affinité de liaison entre le récepteur et le substrat peut être modulée par des modifications post-traductionnelles, permettant d'augmenter la spécificité du processus ou de moduler l'intensité de la réponse.

La liaison du récepteur au phagophore fait intervenir deux domaines, le premier sur le récepteur et nommé LIR (LC3-interacting region). Ce domaine permet au récepteur de se lier

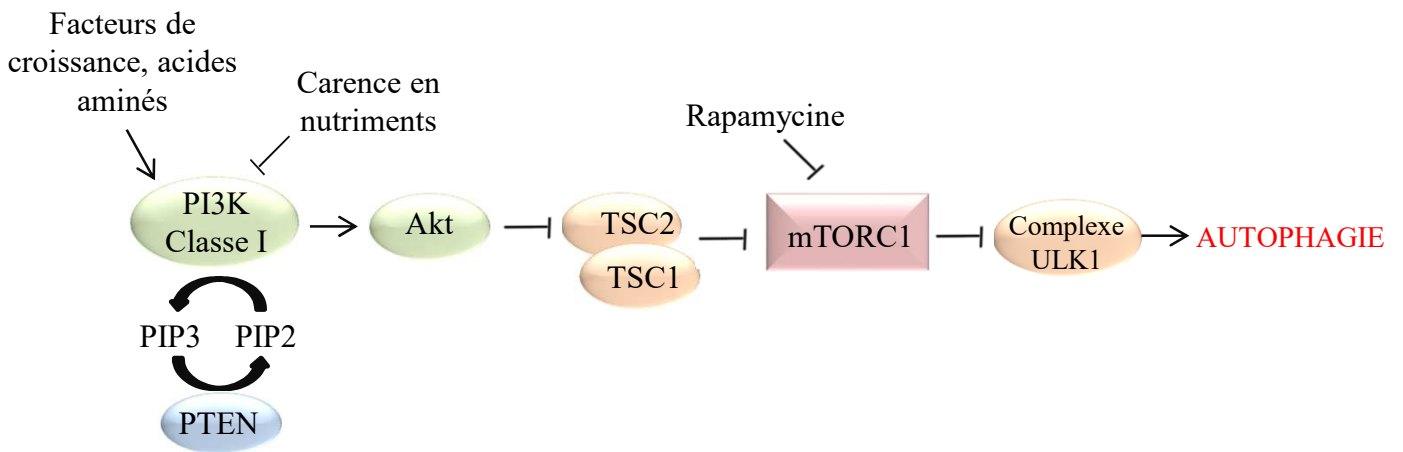


à LC3/GABARAP sur un domaine particulier de ce dernier nommé LBD (LIR-binding domain). L'insertion de mutations dans ce domaine abroge l'interaction entre le récepteur et LC3/GABARAP, empêchant ainsi la dégradation du substrat par l'autophagie et démontre donc que cette interaction est indispensable pour l'autophagie sélective (Johansen and Lamark, 2011).

Le premier récepteur à avoir été identifié est p62 (également connu sous le nom de SQSTM1, sequestosome-1). p62 était décrite comme protéine d'échafaudage dans les voies de signalisation impliquant NF-κB (Moscat and Diaz-Meco, 2009). p62 est aussi bien connue pour être accumulée au niveau d'agrégats protéiques dans plusieurs maladies neurodégénératives (Kuusisto et al., 2001; Zatloukal et al., 2002). p62 constitue à la fois un substrat de l'autophagie sélective et un récepteur pour la dégradation sélective des protéines ubiquitylées (Pankiv et al., 2010). En effet, un rôle de p62 dans la reconnaissance et l'adressage des pathogènes à la dégradation par l'autophagie a été mis en évidence (Shaid et al., 2013; Tsuchiya et al., 2018). p62 interagit avec les chaînes poly-ubiquitylées présentes à la surface des bactéries pathogènes via son domaine UBA (Ubiquitin-associated). Une seconde interaction via son motif LIR à la protéine LC3-PE présente à la surface du phagosome va permettre la séquestration et la dégradation de la bactérie ciblée. p62 est dégradée en même temps que la bactérie au cours du flux autophagique, ce qui fait de la diminution de l'accumulation de p62 un marqueur de l'activation d'une autophagie fonctionnelle (Klionsky et al., 2016).

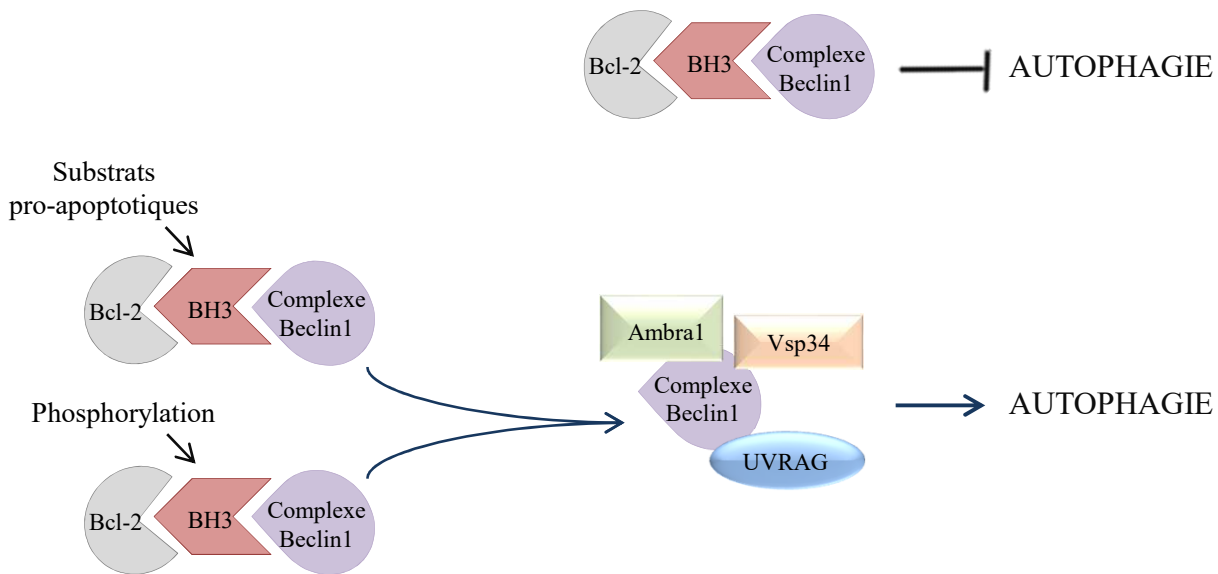
Plusieurs récepteurs autophagiques suivent la même organisation et mode de reconnaissance de leurs substrats que p62, ce qui leur vaut le nom de Sequosome-like receptors (SLR). NDP52 (ou CALCOCO2) est un SLR et reconnaît d'une part les bactéries à dégrader via la reconnaissance d'ubiquitines recrutées sur la bactérie, ou de la Galectine 8 associée à des membranes endommagées contenant la bactérie. D'autre part, via son domaine LIR, NDP52 se fixe sur la protéine LC3 liée à la membrane du phagosome non mature (Verlhac et al., 2015). Plus récemment, une étude a mis en évidence le rôle majeur de NDP52 dans la maturation des autophagosomes (Verlhac et al., 2015). NDP52 favorise ainsi la fusion entre l'autophagosome et le lysosome en interagissant d'une part avec les facteurs autophagiques LC3A, LC3B et GABARAPL2 associés à l'autophagosome grâce à son motif LIR, et d'autre part avec un facteur important pour l'adressage des autophagosomes vers la voie endo-lysosomale, la Myosine VI (Verlhac et al., 2015).

L'optineurine est un SLR qui joue un rôle majeur dans la dégradation des pathogènes tels que *Salmonella* ainsi que des protéines aberrantes qui forment des agrégats et des



**Figure 40 : Régulation de l'autophagie par la voie mTOR.**

Un stress cellulaire, tel qu'une carence en nutriments, entraîne l'activation de l'AMPK qui inhibe mTORC1 par phosphorylation et activation de TSC2. L'inhibition de mTORC1 entraîne l'inhibition de la répression du complexe ULK1 par mTOR et ainsi l'activation de l'autophagie. La rapamycine est un inhibiteur de mTORC1 et donc un activateur de l'autophagie.



**Figure 41 : Régulation de l'autophagie par le complexe Beclin1.**

L'interaction de Bcl-2 avec Beclin1 via son domaine BH3 empêche l'interaction de Beclin1 avec la machinerie autophagique. La phosphorylation de BH3 ou l'interaction de BH3 avec des substrats pro-apoptotiques déstabilise l'interaction entre Bcl-2 et Beclin résultant en l'activation de l'autophagie.

mitochondries endommagées (Ying and Yue, 2016). De plus, il a été montré que, comme NDP52, l'optineurine joue un rôle dans la maturation des autophagosomes via son domaine d'interaction à la myosine VI (Tumbarello et al., 2012). Plus récemment, une étude a montré que l'optineurine joue un rôle dans l'étape d'initiation du phagophore en favorisant le recrutement du complexe ATG5-ATG12 à la membrane du phagophore exprimant WIPI2 (Bansal et al., 2018).

S'ils sont les récepteurs les plus étudiés à ce jour, les SLRs ne sont pas les seuls récepteurs autophagiques et de nouveaux récepteurs sont découverts régulièrement nous apportant une meilleure compréhension des différents modes de reconnaissance des substrats par l'autophagie. On peut par exemple citer NOD2, un récepteur intracellulaire clé de l'immunité innée, qui interagit avec la protéine de l'autophagie ATG16L1, permettant le recrutement de la machinerie autophagique au site d'entrée d'une bactérie pathogène (Travassos et al., 2010).

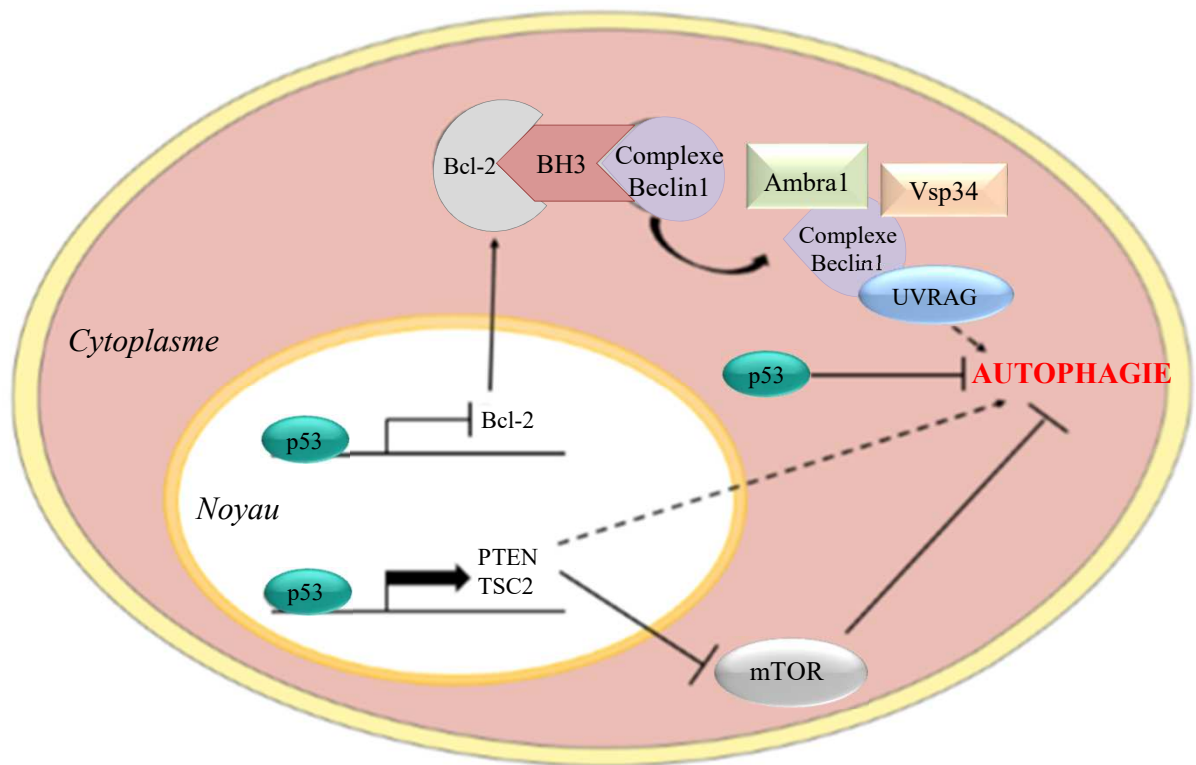
### IV.3.2. Les voies et les facteurs de régulation de l'autophagie

L'autophagie est un processus biologique complexe bénéfique au maintien de l'homéostasie cellulaire en permettant l'adaptation de la cellule à différents stress de l'environnement tels qu'une carence en acides aminés, des conditions d'hypoxie ou bien encore des dommages à l'ADN. Différentes voies et facteurs sont donc impliqués dans la régulation fine de ce processus.

#### IV.3.2.1. La voie mTOR

La voie mTOR, constituée des complexes mTORC1 et mTORC2, est un régulateur négatif de l'autophagie. La phosphorylation d'ATG13 par mTOR empêche la formation du complexe ULK, inhibant ainsi le processus autophagique (Jung et al., 2010). mTORC1 est régulée par la quantité des nutriments disponibles, notamment d'acides aminés particuliers, tels que l'alanine, la leucine, la glutamine et la phénylalanine. Il a ainsi été montré que l'état carencé en nutriment est associé à l'inhibition de la signalisation mTOR, induisant par conséquent l'autophagie. mTOR est aussi régulé par d'autres stress tels que l'hypoxie (Cam and Houghton, 2011; Vadysirisack and Ellisen, 2012) (**figure 40**).

De manière intéressante, la voie mTOR est activée par la voie PI3K-AKT, ces deux voies étant fréquemment dérégulées et impliquées dans l'augmentation de la prolifération au cours du phénomène de carcinogenèse humaine.



**Figure 42 : Régulation de l'autophagie par la voie p53.**

P53 régule l'autophagie de façon dépendante de sa localisation. Au niveau du noyau, la protéine p53 active l'autophagie en inhibant l'expression du gène Bcl-2 et induit l'expression des gènes pro-apoptotiques tels que PTEN et TSC2. Au contraire, dans le cytoplasme, p53 est décrit comme un inhibiteur de l'autophagie.

#### IV.3.2.2. Le complexe Beclin1-BCL-2

Les protéines de la famille BCL-2, ont la capacité d'interagir avec la protéine Beclin1, via leur domaine BH3 (BCL-2 homology domain 3) (**figure 41**). En 2005, Pattingre et ses collaborateurs démontrent que la formation du complexe Beclin1-BCL-2 induit la séquestration de Beclin1 et est associée à l'inhibition de l'activité pro-autophagique de Beclin1 (Pattingre et al., 2005). La dissociation de ce complexe est donc indispensable à la formation du complexe PI3K de classe III, nécessaire à l'activation du processus autophagique. Cette dissociation est elle aussi régulée de différentes façons : une compétition se met en place entre Beclin1 et des protéines pro-apoptotiques pour occuper le domaine BH3 de BCL-2 (Sinha and Levine, 2008) ou, le domaine BH3 peut être phosphorylé ce qui déstabilise l'interaction (Wei et al., 2008) de Beclin1 avec d'autres protéines, telle que le suppresseur de tumeur UVRAG (UV radiation resistance-assoiated gene) dont l'interaction avec Beclin1 favorise l'activation du flux autophagique. Enfin, l'activation de Beclin-1 peut aussi impliquer l'association directe avec DAPK (death assoiated protein kinase), un régulateur de l'apoptose, permettant ainsi la phosphorylation de Beclin-1 par DAPK et sa libération de BCL-2/BCL-XL (Zalckvar et al., 2009).

#### IV.3.2.3. La signalisation p53

La signalisation p53 régule l'autophagie selon plusieurs mécanismes. L'un des mécanismes implique l'inhibition de la voie mTOR suite à l'activation de p53 par un agent délétère pour l'ADN, l'étoposide. L'activation transcriptionnelle de la protéine DRAM (damage-regulated autophagy modulator), une protéine de la membrane des lysosomes qui est surexprimé via p53 suite à des dommages à l'ADN, est un second mécanisme par lequel p53 peut induire l'activation de l'autophagie ainsi que l'apoptose (Crighton et al., 2006). L'expression de DRAM est requise pour l'activation de l'autophagie de manière dépendante de p53.

Par contraste, d'autres études ont mis en évidence que l'inhibition de p53, par manipulation génétique ou pharmacologique, entraîne l'activation de l'autophagie. Ce rôle inhibiteur de l'autophagie a été attribué exclusivement à la portion cytoplasmique de p53 (Tasdemir et al., 2008). De plus, l'autophagie est capable d'induire la dégradation de p53 de façon dépendante de HDM2 conduisant à l'activation de l'autophagie (Tasdemir et al., 2008). Dans ce contexte, l'autophagie serait plutôt associée à la survie cellulaire. Par exemple, les cellules déficientes pour p53 activent l'autophagie afin de maintenir leur niveau d'ATP en condition de carence.

Facteur de transcription	Cible	Effet	Référence
ATF4	<i>Atg5, Lc3, Ulk1</i>	+	Rouschop et al., 2010 ; Milani et al., 2009 ; Pike et al., 2013 ; Pike et al., 2012
ATF5	<i>mtor</i>	-	Sheng et al., 2011
CEBPB	<i>Bnip3, Lc3, Ulk1</i>	+	Ma et al., 2011
DDIT3/CHOP	<i>Atg5, Lc3</i>	+	Rouschop et al., 2010
E2F1	<i>Atg5, Bnip3, Lc3, Ulk1</i>	+	Polager et al., 2008 ; Shaw et al., 2008 ; Yurkova et al., 2008
FOXO1	<i>Atg5, Atg12, Atg14, Becn-1, Bnip3, Lc3, Pik3c3/Vps34</i>	+	Xu et al., 2011 ; Liu et al., 2009 ; Shaw et al., 2008
FOXO3	<i>Atg4, Atg12, Becn1, Bnip3, Lc3, Ulk1, Ulk2, Pik3c3/Vps34</i>	+	Mammucari et al., 2007 ; Zhao et al., 2007 ; Xiong et al., 2012 ; Sanchez et al., 2012 ; Schips et al., 2011
GATA1	<i>Lc3</i>	+	Kang et al., 2012
JUN	<i>Becn1, Lc3</i>	+	Sun et al., 2011 ; Jia et al., 2006 ; Li et al., 2009
NFκB	<i>Bcl2, Becn1, Bnip3</i>	+ ou -	Shaw et al., 2008 ; Copetti et al., 2009 ; Ling et al., 2012
TP53	<i>Atg2, Atg4, Atg7, Atg10, Bcl2, Ulk1</i>	cytosol - ; noyau +	Xie et al., 2008 ; Yee et al., 2009
SOX2	<i>Atg10</i>	+	Kenzelmann et al., 2013 ; Rosenbluth and Pietenpol, 2009
SREBF2/SREBP2	<i>Atg4, Lc3</i>	+	Seo et al., 2011
STAT1	<i>Atg12, Becn1</i>	-	McCornick et al., 2012
STAT3	<i>Atg3, Bcl2, Bnip3</i>	-	Dauer et al., 2005 Lipinski et al., 2010
TFEB	<i>Atg4, Atg9, Bcl2, Lc3, Wip1</i>	+	Settembre et al., 2013
ZKSCAN3	<i>Lc3, Ulk1, Wip1</i>	-	Moresi et al., 2012

+ autophagie augmentée

- autophagie diminuée

## **Tableau 2 : Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'autophagie.**

ATF, activating transcription factor ; CEBPB, CCAAT enhancer-binding protein beta ; DDIT3, DNA-damage-inducible transcript 3 ; CHOP, CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein ; E2F1 eukaryotic translation elongation transcription factor 1, FOXO, forkhead box O ; GATA1, globin transcription factor 1 ; NFκB nuclear factor kappa B ; SOX2, SRY (sex determining region Y)-box 2 ; SREBF/B, sterol regulatory element-binding transcription factor / protein ; STAT, signal transducer and activator of transcription ; TFEB transcription factor EB ; ZKSCAN3 zinc finger protein with krab and scan domains 3 ; ATG, autophagy-related protein ; LC3, microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 ; ULK, unc-51 like autophagy activating kinase ; mTOR, mammalian target of rapamycin ; BNIP3, BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3 ; PIK3C3, phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic subunit type 3 ; VPS34, vacuolar protein sorting protein 34 ; BECN1, beclin 1 ; BCL2, B-cell CLL/lymphoma 2 ; Wip1, WPP domain interacting protein 1)

(Modifié d'après Feng et al., 2015).

La régulation de l'autophagie par p53 dépend donc de sa localisation. Une localisation nucléaire de p53 favorise l'activation de l'autophagie quand une localisation cytoplasmique réprime ce même processus (**figure 42**).

#### IV.3.2.4. Régulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle et post-traductionnelle

Lors d'un stress cellulaire, de nombreux facteurs de transcription vont se fixer sur les promoteurs des gènes de l'autophagie et ainsi moduler leur activité. Ces facteurs de transcription ainsi que leurs cibles sont de mieux en mieux décrits (Feng et al., 2015) (**tableau 2**). Outre les facteurs de transcription, de nombreux microARN régulateurs du processus autophagique ont été identifiés et interviennent à différentes étapes du processus (Feng et al., 2015). Enfin, des modifications post-traductionnelles ont été décrites comme primordiales pour définir l'intensité et la durée de la réponse autophagique. Notamment, la phosphorylation est la modification post-traductionnelle majeure au cours du processus autophagique. L'un des exemples les plus documentés est le contrôle exercé par la phosphorylation sur la protéine ULK1 par le complexe mTORC1 qui empêche l'activation de l'autophagie (Kim et al., 2011a).

### IV.3.3. Les signaux de stress régulant l'autophagie

#### IV.3.3.1. Le stress métabolique

L'autophagie peut être stimulée en condition de stress métabolique afin de fournir les nutriments et l'énergie nécessaires à la survie cellulaire. En effet, des études sur différentes lignées cellulaires ont montrées une activation du processus autophagique lorsque les cellules sont cultivées en absence de substances nutritives ou de facteurs de croissance (Russell et al., 2014). De même, un nombre important d'autophagosome est détecté dans les tissus de souris mises à jeun pendant 48 heures (Mizushima and Levine, 2010). Dans le cas d'une carence en nutriments, la kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) est inactivée. Ceci entraîne la suppression de la prolifération cellulaire afin de réduire la demande énergétique ainsi que l'induction de l'autophagie (Rabinowitz et White, 2010). Ainsi, les acides aminés produits par la dégradation des protéines par l'autophagie sont recyclés, permettant la production d'ATP afin d'assurer la survie cellulaire.

En amont de mTOR se trouve l'AMPK (AMP-activated protein kinase) qui est considéré comme le senseur énergétique principal de la cellule, en percevant le ratio

ADP/ATP cytosolique. Ainsi, une augmentation de l'AMP, caractéristique d'un manque d'énergie, entraîne une phosphorylation activatrice de l'AMPK, ainsi qu'une inactivation de mTOR, entraînant ainsi l'activation de l'autophagie.

Bien que la réponse aux carences soit souvent exclusivement attribuée à l'inactivation de mTOR, dans le cas de carences en acides aminés indispensables, la kinase GCN2 (aussi appelée eIF2 $\alpha$ K4) induit, elle aussi, l'activation de l'autophagie. L'absence d'acides aminés entraîne l'accumulation d'ARN de transfert non chargés. Ces derniers activent la kinase GCN2 entraînant ainsi la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  au niveau de la sérine 51 ainsi que l'activation du facteur de transcription ATF4 (B'chir et al., 2013). La voie de signalisation GCN2/peIF2 $\alpha$ /ATF4 induit la transcription de nombreux gènes de l'autophagie.

#### IV.3.3.2. Le stress du réticulum endoplasmique

Au niveau du réticulum endoplasmique (RE), l'accumulation de protéines mal repliées induit une situation de stress cellulaire. En réponse à ce stress, la cellule initie une réponse adaptative appelée la réponse UPR (unfolded protein response). Cette dernière est activée afin de restaurer une quantité de protéines contrôlée dans le RE. Il existe trois senseurs du stress du RE, les protéines transmembranaires PERK (protein RNA-like endoplasmic reticulum kinase), ATF (activating transcription factor)-6 et IRE1 (inositol requiring enzyme 1) (Bertolotti et al., 2000). L'activation de PERK induit la transcription de gènes, tels que les facteurs de transcription ATF4 et CHOP (CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein), capables d'activer la transcription spécifique des gènes de l'autophagie tels que *LC3*, *ATG5*, *ATG16L1*, *ATG12*, *ATG3*, *BECLIN1*, *p62*, *ATG7* et *ATG10* (B'chir et al., 2013; Rouschop et al., 2010), initiant par conséquent l'activation de l'autophagie.

#### IV.3.3.3. Les mitochondries endommagées

Les mitochondries assurent de nombreuses fonctions indispensables à la survie cellulaire. Leur rôle principal est la production d'ATP. Les mitochondries sont la source principale de ROS qui peuvent présenter des effets soit bénéfiques, soit néfastes pour l'hôte. L'accumulation des dommages liée aux ROS est associée à plusieurs pathologies telles que les maladies neuro-dégénératives ou les cancers (Vigié and Camougrand, 2017). La mitophagie (*i.e.* dégradation sélective des mitochondries) est essentielle afin de prévenir l'accumulation des ROS. Dans les cellules de mammifères, le contrôle de la qualité des mitochondries fait aussi intervenir des vésicules dérivées des mitochondries, MDV



(mitochondrial-derived vesicles). Ces MDV sont des vésicules contenant du matériel mitochondrial envoyées par les mitochondries vers les lysosomes et les peroxysomes pour leur dégradation (Vigié and Camougrand, 2017). Ils peuvent être générés suite à un stress cellulaire, notamment une augmentation de la quantité de ROS intracellulaires.

#### IV.3.3.4. L'hypoxie et l'anoxie

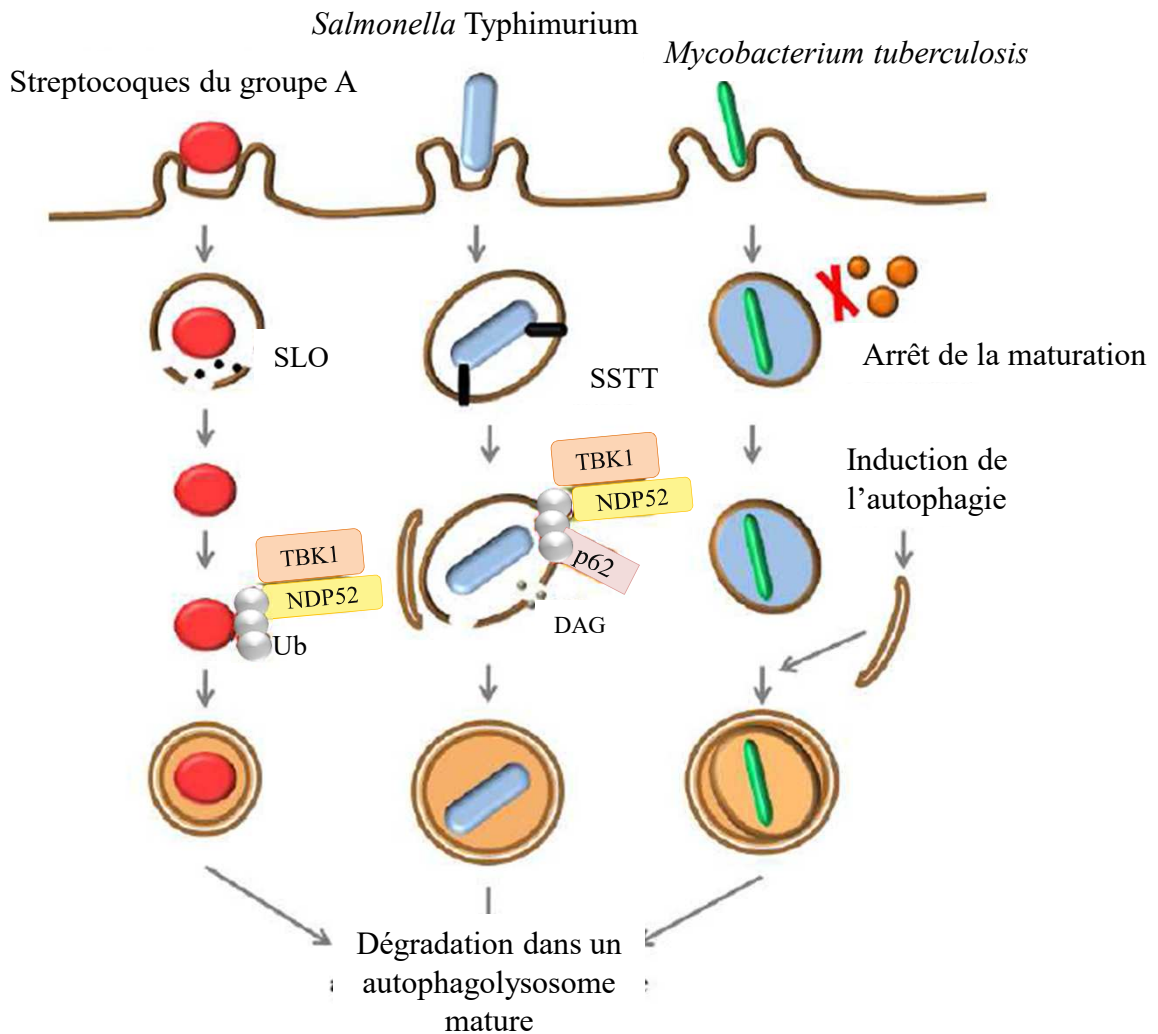
L'hypoxie et l'anoxie sont caractérisées par une disponibilité insuffisante en dioxygène, l'anoxie étant un stade plus critique (moins de 0,1% d'oxygène) que l'hypoxie (moins de 3% d'oxygène). Les études ont mis en évidence une activation de l'autophagie en condition d'hypoxie, et ce, de façon dépendante du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 alpha) dans le cas de l'hypoxie ; et de façon indépendante de HIF-1 $\alpha$  dans le cas de l'anoxie. Une étude récente a montré que l'autophagie améliore la survie des cellules en condition hypoxique (Tan et al., 2016).

#### IV.3.3.5. L'infection par des pathogènes

En 1984 était décrite pour la première fois l'activation de l'autophagie en réponse à une infection (Rikihisa, 1984). La dégradation spécifique des pathogènes par la voie autophagique a été nommée xénophagie. Depuis, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle majeur de l'autophagie dans l'élimination des pathogènes tels que les bactéries, les virus ou les parasites (Deretic, 2010). Il sera développé dans ce manuscrit uniquement la reconnaissance des bactéries pathogènes par la xénophagie qui est abordée et étudiée dans ce projet de recherche de thèse.

Les modèles murins déficients pour un gène de l'autophagie présentent des défauts au niveau des cellules de Paneth et des cellules à gobelet, accompagnés par des défauts de sécrétion des peptides anti-microbiens. Ces défauts sont souvent associés à une diminution des mécanismes de défense de l'hôte en réponse à l'infection par des bactéries, soulignant le rôle majeur de l'autophagie dans l'élimination des pathogènes (Brest et al., 2011; Conway et al., 2013; Lapaquette et al., 2010, 2012; Lassen et al., 2014; Nguyen et al., 2014).

Cependant, si l'autophagie est requise afin de limiter la multiplication intracellulaire de certaines bactéries pathogènes, certaines bactéries ont développé des stratégies afin de contourner ou de profiter de la réponse autophagique. De ce fait, on distingue trois types de bactéries, (1) les bactéries contrôlées par l'autophagie, (2) les bactéries qui échappent à la machinerie autophagique, et (3) les bactéries qui se servent de l'autophagie à leur avantage.



**Figure 43: Les bactéries contrôlées par l'autophagie.**

Les streptocoques du groupe A lysent leur vacuole grâce à la sécrétion de la streptolysine O (SLO) et se retrouvent libres dans le cytoplasme. *Salmonella Typhimurium* lors de la mise en place de son système de sécrétion (SSTT) de type III peut endommager sa vacuole d'endocytose. Le comportement intracellulaire de ces 2 bactéries induit leur ciblage par l'autophagie grâce à différents adaptateurs moléculaires tels que l'ubiquitine, NDP52, SQSTM1/p62, et DAG. *Mycobacterium tuberculosis* stoppe la maturation de son phagosome en interférant avec les voies de signalisation de la cellule hôte. Une induction du processus autophagique (rapamycine ou IFN- $\gamma$ ) permet de surmonter ce blocage en redirigeant les mycobactéries vers un autophagolysosome mature, et cela de manière dépendante de la protéine IRGM.

(Modifiée d'après Huang et Brumell, 2014)

#### IV.3.3.5.1. Les bactéries contrôlées par l'autophagie

Un exemple bien décrit est la reconnaissance de *Salmonella* Typhimurium par la machinerie autophagique (**figure 43**). Cette bactérie adhère, envahit les cellules épithéliales à l'aide du système de sécrétion de type III et réside au sein d'une vacuole appelée la vacuole contenant *Salmonella* (ou SCV, *Salmonella*-containing vacuole) (Bakowski et al., 2008). Une partie des bactéries intracellulaires altère l'intégrité de leur vacuole par la formation de pores, lors de la mise en place du SSTIII. Les *Salmonella* libres dans le cytosol sont ubiquitinylées et reconnues par les récepteurs de l'autophagie (Birmingham et al., 2006). La déficience de l'autophagie spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales chez les souris entraîne une augmentation de la colonisation par des *S. Typhimurium* et de l'inflammation intestinale (Conway et al., 2013). Plus récemment, une étude a montré que l'autophagie pouvait être bénéfique pour *S. Typhimurium* puisque l'autophagie répare des dommages causés par le SSTIII sur les SCV (Kreibich et al., 2015).

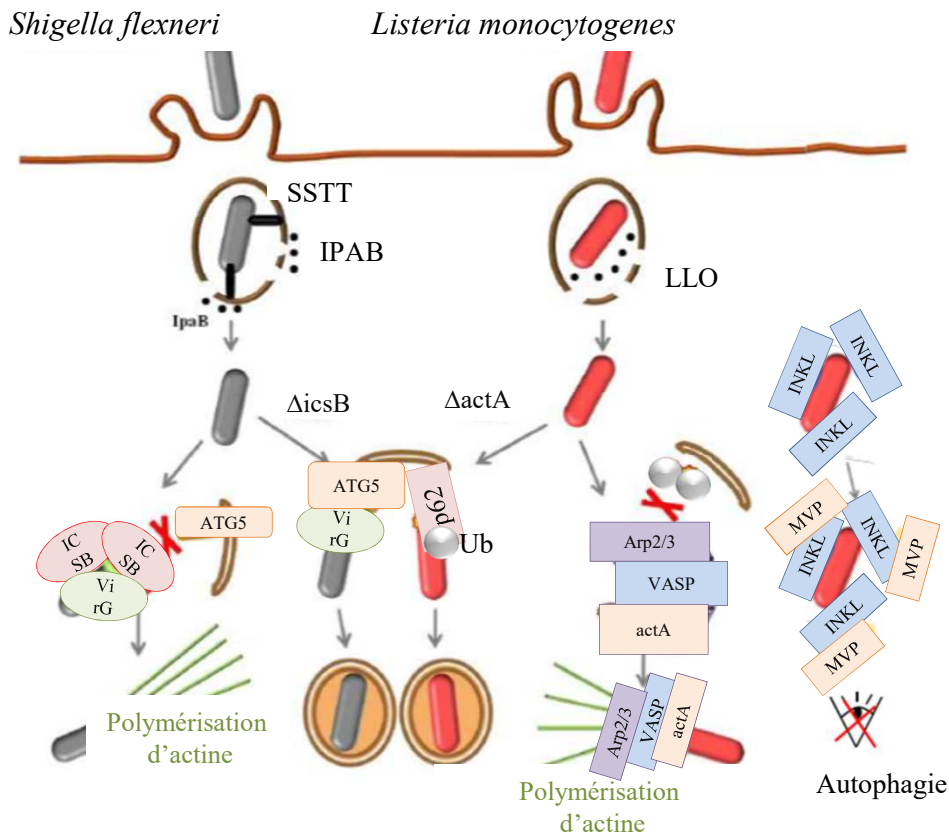
Lors d'une infection des cellules hôte par les *E. coli* adhérents et invasifs (AIEC) associés à la maladie de Crohn, l'autophagie est induite permettant le contrôle de la réplication intracellulaire des AIEC (Lapaquette et al., 2010, 2012). Un défaut de l'autophagie dans les cellules hôte conduit à une réplication intracellulaire augmentée des AIEC (Brest et al., 2011; Lapaquette et al., 2010, 2012; Nguyen et al., 2014). Les cellules de Paneth des patients atteints de maladie de Crohn et porteurs du variant à risque d'*ATG16L1* (*ATG16L1/T300A*) présentent une autophagie défectueuse et une persistance accrue des AIEC (Deuring et al., 2014).

Un autre exemple de bactéries contrôlées par la machinerie autophagie est le cas des *Streptocoques* du groupe A (ou GAS) (**figure 43**). Les GAS sont capables d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales mais également de s'échapper de leur phagosome initial en sécrétant une toxine bactérienne formant des pores dans les bicouches lipidiques, la streptolysine O (Sakurai et al., 2010). Les GAS cytoplasmiques recouverts de peptides mono ou poly-ubiquitinylés sont alors reconnus par le récepteur NDP52. Par ailleurs, une étude a montré que les GAS possèdent la capacité de sécréter des protéases qui vont dégrader les protéines de la cellule hôte impliquées dans l'adressage des bactéries à l'autophagosome, leur permettant ainsi d'éviter le processus autophagique (Barnett et al., 2013). Plus récemment, il a été montré que certains types cellulaires tels que les cellules endothéliales sont intrinsèquement déficients pour la xénophagie dirigée contre les GAS (Lu et al., 2017). Ceci suggère que les GAS possèdent différentes stratégies d'échappement de l'autophagie, en fonction du type cellulaire infecté et de la souche de GAS.

Enfin, une étude a montré que l'infection de macrophages murins par *Mycobacterium tuberculosis* entraîne l'activation de l'autophagie afin d'éliminer le pathogène (Singh et al., 2006) (**figure 43**). *M. tuberculosis* est capable d'inhiber la maturation et la fusion du phagosome dans lequel il se trouve avec le lysosome (Vergne et al., 2004) et de résister à l'environnement acide du lysosome (Vandal et al., 2008). Cependant *M. tuberculosis* provoque des dommages au niveau de la membrane du phagosome non mature. Ces dommages sont repérés par les récepteurs autophagiques SQSTM1 et NDP52, qui prennent en charge le phagosome contenant *M. tuberculosis* afin de le diriger vers la dégradation par le processus autophagique (Watson et al., 2012). Contrairement aux autres pathogènes cibles de l'autophagie, les mycobactéries ne sont pas uniquement reconnues par l'autophagie via un mécanisme dépendant de l'ubiquitinylation et des récepteurs autophagiques (Watson et al., 2012). Une étude a montré que les mycobactéries induisaient également une augmentation de la transcription des gènes de l'autophagie via un mécanisme dépendant de l'activation de TLR2 et indépendant de l'ubiquitinylation de la bactérie (Bah et al., 2016).

#### IV.3.3.5.2. Les bactéries qui bloquent et échappent à la machinerie autophagique

Afin d'échapper à la dégradation par l'autophagie, certaines bactéries ont acquis la capacité à moduler les voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'autophagie, à bloquer les différentes étapes du processus ou encore à se cacher afin d'éviter la reconnaissance par l'autophagie. *Shigella flexneri* en est un exemple bien décrit (**figure 44**). Ces bactéries traversent la barrière intestinale au niveau des cellules M, infectent les macrophages résidents, et induisent la mort de ceux-ci par apoptose. Les bactéries libres envahissent alors les entérocytes par le pôle basolatéral afin de se disséminer au sein de l'épithélium intestinal. *S. flexneri* lyse sa vacuole d'endocytose dans les cellules épithéliales intestinales (Haglund and Welch, 2011) ce qui entraîne une sécrétion accrue de TNF- $\alpha$ . L'inflammation induite entraîne le recrutement des récepteurs de l'autophagie p62 et NDP52 qui permettent l'adressage du pathogène à l'autophagosome (Mostowy et al., 2011). L'autophagie cible les *S. flexneri* cytoplasmiques via l'interaction entre la protéine de l'autophagie ATG5 et la protéine bactérienne Isc (iron-sulfur cluster protein)-A, aussi appelée VirG, exprimée à un pôle de la bactérie (Ogawa et al., 2005) et essentielle à la bactérie pour sa dissémination de cellule en cellule (Robbins et al., 2001). Toutefois, seules 10% des *S. flexneri* libres dans le cytoplasme sont prises en charge par ce processus. En effet, dans la plupart des cas, *S. flexneri* sécrète une protéine IscB qui se fixe sur IscA, masquant ainsi la



**Figure 44 : Les bactéries qui échappent à l'autophagie.**

*Shigella flexneri*, via un système de sécrétion (SST) de type III, sécrète l'effecteur bactérien IPAB responsable de la lyse de sa vacuole d'endocytose. La bactérie, libre dans le cytoplasme exprime la protéine bactérienne ICSB qui masque la reconnaissance de la protéine VIRG par la protéine de l'autophagie Atg5. La bactérie n'est pas prise en charge dans un autophagosome et peut se disséminer en recrutant à un de ses pôles la machinerie eucaryote nécessaire à la polymérisation d'actine (ARP2/3, N-WASP et CDC42). Un mutant pour la protéine IcsB ( $\Delta$ icsB), exposant VIRG, est lui séquestré et dégradé dans un autophagosome. *Listeria monocytogenes* s'échappe de sa vacuole d'endocytose en sécrétant la listériolysine O (LLO). Libre dans le cytoplasme, elle exprime la protéine ACTA qui va recruter les complexes protéiques de la cellule hôte ARP2/3 et VASP (permettant la polymérisation d'actine) et masque sa reconnaissance par l'autophagie. Un mutant pour la protéine ACTA ( $\Delta$ actA) fixe des peptides ubiquitinylés qui recrutent p62 et ce qui conduit à la séquestration et la dégradation de la bactérie dans un autophagolysosome. La protéine bactérienne INLK est ancrée à la surface de la bactérie et qu'une fois la bactérie à l'intérieur de la cellule hôte, la protéine INLK interagit avec les protéines cytoplasmiques MVP de l'hôte, masquant ainsi la bactérie de l'autophagie.

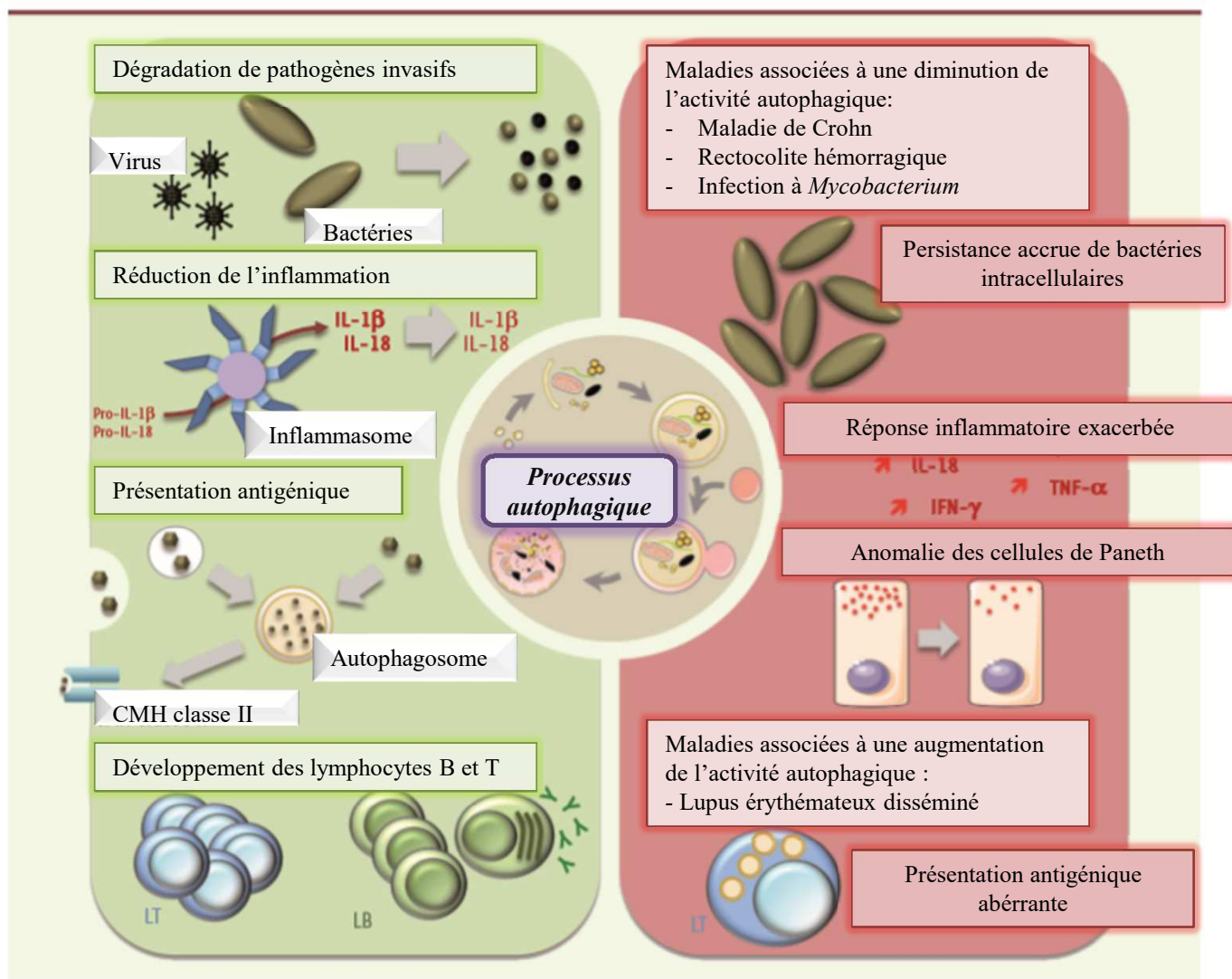
(Modifiée d'après Deretic, 2010)

reconnaissance de IscA par ATG5 et inhibant donc la prise en charge de *S. flexneri* par l'autophagie (Ogawa et al., 2005). Par ailleurs, un autre effecteur de la bactérie, VirA agit comme un inhibiteur de la GTPase Rab1, afin de limiter la formation de l'autophagosome et de favoriser la survie intracellulaire de *S. flexneri* (Dong et al., 2012).

*Listeria monocytogenes*, tout comme *S. flexneri*, est capable d'envahir les cellules hôte et de lyser la membrane de son phagosome via la production d'une toxine formant des pores dans la membrane, la listeriolysine O (LLO, listeriolysin O) (Molloy, 2012) (**figure 44**). La LLO, en exposant les *L. monocytogenes*, serait à l'origine d'un ciblage de ces bactéries par l'autophagie. Toutefois, plusieurs études *in vitro* ont mis en évidence la capacité de *L. monocytogenes* à échapper au mécanisme d'autophagie (Birmingham et al., 2008; Rich et al., 2003; Yoshikawa et al., 2009). Dans le cytoplasme, *L. monocytogenes* utilise sa protéine de surface ActA pour recruter de façon directe le complexe Arp2/3 (actin-related protein 2/3) et pour former des queues d'actine permettant la mobilité de *L. monocytogenes* et lui conférant ainsi la capacité de passer de cellules en cellules (May et al., 1999). Par sa capacité à recruter des organelles de la cellule hôte, ActA permet à *L. monocytogenes* de ne pas être ciblée pour la dégradation par l'autophagie (Dortet et al., 2012; Yoshikawa et al., 2009).

#### IV.3.3.5.3. Les bactéries qui se servent de l'autophagie à leur avantage

*Coxiella burnetii* est un exemple de bactérie se servant de l'autophagie pour son propre bien. Cette bactérie est retrouvée dans des vacuoles autophagiques moins de 24h après son internalisation (Gutierrez et al., 2005). Des études ont proposé un modèle selon lequel l'interaction des autophagosomes avec les vacuoles contenant *C. burnetii* apporterait un double avantage à cette dernière: (i) un ralentissement de la maturation du phagosome, en particulier, un ralentissement de la fusion avec les compartiments lysosomaux, et (ii) un apport de nutriments issus du cytosol dans la vacuole contenant la bactérie. Ainsi *C. burnetii* détournerait le processus autophagique pour convoier des nutriments dans sa vacuole et avoir le temps d'opérer les changements métaboliques nécessaires à sa survie (Boarbi et al., 2015). Enfin, il a été montré que BECLIN-1 et BCL-2 sont localisées sur la vacuole de *C. burnetii*, ce qui permettrait à la bactérie d'empêcher la mort de la cellule infectée par apoptose afin de pérenniser sa niche de réplication dans un autophagolysosome mature (Vázquez and Colombo, 2010). Des comportements semblables ont été décrits pour deux autres bactéries pathogènes, *Brucella abortus* dans les cellules épithéliales humaines (Starr et al., 2012) et *Legionella pneumophila* au sein des macrophages (Choy et al., 2012; Kubori et al., 2017).



**Figure 45 : Autophagie et immunité.**

L'autophagie joue un rôle majeur dans l'immunité puisque ce processus permet la dégradation des pathogènes invasifs, la modulation de la réponse inflammatoire et notamment de l'inflammasome, la présentation antigénique mais aussi le développement et la survie des lymphocytes T et B.

Des dérégulations du processus autophagique entraînent l'apparition de pathologies liées à la présence augmentée de pathogènes, la réponse immunitaire importante ou encore une présentation antigénique aberrante.

(D'après Lapaquette et al., 2017)

Enfin, l'invasion du cytoplasme cellulaire par *Staphylococcus aureus* induit l'activation de l'autophagie. Toutefois, cette bactérie bloque la fusion de l'autophagosome avec les lysosomes, entraînant une accumulation des autophagosomes intracellulaires non matures dont les bactéries se servent comme d'une niche de réplication (Huang et Brumell, 2014).

#### **IV.4. Rôles de l'autophagie dans l'immunité innée et adaptative**

L'autophagie permet d'optimiser la défense de l'hôte en exerçant plusieurs fonctions : (1) l'élimination directe des pathogènes ayant pénétré la cellule hôte au cours de la xénophagie, (2) la modulation de l'immunité innée et notamment l'inflammation, et (3) l'activation de l'immunité adaptative par la régulation de la prise en charge et la présentation d'antigènes (Netea-Maier et al., 2016) (**figure 45**).

##### **IV.4.1. Autophagie, immunité innée et inflammation**

Le lien entre l'autophagie et l'inflammation est bien établi et plusieurs études à l'échelle du génome ont mis en évidence une association entre des polymorphismes des gènes de l'autophagie [*ATG16L1*, *ULK1* et *IRGM* (immunity-related GTPase family M protein)] avec la maladie de Crohn. D'autres études ont mis en évidence des variants des gènes de l'autophagie dans des cas de maladies auto-immunes, tels que les gènes *IRGM* et *ATG5* dans le cadre du lupus érythémateux disséminé ainsi que dans les dérèglements immunitaires, tel que *ATG5* dans l'arthrite rhumatoïde (Deretic et al., 2013).

De plus, une étude a mis en évidence que l'autophagie peut inhiber l'activation de l'inflammasome dans un modèle murin de colite induite par le traitement au DSS (Saitoh et al., 2008). L'inflammasome est un complexe cytosolique multiprotéique de l'immunité innée qui répond aux signaux moléculaires associés aux pathogènes et aux dangers induisant l'activation de la caspase-1 nécessaire à la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18 (Rathinam et al., 2012).

En effet, lorsque le processus autophagique est bloqué, l'accumulation de mitochondries aberrantes et de ROS induit l'activation de l'inflammasome NLRP3 [NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3] qui pourrait entraîner l'apparition de dommages cellulaires (Nakahira et al., 2011). D'autres études ont suggéré que l'autophagie utilise la forme non active pro-IL-1 $\beta$  comme substrat de dégradation afin de diminuer la disponibilité en IL-1 $\beta$  active, limitant ainsi l'activation de l'inflammasome (Harris et al., 2011). Enfin, l'autophagie peut diminuer l'activation de l'inflammasome en dégradant directement les



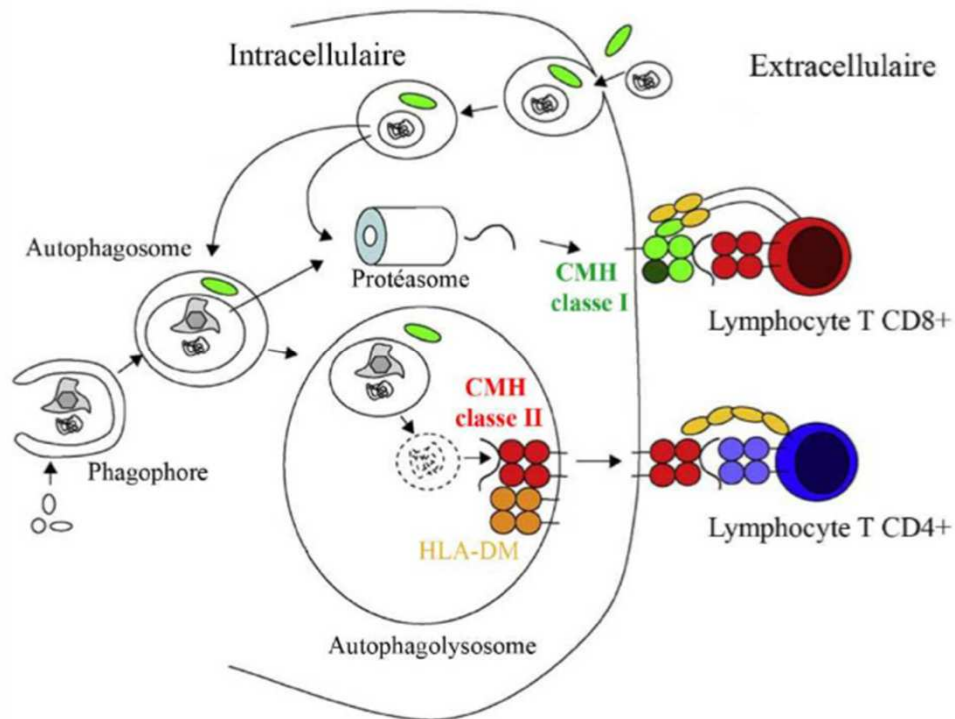
composés agrégés qui le composent, tels que la protéine ASC (apoptosis-associated speck-like protein), NLRP3 ou encore AIM2 (absent in melanoma 2) (Chuang et al., 2013; Shi et al., 2012). Au contraire, l'inflammasome régule l'activation de l'autophagie. Notamment, l'infection par *Shigella flexneri* entraîne l'activation de l'inflammasome NLRC4 (NLR family card domain containing 4) supprimant ainsi la formation des autophagosomes (Man and Kanneganti, 2015).

Par ailleurs, il existe une interaction entre l'autophagie et une voie majeure par laquelle la réponse inflammatoire est induite, la voie IKK (inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase)/NF- $\kappa$ B (Criollo et al., 2010). L'autophagie permet l'élimination de protéines ou de structures impliquées dans l'induction d'un état inflammatoire, telles que la kinase activatrice de NF- $\kappa$ B, IKK, permettant ainsi d'éviter une réponse inflammatoire trop intense qui peut conduire la cellule vers une mort cellulaire. Il a été montré que la kinase IKK, dans de nombreux cas, participe à l'induction du processus autophagique, par l'activation des kinases AMPK et JNK, mais de manière indépendante de NF- $\kappa$ B, suggérant un contrôle parallèle de l'autophagie en cas de stimuli inflammatoires activant IKK (composants bactériens par exemple) (Criollo et al., 2010).

Enfin, en réponse à une infection virale, l'autophagie peut aussi bien favoriser la production des interférons de type I par les cellules dendritiques (Zhou et al., 2012) ou les inhiber (Tal et al., 2009). Certains acteurs du processus autophagique tels que le complexe ATG5-ATG12 inhibent la production des INF-I via son interaction avec le récepteur RIG-1 et son adaptateur IPS-I (IFN-beta promoter stimulator I) (Jounai et al., 2007), ou encore ATG9, qui empêche la production des IFN-I en réponse à la présence d'ADN double brin dans le cytosol de la cellule via le blocage de l'assemblage de STING (stimulator of interferon genes) avec TBK1 (TANK-binding kinase 1) (Saitoh et al., 2009).

#### IV.4.2. Autophagie et immunité adaptative

L'autophagie joue un rôle dans l'immunité adaptative en participant notamment au développement des lymphocytes. Plusieurs études sur des modèles murins de délétion du gène *Atg5* ont mis en évidence une diminution du nombre de lymphocytes B et T (Pua et al., 2009; Stephenson et al., 2009). L'autophagie joue un rôle à plusieurs niveaux dans la mise en place des lignées lymphocytaires. Chez les souris, une activité autophagique très soutenue a été décrite dans les cellules épithéliales du thymus qui sont à l'origine de la sélection des clones de lymphocytes T afin d'éviter les réactions auto-immunes dans l'organisme (Mizushima et al., 2004). Ces cellules ont un transcriptome bien particulier puisqu'elles expriment des gènes



**Figure 46 : Contribution de l'autophagie dans la présentation des antigènes.**

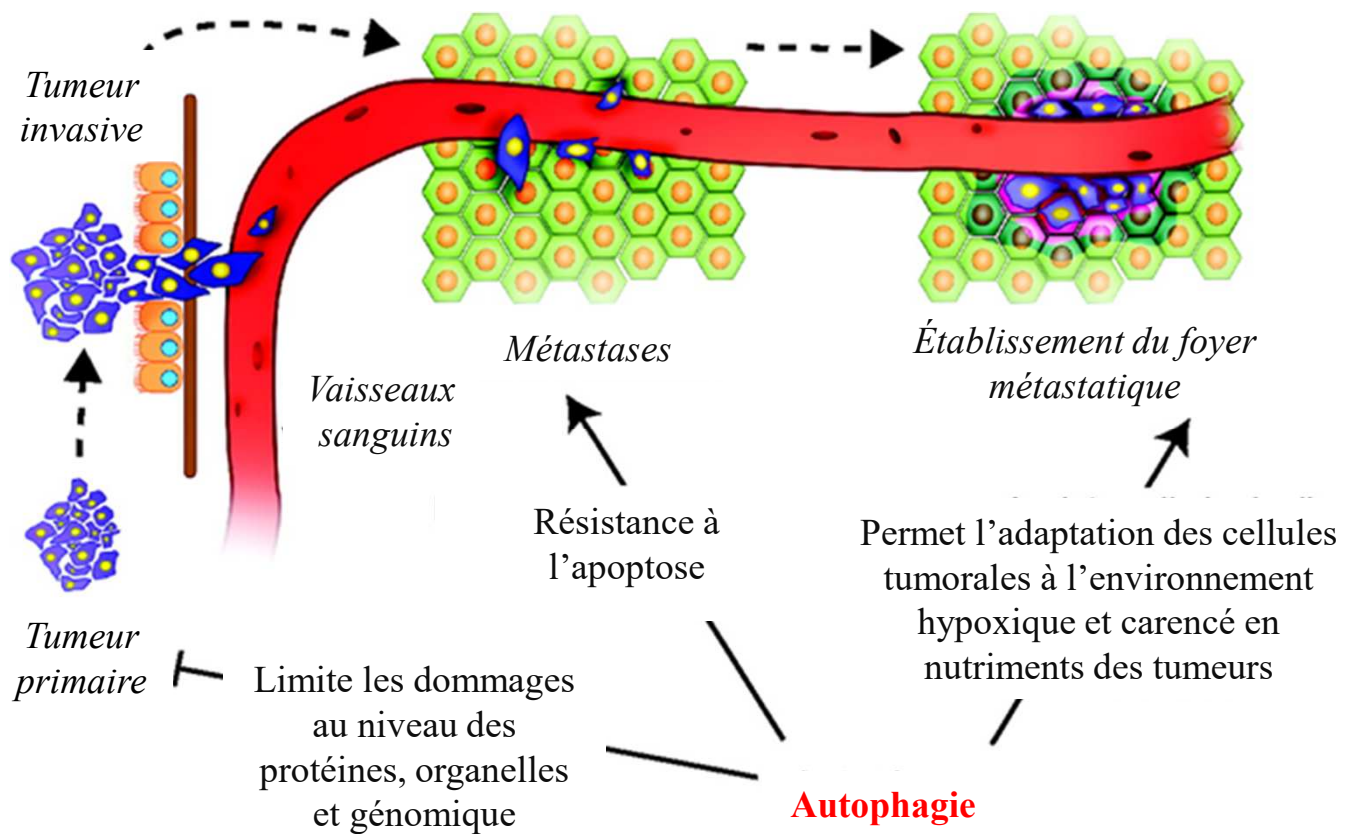
Lors de sa maturation, l'autophagosome fusionne avec des lysosomes porteurs de molécules du CMH de classe II. Ceci permet à l'autophagolysosome mature de produire des peptides antigéniques, qui sont pris en charge par les complexes formés par les molécules de classe II du CMH (HLA-DM) et présentés aux lymphocytes T CD4+. De plus, les peptides antigéniques produits par les autophagolysosomes peuvent être pris en charge dans le cytosol par le protéasome qui va générer des peptides chargés sur les molécules du CMH de classe I, servant à la présentation antigénique aux lymphocytes T CD8+. (Modifiée d'après Münz, 2010).

propres à certains tissus périphériques (Kyewski and Klein, 2006). Elles vont ensuite exprimer à leur surface les peptides correspondants via les molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II afin d'établir un répertoire correct de lymphocytes T CD4+. Chez des souris invalidées pour le gène *Atg5*, les sélections négatives et positives des cellules T sont affectées, ayant pour conséquence une sélection inappropriée des récepteurs des cellules T et une mauvaise élimination des cellules T CD4+ autoréactives (Nedjic et al., 2008). L'autophagie joue également un rôle dans la survie et la prolifération des lymphocytes T CD4+ et CD8+ en périphérie (Pua et al., 2007). En effet, chez des souris invalidées pour le gène *Atg5* dans les lymphocytes, les lymphocytes T arrivent à maturation, cependant, une mort cellulaire importante des lymphocytes T CD8+ en périphérie et une incapacité des lymphocytes T CD4+ et T CD8+ à proliférer suite à l'activation de leur récepteur TCR ont été observées.

La présentation des antigènes à la surface des cellules par les molécules du CMH est essentielle pour l'activation des lymphocytes T et donc la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace. Deux classes de molécules du CMH sont distinguées. Les molécules du CMH de classe I ont pour rôle de présenter des antigènes issus d'événements intracellulaires (infection virale, présence de bactéries intracellulaires) à des lymphocytes T CD8+. Les molécules du CMH de classe II, exprimées de manière constitutive par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (cellules dendritiques, lymphocytes B ou macrophages), sont chargées de présenter des antigènes issus du milieu extracellulaire à des lymphocytes T CD4+ (Crotzer and Blum, 2009). L'autophagie a été décrite comme une source d'antigènes pour les 2 classes de molécules du CMH. En effet, les autophagosomes, au cours de leur maturation, fusionnent avec des lysosomes porteurs de molécules du CMH de classe II (Schmid and Münz, 2007). L'autophagie fonctionne en transportant les protéines du cytoplasme vers la lumière des compartiments qui s'occupe des antigènes. Cette propriété peut être artificiellement exploitée en fusionnant des antigènes (comme des protéines du virus influenza) sur LC3 pour augmenter la présentation de ces antigènes par le CMH de classe II aux cellules T CD4+ (Schmid and Münz, 2007) (**figure 46**).

L'autophagie affecte la voie conventionnelle de présentation des antigènes via le CMH de type I par un mécanisme de compétition avec le protéasome pour la dégradation des protéines cytosoliques nouvellement synthétisées (Wenger et al., 2012).

Enfin, l'autophagie a été décrite comme participant à la production de peptides antigéniques pour une présentation par les molécules du CMH de classe I en réponse à une



**Figure 47 : Rôle complexe de l'autophagie dans les cancers.**

L'autophagie joue un rôle complexe dans les cancers puisque selon le contexte, l'autophagie peut-être pro- ou anti-tumoral.

L'autophagie joue un rôle anti-tumoral en limitant les dommages au niveau des protéines, organites et au niveau génomique. De ce fait, l'autophagie empêche la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse.

Dans le cas d'une cellule cancéreuse, l'autophagie joue un rôle pro-tumoral en favorisant la survie de la cellule contre l'apoptose et en permettant l'adaptation de la cellule à l'environnement pauvre en nutriments et en oxygène des tumeurs.

(Modifiée d'après Liu et al., 2012)

infection par le virus Herpes Simplex Virus type 1 (English et al., 2009) et ceci par un mécanisme non décrit à ce jour.

## **IV.5. Implication de l'autophagie dans les cancers**

Des dérégulations de l'autophagie sont souvent associées à différentes pathologies telles que les maladies neurodégénératives, les maladies inflammatoires chroniques, ou les cancers (Levine and Kroemer, 2008). Dans ce manuscrit, nous nous sommes focalisés sur le rôle de l'autophagie dans les cancers, en particulier le CCR.

De nombreux travaux ont permis d'établir un lien étroit entre l'autophagie et la carcinogenèse (Singh et al., 2018). Cependant, le rôle de l'autophagie dans la carcinogenèse est paradoxal puisqu'il peut être pro- ou anti-tumoral selon le contexte (**figure 47**).

### **IV.5.1. L'autophagie et la suppression tumorale**

La première évidence de la relation entre l'autophagie et le cancer a été établie en 1999 après la mise en évidence de *BECLIN 1* comme possible gène suppresseur de tumeur (Liang et al., 1999). De plus, Wang et collaborateurs ont mis en évidence que la suppression de l'autophagie *via* la phosphorylation de BECLIN 1 favorise le développement du cancer (Wang et al., 2012b). D'autres composants du complexe autophagique PI3K/BECLIN1 tels que UVRAG participent au contrôle de la prolifération cellulaire supprimant ainsi le développement tumoral (Liang et al., 1999; Takahashi et al., 2007). De plus, la délétion partielle du gène *Atg5* dans un modèle murin entraîne le développement de tumeurs bénignes au niveau du foie. Enfin, des souris présentant une délétion spécifique du gène *Atg7* au niveau du foie développent aussi la formation de tumeurs bénignes (Takamura et al., 2011). Plusieurs études ont mis en évidence les mécanismes impliqués dans le rôle anti-tumoral de l'autophagie.

#### **IV.5.1.1. Autophagie et stabilité génomique**

L'un des rôles majeurs de l'autophagie afin de prévenir la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse est le maintien de la stabilité du génome. Notamment, le stress métabolique peut avoir un impact direct sur la stabilité du génome. Le stress métabolique est caractérisé par l'accumulation de protéines mal appariées ou mal repliées, généralement associé à une hyperproduction de ROS. En condition physiologique, l'autophagie permet de diminuer ce stress. En revanche, la déficience en autophagie favorise la mise en place du stress métabolique au sein de la cellule, ayant des effets délétères pour cette dernière. En effet,

en 2007, Mathew et collaborateurs ont montré pour la première fois le rôle protecteur de l'intégrité du génome de l'autophagie. Les auteurs ont montré qu'une déficience du gène *Atg5* dans des cellules iBMK (pour Immortalized Baby Mouse Kidney epithelial cells) entraîne une augmentation des mutations, des dommages à l'ADN et de l'instabilité chromosomique associée à une aneuploïdie importante, connus pour favoriser la tumorigénèse (Mathew et al., 2007). Les mêmes auteurs ont mis en évidence le rôle pro-métastatique d'un défaut de l'autophagie, lié à l'accumulation d'agrégats de p62 entraînant la production de ROS, l'accumulation de dommages à l'ADN ainsi qu'une instabilité chromosomique (Mathew et al., 2009).

Comme évoqué précédemment, les souris déficientes pour les gènes *Atg5* ou *Atg7* au niveau du foie développent des adénomes précoces hépatiques liés à une accumulation de mitochondries endommagées, de ROS et de dommages à l'ADN (Takamura et al., 2011).

Enfin, une étude sur un modèle murin prédisposé au développement de tumeurs au niveau du foie (souris traitées avec l'agent carcinogène diethylnitrosamine) a mis en évidence que suite au traitement par le diethylnitrosamine, l'autophagie est activée afin d'inhiber les dommages à l'ADN ainsi que l'instabilité génomique induits par l'agent carcinogène (Xie et al., 2011) confirmant le rôle protecteur de l'autophagie sur le maintien de la stabilité génomique.

#### IV.5.1.2. Autophagie et inflammation

La déficience de l'autophagie entraîne l'activation de l'inflammasome, caractérisée par la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18. Ce phénomène serait lié à l'accumulation des ROS dans les cellules déficientes pour l'autophagie. Les ROS activent un médiateur de l'inflammasome, NLRP3, qui entraîne le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  mature sécrétée ensuite par la cellule. Les ROS sont capables d'activer d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$  et IL-6 (Bulua et al., 2011).

Lors des étapes précoces de la tumorigénèse, la mise en place d'un stress hypoxique et métabolique peut conduire à l'apparition de signaux nécrotiques. La nécrose est caractérisée par une lyse cellulaire massive entraînant le relargage du contenu cytoplasmique. Les signaux nécrotiques sont des signaux majeurs d'induction de l'inflammation. En réponse à ces stress, l'autophagie est activée afin de réduire la nécrose et l'inflammation, ayant pour conséquence le ralentissement de la progression tumorale (Degenhardt et al., 2006).

Enfin, une étude a montré qu'une déficience de l'autophagie entraîne une augmentation des niveaux d'expression des médiateurs de l'inflammation, tels que TNF- $\alpha$ ,

IL-1 $\beta$  et IL-6, dans un modèle murin de cancer du foie induit par le carcinogène diethylnitrosamine (Xie et al., 2011).

#### IV.5.1.3. Autophagie et sénescence cellulaire

Des études ont mis en évidence un lien entre l'autophagie et la sénescence cellulaire, étape importante de la défense anti-tumorale. La sénescence est mise en place suite à l'expression aberrante de signaux prolifératifs induits par des oncogènes (Gewirtz, 2009). Une étude a montré que la surexpression d'ULK3 entraîne l'activation de l'autophagie et de la sénescence cellulaire. De plus, l'inhibition de l'autophagie retarde le phénotype de sénescence cellulaire (Young et al., 2009). En 2014, une revue met en évidence que la délétion du gène *Atg5* est associée à un contournement de la sénescence (Liu et al., 2014). Ces résultats mettent en évidence le rôle majeur de l'autophagie dans la mise en place de la sénescence, conduisant ainsi à la prévention de la prolifération des cellules anormales.

#### IV.5.2. L'autophagie, un acteur pro-tumoral

Au sein d'une tumeur déjà établie, le rôle de l'autophagie est de répondre aux forts besoins métaboliques des cellules cancéreuses en constante prolifération. Les cancers présentant des mutations dans les gènes H-RAS et K-RAS sont très dépendants de l'autophagie et présentent une forte activation de l'autophagie (Kim et al., 2011b). Cette forte activation de l'autophagie permet la dégradation et le recyclage de nombreux composés augmentant les ressources métaboliques disponibles pour les cellules cancéreuses (Liu and Ryan, 2012). La faible disponibilité en oxygène active l'autophagie de manière dépendante ou non de HIF-1 $\alpha$  favorisant la survie des cellules tumorales (Bellot et al., 2009). Plusieurs études ont mis en évidence qu'une inhibition de l'autophagie entraîne la mort des cellules cancéreuses. Notamment, une délétion du gène FIP200 entraîne la réduction du développement des tumeurs mammaires (Wei et al., 2011). De plus, l'inhibition de l'autophagie entraîne une régression du développement des tumeurs dans des modèles de xénogreffes et de cancer du pancréas (Yang et al., 2011).

En conclusion, l'adaptation des cellules cancéreuses aux différents stress fait de l'autophagie un mécanisme favorisant la survie de ces dernières.

##### IV.5.2.1. Autophagie et adaptation métabolique

L'autophagie joue un rôle pro-tumoral en apportant à la cellule cancéreuse l'énergie nécessaire à sa croissance. Le changement de métabolisme opéré par la cellule cancéreuse a

été nommé « l'effet Warburg » et est caractérisé par une augmentation de la glycolyse aérobie (Liberti and Locasale, 2016). A l'instar des cellules saines, les cellules cancéreuses ont besoin des mitochondries afin de leur fournir l'énergie nécessaire à leur croissance. La mitophagie est alors indispensable afin de conserver le maximum de mitochondries saines utiles à la cellule cancéreuse très demandeuse en énergie (White, 2015).

#### IV.5.2.2. Autophagie, prolifération cellulaire et angiogenèse

Le maintien de la prolifération cellulaire est une caractéristique majeure des cellules cancéreuses qui contournent les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire afin de proliférer de façon continue. Les dérégulations de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR observées dans des nombreux cas de cancers pourraient être à l'origine d'une diminution de l'activité protectrice de l'autophagie. En effet, une étude a montré que la voie mTOR inhibe la protéine autophagique AMBRA1, qui régule la prolifération cellulaire via la déphosphorylation de c-MYC (Cianfanelli et al., 2015), pouvant augmenter le risque de développement tumoral. De plus, la délétion du gène *Atg7* dans un modèle murin de cancer du poumon entraîne la régression tumorale (Guo et al., 2013).

La formation de nouveaux vaisseaux (*i.e.* angiogenèse) est indispensable au développement tumoral. Pour ce faire, les cellules tumorales produisent le VEGF ainsi que d'autres facteurs de croissance qui activent des voies de signalisation afin de stimuler la croissance de nouveaux vaisseaux. Des études ont montré que la mise en place de ces nouveaux vaisseaux apporte de nouveaux nutriments aux cellules cancéreuses et leur permet l'invasion et éventuellement la mise en place de métastases (Cavallaro and Christofori, 2000). Les thérapies anti-angiogéniques à base d'inhibiteurs du VEGF par exemple permettent de limiter la prolifération cellulaire et d'induire la mort cellulaire. Cependant, la perte des vaisseaux sanguins néoformés provoque une forte hypoxie qui entraîne l'activation de l'autophagie. L'autophagie permet à la cellule cancéreuse de s'adapter au stress hypoxique et est responsable de résistance aux traitements anti-angiogéniques. Les mécanismes précis par lesquels l'autophagie entraîne une résistance aux traitements anti-angiogéniques ne sont pas décrits. Cependant, des études ont montré que l'utilisation des inhibiteurs de l'autophagie couplés à des inhibiteurs de l'angiogenèse favorise la mort cellulaire (Hu et al., 2012; Nishikawa et al., 2010).

#### IV.5.2.3. Autophagie et dormance tumorale

Le phénomène de dormance tumorale est caractérisé par la persistance de cellules cancéreuses résiduelles dont le cycle cellulaire est arrêté en phase G0-G1 pendant des



périodes prolongées et qui est à l'origine de la réapparition de cancer après un traitement ou suite à une longue période de rémission. Il a été émis l'hypothèse que la dormance tumorale pourrait induire l'autophagie de façon à protéger la cellule dormante de stress extérieurs, permettant ainsi la survie de la cellule pendant une longue période (Kenific et al., 2010). Le lien entre dormance tumorale et autophagie a été mis en évidence dans un modèle de xénogreffe de cancer de l'ovaire, où l'injection du suppresseur de tumeur ARH (ADP-ribosylarginine hydrolase)-1 entraîne l'activation de l'autophagie et la mise en place d'une dormance de la tumeur (Lu et al., 2008). La reprise de la prolifération cellulaire a été effective uniquement après l'inhibition du processus autophagique.

Récemment, une étude a mis en évidence l'implication de l'autophagie dans la survie des cellules cancéreuses dormantes disséminées (Vera-Ramirez et al., 2018). En effet, l'inhibition génétique ou pharmacologique de l'autophagie dans les cellules en dormance de cancer du sein entraîne une réduction significative de la survie et de la charge métastatique dans des modèles précliniques de dormance cellulaire. Ceci était provoqué par une accumulation de mitochondries endommagées et de ROS activant les voies apoptotiques (Vera-Ramirez et al., 2018).

#### IV.5.2.4. Autophagie et métastases

Les cellules tumorales ont la capacité d'envahir et de coloniser de nouveaux tissus afin d'établir des métastases. L'autophagie peut jouer un rôle pro-tumoral en intervenant dans ces processus de colonisation. Notamment, l'autophagie est activée par de nombreux stress cellulaires connus comme pouvant favoriser les métastases tels que l'accumulation des ROS, les carences en nutriments et en hypoxie et le détachement de l'épithélium. De plus, des études ont mis en évidence une augmentation de l'autophagie dans les cellules métastatiques.

Par exemple, les métastases de mélanome présentent une augmentation de LC3-II comparativement au foyer tumoral primaire (Lazova et al., 2010). Dans les cas de glioblastome, l'autophagie est associée à un phénotype plus agressif et invasif (Galavotti et al., 2013). D'un point de vue mécanistique, l'autophagie permet à la cellule métastatique de résister à l'anoïkis et favorise la survie des cellules malgré leur détachement de l'épithélium. De plus, elle favorise la dissémination et la motilité des cellules cancéreuses (Mowers et al., 2016, 2017).

#### IV.5.2.5. Autophagie et maintien des cellules souches cancéreuses

Si la majorité des cellules cancéreuses sont différenciées, une population de cellules tumorales présente des caractéristiques de cellules non différenciées, ce sont les cellules

souches cancéreuses (ou CSC). Les CSC sont caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement, de multi-potentialité et de plasticité et sont intimement liées au développement tumoral et à l'échappement métastatique. Des études ont mis en évidence le rôle majeur de l'autophagie dans la survie et la résistance des CSC (Bellodi et al., 2009; Boya et al., 2018; Chen et al., 2018b).

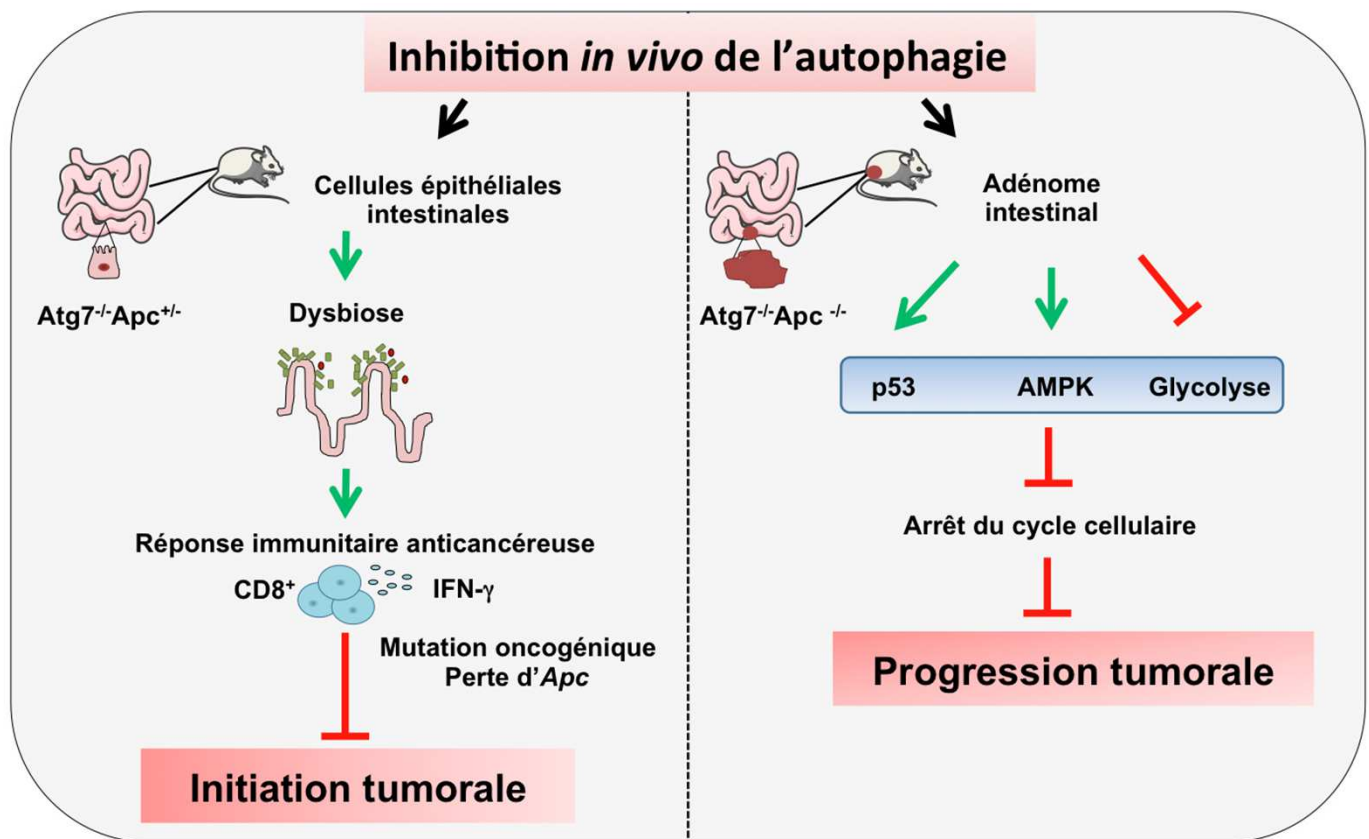
Par ailleurs, l'inhibition de l'autophagie, par traitement au 3-méthyladenine et à la bafilomycine A1, sensibilise les CSC aux rayons  $\gamma$  (Lomonaco et al., 2009). De même, les CSCs de la leucémie myéloïde chronique sont potentiellement résistantes aux thérapies utilisant des inhibiteurs de tyrosine kinases. De plus, il apparaît que l'autophagie est un des mécanismes impliqués dans cette résistance (Helgason et al., 2013). Ainsi, la suppression de l'autophagie, par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques (3-méthyladenine, bafilomycine A1 et chloroquine) ou d'ARN interférents ciblant des gènes clés de l'autophagie (*Atg5* et *Atg7*), entraîne une quasi-complète élimination des CSCs de la leucémie myéloïde chronique (Bellodi et al., 2009). L'ensemble de ces données illustrent clairement le rôle pro-tumoral de l'autophagie, faisant de ce processus une cible intéressante dans le cadre de traitements thérapeutiques.

#### IV.4.3. Processus autophagique et CCR

Comme dans les autres cancers, il semble que l'autophagie puisse jouer un rôle anti-ou pro-tumorale dans le cadre du cancer colorectal, selon le contexte.

En effet, une augmentation du niveau de LC3-II a été observée dans les tumeurs colorectales comparativement aux tissus sains chez des patients atteints de CCR (Zheng et al., 2012). Dans cette même étude, une corrélation positive entre le niveau de la protéine LC3-II et l'agressivité tumorale a été également rapportée (Zheng et al., 2012). De même, une augmentation de l'expression d'ATG10 a été associée à l'invasion des tumeurs et l'apparition de métastases (Jo et al., 2012a). De plus, les taux de survie à 5 ans et de survie globale des patients porteurs de tumeurs n'exprimant pas ATG10 étaient significativement plus élevés que ceux des patients porteurs de tumeurs exprimant ATG10 (Jo et al., 2012a).

Par ailleurs, la surexpression des microARN 140-5p, 502 et 140 inhibe l'autophagie, entraînant l'inhibition de l'invasion et la prolifération cellulaire, l'arrêt du cycle cellulaire, l'inhibition de la croissance des cellules souches tumorales ainsi que l'inhibition de la capacité des cellules à former des sphères (Zhai et al., 2015). *In vivo*, la surexpression du miR-140 réduit la tumorigénèse et retarde la mise en place de métastases. Le miR-140 est



**Figure 48 : Mécanismes pro-tumoraux de l'autophagie dans le CCR décrit par Lévy et al., 2015.**

L'inhibition conditionnelle de l'autophagie dans les cellules épithéliales intestinales inhibe la formation de lésions précancéreuses chez les souris *Apc*<sup>+/-</sup>. Cet effet passe par la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale. La délétion du gène de l'autophagie *Atg7* (souris *Apc*<sup>+/-</sup>*Atg7*) entraîne la mise en place d'une dysbiose intestinale et ce microbiote est requis pour la mise en place de la réponse anti-tumorale. De plus, la déficience de *Atg7* entraîne l'apparition d'un stress accompagné de désordres métaboliques, de l'activation de la voie de signalisation AMPK et de l'arrêt du cycle cellulaire via p53 dans les cellules cancéreuses. Cette étude montre que l'inhibition de l'autophagie dans les cellules épithéliales intestinales inhibe le développement et la progression du CCR dans un modèle préclinique de CCR.

(D'après Lévy et al., 2015)

donc un facteur de bon pronostic chez les patients atteints de CCR de stade tardif. Par ailleurs, la même étude a mis en évidence la diminution progressive de l'expression de miR-140 de la muqueuse colique normale vers les tissus cancéreux primaires. Cette diminution d'expression est d'autant plus marquée dans les foyers cancéreux secondaires (Zhai et al., 2015).

Enfin, une seule étude fonctionnelle *in vivo* a été réalisée à ce jour chez des souris déficientes pour le gène *Apc* spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales de manière inductible au tamoxifène (souris *VilCreER<sup>T2</sup>Apc<sup>lox/+</sup>* ou *Apc<sup>+/-</sup>*). Les auteurs ont montré que l'inactivation du gène *Atg7* spécifiquement au niveau des cellules épithéliales intestinales (souris *VilCreER<sup>T2</sup>Apc<sup>lox/+</sup>Atg7<sup>lox/lox</sup>* ou *Apc<sup>+/-</sup>Atg7<sup>ACEI</sup>*) permet à la fois d'inhiber l'initiation mais également la progression tumorale (Lévy et al., 2015). L'étude mécanistique a mis en évidence deux mécanismes différents en fonction du contexte (**figure 48**) : L'inhibition de l'autophagie au stade précoce, au sein d'une cellule épithéliale encore saine, entraîne une perturbation de l'intégrité de l'épithélium intestinal avec des défauts au niveau des cellules sécrétrices (Paneth et Goblet) et une augmentation de la perméabilité intestinale. Ces défauts entraînent la mise en place d'une dysbiose intestinale chez les souris *Apc<sup>+/-</sup>Atg7<sup>-/-</sup>* caractérisée notamment par une augmentation des *Firmicutes* et une diminution des *Proteobactéries* dans les fèces. De manière intéressante, la muqueuse des souris *Apc<sup>+/-</sup>Atg7<sup>-/-</sup>* présentait une diversité bactérienne plus importante que celle des souris *Apc<sup>+/-</sup>*, et une augmentation de l'abondance en bactéries productrices du butyrate. Cette dysbiose intestinale était accompagnée par la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale caractérisée par une forte infiltration des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et Th1 au sein des tumeurs des souris *Apc<sup>+/-</sup>Atg7<sup>-/-</sup>*, ce qui n'était pas observé chez les souris *Apc<sup>+/-</sup>*. De plus, la production des cytokines CX3CL1, CXCL9 et CXCL10 est augmentée chez les souris *Apc<sup>+/-</sup>Atg7<sup>-/-</sup>*. Cela met en évidence une réponse immunitaire de type anti-tumoral chez les souris déficientes pour l'autophagie. Au stade plus tardif du développement du CCR, la perte de l'autophagie est responsable d'un stress métabolique, de l'activation de l'AMPK et d'un arrêt du cycle cellulaire permettant ainsi de ralentir la progression tumorale (Lévy et al., 2015).

De plus, une étude a montré qu'une inhibition de l'autophagie exerce un effet anti-tumoral suite à l'activation l'apoptose induite par p53 et par l'accumulation de stress au niveau du réticulum (Sakitani et al., 2015). Ces données soutiennent le rôle pro-tumoral de l'autophagie dans la carcinogenèse colorectale.

Néanmoins, il a été rapporté un rôle anti-tumoral de l'autophagie dans le cadre du CCR. En effet, une étude a montré que la protéine autophagique ATG5 est bien exprimée dans les cellules épithéliales normales du côlon, alors qu'elle est absente dans 22% des

carcinomes colorectaux. Ceci suggère que la perte d'expression du gène *ATG5* pourrait jouer un rôle dans la carcinogenèse colorectale (An et al., 2011). De plus, des patients atteints de CCR et présentant une expression élevée de BECLIN1 ont une meilleure survie (Yang et al., 2015). *In vitro*, la surexpression de BECLIN1 inhibe la prolifération des cellules cancéreuses et augmente les effets anti-tumoraux de la rapamycine, un inhibiteur de la voie mTOR (Chen et al., 2013). De plus, une étude a mis en évidence la présence de mutations avec un décalage du cadre de lecture des gènes *ATG2b*, *ATG9* et *ATG5* dans des carcinomes colorectaux de phénotype MSI-H (Kang et al., 2009).

Ces études laissent penser que l'autophagie pourrait jouer un rôle de suppresseur de tumeurs colorectales. Aussi, le rôle de l'autophagie dans le CCR reste encore aujourd'hui mal décrit.

A ce jour, une étude a établi un lien entre une infection par une bactérie, *Fusobacterium nucleatum*, l'autophagie et le développement du CCR. Suite à l'infection par *F. nucleatum*, les auteurs ont mis en évidence par séquençage haut débit, une augmentation de l'expression de 1466 gènes dans les cellules de cancer de côlon humain, HT-29. En particulier, les gènes impliqués dans la formation des autophagosomes, les lysosomes, la régulation de l'autophagie et l'apoptose étaient augmentés dans les cellules infectées (Yu et al., 2017). De plus, *F. nucleatum* augmente l'expression de plusieurs éléments régulateurs de l'autophagie tels que phospho-AMPK, phospho-ULK1, ULK1, et *ATG7* et favorise la conversion de la forme LC3-I vers la forme LC3-II signifiant l'activation de l'autophagie. Les auteurs ont montré que la co-incubation de *F. nucleatum* avec des agents de chimiothérapie, l'Oxaliplatine et le 5-fluorouracil diminue les effets de ces drogues via une diminution de l'apoptose comparativement aux cellules non infectées. Ceci suggère que *F. nucleatum* favorise la chimiorésistance des cellules infectées. De manière intéressante, la co-incubation de *F. nucleatum* avec la chloroquine, un inhibiteur de la fusion autophagosome/lysosome, n'entraîne plus d'effet de résistance à l'apoptose suite à l'administration des drogues de chimiothérapie. Les mêmes auteurs ont montré que l'infection par *F. nucleatum* entraîne l'activation de l'autophagie et augmente l'expression des protéines *ATG7* et *ULK1* via l'inhibition de deux microARN, miR-18a et miR-4802, par la voie de signalisation TLR4/MYD88.

Cette étude a mis en évidence un rôle pro-tumoral de l'autophagie *via* la mise en place d'une chimiorésistance aux drogues couramment utilisées dans le CCR et constitue un exemple de la modulation de l'autophagie par un pathogène afin de favoriser le CCR.

Agent	Mode d'action	Statuts
<b>Activateurs</b>		
A-769662	Activation de la voie AMPK	Développement pré-clinique
Antimycobacterial antibiotics	Altère la production de ROS	Approuvé: Traitement des infections aux mycobactéries
BECN1-derived peptide	Active BECLIN1	Développement pré-clinique
BRD5631	Non décrit	Développement pré-clinique
Carbamazepine	Reduction in Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> and inositol levels	Approuvé: Traitement des troubles bipolaire
Chloramphenicol	Non décrit	Approuvé: traitement des infections
Everolimus	Inhibition de mTORC1	Approuvé : thérapie anti-cancer
IFN $\gamma$	Activation de la voie AMPK	Etude clinique : Immunothérapie anti-cancer
Lithium	Reduction in Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> and inositol levels	Approuvé: Traitement des troubles bipolaire
Metformin	Activation de la voie AMPK	Approuvé: Traitement du diabète de type 2
Rapamycin (ou sirolimus)	Inhibition de mTORC1	Approved for use in coronary stents (to prevent transplant rejection) and to treat a rare pulmonary disease
Resveratrol	CRM	Nutritional supplement that is available over the counter; in clinical trials for treatment of several disorders
Retinoic acid	Non décrit	Approuvé : thérapie anti-cancer
Simvastatin	Activation de la voie AMPK	Approuvé : traitement de l'obésité
Spermidine	CRM	Nutritional supplement that is available over the counter
Temsirolimus	Inhibition de mTORC1	Approuvé : thérapie anti-cancer
Trehalose	Non décrit	In clinical trials for treatment of bipolar disorders, dry eye syndrome and vascular ageing
Vorinostat	Non décrit	Approuvé : thérapie anti-cancer
<b>Inhibiteurs</b>		
Azithromycin	Non décrit	Approuvé: traitement des infections
Cardiac glycosides	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase inhibition	Extensively used in the past for treatment of cardiac disorders
Chloroquine	Inhibition lysosomale	Extensively used in the past as an antimalarial agent
Dorsomorphine	Activation de la voie AMPK	Développement pré-clinique
HCQ	Inhibition lysosomale	Extensively used in the past as an antimalarial agent
LY294002	Inhibition de VPS34	In clinical trials for the treatment of refractory neuroblastoma
Lys05	Inhibition lysosomale	Développement pré-clinique
Mdivi-1	Mitophagy inhibition	Développement pré-clinique
Mélatonine	Altère la production de ROS	In clinical trials for treatment of a wide panel of conditions
MRT67307	Inhibition de ULK1	Développement pré-clinique
MRT68921	Inhibition de ULK1	Développement pré-clinique
NSC185058	Inhibition de ATG4B	Développement pré-clinique
SAR405	Inhibition de VPS34	Développement pré-clinique
SBI-0206965	Inhibition de ULK1	Développement pré-clinique
VPS34-IN1	Inhibition de VPS34	Développement pré-clinique

**Tableau 3 : Tableau répertoriant les modulateurs de l'autophagie, leur mode d'action et leur statut clinique.**

Dans ce tableau sont répertoriés les modulateurs (activateurs et inhibiteurs) de l'autophagie, leurs modes d'action ainsi que leurs statuts cliniques.

(D'après Galluzzi et al., 2017)

#### IV.4.4. La modulation de l'autophagie dans les cancers : stratégies thérapeutiques.

Des dérégulations du processus sont à l'origine de nombreux cas de cancers et les études axées sur la modulation de l'autophagie comme perspective et cible thérapeutiques sont en constante augmentation. Certains modulateurs de l'autophagie, comme la rapamycine, un inhibiteur de mTOR, et ses dérivés hydrosolubles (temsirolimus et everolimus), sont déjà utilisés dans les thérapies contre le cancer. En 2007 et 2009, respectivement, le temsirolimus et l'everolimus ont été approuvés par la FDA (Food and drug administration) pour le traitement du carcinome rénal avancé. En 2011, la FDA a également approuvé l'utilisation de l'everolimus pour le traitement des cancers du sein hormonaux-dépendants en association avec l'exemestane, un agent de chimiothérapie couramment utilisé pour ce type de cancer du sein (Marinković et al., 2018). Les modulateurs de l'autophagie, leur implication actuelle dans les protocoles d'études et d'essais cliniques ainsi que les limites de leur utilisation ont été résumés dans la revue par Galluzzi *et al.* en 2017 (Galluzzi et al., 2017) (**tableau 3**).

Dans le contexte du cancer, plusieurs essais cliniques portant sur l'utilisation d'un inhibiteur de la fusion entre l'autophagosome et les lysosomes, la chloroquine, seul ou en combinaison avec des agents de chimiothérapie ont été réalisés chez des patients atteints de lymphome, de mélanome et de glioblastome. Ces approches ont fait l'objet d'études cliniques de phase II et III en Europe et aux Etats-Unis (ClinicalTrials.gov). Cependant, aucune de ces études n'a pu mettre en évidence les bénéfices thérapeutiques de l'inhibition de l'autophagie sur les cellules cancéreuses. En revanche, les stratégies de restriction calorique ou l'administration de molécules mimant une carence en nutriments augmentent l'efficacité thérapeutique de la cisplatine, le cyclophosphamide, et le doxorubicine dans des modèles d'allogreffes de cancer du sein, de gliome, de neuroblastome et cancer de l'ovaire (Lee et al., 2012) ainsi que du mitoxantrone et de l'oxaliplatine dans un modèle murin de fibrosarcome (Pietrocola et al., 2016). De plus, la présence de marqueurs de l'activation de l'autophagie dans des cellules cancéreuses est associée avec une augmentation de l'immuno-surveillance et l'amélioration du devenir des patients atteints de cancer du sein et traités avec des anthracyclines, une famille d'agents de chimiothérapie (Ladoire et al., 2016).

A ce jour, seules quelques études précliniques sur des cellules coliques cancéreuses ou sur des modèles murins de CCR étudient l'impact de la modulation de l'autophagie sur le développement du CCR. Notamment, une étude a montré que la chloroquine potentialise les effets anti-cancéreux de 5-fluorouracil dans un modèle murin de xéno greffe de CCR (Sasaki

et al., 2012). Enfin, *in vitro*, la chloroquine augmente les effets anti-cancéreux de la radiothérapie et du 5-fluorouracil en diminuant la survie des cellules coliques cancéreuses, HT-29 et HCT-116 (Schonewolf et al., 2014).

Considérant le rôle très complexe de l'autophagie dans la carcinogenèse colorectale, des études supplémentaires sont nécessaires afin de développer des thérapies personnalisées en se basant sur la modulation de l'autophagie de manière sélective.

Une partie de la synthèse bibliographique est valorisée par une revue publiée dans le journal « International Journal of Molecular Sciences » : Lucas et al., « Microbiota, inflammation and colorectal cancer », 2017.





Review

# Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer

Cécily Lucas, Nicolas Barnich and Hang Thi Thu Nguyen \*

M2iSH, UMR 1071 Inserm, University of Clermont Auvergne, INRA USC 2018, Clermont-Ferrand 63001, France; cecily.lucas@uca.fr (C.L.); nicolas.barnich@uca.fr (N.B.)

\* Correspondence: hang.nguyen@uca.fr or hang.nguyen@udamail.fr; Tel.: +33-47-317-8372;

Fax: +33-47-317-8371

Received: 17 May 2017; Accepted: 15 June 2017; Published: 20 June 2017

**Abstract:** Colorectal cancer, the fourth leading cause of cancer-related death worldwide, is a multifactorial disease involving genetic, environmental and lifestyle risk factors. In addition, increased evidence has established a role for the intestinal microbiota in the development of colorectal cancer. Indeed, changes in the intestinal microbiota composition in colorectal cancer patients compared to control subjects have been reported. Several bacterial species have been shown to exhibit the pro-inflammatory and pro-carcinogenic properties, which could consequently have an impact on colorectal carcinogenesis. This review will summarize the current knowledge about the potential links between the intestinal microbiota and colorectal cancer, with a focus on the pro-carcinogenic properties of bacterial microbiota such as induction of inflammation, the biosynthesis of genotoxins that interfere with cell cycle regulation and the production of toxic metabolites. Finally, we will describe the potential therapeutic strategies based on intestinal microbiota manipulation for colorectal cancer treatment.

**Keywords:** colorectal cancer; intestinal microbiota; inflammation; genotoxins; host-pathogen interaction

## 1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in both males and females with about 1.36 million of new cases per year and the fourth leading cause of cancer-related deaths worldwide with 700,000 deaths per year [1].

CRC formation begins with the transformation of the normal epithelium mucosa into hyper-proliferative epithelium. These hyper-proliferative intestinal epithelial cells (IECs) lose their organization and structure and have the ability to form adenomas. Adenomas can then growth and invade the submucosa and become cancerous with the ability to disseminate into the colon [2]. This series of events, called “adenoma-carcinoma sequence”, which leads to CRC, is heterogeneous, and, depending on the molecular alterations during this sequence, different subtypes of CRC have been described. Three major mechanisms of genetic instability have been described in the framework of sporadic CRC: chromosomal instability (CIN), microsatellite instability (MSI) and CpG island methylator phenotype (CIMP). These mechanisms have an impact on the major signaling pathways and lead to the loss of control of cell proliferation, unlimited cell growth and tumor development.

About 10% of CRC cases are hereditary, and up to 90% are sporadic (without family history or genetic predisposition). Several risk factors for the development of CRC have been identified, including unhealthy behaviors such as physical inactivity, smoking, and red and processed meat as well as alcohol consumption. Some diseases including obesity, diabetes type 2 and inflammatory bowel diseases (IBD) have been also associated with increased risk to develop CRC [3].

It has been proposed that CRC occurrence may also be influenced by the intestinal microbiota which the gut is in constant exposition with. CRC preferentially affects the large intestine, where

the bacterial density is largest ( $10^{12}$  cells per mL versus  $\sim 10^2$  cells per mL in the small intestine) [4]. Several studies have linked a modification of intestinal mucosa-associated microbiota composition in patients with CRC compared to control subjects [5–7]. Moreover, in animal models of CRC (genetic or chemical-induced), those bearing the normal intestinal microbiota (conventional animals) develop more tumors than those deprived of the intestinal microbiota (germ-free animals). These observations suggest that intestinal microbiota is a new player in CRC development. Over the last decades, many discoveries have been made to understand the mechanisms by which the intestinal microbiota acts on the development of CRC. The accepted model of bacteria-induced CRC mechanism is based on the enhanced release of toxins produced by bacteria, the decrease of beneficial bacterial-derived metabolites, the disruption of epithelial barrier, the production of pro-carcinogenic compounds and alterations in the intestinal microbiota or dysbiosis; all of these mechanisms lead to an aberrant activation of the immune system with chronic inflammation, increased cellular proliferation and thus increased CRC development [8]. This model of bacteria-host interaction in CRC has helped pave the way to new therapeutic strategies such as supplementation of microbial fermentation products such as short-chain fatty acids (SCFAs), which have anti-inflammatory and anti-carcinogenic effects [9]; direct suppression of bacterial toxin-induced DNA damage and tumorigenesis using small inhibitor molecules [10]; use of prebiotics shown to decrease carcinogen-induced aberrant crypt foci number in vivo [11]; consumption of lactic acid bacteria-containing probiotics, which can prevent DNA damage induced by the mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines [12]; and the use of bacteria such as *Bifidobacterium* and *Bacteroides* to enhance anti-tumor immune therapy efficiency and therefore improving tumor control [13,14].

This review will focus on the current knowledge of the contribution of the intestinal microbiota, especially bacteria, to CRC development, and more particularly how it influences the initiation and the progression of CRC via its different pro-carcinogenic effects including the induction of inflammation, the biosynthesis of genotoxins that interfere with cell cycle regulation, the production of toxic metabolites. Finally, we will discuss the potential therapeutic strategies for CRC treatment based on manipulation of intestinal microbiota.

## 2. Determinant Factors of Colorectal Cancer (CRC)

CRC is the third most commonly diagnosed cancer in males and the second in females, with 1.36 million new cases per year and almost 694,000 deaths in 2012 [1]. The risk of developing CRC increases with age. Additional risk factors are inherited genetic factors, lifestyle and some diseases such as obesity, diabetes type 2 and IBD. Only 5–6% of CRC cases involve inherited genetic alterations. It has been shown that having one or two first-degree relatives with CRC is associated, respectively, with 2.26- and 3.76-fold increased risk to develop CRC [15].

The two main forms of hereditary CRC are the Lynch syndrome or non-polyposis colon cancer, which involves mutations in the DNA mismatch repair system, and the familial adenomatous polyposis (FAP), which is caused by germline mutations in the tumor suppressor adenomatous polyposis coli (*Apc*) gene [16].

Beside the uncontrollable genetic factor, several lifestyle factors play an important role and are responsible of approximately 90% of CRC occurrence. Indeed, CRC incidence is very inconsistent over the world, with the highest rates in Europe, New Zealand, United States and Australia, and the lowest rates in Africa and South Asia [1]. In 2012, one study showed a large disparity of CRC occurrence depending on socioeconomic status with an increased risk for the lowest socioeconomic status compared to the highest one due to the highest prevalence of adverse health behaviors such as unhealthy diet, alcohol consumption, smoking, obesity and absence of physical activity [17]. Indeed, diet plays an important role in the occurrence of CRC, and it has been estimated to be involved in 30% to 50% of CRC worldwide. Studies have shown that red meat consumption, low fiber, calcium, folic acid and vitamin D diet could enhance the risk to develop CRC [18]. Alcohol consumption has been suspected to be implicated in CRC development, as the compound resulted from the metabolism of alcohol, acetaldehyde, has mutagenic and pro-carcinogenic activities [19]. In addition, it was shown

that alcohol consumption enhances the risk to develop CRC in a dose-dependent manner. Indeed, a pooled analysis of eight cohort studies showed that the consumption of 30 g of ethanol per day or greater during a maximum of 6–16 years of study period enhances the risk to develop CRC by 16%, and 45 g of ethanol enhances the risk by 41% [20]. Cigarette smoking also increases the risk to develop CRC in a time and dose-dependent manner. In 2008, a meta-analysis showed that smokers have 18% increased risk to develop CRC compared to never-smokers [21].

Obesity is a risk factor of various cancers, including pancreatic, kidney, liver, breast, esophageal, gastric and colorectal cancer and has been estimated to account for 14% of cancer deaths in men and 20% of cancer deaths in women [22]. Recently, a meta-analysis on 9,000,000 participants from different countries showed that the obese category has a risk to develop CRC 1.3 time higher than the normal category [23]. Later, studies have tried to reveal the molecular link between obesity and CRC. Lin and colleagues showed that diet-induced obesity leads to a silencing of the colonic cell surface receptor guanylyl cyclase C due to loss of expression of its paracrine hormone ligand guanylin. The authors showed that the loss of guanylin is associated with epithelial dysfunction, colon endoplasmic reticulum stress and promoted tumorigenesis in mice treated with the carcinogenic agent azoxymethane (AOM) [24]. Other studies have linked the obesity-associated hormone leptin with the occurrence of CRC, as its expression is enhanced in CRC compared to normal colorectal epithelium and colorectal adenomas [25]. In vitro, this adipokine is able to activate the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB/AKT)/*mammalian target of rapamycin* (mTOR) signaling pathway and therefore enhance proliferation and inhibit apoptosis of the human HCT116 colon cancer cells [26]. The risk to develop CRC is decreased with physical activity practicing [27]. Indeed, people with no or low physical activity have 27% more risk to develop CRC compared to people with physical activity [28]. In people with high physical activity, incidence of CRC is reduced by 40–50% compared to those with little or no physical activity [29]. It has been proposed that physical activity may decrease the risk to develop various cancers including CRC by decreasing central adiposity, influencing sexual and metabolic hormone levels, reducing inflammation and improving immune function [30].

Chronic inflammation is one of the major risks of CRC. Patients with IBD, including ulcerative colitis and Crohn's disease, have a higher risk to develop colitis-associated CRC compared to the general population [31,32]. Recently, a study on 44,278 individuals showed an association between a higher dietary inflammatory index, which is developed to evaluate the inflammatory potential of an individual's diet, and an increased prevalence of colorectal adenomas [33]. The consumption of non-steroid anti-inflammatory drugs, such as aspirin, was shown to reduce the occurrence of CRC and decrease tumor growth in various animal models of CRC [34]. Moreover, the susceptibility to develop colonic tumors in animal models of CRC, such as *APC<sup>Min/+</sup>* mice (which carry a germline mutation in *Apc* gene) and AOM-treated mice, is enhanced following treatment with the inflammatory agent dextran sodium sulfate (DSS) [35,36]. It is well known that chronic inflammation induces dysplasia via the induction of DNA modifications in IECs, such as nitration, oxidation, methylation and deamination reactions, which can contribute to the initiation or progression of CRC [37]. During inflammation, the recruitment of innate immune cells such as macrophages, neutrophils and dendritic cells and adaptive immune cells such as T and B cells, leads to the secretion of oxygen/nitrogen reactive species, which are highly genotoxic [38], pro-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-6, IL-8, IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), as well as growth factors [39]. The production of these mediators is mediated by several major signaling pathways such as nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), PI3K/AKT, cyclo-oxygenase-2 (COX-2)/prostaglandin E2 (PGE2), which are implied in many processes including proliferation, angiogenesis, invasion, metastasis and recruitment of inflammatory mediators [39]. This inflammatory environment has a lot of similarities with the tumor microenvironment, suggesting the implication of the same mediators in chronic intestinal inflammation and colorectal carcinogenesis [39]. Indeed, many inflammatory mediators have been found positively associated with the prevalence of colorectal adenomas [40–42]. For example, IL-6 levels are higher in the serum of CRC patients compared to healthy controls [43]. In vitro, IL-6 was

shown to stimulate the invasiveness of human colorectal carcinoma cells [44]. Using a mouse model of AOM-DSS-induced colitis-associated CRC, IL-6 was also shown to be a strong promoter of colonic tumor growth [45]. Mice deficient for the anti-inflammatory cytokine IL-10 (*il10*<sup>-/-</sup> mice), which develop spontaneously chronic colitis [46], have increased carcinogenesis with higher grade and invasiveness when being treated with AOM compared to wild type mice [47]. In addition, IL-10 deficiency leads to increased colon tumor number in *APC*<sup>Min/+</sup> mouse model of CRC [48]. Interestingly, under germ-free condition *il10*<sup>-/-</sup> mice develop reduced colitis, and this is associated with reduced AOM-induced CRC development [47]. Moreover, the intestinal microbiota composition is different in AOM-treated *il10*<sup>-/-</sup> mice compared to AOM-treated wild type mice [49].

The implication of toll-like receptors (TLRs) and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs), which are innate immune sensors that function to maintain gut homeostasis by inducing an appropriate inflammatory response against pathogenic exposures, in inflammation-associated colorectal carcinogenesis has been largely investigated. Ten TLRs have been identified in humans, and several single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the *tlr* genes have been associated with altered susceptibility to infectious, allergic, and inflammatory diseases as well as cancers [50]. A correlation between SNPs in *tlr3*, *tlr5* and *tlr9* genes and CRC has been found [51,52]. A dual role for TLRs in CRC has been proposed as they may promote cancer cell survival and progression or induce tumor cell death depending on the context [53]. For example, TLR5 and TLR9 exhibit anti-tumoral properties by activating immune cells and having a direct cytotoxicity effects on tumor cells [53]. Moreover, TLR8 activation was shown to inhibit regulatory T cells, thus promoting anti-tumor immunity [54]. Using a mouse xenograft model of human colon cancer, a study showed that deficiency of TLR5 is associated with increased tumor volume accompanied with a deregulation of tumor immune response [55]. In addition, TLR9 exhibits also anti-tumoral activity in a xenograft model of colon cancer [56]. Finally, TLR2 deficiency leads to increased tumor development with higher pro-inflammatory mediators' level in an AOM-DSS mouse model of inflammation-induced CRC [57]. In contrast, TLRs have the capacity to activate the NF- $\kappa$ B signaling pathway, and this is one of their major tumor-promoting effects [53]. TLR activation stimulates several immune mediators, such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6, which are implied in cell survival, immune response and inflammation [53]. In vitro, TLR4 was found to enhance immunosuppression by inhibiting T cell proliferation [58]. Using xenograft mouse model of CRC, the blockade of TLR4 was found to improve the survival of tumor-bearing mice [58], and this was confirmed in the AOM-DSS mouse model, where TLR4 was shown to recruit and activate COX-2-expressing macrophages and increase the number and size of dysplastic lesions per colon [59]. Moreover, deficiency of the TLR adaptor molecule myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) in *APC*<sup>Min/+</sup> mice leads to a decrease in the number of colonic and ileal polyps [60].

In 2004, Kurzawski and colleagues first reported an association between a SNP in *nod2* gene and an enhanced risk to develop CRC [61]. It was later shown that NOD2 deficiency increases the susceptibility of mice to chemically induced colitis and colitis-associated carcinogenesis, and this is due to changes in the composition of gut bacterial communities and enhanced IL-6 production [62]. Deficiency of NOD1 leads to increased colorectal tumor number in *APC*<sup>Min/+</sup> mice and AOM-DSS-treated mice. Treatment with antibiotics suppresses intestinal tumor formation in NOD1-deficient mice compared to untreated mice [62]. Moreover, following AOM-DSS treatment, NOD1-deficient mice exhibit impaired interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) production and therefore increased inflammation-associated tumorigenesis compared to wild type mice [63].

These data suggest a close link between inflammation and microbiota modulation during colorectal tumorigenesis.

### 3. Intestinal Microbiota and Gut Homeostasis

The intestinal microbiota is the complex community of all microorganisms in the gut, including not only bacteria but also fungi, viruses, archaea and protozoans. It has been estimated that over 1000 bacterial species inhabit the human intestinal tract [64]. In healthy individuals, the microbiota is

mainly composed of two principal strictly anaerobic phyla: the *Firmicutes* and the *Bacteroidetes*. Despite the stability of these groups in the gut, their proportions and the associated species are highly variable over time and between individuals [65]. In a single individual, there is also a spatial variability in the composition and the amount of microbiota. Indeed, it has been observed an increase in the number of bacteria beginning at  $10\text{--}10^3$  bacteria per gram of stomach and duodenal contents, increasing to  $10^4\text{--}10^7$  bacteria per gram in the small intestine, and rising to  $10^{11}\text{--}10^{12}$  bacteria per gram in the large intestine [66]. The gut microbiota has a symbiotic relationship with the host and is involved in metabolic, immunological and protective functions in a healthy individual. This part lists the main functions of the healthy intestinal microbiota.

### 3.1. Nutrient Metabolism

The gut microbiota has a major role in metabolism by providing important metabolites for its host. The key bacterial fermentation products following the fermentation of dietary carbohydrates are SCFAs and gases. SCFAs, such as butyrate, propionate, and acetate, are the main end products synthesized from the fermentation of non-digestible carbohydrates by the two main fermenters: *Bacteroidetes* which transform simple sugars from carbohydrates into organic acids such as SCFAs and hydrogen, and *Clostridium* with butyrate-producing bacteria that transform organic acids into additional SCFAs. The beneficial roles of SCFAs for the host have attracted many researchers, such as their role in energy homeostasis as they are the principal source of energy for colonocytes [67], their anti-inflammatory and anti-carcinogenic effects, and their capacity to reinforce the intestinal barrier function and to decrease the oxidative stress [9]. The gut microbiota plays also a role in gas metabolism. The majority of gas generated by bacteria comprises hydrogen, carbon dioxide, and methane, all odorless gases. Gas production by the colonic microbiota can exert clinical consequences for the host. For example, the utilization of hydrogen to reduce sulfate generates hydrogen sulfide, which is highly toxic to colonocytes and can have pathological consequences. There is also an association between the presence of methane in the colon and CRC, although this could be a consequence rather than causal of the disease [68].

The gut microbiota has also an impact on lipid metabolism as the microbiota can enhance the lipoprotein lipase activity in adipocytes [69]. The lipids can be derived from the intestine itself, from the desquamation of the epithelial cells and from the bacteria [70]. Only 5% of bile acids, transformation products from cholesterol, reach the colon to be metabolized by bacteria into secondary bile acids. *Bacteroides intestinalis*, for example, has the ability to deconjugate and dehydrate the primary bile acids to convert them into secondary bile acids in the colon [71]. Several primary bile acids such as cholic acid are converted into desoxycholic acid and lithocholic acid and may have carcinogenic effects [72]. The gut microbiota has also a role in protein metabolism. Indeed, a lot of bacteria have protease activity and can hydrolyze proteins into small peptides [73]. These peptides can be then metabolized by several bacteria into amino acids which can serve as a source of energy or nitrogen by other bacteria [73]. The gut microbiota can also synthesize certain vitamins, notably vitamins K and B, which are not only important for bacterial metabolism, but also have a physiological significance to the host [74]. For example, people treated with a broad-spectrum antibiotic showed a significant decrease in plasma prothrombin levels [75]. Germ-free but not the conventional animals fed a diet without vitamin K supplement have low prothrombin levels and develop hemorrhages [76].

### 3.2. Intestinal Barrier Maintenance

The principal functions of the intestinal epithelium are to form a barrier and protect the gut from the external environment, to regulate the absorption of nutrients, electrolytes and water from the lumen and to maintain the homeostasis between the environment and the host. In order to maintain a high protection, the intestinal epithelium is composed of two main elements: the mucus layer and the tight junctions. The gut microbiota has an impact on both of them. Indeed, it has been shown that the mucus layer is not well developed in germ-free mice [77]. Moreover, the SCFAs produced by the gut microbiota and more specifically butyrate can act as a guardian of the intestinal barrier by

decreasing the permeability through increased expression of the tight junction proteins claudin-1 and zonula occludens-1 [78]. SCFAs such as butyrate have also an impact on intestinal mucus production by enhancing expression of mucins [79]. Germ-free animals show impaired intestinal barrier due to decreased tight junction protein expression and low expression of mucus proteins, and therefore a high susceptibility to DSS-induced colitis [80]. These studies show a major role of the microbiota in protecting the gut integrity.

### 3.3. Modulation of Immune System

The gut microbiota contributes to the maturation and modulation of both mucosal and systemic immune systems via innate immune components not much specific such as the pattern recognition receptors (PRRs) expressed on the different cell types in the mucosa (enterocytes, polynuclear cells, mast cells, macrophages and dendritic cells), and adaptive immune components which are highly specific receptors expressed on the surface of T cells and B cells. Recruitment and activation of all of these cells are highly dependent on signals from the microbiota and are tightly regulated.

#### 3.3.1. Intestinal Innate Immune Cells

Among the innate immune cells, macrophages are the most abundant. In the intestine, macrophages have a phagocytic activity by expressing the phagocytic receptor TREMC2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2), and therefore the ability to get rid of invasive bacteria [81]. Macrophages are also producers of the anti-inflammatory cytokine IL-10 which contributes to the maintenance of intestinal homeostasis [81]. Neutrophils and eosinophils play also a role in innate immunity by respectively secreting the pro-inflammatory mediators such as IL-22 and stimulating the adaptive immune responses via the production of immunoglobulin-A (IgA) [82,83]. Innate lymphoid cells are activated in response to cytokines produced by dendritic cells or by the epithelium. Among these cells, the type 3 innate lymphoid cells (ILC3) expressing the nuclear factor retinoid acid-related orphan receptor  $\gamma$ , which are activated by IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-23, are producers of effector cytokines such as IL-17 and/or IL-22, and require the presence of commensal bacteria for their development [84]. When being activated, ILC3 have also the ability to induce the production of mucus and antimicrobial peptides (AMPs) by the epithelium. Moreover, ILC3 have a direct impact on adaptive immune response through the production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). GM-CSF production, as a consequence of the detection of commensal bacteria and the production of IL-1 $\beta$  by macrophages, leads to the generation of regulatory T cells [85]. ILC3 are also found to express major histocompatibility complex molecules, process and present antigens, and interact with CD4<sup>+</sup> T cells leading to the regulation of adaptive immune responses to commensal bacteria [86]. Finally, dendritic cells are key regulators of adaptive immune responses by recruiting and activating naïve T cells by inducing T cell receptors [87]. One subpopulation of dendritic cells is predominant in Peyer's patches, key site of microbiota-induced immune responses, and could promote regulatory T cell production, while the other subpopulation seems to have pro-inflammatory properties by promoting T cell repertory [87].

#### 3.3.2. Intestinal Adaptive Immune Cells

Peyer's patches and isolated lymphoid follicles are the major sites for adaptive immune responses. These two sites are enriched in microfold cells (M cells), which allow the translocation of bacteria that can be captured by dendritic cells and presented to naïve T cells, leading to the activation of B cells and therefore the secretion of IgA [88]. Compared to conventional animals, germ-free animals have reduced number and unachieved development of Peyer's patches. Indeed, Peyer's patches from germ-free mice exhibit fewer M cells and T lymphocytes [89]. Germ-free mice have also decreased IgA-producing plasma cells and reduction of T cells in the *lamina propria* [90]. Bacterial colonization induces the production of IL-17 by the T helper 17 (Th17) cells, which is important to control intestinal bacteria. Indeed, IL-17 stimulates the production of AMPs by the epithelium, the recruitment of neutrophils, and also promote IgA secretion [91,92]. Immune responses vary according to bacterial densities and

are dependent of the microbial community. The most implied bacteria in the modulation of both innate and adaptive immune systems are the segmented filamentous bacteria (SFB) [93]. The SFB, related to *Clostridium*, adhere to the epithelial surface and to the Peyer's patches in order to get nutrients [94]. This contact between the SFB and the epithelium is also beneficial for the host by stimulating the immune system. Indeed, the SFB stimulate innate immune responses and promote the development of lymphoid tissues such as Peyer's patches and the isolated lymphoid follicles. SFB also induce IgA secretion and activate pro-inflammatory T cells as well as regulatory T cells [91,95].

Besides the role in shaping the intestinal immune system, the gut microbiota has also indirect effects on the periphery. While the mechanisms are still poorly described, theories have emerged suggesting that the gut microbiota might have peripheral effects by the diffusion of soluble factors derived from bacteria and their metabolites [96,97]. Indeed, Burgess and colleagues showed that transfer of bone marrow-derived macrophages from mice carrying SFB to mice deficient in SFB is sufficient to protect SFB-deficient mice from infection with *Entamoeba histolytica*, responsible of diarrhea [98]. Furthermore, it was shown that the gut microbiota can protect against enteric infection via extra-intestinal mediators [98].

#### 3.4. Protection against Pathogens

Studies have shown a crucial role of gut microbiota in protection against gut colonization by pathogens. It has been shown that antibiotic-treated mice have increased susceptibility to infection with enteric pathogens compared to untreated mice [99,100]. The mechanisms by which the gut microbiota inhibits gut colonization by pathogens involve competition for adhesion receptors and for nutrients, stabilization of the mucosal barrier and production of anti-microbial substances [101].

Commensal microbiota and bacterial pathogens require the same niche to colonize the intestine. Commensal bacteria are able to produce bacteriocins and toxins that inhibit specifically the members of the same species. For example, bacteriocin produced by several commensal *Escherichia coli* strains isolated from human and different animals inhibits the growth of the pathogenic enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) [102]. Moreover, commensal bacteria have the ability to influence the pH of the gut in order to prevent the colonization of pathogens. For example, *Bifidobacterium* protect mice against death induced by EHEC serotype O157:H7 through acidification of the environment via the production of acetate [103]. Similarly, the SCFAs produced by some commensal bacteria can have toxic effects for some pathogens such as *Salmonella* by modifying the environment pH [67]. Moreover, SCFAs, especially butyrate, have been shown to inhibit the virulence of *Salmonella* by decreasing the *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression, thereby limiting the invasion of epithelial cells by this pathogen [104]. Another strategy used by commensal bacteria to inhibit the colonization by pathogens is the competition for nutrients, leading to starvation of pathogenic bacteria. Indeed, a study showed that co-culture with high proline-consuming commensal *E. coli* decreases the growth of EHEC serotype O157:H7 [105]. Moreover, the modulation of the microenvironment in the gut, such as oxygen concentration, by commensal bacteria can lead to incomplete virulence gene expression in pathogens such as *Shigella flexneri* [106].

Another defense strategy from the commensals against pathogens is the activation of host innate immunity via the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or microbe-associated molecular patterns (MAMPs) which include microbial components such as lipopolysaccharides, lipid A, flagella, bacterial DNA and RNA [107]. Those PAMPs/MAMPs are recognized by the PRRs such as the TLRs, the C-type lectin receptors (CLRs) and the NLRs of eukaryotic cells. The interactions between PRRs and PAMPs/MAMPs lead to the activation of several pathways guaranteeing the intestinal homeostasis such as those implied in the mucosal barrier function or in the synthesis of AMPs by Paneth cells such as C-type lectins, prodefensins and cathelicidins [108]. *MyD88*<sup>-/-</sup> mice have impaired production of AMPs by Paneth cells in the small intestine, leading to enhanced colonization by commensal bacteria in the mesenteric lymph node and also an increased dissemination of the pathogenic bacterium *Salmonella* into the spleen [109]. Mice deficient for the intracellular sensor of

small bacterial peptides NOD2 show an impaired production of the  $\alpha$ -defensins, called cryptdins in mice, which might lead to a higher susceptibility to infection by pathogens [110]. Using mice deficient for MyD88 specifically in IECs (MyD88 <sup>$\Delta$ IEC</sup> mice), a study showed that the loss of MyD88 results in an increased number of mucosa-associated bacteria, impaired mucus-associated antimicrobial activity, increased bacterial translocation, decreased mucin-2 expression, and decreased expression of epithelial IgA transporter, leading to an enhanced susceptibility of mice to colitis [111]. In addition, Frantz et al. also noted a significant difference in the gut microbiota composition in MyD88 <sup>$\Delta$ IEC</sup> mice, with a decrease in the abundance of *Bacteroides* and an increase in a large proportion of species belonging to *Proteobacteria*, compared to the control MyD88<sup>flx/flx</sup> littermates [111]. Among the commensal bacteria, some species of *Bacteroides* and *Lactobacillus* are the more frequently implied in the production of AMPs [66]. Mono-colonization of germ-free mice deficient in T cells and IgA secretion (RagT mice) with either the gram-negative *Bacteroides thetaiotaomicron* or the gram-positive *Lactobacillus innocua* results in a significant increase in mRNA expression of RegIII-gamma, which is a secreted C-type lectin, part of the AMP families, triggered by enhanced mucosal contact between bacteria and epithelial cells [112]. Using germ-free mice mono-colonized with SFB, which are specific members of the commensal microbiota, Ivanov and colleagues showed that SFB are able to induce Th17 cells in the lamina propria and production of the Th17 cell effector cytokines IL-22 and IL-17 [91]. These are accompanied by a decrease in the invasion of the pathogen *Citrobacter rodentium* in the colonic tissue compared to germ-free mice that are not mono-colonized with SFB and therefore lack Th17 cells [91]. However, some pathogens have developed strategies to use commensal bacteria for their own good. For example, *Clostridium difficile* use bile salt, a by-product derived from commensal bacteria, in order to stimulate the germination of spores [113].

#### 4. Intestinal Microbiota and CRC

In 2012, among the 14 million new cancer cases, 2.2 million cases were attributed to infectious agents [114]. A review summarizing all the epidemiologic and pathologic studies since 2000 showed that the proportion of cancer cases attributed to infectious agents is up to 20%. This varies greatly from 5% in highly developed countries to more than 50% in Sub-Saharan African countries where 90% of the cancer cases attributed to infection were caused by *Helicobacter pylori* (770,000 cases), human papillomavirus (640,000 cases), hepatitis B virus (420,000 cases), hepatitis C virus (170,000 cases) and Epstein-Barr virus (120,000 cases) [114,115]. Since 99% of the microbial mass is located in the intestinal tract, the gut microbiota has the greatest impact on human health and is the most studied microbiota. Several studies have shown a link between a modification of the gut microbiota and CRC. In 1995, a study reported 15 bacterial species associated with a higher risk to develop CRC, including two *Bacteroides* species (*Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides stercoris*), two *Bifidobacterium* species (*Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium angulatum*), five *Eubacterium* species (*Eubacterium rectale* 1 and 2, *Eubacterium eligens* 1 and 2, *Eubacterium cylindroides*), three *Ruminococcus* species (*Ruminococcus torques*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus gnavus*), *Streptococcus hansenii*, *Fusobacterium prausnitzii* and *Peptostreptococcus productus* 1 [116]. The authors also reported five bacterial species associated with a lower risk of CRC development including some *Eubacterium* species, *Lactobacillus* S06, *Peptostreptococcus* DZ2 and *Fusobacterium* AB [116]. By analyzing the microbiota composition of different intestinal compartments from 46 patients with CRC and 56 healthy volunteers, Chen and colleagues showed that the mucosa-associated bacterial composition was significantly different in CRC patients compared to healthy subjects [5]. Indeed, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Gemella*, *Mogibacterium* and *Klebsiella* are enriched in CRC patients, whereas *Feacalibacterium*, *Blautia*, *Lachnospira*, *Bifidobacterium* and *Anaerostipes* are reduced [5]. Moreover, the authors showed that the microbiota of cancerous tissues exhibited lower diversity compared to that of the non-cancerous normal tissues [5]. More recently, Goa et al. showed that the predominant phylum in CRC patients is the *Firmicutes*, whereas it is the *Proteobacteria* in healthy individuals. In addition, a relatively higher abundance of *Lactococcus* and *Fusobacterium*



and lower abundance of *Pseudomonas* and *Escherichia-Shigella* was observed in cancerous tissues compared to adjacent non-cancerous tissues [7]. Recent pyrosequencing data of CRC-associated gut microbiota revealed, in particular, over-representation of some bacteria such as *Bacteroides/Prevotella*, *Faecalibacterium* and *Fusobacterium* [117]. However, these modifications vary depending on the analysis techniques and the sample localization. Indeed, Sobhani and colleagues showed that *Bacteroides* are over-represented in CRC patients' tissues (tumoral tissues and associated normal mucosa) compared to normal tissues from control subjects. In the stool samples, the authors showed a significant increase of *Bacteroides/Prevotella* in CRC samples compared to healthy subjects' samples [118]. When analyzing CRC at an earlier stage, studies have shown an increase of *Proteobacteria* and *Fusobacteria* and a decrease of *Bacteroides* in normal mucosa from CRC patients compared to that from control subjects [119,120]. At species levels, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis/gallolyticus*, *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum* are increased in the fecal samples from CRC patients, while *Bacteroides vulgatus* and *Faecalibacterium prausnitzii* are decreased when compared to fecal samples from healthy volunteers [117,121]. More recently, Viljoen and colleagues reported a significant increase in *Fusobacterium* in tumor samples compared to non-tumoral adjacent mucosa, and this is associated with late stages of CRC [122]. The alterations in intestinal microbiota composition have also been found in animal models of CRC. Indeed, in 2013, using the AOM-DSS mouse model of colitis-induced CRC, Zackular and colleagues showed a shift in fecal microbiota composition with a significant decrease in the diversity following the first round of DSS treatment [123]. Right after the first round of DSS treatment, *Bacteroides* was found increased, while *Prevotella* was found decreased [123]. However, following the third round of DSS treatment, a significant decrease in *Bacteroides* and *Porphyromonadaceae* was found, which has also been observed in IBD patients [123,124]. The authors proposed that these species could have a protective role as the anti-inflammatory mediators in the gut. When they conventionalized germ-free mice with either the healthy microbiota of untreated mice or the microbiota of tumor-bearing AOM-DSS-treated mice, those conventionalized with tumor-bearing mice-associated microbiota exhibit more tumors and decreased gut microbiota diversity compared to those conventionalized with the healthy microbiota [123]. Analyses of the diversity and richness of the intestinal lumen microbiota were also performed via the analysis of the feces in an animal model of CRC induced by the carcinogenic agent 1,2-dimethylhydrazine [125]. The results showed an increase in *Bacteroides* and *Proteobacteria* in the lumen of CRC rats compared to healthy rats. A reduction of butyrate-producing bacteria such as *Roseburia* and *Eubacterium* in the gut microbiota of CRC rats was also observed [125]. Recently, it was shown that germ-free *APC<sup>Min/+</sup>/il10<sup>-/-</sup>* mice exhibit almost no tumor compared to conventionalized *APC<sup>Min/+</sup>/il10<sup>-/-</sup>* mice, indicating the primordial role of the gut microbiota in inflammation-induced CRC [48].

Theories have been made regarding the role of the gut microbiota in CRC initiation or progression. Tjalsma and colleagues proposed a "driver-passenger" bacterial model, in which the intestinal mucosa of CRC patients could be colonized by one or several microbes called "driver" because of their pro-carcinogenic properties such as production of DNA-damaging compounds, induction of cellular proliferation, causing permeabilization of intestinal barrier and induction of chronic inflammation, leading to initiation of CRC. *Enterococcus faecalis*, some *Escherichia coli* strains, *Bacteroides fragilis*, *Shigella*, *Salmonella* and *Citrobacter* have been described among the "driver" bacteria [4]. The "driver" bacteria are associated with the early stages of CRC and are not found in cancerous tissue as the disease progresses, which may explain the heterogeneity of the results reported by CRC-associated microbiota studies. Via their pro-carcinogenic effects, the "driver" bacteria can influence the tumoral microenvironment and promote the emergence of "passenger" bacteria, which are better suited to the new environment. *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus bovis/gallolyticus* and with less evidence *Clostridium septicum* have been considered as candidate "passenger" bacteria [4]. Primarily linked to gastric cancer, studies have also started to investigate the association between *Helicobacter pylori* and CRC [126].

## 5. Possible Mechanisms of Action of the Intestinal Microbiota in Colorectal Carcinogenesis

### 5.1. *Enterococcus faecalis*

*E. faecalis* is a gram-positive facultative anaerobic commensal bacterium and mostly appears harmless to humans. However, studies have started to associate *E. faecalis* to CRC because it has been found to be enriched in fecal samples from CRC patients compared to healthy individuals [127], and also in tumors as well as in the adjacent tissues of CRC patients compared to mucosa from healthy individuals [128]. Recently, a study reported the case of an 86-year-old Caucasian male with *E. faecalis* bacteremia, who presented gastrointestinal bleeding secondary identified to be colorectal adenocarcinoma by colonoscopy [129]. In *il10<sup>-/-</sup>* mice, *E. faecalis* was shown to be able to promote and perpetuate colitis, to induce dysplasia and rectal carcinoma [130]. It was also shown that upon infection with colitogenic *E. faecalis*, IECs from wild type mice express the immunosuppressive cytokine TGF- $\beta$ , thus activating Smad signaling [131]. This was associated with a loss of TLR2 protein expression and inhibition of NF- $\kappa$ B-dependent pro-inflammatory gene expression. In contrast, *il10<sup>-/-</sup>* mice fail to inhibit TLR2-mediated expression of pro-inflammatory genes in IECs upon colonization with *E. faecalis* [131]. In addition to its ability to induce chronic inflammation, *E. faecalis* was shown to produce extracellular superoxide and hydrogen peroxide [132]. In vitro, this production of extracellular free radical was shown to induce DNA damage [133]. When being administered to rats, *E. faecalis* is also able to induce DNA damage in luminal colonic cells [133]. Since reactive oxygen species (ROS) are able to induce chromosomal instability [134], which could be associated with CRC occurrence, a study investigated whether *E. faecalis* could promote CIN [135]. Using mammalian cells, the authors showed that *E. faecalis* is able to induce CIN, and this is due to the production of superoxide but not hydrogen peroxide, and this seems to involve COX-2 whose expression is enhanced after 2 h of infection. The authors admitted that extracellular superoxide-producing *E. faecalis* infection leads to enhanced COX-2 expression in macrophages and promotes CIN in epithelial cells [135]. More recently, Wang and colleagues showed that *E. faecalis* is able to polarize colon macrophages to a M1 phenotype. *E. faecalis*-polarized macrophages were shown to induce aneuploidy and chromosomal instability in primary colon epithelial cells which are commonly found in cancers [136]. In addition, primary murine colon epithelial cells when being repetitively exposed to *E. faecalis*-infected macrophages are transformed with strong expression of stem/progenitor cell markers. In immunodeficient mice, eight of 25 transformed clones grow as poorly differentiated carcinomas with three tumors invading skin and/or muscle [136]. These findings could explain the mechanisms by which *E. faecalis* exert son impact on colorectal carcinogenesis.

### 5.2. *Bacteroides fragilis*

The strict anaerobe *B. fragilis* is a common human symbiont that colonizes the entire length of the colon and represents only a small proportion of the gut microbiota. There are two subtypes of *B. fragilis*, the nontoxigenic *B. fragilis* (NTBF) and the enterotoxigenic *B. fragilis* (ETBF). The latter, which has been associated to diarrhea in humans [137], exhibits a pathogenic island, called the *B. fragilis* pathogenicity island (BfPAI), that allows them to produce an enterotoxin called “fragilysin” or BFT encoded by the *bft* gene [138]. Several studies have linked *B. fragilis* with CRC as it has been found enriched in stools from CRC patients compared to healthy individuals [117,118]. Using stool samples from 73 CRC patients and 59 healthy subjects, the *bft* gene has been found in 38% of the CRC patients' samples compared to 12% in the healthy group [139]. ETBF is associated with late-stage CRC as 100% of the late-stage tumors are *bft*-positive compared to 72% of the early-stage tumors [140]. However, Purcell and colleagues showed that *B. fragilis* is associated with early-stage carcinogenic lesions [141]. In vitro studies have highlighted the proteolytic activity of fragilysin, which is responsible for the degradation of tight junction proteins such as zonula occludens-1 [142] and therefore leads to a dysfunction of the intestinal epithelial barrier with enhanced epithelial permeability and damaged intestinal crypts and colonocytes [143,144]. In 2003, Wu and colleagues showed that EBFT is able

to degrade the cellular adhesion molecule E-cadherin in HT29 cells, triggering the translocation of  $\beta$ -catenin into the nucleus and the transcription of the oncogene *c-myc*, leading to enhanced and persistent cellular proliferation that could positively influence CRC development [145]. In *APC<sup>Min/+</sup>* mice, ETBF colonization leads to an increase in colonic thickness, inflammation and visible colonic tumors, which were not observed with NTBF infection [146]. ETBF mediates its effects via the activation of STAT3 in colonic epithelial cells and therefore induces the pro-carcinogenic Th17 inflammatory response with subsequent secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-17. When blocking the IL-17 secretion with IL-17 neutralizing antibodies, EBTF-induced colon tumors are significantly reduced without affecting STAT3 activation, showing the preponderant role of EBTF-induced inflammation in the promotion of colon carcinogenesis [146].

### 5.3. *Fusobacterium nucleatum*

*F. nucleatum* is a gram-negative strictly anaerobic oral commensal and periodontal pathogen associated with diverse diseases [147]. *F. nucleatum* has recently been associated with CRC as its prevalence is enhanced in mucosa from patients with CRC compared to control subjects [120] and is found in higher proportion in CRC tumors compared to adjacent normal tissues [148,149]. *F. nucleatum* administration leads to increased tumor size and number, ascites, diarrhea, gut dilatation, splenomegaly and also shorter survival in *APC<sup>Min/+</sup>* mice. The tumors from *APC<sup>Min/+</sup>* mice infected with *F. nucleatum* exhibit high levels of proliferating cell nuclear antigen compared with uninfected *APC<sup>Min/+</sup>* mice, indicating the positive impact of *F. nucleatum* on cell proliferation [150]. *F. nucleatum* infection also leads to activation of the immune response with increased levels of inflammatory mediators in the serum of infected *APC<sup>Min/+</sup>* mice compared to uninfected group [150]. In addition, *F. nucleatum* infection induces expression of miRNA 21, which is considered as “oncomiR” because of its oncogenic properties [150,151]. Gene expression microarray analysis showed activation of the TLR4/MYD88/NF- $\kappa$ B pathway in colon cancer cells upon infection with *F. nucleatum*, and in vitro experiments confirmed that *F. nucleatum* regulates miRNA 21 expression via the TLR4/MYD88/NF- $\kappa$ B pathway [150]. Using *APC<sup>Min/+</sup>* mice, *F. nucleatum* was shown to be able to increase tumor development, without inducing colitis, accompanied with increased infiltration of myeloid cells into the tumors [152]. Assessment of the tumor immune microenvironment showed that compared to the uninfected group, *APC<sup>Min/+</sup>* mice infected with *F. nucleatum* exhibit enhanced proportion of myeloid-derived suppressor cells, which are tumor permissive myeloid cells, increased tumor-associated neutrophils, which are known to play a role in tumor progression, an enrichment of tumor-associated macrophages, which are also known as promoters of carcinogenesis, and an increase in dendritic cells, which have a role in anti-tumor immunity [152]. This pathogen is also able to invade epithelial cells via its virulence factor FadA by modulating the E-cadherin signaling pathway, leading to the activation of several transcription factors such as T-cell factor (TCF),  $\beta$ -catenin, NF- $\kappa$ B, *c-myc* and cyclin D1 and subsequently enhanced proliferation of colon cancer cells [153]. Using xenograft model, it was shown that FadA is able to enhance tumor growth and induce the release of pro-inflammatory cytokines, and this is mediated by E-cadherin [153]. These data suggest that *F. nucleatum* may not only impact the tumor microenvironment but has also a more direct impact on the tumor [153].

### 5.4. *Streptococcus bovis/gallolyticus*

The association between *S. bovis* and CRC was first been made in 1951 [154]. In 1977, *S. bovis* was isolated from fecal samples from 35 of 63 CRC patients compared to 11 of 105 control individuals with no apparent gastrointestinal diseases, showing the high prevalence of this bacterium in CRC patients [155]. Since then, a lot of studies have confirmed the link between *S. bovis/gallolyticus* and CRC [156,157]. Studies have shown that *S. bovis* is implied in various cellular and molecular modifications that could be linked to the development of CRC. An in vitro study showed that infection of colon cancer epithelial cells with *S. bovis* leads to the increased expression of pro-inflammatory mediators such as IL-8, COX-2 and the release of PGE2 [158]. Experiments using AOM-treated rats

confirmed the release of pro-inflammatory mediators following the infection with *S. bovis*, which leads to increased number of aberrant crypts. Three of six AOM-treated rats developed polyps following *S. bovis* infection, whereas no polyp was found in uninfected AOM-treated rats [158]. Another study using AOM-treated rats highlighted the ability of *S. bovis* to promote colorectal carcinogenesis by enhancing proliferation markers leading to increased number of hyper-proliferative crypts [159]. Using human samples (feces, mucosa, tumorous and non-tumorous colorectal tissues), Abdulmir and colleagues showed an enrichment of this bacterium in fecal and mucosal samples of CRC patients compared to control subjects without gastrointestinal lesions, reinforcing the link between *S. bovis* and CRC [160]. Moreover, *S. bovis* is found with higher proportion in tumoral tissues compared to the non-tumoral one [160]. In addition, the authors showed significant higher mRNA expression levels of pro-inflammatory mediators (IL-1 $\beta$ , COX-2, and IL-8) in *S. bovis*-infected tissues compared to uninfected tissues, but also higher in tumorous tissues compared to the non-tumorous one, highlighting a possible role of *S. bovis* in inflammation-induced CRC [160].

### 5.5. *Clostridium septicum*

*Clostridium septicum* is an aerotolerant, gram-positive, pore-forming bacillus not usually present in the normal intestinal flora of humans. *C. septicum* produces a virulence factor,  $\alpha$ -toxin, which is both lethal and hemolytic [161]. Only rare bacteremia are attributed to *C. septicum* (1%) with high rate mortality (60%) [162]. The association of *C. septicum* with CRC has been suggested [163–165]. This association could be explained by the fact that the germination of *C. septicus* spore could be favored by the hypoxic and acidic tumor environment [163]. The exact mechanisms underlying the contribution of this bacterium in colorectal carcinogenesis are still poorly known. Recently, a study showed the ability of  $\alpha$ -toxin-producing *C. septicum* to induce activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling, which has been shown to be deregulated in various diseases including cancers. This activation is associated with a release of the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  [166], which could lead to a pro-inflammatory environment propitious for cancer development. Despite these data, no direct link between *C. septicum* and CRC has been defined.

### 5.6. *Helicobacter pylori*

*H. pylori* is a gram-negative bacterium that colonizes specifically the gastric epithelium of slightly more than 50% of the population. Although most of the infected population remain asymptomatic, *H. pylori* is known to induce chronic inflammation and is a risk factor for the occurrence of gastric ulcer, mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas and gastric adenocarcinomas [167]. Even if the colonization of *H. pylori* is located in the stomach, it has been demonstrated that its toxicity can be extra-gastric [168]. The association between *H. pylori* infection and CRC is still controversial with studies showing a close link with a higher prevalence of *H. pylori* infection in patients with colonic adenomas and carcinomas [169–172], while others do not [173–175]. Recent studies released in 2017 have suggested indeed a significant association between *H. pylori* infection and an increase in CRC occurrence [176–178]. Yan and colleagues showed a positive association between *H. pylori* and CRC only when *H. pylori* is associated with intestinal metaplasia [178]. Analyzing 1245 colorectal adenomas and 3221 control subjects without polyp, Nam and colleagues showed that the overall rate of positive *H. pylori* infection is increased in adenoma cases compared to polyp-free control cases, and that the positive association of *H. pylori* infection with colorectal adenomas is more prominent in advanced adenomas and multiple adenomas [177]. Despite this controversy, some studies have tried to clarify the mechanism underlying the potential association between this pathogen and CRC with some hypotheses including release of toxin or hormone, intestinal microbiota fluctuation and chronic inflammation. Indeed, increased levels of gastrin, an important hormone of the digestive system that assists gastric acid secretion, in *H. pylori*-infected patients was shown [179]. The *H. pylori*-induced over-production of gastrin is associated with enhanced COX-2 expression and reduced apoptosis due to increased expression of the anti-apoptotic protein BCL2 over the pro-apoptotic protein BAX [179].

In vivo, supplementation of gastrin leads to increased proliferative index in the colon, expansion of the proliferative zone in the intestinal crypt, increased thickness of the colonic mucosa and hyperplasia of goblet cells, which may increase the risk to develop CRC [180]. The perturbation in acid production generated by the over-production of gastrin might be linked to a gastric barrier perturbation, which can lead to fluctuation in gut microbiota [181]. Studies have shown that this perturbation can facilitate the colonization and growth of CRC-associated bacteria such as *B. fragilis* and *E. faecalis* [181]. Another theory is that the production of ROS and reactive nitrogen species (RNS) by *H. pylori* can lead to DNA damage, which could favor colorectal carcinogenesis [182]. Furthermore, different strains of *H. pylori* have different impacts on patients. Indeed, the strains that exhibit the virulence factor CagA are more harmful than those without this factor, and patients carrying these strains have an increased risk to develop gastric cancer and also CRC compared to those who do not [183]. VacA, another virulence factor carried by some *H. pylori* strains have not yet been associated with CRC but appeared to be a key factor in the colonization and virulence of *H. pylori* [184]. Finally, some *H. pylori* strains carry the virulence factor *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein (HP-NAP), which has been found to promote the production of ROS by neutrophils [185]. Moreover, *H. pylori* has been shown to induce the secretion of several pro-inflammatory mediators such as TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8 by infected cells showing its contribution in inflammation-induced cancer [186].

### 5.7. *Escherichia coli*

*E. coli* is a gram-negative, aero-anaerobic, commensal bacterium that colonizes the human gut soon after birth. *E. coli* has a symbiotic relationship with the host and is not normally implied in diseases. However, some virulent strains of *E. coli* have acquired pathogenic characteristics that allow them to colonize the human gut and promote the occurrence of intra- and extra-intestinal diseases. These *E. coli* strains can be divided into eight pathotypes based on their pathogenic profiles: enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), diffusely adherent *E. coli* (DAEC), adherent-invasive *E. coli* (AIEC) and Shiga toxin-producing enteroaggregative *E. coli* (STEAEC) [187]. *E. coli* strains are divided into four main phylogenetic groups A, B1, B2 and D, with fecal strains often belong to A and B1 groups, whereas the pathogenic strains carrying the virulence factors most frequently belong to B2 and D groups [188]. Some strains of the B2 and D groups are associated with chronic inflammatory intestinal diseases which are known to be risk factors for CRC [189,190]. An enrichment of *E. coli* strains mainly belonging to the B2 and D groups in CRC patients has been shown. Indeed, *E. coli* strains were found in 90% and 93% of patients with adenomas and carcinomas respectively, whereas only 3% of colonic biopsies from asymptomatic control subjects are positive for *E. coli* [191]. In 2004, mucosa-associated *E. coli* was found enriched in 70% of the 21 CRC patients compared to 42% of the 24 control biopsies [192]. Using adenocarcinomas and normal colonic mucosa from CRC patients, mucosa-associated *E. coli* was found in 50% of adenomas compared to 15% of normal mucosal samples [193]. More recent studies have confirmed the enrichment of *E. coli* in tumors and mucosa from CRC patients compared to the control subjects [49,194–196]. Interestingly, in CRC samples, studies have shown a high prevalence of *E. coli* strains that harbor virulence factors and produce toxins called cyclomodulins able to induce DNA damage and/or influence the cell cycle of eukaryotic cells and therefore affecting cellular proliferation, differentiation and apoptosis [193,194,197]. Interestingly, there is a correlation between poor prognostic factors for CRC (tumor-node-metastasis stage) and colonization of mucosa with *E. coli* [196]. Cyclomodulin-producing *E. coli* strains are more prevalent on mucosa of patients with advanced stage III/IV CRC compared to those with stage I CRC, suggesting that pathogenic *E. coli* colonization could be used as a new and crucial prognostic marker [196]. Four toxins have been extensively studied for their impacts on CRC: CIF (cycle-inhibiting factor), CNF (cytotoxic necrotizing factor), CDT (cytotoxic distending toxin) and colibactin. CIF is produced by certain EPEC strains, promotes the actin cytoskeleton rearrangement and mediates the G2/M cell cycle arrest characterized by inactive phosphorylation of cyclin-dependent kinase 1, a key player in cell

cycle regulation [198]. CNF induces a transient activation of COX-2 and the Rho GTPases such as Rac, RhoA, and Cdc42. As Rho GTPases have been characterized as regulators of actin cytoskeleton, their deregulation leads to cytoskeletal alterations and therefore affects the cell cycle [199,200]. CDT was first identified in 1988 in the culture of *E. coli* strains isolated from patients with diarrhea. This toxin has been found in various gram-negative bacterial species and is known to have DNase activity and therefore induce DNA double-strand breaks, cell cycle arrest and cell apoptosis if the DNA double-strand breaks exceed the repair capacity of the cell [200]. Colibactin is another bacterial-derived genotoxin first described in 2006 by Nougayrede and colleagues [201] and has not yet been isolated or purified to date. Colibactin is a hybrid polyketide-non ribosomal peptide compound produced by a complex biosynthetic machinery encoded by the polyketide synthase (*pks*) pathogenicity island [201]. High prevalence of *E. coli* strains harboring the *pks* island has been associated with CRC [49,194]. In vitro, colibactin induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells with activation of the DNA damage signaling cascade and cell cycle arrest [201]. In addition, colibactin is able to induce chromosomal instability with sign of chromosome aberration [202]. In 2015, Vizcaino and Crawford were successful in purifying a pre-colibactin compound and showed that the pre-colibactin is able to induce in vitro DNA crosslink but not DNA double-strand breaks [203]. The authors thus hypothesized that DNA double-strand breaks may not be induced directly by colibactin but rather a response of infected mammalian cells to repair their DNA [203]. Experiments using human epithelial cells have shown that *pks*-harboring *E. coli* strains are able to induce senescence of infected cells, which is accompanied with ROS production, release of pro-inflammatory mediators and also production of growth factors, such as the hepatocyte growth factor, which have the ability to promote the proliferation of neighboring uninfected cells [204,205]. Using macrophages, which are one of the predominant tumor-infiltrating immune cells, Raisch and colleagues showed that *pks*-harboring *E. coli* strains are able to survive in macrophages and induce pro-inflammatory and pro-carcinogenic mediators such as COX-2 and PGE2 [206]. This suggests that *E. coli* might influence CRC progression by persisting in immune cells and controlling the secretion of pro-tumoral mediators [206]. Using a genetically modified mouse model, the *pks*-harboring *E. coli* strain 11G5 isolated from CRC was shown to highly persist in the gut, induce colonic inflammation, epithelial damages and cellular proliferation [197]. Using inflammation-induced CRC model (AOM-treated *il10*<sup>-/-</sup> mice), mono-colonization with *pks*-harboring *E. coli* strains leads to enhanced tumor multiplicity and invasion compared to mice colonized with the isogenic mutant defective for *pks* island and therefore not able to produce colibactin, or compared to uninfected mice [49]. The effect of *pks*-harboring *E. coli* strains to enhance intestinal tumorigenesis is confirmed using *APC*<sup>Min/+</sup> mice [196] or xenograft and AOM-DSS mouse models of CRC [205]. Recently, a clinical study on 88 CRC patients showed a significant increase in *E. coli* colonization in the MSI CRC phenotype [207]. However, colibactin-producing *E. coli* are more frequently found in microsatellite stable (MSS) CRC, suggesting that the involvement of *pks*-harboring *E. coli* in CRC may depend on the CRC phenotype [207].

## 6. Conclusions and Future Directions/Clinical Application

CRC is a multifactorial disease, of which several risk factors have been identified involving genetic and environment factors, lifestyle and gut microbiota. Usually treated with surgery, chemotherapy and radiotherapy with high toxicity and treatment resistance, it is essential to propose less harmful new therapeutic strategies for CRC. Since gut microbiota can contribute to colorectal carcinogenesis, strategies targeting the gut microbiota have been proposed to prevent and treat CRC. A potential strategy could be the supplementation of SCFAs, which have beneficial effects on the epithelial barrier functions and mucosal immune response, as well as anti-inflammatory and anti-carcinogenic activities [9]. Indeed, administration of SCFAs was shown to inhibit colonic inflammation and decrease cellular proliferation marker levels leading to reduced colon tumorigenesis in AOM-DSS-treated mice [208]. The bacteria-induced ROS could also be targeted as a strategy for CRC prevention. For example, it was shown that inhibition of polyamine catabolism, which leads to formation of ROS, leads to decreases in ETBF-induced proliferation, chronic

inflammation and tumorigenesis in *APC<sup>Min/+</sup>* mice [209]. Recently, Cougnoux et al. showed that two compounds that bind to the active site of ClbP enzyme involved in the synthesis of colibactin are able to suppress colibactin-induced DNA damage both in vitro using human epithelial Hela cells and in vivo using a mouse colonic loop model [10]. Using human HCT116 colon cancer cells, the authors showed that the treatment of *pks*-harboring *E. coli* with these two compounds significantly inhibits *pks*-harboring *E. coli*-induced cellular senescence, which consequently suppresses hepatocyte growth factor secretion and proliferation of neighboring uninfected cell. These two compounds are also able to reduce tumor growth in xenograft and AOM-DSS CRC models by inhibiting *pks*-harboring *E. coli*-induced senescence, decreasing hepatocyte growth factor levels and cell proliferation [10]. This study showed that targeting colibactin production could be a strategy to prevent the emergence of CRC induced by *pks*-harboring *E. coli*. The direct modulation of the gut microbiota is a highly considered strategy for CRC treatment. In this regard, two prebiotics, substances that induce the growth or activity of microorganisms and therefore positively influence the gut microbiota, galacto-oligosaccharide and inulin were shown to inhibit aberrant crypt foci formation [11]. In addition, inulin was shown to decrease carcinogen-induced DNA damage in intestinal crypts in mice [210]. Several probiotics have also been shown to have a great impact on prevention of CRC development. Indeed, the consumption of lactic acid bacteria-containing probiotics can prevent DNA damage induced by the mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines [12]. Recently, *Lactobacillus* was shown to induce apoptosis of the human colorectal adenocarcinoma cell line HT29 by enhancing pro-apoptotic BAX protein expression and decreasing anti-apoptotic BCL-2 protein expression, leading to the inhibition of cell growth [211]. Using a mouse model of 1,2-dimethylhydrazine-induced CRC, a *Lactobacillus* strain was shown to decrease the damage score and the number of colonic tumors [212]. Interestingly, the administration of a *Lactobacillus* strain induces expression of an anti-inflammatory cytokine profile with enhanced IL-10 level [212]. These studies suggest that the lactic acid-producing bacteria could be used to inhibit the inflammatory environment associated with CRC, and in a larger extent, to prevent the development of CRC in patients with chronic intestinal inflammation who have a high risk to develop CRC.

Microbiota composition has been shown to influence the response to chemotherapy or immunotherapy [213,214]. In 2015, Sivan and colleagues analyzed melanoma growth in mice from different animal facilities which have different commensal microbes [13]. They found a significant difference in tumor development, and this is immune-mediated with decreased tumor-specific T cell response and less CD8<sup>+</sup> T cell accumulation in the tumors from mice with more aggressive tumor development. Cohousing ablates the difference in tumor growth between the mice from different facilities, showing the presence of commensal microbes that facilitate anti-tumor immunity [13]. By analyzing the bacterial community in fecal samples, the authors showed a positive association between *Bifidobacterium* and anti-tumor T cell response. Administration of *Bifidobacterium* significantly improves the control of tumor development in mice compared to untreated mice, and this is accompanied by an induction of tumor-specific T cells and increased accumulation of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the tumor. Of note, *Bifidobacterium* improves response to anti-programmed death-ligand 1 monoclonal antibody therapy, which is an anti-tumor immunotherapy, in mice [13]. Vétizou and colleagues have studied another anti-tumor immunotherapy, which relies on the blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA4), a major negative regulator of T cell activation against a variety of antigens including tumor-associated antigens. The authors showed that the CTLA4 immunotherapy is influenced by *Bacteroides* which stimulates the T cell response [14]. These results showed that the heterogeneity between patients in the response to anti-tumor immunotherapy is largely associated with the gut microbiota composition, suggesting that manipulation of gut microbiota could improve immunotherapy responses.

Finally, immune therapies targeting TLRs to activate anti-cancer immunity or suppress oncogenic signaling pathways should be considered for CRC treatment. Various molecules targeting TLRs are currently under investigation in clinical trials for their ability to promote antitumor immunity [215]. For example, TLR9 agonists, which have already been added to anti-cancer strategies such as chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy, are able to enhance the anti-tumor immune response mediated by T and B cells. Moreover, TLR9 agonists were shown to inhibit colon cancer cell

proliferation, promote apoptosis, and improve the beneficial effects of radiotherapy [215]. Strategies using TLR4 antagonists have been also proposed in CRC treatment. Indeed, anti-TLR4 antibodies have been shown to decrease the number of polyps in AOM-DSS-treated mice [216].

In conclusion, the modulation of the gut microbiota by all the strategies outlined here can have a beneficial impact on the dialogue between the gut, the immune system and the microbiota. In addition, increasing evidence shows that gut microbiota manipulation can exert a protective effect against CRC via the production of SCFAs, inhibition of toxin-producing pathogens, anti-proliferative activity, reduction of aberrant crypt foci and enhanced production of anti-oxidant enzymes and anti-inflammatory responses. Moreover, the identification of other microbes associated with clinical benefits or microbes as biomarkers to predict immunotherapy response should be considered.

**Acknowledgments:** This work was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie, Inserm (UMR1071), INRA (USC 2018), the European Union FP7 People Marie Curie International Incoming Fellowship (to Hang Nguyen), and “Nouveau chercheur” grant from Région Auvergne (to Hang Nguyen).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

AIEC	Adherent-invasive <i>Escherichia coli</i>
AKT	Protein kinase B
AMPs	Antimicrobial peptides
AOM	Azoxymethane
Apc	Adenomatous polyposis coli
BAX	Bcl-2-associated X
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BfPAI	<i>Bacteroides fragilis</i> pathogenicity island
CDT	Cytotoxic distending toxin
CIF	Cycle-inhibiting factor
CIMP	CpG island methylator phenotype
CIN	Chromosomal instability
CLRs	C-type lectin receptors
CNF	Cytotoxic necrotizing factor
COX-2	Cyclo-oxygenase-2
CRC	Colorectal cancer
CTLA4	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
DAEC	Diffusely adherent <i>Escherichia coli</i>
DSS	Dextran sodium sulfate
EAEC	Enteraggregative <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
ETBF	Enterotoxigenic <i>Bacteroides fragilis</i>
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>
FAP	Familial adenomatous polyposis
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HP-NAP	<i>Helicobacter pylori</i> neutrophil-activating protein
IBD	Inflammatory bowel diseases
IECs	Intestinal epithelial cells
IgA	Immunoglobulin-A
IL	Interleukin
ILC3	Innate lymphoid cells
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
M cells	Microfold cells



MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
MAMPs	Microbe-associated molecular patterns
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MLH1	MutL homolog 1
MSI	Microsatellite instability
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
NLRs	NOD-like receptors
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
NTBF	Nontoxigenic <i>Bacteroides fragilis</i>
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
<i>pks</i>	Polyketide synthase
PRRs	Pattern recognition receptors
ROS	Reactive oxygen species
RNS	Reactive nitrogen species
SCFAs	Short-chain fatty acids
SFB	Segmented filamentous bacteria
SNP	Single nucleotide polymorphism
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STEAEC	Shiga toxin-producing enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
TCF	T-cell factor
Th17	T helper 17
TLRs	Toll-like receptors
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$

## References

1. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D.M.; Forman, D.; Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E359–E386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Terzić, J.; Grivennikov, S.; Karin, E.; Karin, M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* **2010**, *138*, 2101–2114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Brenner, H.; Kloor, M.; Pox, C.P. Colorectal cancer. *Lancet* **2014**, *383*, 1490–1502. [[CrossRef](#)]
4. Tjalsma, H.; Boleij, A.; Marchesi, J.R.; Dutilh, B.E. A bacterial driver–passenger model for colorectal cancer: Beyond the usual suspects. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 575–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chen, W.; Liu, F.; Ling, Z.; Tong, X.; Xiang, C. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e39743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Lu, Y.; Chen, J.; Zheng, J.; Hu, G.; Wang, J.; Huang, C.; Lou, L.; Wang, X.; Zeng, Y. Mucosal adherent bacterial dysbiosis in patients with colorectal adenomas. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 26337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Gao, Z.; Guo, B.; Gao, R.; Zhu, Q.; Qin, H. Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Front. Microbiol.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Schwabe, R.F.; Jobin, C. The microbiome and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 800–812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Van der Beek, C.M.; Dejong, C.H.C.; Troost, F.J.; Masclee, A.A.M.; Lenaerts, K. Role of short-chain fatty acids in colonic inflammation, carcinogenesis, and mucosal protection and healing. *Nutr. Rev.* **2017**, *75*, 286–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Coughnoux, A.; Delmas, J.; Gibold, L.; Faïs, T.; Romagnoli, C.; Robin, F.; Cuevas-Ramos, G.; Oswald, E.; Darfeuille-Michaud, A.; Prati, F.; et al. Small-molecule inhibitors prevent the genotoxic and protumoural effects induced by colibactin-producing bacteria. *Gut* **2016**, *65*, 278–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Qamar, T.R.; Syed, F.; Nasir, M.; Rehman, H.; Zahid, M.N.; Liu, R.H.; Iqbal, S. Novel Combination of Prebiotics Galacto-Oligosaccharides and Inulin-Inhibited Aberrant Crypt Foci Formation and Biomarkers of Colon Cancer in Wistar Rats. *Nutrients* **2016**, *8*, 465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Zsivkovits, M.; Fekadu, K.; Sontag, G.; Nabinger, U.; Huber, W.W.; Kundi, M.; Chakraborty, A.; Foissy, H.; Knasmüller, S. Prevention of heterocyclic amine-induced DNA damage in colon and liver of rats by different lactobacillus strains. *Carcinogenesis* **2003**, *24*, 1913–1918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sivan, A.; Corrales, L.; Hubert, N.; Williams, J.B.; Aquino-Michaels, K.; Earley, Z.M.; Benyamin, F.W.; Lei, Y.M.; Jabri, B.; Alegre, M.-L.; et al. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* **2015**, *350*, 1084–1089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Vétizou, M.; Pitt, J.M.; Daillère, R.; Lepage, P.; Waldschmitt, N.; Flament, C.; Rusakiewicz, S.; Routy, B.; Roberti, M.P.; Duong, C.P.M.; et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* **2015**, *350*, 1079–1084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Johns, L.E.; Houlston, R.S. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am. J. Gastroenterol.* **2001**, *96*, 2992–3003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Jasperson, K.W.; Tuohy, T.M.; Neklason, D.W.; Burt, R.W. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* **2010**, *138*, 2044–2058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Doubeni, C.A.; Laiyemo, A.O.; Major, J.M.; Schootman, M.; Lian, M.; Park, Y.; Graubard, B.I.; Hollenbeck, A.R.; Sinha, R. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: An analysis of over one-half million adults in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Cancer* **2012**, *118*, 3636–3644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Ryan-Harshman, M.; Aldoori, W. Diet and colorectal cancer. *Can. Fam. Physician* **2007**, *53*, 1913–1920. [[PubMed](#)]
19. Boffetta, P.; Hashibe, M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* **2006**, *7*, 149–156. [[CrossRef](#)]
20. Cho, E.; Smith-Warner, S.A.; Ritz, J.; van den Brandt, P.A.; Colditz, G.A.; Folsom, A.R.; Freudenheim, J.L.; Giovannucci, E.; Goldbohm, R.A.; Graham, S.; et al. Alcohol intake and colorectal cancer: A pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann. Intern. Med.* **2004**, *140*, 603–613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Botteri, E.; Iodice, S.; Bagnardi, V.; Raimondi, S.; Lowenfels, A.B.; Maisonneuve, P. Smoking and colorectal cancer: A meta-analysis. *JAMA* **2008**, *300*, 2765–2778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Berger, N.A. Obesity and cancer pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2014**, *1311*, 57–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ma, Y.; Yang, Y.; Wang, F.; Zhang, P.; Shi, C.; Zou, Y.; Qin, H. Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review of Prospective Studies. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e53916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lin, J.E.; Colon-Gonzalez, F.; Blomain, E.; Kim, G.W.; Aing, A.; Stoecker, B.; Rock, J.; Snook, A.E.; Zhan, T.; Hyslop, T.M.; et al. Obesity-induced colorectal cancer is driven by caloric silencing of the guanylin-GUCY2C paracrine signaling axis. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 339–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Koda, M.; Sulkowska, M.; Kanczuga-Koda, L.; Surmacz, E.; Sulkowski, S. Overexpression of the obesity hormone leptin in human colorectal cancer. *J. Clin. Pathol.* **2007**, *60*, 902–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Wang, D.; Chen, J.; Chen, H.; Duan, Z.; Xu, Q.; Wei, M.; Wang, L.; Zhong, M. Leptin regulates proliferation and apoptosis of colorectal carcinoma through PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. *J. Biosci.* **2012**, *37*, 91–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Walter, V.; Jansen, L.; Knebel, P.; Chang-Claude, J.; Hoffmeister, M.; Brenner, H. Physical activity and survival of colorectal cancer patients: Population-based study from Germany. *Int. J. Cancer* **2017**, *140*, 1985–1997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Golshiri, P.; Rasooli, S.; Emami, M.; Najimi, A. Effects of Physical Activity on Risk of Colorectal Cancer: A Case-control Study. *Int. J. Prev. Med.* **2016**, *7*, 32. [[PubMed](#)]
29. Ghafari, M.; Mohammadian, M.; Valipour, A.A.; Mohammadian-Hafshejani, A. Physical Activity and Colorectal Cancer. *Iran. J. Public Health* **2016**, *45*, 1673–1674. [[PubMed](#)]
30. Kruk, J.; Czerniak, U. Physical activity and its relation to cancer risk: Updating the evidence. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2013**, *14*, 3993–4003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Jess, T.; Rungoe, C.; Peyrin-Biroulet, L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: A meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *10*, 639–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Farraye, F.A.; Odze, R.D.; Eaden, J.; Itzkowitz, S.H. AGA Medical Position Statement on the Diagnosis and Management of Colorectal Neoplasia in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **2010**, *138*, 738–745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Haslam, A.; Robb, S.W.; Hébert, J.R.; Huang, H.; Wirth, M.D.; Shivappa, N.; Ebell, M.H. The association between Dietary Inflammatory Index scores and the prevalence of colorectal adenoma. *Public Health Nutr.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Gupta, R.A.; Dubois, R.N. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1*, 11–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Tanaka, T.; Kohno, H.; Suzuki, R.; Hata, K.; Sugie, S.; Niho, N.; Sakano, K.; Takahashi, M.; Wakabayashi, K. Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice: Inflammatory stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. *Int. J. Cancer* **2006**, *118*, 25–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Neufert, C.; Becker, C.; Neurath, M.F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1998–2004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Bayarsaihan, D. Epigenetic Mechanisms in Inflammation. *J. Dent. Res.* **2011**, *90*, 9–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Meira, L.B.; Bugni, J.M.; Green, S.L.; Lee, C.-W.; Pang, B.; Borenshtein, D.; Rickman, B.H.; Rogers, A.B.; Moroski-Erkul, C.A.; McFaline, J.L.; et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J. Clin. Investig.* **2008**, *118*, 2516–2525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Francescone, R.; Hou, V.; Grivennikov, S.I. Cytokines, IBD and colitis-associated cancer. *Inflamm. Bowel Dis.* **2015**, *21*, 409–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Basavaraju, U.; Shebl, F.M.; Palmer, A.J.; Berry, S.; Hold, G.L.; El-Omar, E.M.; Rabkin, C.S. Cytokine gene polymorphisms, cytokine levels and the risk of colorectal neoplasia in a screened population of Northeast Scotland. *Eur. J. Cancer Prev.* **2015**, *24*, 296–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Kim, S.; Keku, T.O.; Martin, C.; Galanko, J.; Woosley, J.T.; Schroeder, J.C.; Satia, J.A.; Halabi, S.; Sandler, R.S. Circulating levels of inflammatory cytokines and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 323–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Song, M.; Mehta, R.S.; Wu, K.; Fuchs, C.S.; Ogino, S.; Giovannucci, E.L.; Chan, A.T. Plasma Inflammatory Markers and Risk of Advanced Colorectal Adenoma in Women. *Cancer Prev. Res.* **2016**, *9*, 27–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Knüpfer, H.; Preiss, R. Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients—A summary of published results. *Int. J. Colorectal Dis.* **2010**, *25*, 135–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hsu, C.-P.; Chung, Y.-C. Influence of interleukin-6 on the invasiveness of human colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* **2006**, *26*, 4607–4614. [[PubMed](#)]
45. Grivennikov, S.; Karin, E.; Terzic, J.; Mucida, D.; Yu, G.-Y.; Vallabhapurapu, S.; Scheller, J.; Rose-John, S.; Cheroutre, H.; Eckmann, L.; et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 103–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Kühn, R.; Löhler, J.; Rennick, D.; Rajewsky, K.; Müller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **1993**, *75*, 263–274. [[CrossRef](#)]
47. Uronis, J.M.; Mühlbauer, M.; Herfarth, H.H.; Rubinas, T.C.; Jones, G.S.; Jobin, C. Modulation of the Intestinal Microbiota Alters Colitis-Associated Colorectal Cancer Susceptibility. *PLoS ONE* **2009**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Tomkovich, S.; Yang, Y.; Winglee, K.; Gauthier, J.; Mühlbauer, M.; Sun, X.; Mohamadzadeh, M.; Liu, X.; Martin, P.; Wang, G.P.; et al. Locoregional Effects of Microbiota in a Preclinical Model of Colon Carcinogenesis. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2620–2632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Arthur, J.C.; Perez-Chanona, E.; Mühlbauer, M.; Tomkovich, S.; Uronis, J.M.; Fan, T.-J.; Campbell, B.J.; Abujamel, T.; Dogan, B.; Rogers, A.B.; et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* **2012**, *338*, 120–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Medvedev, A.E. Toll-like receptor polymorphisms, inflammatory and infectious diseases, allergies, and cancer. *J. Interferon Cytokine Res.* **2013**, *33*, 467–484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Weber, A.N.; Försti, A. Toll-like receptor genetic variants and colorectal cancer. *Oncoimmunology.* **2014**, *3*, e27763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Semlali, A.; Parine, N.R.; Al Amri, A.; Azzi, A.; Arafah, M.; Kohailan, M.; Shaik, J.P.; Almadi, M.A.; Aljebreen, A.M.; Alharbi, O.; et al. Association between TLR-9 polymorphisms and colon cancer susceptibility in Saudi Arabian female patients. *OncoTargets Ther.* **2016**, *10*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Sipos, F.; Fűri, I.; Constantinovits, M.; Tulassay, Z.; Műzes, G. Contribution of TLR signaling to the pathogenesis of colitis-associated cancer in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 12713–12721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Peng, G.; Guo, Z.; Kiniwa, Y.; Voo, K.S.; Peng, W.; Fu, T.; Wang, D.Y.; Li, Y.; Wang, H.Y.; Wang, R.-F. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science* **2005**, *309*, 1380–1384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

55. Hoon Rhee, S.; Im, E.; Pothoulakis, C. Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. *Gastroenterology* **2008**, *135*, 518–528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Heckelsmiller, K.; Beck, S.; Rall, K.; Sipos, B.; Schlamp, A.; Tuma, E.; Rothenfusser, S.; Endres, S.; Hartmann, G. Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur. J. Immunol.* **2002**, *32*, 3235–3245. [[CrossRef](#)]
57. Lowe, E.L.; Crother, T.R.; Rabizadeh, S.; Hu, B.; Wang, H.; Chen, S.; Shimada, K.; Wong, M.H.; Michelsen, K.S.; Arditì, M. Toll-Like Receptor 2 Signaling Protects Mice from Tumor Development in a Mouse Model of Colitis-Induced Cancer. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Huang, B.; Zhao, J.; Li, H.; He, K.-L.; Chen, Y.; Mayer, L.; Unkeless, J.C.; Xiong, H. Toll-Like Receptors on Tumor Cells Facilitate Evasion of Immune Surveillance. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 5009–5014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Fukata, M.; Hernandez, Y.; Conduah, D.; Cohen, J.; Chen, A.; Breglio, K.; Goo, T.; Hsu, D.; Xu, R.; Abreu, M.T. Innate immune signaling by Toll-like receptor-4 (TLR4) shapes the inflammatory microenvironment in colitis-associated tumors. *Inflamm. Bowel Dis.* **2009**, *15*, 997–1006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Rakoff-Nahoum, S.; Medzhitov, R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science* **2007**, *317*, 124–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Kurzawski, G.; Suchy, J.; Kładny, J.; Grabowska, E.; Mierzejewski, M.; Jakubowska, A.; Debniak, T.; Cybulski, C.; Kowalska, E.; Szych, Z.; et al. The NOD2 3020insC mutation and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 1604–1606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Philpott, D.J.; Sorbara, M.T.; Robertson, S.J.; Croitoru, K.; Girardin, S.E. NOD proteins: Regulators of inflammation in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 9–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Zhan, Y.; Seregin, S.S.; Chen, J.; Chen, G.Y. Nod1 Limits Colitis-Associated Tumorigenesis by Regulating IFN- $\gamma$  Production. *J. Immunol.* **2016**, *196*, 5121–5129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, K.S.; Manichanh, C.; Nielsen, T.; Pons, N.; Levenez, F.; Yamada, T.; et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **2010**, *464*, 59–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Dominguez-Bello, M.G.; Blaser, M.J.; Ley, R.E.; Knight, R. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology* **2011**, *140*, 1713–1719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Jandhyala, S.M.; Talukdar, R.; Subramanyam, C.; Vuyyuru, H.; Sasikala, M.; Reddy, D.N. Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 8787–8803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Sun, Y.; O’Riordan, M.X.D. Regulation of Bacterial Pathogenesis by Intestinal Short-Chain Fatty Acids. *Adv. Appl. Microbiol.* **2013**, *85*, 93–118. [[PubMed](#)]
68. Rowland, I.; Gibson, G.; Heinken, A.; Scott, K.; Swann, J.; Thiele, I.; Tuohy, K. Gut microbiota functions: Metabolism of nutrients and other food components. *Eur. J. Nutr.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Woting, A.; Blaut, M. The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease. *Nutrients* **2016**, *8*, 202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Vernocchi, P.; Del Chierico, F.; Putignani, L. Gut Microbiota Profiling: Metabolomics Based Approach to Unravel Compounds Affecting Human Health. *Front. Microbiol.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Fukiya, S.; Arata, M.; Kawashima, H.; Yoshida, D.; Kaneko, M.; Minamida, K.; Watanabe, J.; Ogura, Y.; Uchida, K.; Itoh, K.; et al. Conversion of cholic acid and chenodeoxycholic acid into their 7-oxo derivatives by *Bacteroides intestinalis* AM-1 isolated from human feces. *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *293*, 263–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Ajouz, H.; Mukherji, D.; Shamseddine, A. Secondary bile acids: An underrecognized cause of colon cancer. *World J. Surg. Oncol.* **2014**, *12*, 164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Neis, E.P.; Dejong, C.H.; Rensen, S.S. The Role of Microbial Amino Acid Metabolism in Host Metabolism. *Nutrients* **2015**, *7*, 2930–2946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Hill, M.J. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur. J. Cancer Prev.* **1997**, *6*, S43–S45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Frick, P.G.; Riedler, G.; Brögli, H. Dose response and minimal daily requirement for vitamin K in man. *J. Appl. Physiol.* **1967**, *23*, 387–389. [[PubMed](#)]
76. Gustafsson, B.E.; Daft, F.S.; McDaniel, E.G.; Smith, J.C.; Fitzgerald, R.J. Effects of vitamin K-active compounds and intestinal microorganisms in vitamin K-deficient germfree rats. *J. Nutr.* **1962**, *78*, 461–468. [[PubMed](#)]

77. Johansson, M.E.V.; Phillipson, M.; Petersson, J.; Velcich, A.; Holm, L.; Hansson, G.C. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15064–15069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Wang, H.-B.; Wang, P.-Y.; Wang, X.; Wan, Y.-L.; Liu, Y.-C. Butyrate Enhances Intestinal Epithelial Barrier Function via Up-Regulation of Tight Junction Protein Claudin-1 Transcription. *Dig. Dis. Sci.* **2012**, *57*, 3126–3135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Gaudier, E.; Jarry, A.; Blottière, H.M.; de Coppet, P.; Buisine, M.P.; Aubert, J.P.; Laboisse, C.; Cherbut, C.; Hoebler, C. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2004**, *287*, G1168–G1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Hernández-Chirlaque, C.; Aranda, C.J.; Ocón, B.; Capitán-Cañadas, F.; Ortega-González, M.; Carrero, J.J.; Suárez, M.D.; Zarzuelo, A.; Sánchez de Medina, F.; Martínez-Augustin, O. Germ-free and Antibiotic-treated Mice are Highly Susceptible to Epithelial Injury in DSS Colitis. *J. Crohns. Colitis* **2016**, *10*, 1324–1335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Bain, C.C.; Mowat, A.M. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol. Rev.* **2014**, *260*, 102–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Zindl, C.L.; Lai, J.-F.; Lee, Y.K.; Maynard, C.L.; Harbour, S.N.; Ouyang, W.; Chaplin, D.D.; Weaver, C.T. IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 12768–12773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Chu, V.T.; Beller, A.; Rausch, S.; Strandmark, J.; Zänker, M.; Arbach, O.; Kruglov, A.; Berek, C. Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. *Immunity* **2014**, *40*, 582–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Sonnenberg, G.F.; Artis, D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 698–708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Mortha, A.; Chudnovskiy, A.; Hashimoto, D.; Bogunovic, M.; Spencer, S.P.; Belkaid, Y.; Merad, M. Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science* **2014**, *343*, 1249288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Hepworth, M.R.; Monticelli, L.A.; Fung, T.C.; Ziegler, C.G.K.; Grunberg, S.; Sinha, R.; Mantegazza, A.R.; Ma, H.-L.; Crawford, A.; Angelosanto, J.M.; et al. Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* **2013**, *498*, 113–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Bekiaris, V.; Persson, E.K.; Agace, W.W. Intestinal dendritic cells in the regulation of mucosal immunity. *Immunol. Rev.* **2014**, *260*, 86–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Slack, E.; Balmer, M.L.; Macpherson, A.J. B cells as a critical node in the microbiota-host immune system network. *Immunol. Rev.* **2014**, *260*, 50–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Yamanaka, T.; Helgeland, L.; Farstad, I.N.; Fukushima, H.; Midtvedt, T.; Brandtzaeg, P. Microbial colonization drives lymphocyte accumulation and differentiation in the follicle-associated epithelium of Peyer’s patches. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 816–822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Macpherson, A.J.; Harris, N.L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 478–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Ivanov, I.I.; Atarashi, K.; Manel, N.; Brodie, E.L.; Shima, T.; Karaoz, U.; Wei, D.; Goldfarb, K.C.; Santee, C.A.; Lynch, S.V.; et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **2009**, *139*, 485–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Cao, A.T.; Yao, S.; Gong, B.; Elson, C.O.; Cong, Y. Th17 cells upregulate polymeric Ig receptor and intestinal IgA and contribute to intestinal homeostasis. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 4666–4673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Cerf-Bensussan, N.; Gaboriau-Routhiau, V. The immune system and the gut microbiota: Friends or foes? *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 735–744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Schnupf, P.; Gaboriau-Routhiau, V.; Gros, M.; Friedman, R.; Moya-Nilges, M.; Nigro, G.; Cerf-Bensussan, N.; Sansonetti, P.J. Growth and host interaction of mouse segmented filamentous bacteria in vitro. *Nature* **2015**, *520*, 99–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Gaboriau-Routhiau, V.; Rakotobe, S.; Lécuyer, E.; Mulder, I.; Lan, A.; Bridonneau, C.; Rochet, V.; Pisi, A.; De Paepe, M.; Brandi, G.; et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* **2009**, *31*, 677–689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Macpherson, A.J.; Smith, K. Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 497–500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

97. Arpaia, N.; Campbell, C.; Fan, X.; Dikiy, S.; van der Veeken, J.; deRoos, P.; Liu, H.; Cross, J.R.; Pfeffer, K.; Coffer, P.J.; et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* **2013**, *504*, 451–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Burgess, S.L.; Buonomo, E.; Carey, M.; Cowardin, C.; Naylor, C.; Noor, Z.; Wills-Karp, M.; Petri, W.A. Bone marrow dendritic cells from mice with an altered microbiota provide interleukin 17A-dependent protection against *Entamoeba histolytica* colitis. *MBio* **2014**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Bammann, L.L.; Clark, W.B.; Gibbons, R.J. Impaired colonization of gnotobiotic and conventional rats by streptomycin-resistant strains of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **1978**, *22*, 721–726. [[PubMed](#)]
100. Rupnik, M.; Wilcox, M.H.; Gerding, D.N. *Clostridium difficile* infection: New developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 526–536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Boleij, A.; Tjalsma, H. Gut bacteria in health and disease: A survey on the interface between intestinal microbiology and colorectal cancer. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **2012**, *87*, 701–730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Schamberger, G.P.; Diez-Gonzalez, F. Selection of recently isolated colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* **2002**, *65*, 1381–1387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Fukuda, S.; Toh, H.; Hase, K.; Oshima, K.; Nakanishi, Y.; Yoshimura, K.; Tobe, T.; Clarke, J.M.; Topping, D.L.; Suzuki, T.; et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* **2011**, *469*, 543–547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Gantois, I.; Ducatelle, R.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F.; Hautefort, I.; Thompson, A.; Hinton, J.C.; Van Immerseel, F. Butyrate Specifically Down-Regulates Salmonella Pathogenicity Island 1 Gene Expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 946–949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Momose, Y.; Hirayama, K.; Itoh, K. Competition for proline between indigenous *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota and its contribution to the colonization resistance against *E. coli* O157:H7. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2008**, *94*, 165–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Marteyn, B.; West, N.; Browning, D.; Cole, J.; Shaw, J.; Palm, F.; Mounier, J.; Prévost, M.-C.; Sansonetti, P.; Tang, C. Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen in vivo. *Nature* **2010**, *465*, 355–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Takeuchi, O.; Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **2010**, *140*, 805–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Salzman, N.H.; Underwood, M.A.; Bevins, C.L. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin. Immunol.* **2007**, *19*, 70–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Vaishnava, S.; Behrendt, C.L.; Ismail, A.S.; Eckmann, L.; Hooper, L.V. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 20858–20863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Kobayashi, K.S.; Chamaillard, M.; Ogura, Y.; Henegariu, O.; Inohara, N.; Nuñez, G.; Flavell, R.A. Nod2-Dependent Regulation of Innate and Adaptive Immunity in the Intestinal Tract. *Science* **2005**, *307*, 731–734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Frantz, A.L.; Rogier, E.W.; Weber, C.R.; Shen, L.; Cohen, D.A.; Fenton, L.A.; Bruno, M.E. C.; Kaetzel, C.S. Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides. *Mucosal Immunol.* **2012**, *5*, 501–512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Cash, H.L.; Whitham, C.V.; Behrendt, C.L.; Hooper, L.V. Symbiotic Bacteria Direct Expression of an Intestinal Bactericidal Lectin. *Science* **2006**, *313*, 1126–1130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Giel, J.L.; Sorg, J.A.; Sonenshein, A.L.; Zhu, J. Metabolism of Bile Salts in Mice Influences Spore Germination in *Clostridium difficile*. *PLoS ONE* **2010**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Plummer, M.; de Martel, C.; Vignat, J.; Ferlay, J.; Bray, F.; Franceschi, S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: A synthetic analysis. *Lancet Glob. Health* **2016**, *4*, e609–e616. [[CrossRef](#)]
115. Schottenfeld, D.; Beebe-Dimmer, J. The cancer burden attributable to biologic agents. *Ann. Epidemiol.* **2015**, *25*, 183–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Moore, W.E.; Moore, L.H. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 3202–3207. [[PubMed](#)]

117. Wang, T.; Cai, G.; Qiu, Y.; Fei, N.; Zhang, M.; Pang, X.; Jia, W.; Cai, S.; Zhao, L. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J.* **2012**, *6*, 320–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Sobhani, I.; Tap, J.; Roudot-Thoraval, F.; Roperch, J.P.; Letulle, S.; Langella, P.; Corthier, G.; Tran Van Nhieu, J.; Furet, J.P. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS ONE* **2011**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Shen, X.J.; Rawls, J.F.; Randall, T.; Burcal, L.; Mpande, C.N.; Jenkins, N.; Jovov, B.; Abdo, Z.; Sandler, R.S.; Keku, T.O. Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. *Gut Microbes* **2010**, *1*, 138–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. McCoy, A.N.; Araújo-Pérez, F.; Azcárate-Peril, A.; Yeh, J.J.; Sandler, R.S.; Keku, T.O. Fusobacterium Is Associated with Colorectal Adenomas. *PLoS ONE* **2013**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Wu, N.; Yang, X.; Zhang, R.; Li, J.; Xiao, X.; Hu, Y.; Chen, Y.; Yang, F.; Lu, N.; Wang, Z.; et al. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microb. Ecol.* **2013**, *66*, 462–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Viljoen, K.S.; Dakshinamurthy, A.; Goldberg, P.; Blackburn, J.M. Quantitative profiling of colorectal cancer-associated bacteria reveals associations between fusobacterium spp., enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) and clinicopathological features of colorectal cancer. *PLoS ONE* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Zackular, J.P.; Baxter, N.T.; Iverson, K.D.; Sadler, W.D.; Petrosino, J.F.; Chen, G.Y.; Schloss, P.D. The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *MBio* **2013**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Morgan, X.C.; Tickle, T.L.; Sokol, H.; Gevers, D.; Devaney, K.L.; Ward, D.V.; Reyes, J.A.; Shah, S.A.; LeLeiko, N.; Snapper, S.B.; et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* **2012**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Zhu, Q.; Jin, Z.; Wu, W.; Gao, R.; Guo, B.; Gao, Z.; Yang, Y.; Qin, H. Analysis of the Intestinal Lumen Microbiota in an Animal Model of Colorectal Cancer. *PLoS ONE* **2014**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Stofilas, A.; Lagoudianakis, E.E.; Seretis, C.; Pappas, A.; Koronakis, N.; Keramidaris, D.; Koukoutsis, I.; Chrysikos, I.; Manouras, I.; Manouras, A. Association of Helicobacter Pylori Infection and Colon Cancer. *J. Clin. Med. Res.* **2012**, *4*, 172–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Balamurugan, R.; Rajendiran, E.; George, S.; Samuel, G.V.; Ramakrishna, B.S. Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, *Desulfovibrio* and *Enterococcus faecalis* in the feces of patients with colorectal cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2008**, *23*, 1298–1303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Zhou, Y.; He, H.; Xu, H.; Li, Y.; Li, Z.; Du, Y.; He, J.; Zhou, Y.; Wang, H.; Nie, Y.; et al. Association of oncogenic bacteria with colorectal cancer in South China. *Oncotarget* **2016**, *7*, 80794–80802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Amarnani, R.; Rapose, A. Colon cancer and enterococcus bacteremia co-affection: A dangerous alliance. *J. Infect. Public Health* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Balish, E.; Warner, T. *Enterococcus faecalis* induces inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice. *Am. J. Pathol.* **2002**, *160*, 2253–2257. [[CrossRef](#)]
131. Ruiz, P.A.; Shkoda, A.; Kim, S.C.; Sartor, R.B.; Haller, D. IL-10 gene-deficient mice lack TGF- $\beta$ /Smad signaling and fail to inhibit proinflammatory gene expression in intestinal epithelial cells after the colonization with colitogenic *Enterococcus faecalis*. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 2990–2999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Huycke, M.M.; Joyce, W.; Wack, M.F. Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of *Enterococcus faecalis*. *J. Infect. Dis.* **1996**, *173*, 743–746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Huycke, M.M.; Abrams, V.; Moore, D.R. *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 529–536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Limoli, C.L.; Giedzinski, E. Induction of Chromosomal Instability by Chronic Oxidative Stress. *Neoplasia* **2003**, *5*, 339–346. [[CrossRef](#)]
135. Wang, X.; Huycke, M.M. Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* promotes chromosomal instability in mammalian cells. *Gastroenterology* **2007**, *132*, 551–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Wang, X.; Yang, Y.; Huycke, M.M. Commensal bacteria drive endogenous transformation and tumour stem cell marker expression through a bystander effect. *Gut* **2015**, *64*, 459–468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Zhang, G.; Svenungsson, B.; Kärnell, A.; Weintraub, A. Prevalence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in adult patients with diarrhea and healthy controls. *Clin. Infect. Dis.* **1999**, *29*, 590–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Sears, C.L. The toxins of *Bacteroides fragilis*. *Toxicon* **2001**, *39*, 1737–1746. [[CrossRef](#)]
139. Toprak, N.U.; Yagci, A.; Gulluoglu, B.M.; Akin, M.L.; Demirkalem, P.; Celenk, T.; Soyletir, G. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin. Microbiol. Infect.* **2006**, *12*, 782–786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

140. Boleij, A.; Hechenbleikner, E.M.; Goodwin, A.C.; Badani, R.; Stein, E.M.; Lazarev, M.G.; Ellis, B.; Carroll, K.C.; Albesiano, E.; Wick, E.C.; et al. The *Bacteroides fragilis* toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *60*, 208–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Purcell, R.V.; Pearson, J.; Aitchison, A.; Dixon, L.; Frizelle, F.A.; Keenan, J.I. Colonization with enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* is associated with early-stage colorectal neoplasia. *PLoS ONE* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Obiso, R.J.; Azghani, A.O.; Wilkins, T.D. The *Bacteroides fragilis* toxin fragilysin disrupts the paracellular barrier of epithelial cells. *Infect. Immun.* **1997**, *65*, 1431–1439. [[PubMed](#)]
143. Wells, C.; van de Westerlo, E.; Jechorek, R.; Feltis, B.; Wilkins, T.; Erlandsen, S. *Bacteroides fragilis* enterotoxin modulates epithelial permeability and bacterial internalization by HT-29 enterocytes. *Gastroenterology* **1996**, *110*, 1429–1437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Riegler, M.; Lotz, M.; Sears, C.; Pothoulakis, C.; Castagliuolo, I.; Wang, C.C.; Sedivy, R.; Sogukoglu, T.; Cosentini, E.; Bischof, G.; et al. *Bacteroides fragilis* toxin 2 damages human colonic mucosa in vitro. *Gut* **1999**, *44*, 504–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Wu, S.; Morin, P.J.; Maouyo, D.; Sears, C.L. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology* **2003**, *124*, 392–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Wu, S.; Rhee, K.-J.; Albesiano, E.; Rabizadeh, S.; Wu, X.; Yen, H.-R.; Huso, D.L.; Brancati, F.L.; Wick, E.; McAllister, F.; et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 1016–1022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Han, Y.W. *Fusobacterium nucleatum*: A commensal-turned pathogen. *Curr. Opin. Microbiol.* **2015**, *23*, 141–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Castellarin, M.; Warren, R.L.; Freeman, J.D.; Dreolini, L.; Krzywinski, M.; Strauss, J.; Barnes, R.; Watson, P.; Allen-Vercoe, E.; Moore, R.A.; et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* **2012**, *22*, 299–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Li, Y.-Y.; Ge, Q.-X.; Cao, J.; Zhou, Y.-J.; Du, Y.-L.; Shen, B.; Wan, Y.-J.Y.; Nie, Y.-Q. Association of *Fusobacterium nucleatum* infection with colorectal cancer in Chinese patients. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 3227–3233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Yang, Y.; Weng, W.; Peng, J.; Hong, L.; Yang, L.; Toiyama, Y.; Gao, R.; Liu, M.; Yin, M.; Pan, C.; et al. *Fusobacterium nucleatum* Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor- $\kappa$ B, and Up-regulating Expression of MicroRNA-21. *Gastroenterology* **2017**, *152*, 851–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Medina, P.P.; Nolde, M.; Slack, F.J. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* **2010**, *467*, 86–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Kostic, A.D.; Chun, E.; Robertson, L.; Glickman, J.N.; Gallini, C.A.; Michaud, M.; Clancy, T.E.; Chung, D.C.; Lochhead, P.; Hold, G.L.; et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor immune microenvironment. *Cell Host Microbe* **2013**, *14*, 207–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Rubinstein, M.R.; Wang, X.; Liu, W.; Hao, Y.; Cai, G.; Han, Y.W. *Fusobacterium nucleatum* Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Signaling via its FadA Adhesin. *Cell Host Microbe* **2013**, *14*, 195–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. McCOY, W.C.; Mason, J.M. Enterococcal endocarditis associated with carcinoma of the sigmoid; report of a case. *J. Med. Assoc. State Ala.* **1951**, *21*, 162–166. [[PubMed](#)]
155. Klein, R.S.; Recco, R.A.; Catalano, M.T.; Edberg, S.C.; Casey, J.I.; Steigbigel, N.H. Association of *Streptococcus bovis* with carcinoma of the colon. *N. Engl. J. Med.* **1977**, *297*, 800–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Boleij, A.; van Gelder, M.M.; Swinkels, D.W.; Tjalsma, H. Clinical Importance of *Streptococcus gallolyticus* infection among colorectal cancer patients: Systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **2011**, *53*, 870–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Corredoira-Sánchez, J.; García-Garrote, F.; Rabuñal, R.; López-Roses, L.; García-País, M.J.; Castro, E.; González-Soler, R.; Coira, A.; Pita, J.; López-Álvarez, M.J.; et al. Association Between Bacteremia Due to *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis* I) and Colorectal Neoplasia: A Case-Control Study. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *55*, 491–496.
158. Biarc, J.; Nguyen, I.S.; Pini, A.; Gossé, F.; Richert, S.; Thiersé, D.; Van Dorsselaer, A.; Leize-Wagner, E.; Raul, F.; Klein, J.-P.; et al. Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S.bovis*). *Carcinogenesis* **2004**, *25*, 1477–1484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



159. Ellmerich, S.; Schöller, M.; Duranton, B.; Gossé, F.; Galluser, M.; Klein, J.P.; Raul, F. Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 753–756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Abdulmir, A.S.; Hafidh, R.R.; Bakar, F.A. Molecular detection, quantification, and isolation of *Streptococcus gallolyticus* bacteria colonizing colorectal tumors: Inflammation-driven potential of carcinogenesis via IL-1, COX-2, and IL-8. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Ballard, J.; Bryant, A.; Stevens, D.; Tweten, R.K. Purification and characterization of the lethal toxin (alpha-toxin) of *Clostridium septicum*. *Infect. Immun.* **1992**, *60*, 784–790. [[PubMed](#)]
162. Kennedy, C.L.; Krejany, E.O.; Young, L.F.; O'Connor, J.R.; Awad, M.M.; Boyd, R.L.; Emmins, J.J.; Lyras, D.; Rood, J.I. The alpha-toxin of *Clostridium septicum* is essential for virulence. *Mol. Microbiol.* **2005**, *57*, 1357–1366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Chew, S.S.; Lubowski, D.Z. *Clostridium septicum* and malignancy. *ANZ J. Surg.* **2001**, *71*, 647–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Corredoira, J.; Grau, I.; Garcia-Rodriguez, J.F.; García-País, M.J.; Rabuñal, R.; Ardanuy, C.; García-Garrote, F.; Coira, A.; Alonso, M.P.; Boleij, A.; et al. Colorectal neoplasm in cases of *Clostridium septicum* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bacteraemia. *Eur. J. Intern. Med.* **2017**, *41*, 68–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Mirza, N.N.; McCloud, J.M.; Cheetham, M.J. *Clostridium septicum* sepsis and colorectal cancer—A reminder. *World J. Surg. Oncol.* **2009**, *7*, 73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Chakravorty, A.; Awad, M.M.; Cheung, J.K.; Hiscox, T.J.; Lyras, D.; Rood, J.I. The Pore-Forming  $\alpha$ -Toxin from *Clostridium septicum* Activates the MAPK Pathway in a Ras-c-Raf-Dependent and Independent Manner. *Toxins* **2015**, *7*, 516–534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Suerbaum, S.; Michetti, P. Helicobacter pylori infection. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 1175–1186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Testerman, T.L.; Morris, J. Beyond the stomach: An updated view of Helicobacter pylori pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 12781–12808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Meucci, G.; Tatarella, M.; Vecchi, M.; Ranzi, M.L.; Biguzzi, E.; Beccari, G.; Clerici, E.; de Franchis, R. High prevalence of Helicobacter pylori infection in patients with colonic adenomas and carcinomas. *J. Clin. Gastroenterol.* **1997**, *25*, 605–607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Fujimori, S.; Kishida, T.; Kobayashi, T.; Sekita, Y.; Seo, T.; Nagata, K.; Tatsuguchi, A.; Gudis, K.; Yokoi, K.; Tanaka, N.; et al. Helicobacter pylori infection increases the risk of colorectal adenoma and adenocarcinoma, especially in women. *J. Gastroenterol.* **2005**, *40*, 887–893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Hong, S.N.; Lee, S.M.; Kim, J.H.; Lee, T.Y.; Kim, J.H.; Choe, W.H.; Lee, S.-Y.; Cheon, Y.K.; Sung, I.K.; Park, H.S.; et al. Helicobacter pylori infection increases the risk of colorectal adenomas: Cross-sectional study and meta-analysis. *Dig. Dis. Sci.* **2012**, *57*, 2184–2194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Inoue, I.; Mukoubayashi, C.; Yoshimura, N.; Niwa, T.; Deguchi, H.; Watanabe, M.; Enomoto, S.; Maekita, T.; Ueda, K.; Iguchi, M.; et al. Elevated risk of colorectal adenoma with Helicobacter pylori-related chronic gastritis: A population-based case-control study. *Int. J. Cancer* **2011**, *129*, 2704–2711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Siddheshwar, R.K.; Muhammad, K.B.; Gray, J.C.; Kelly, S.B. Seroprevalence of helicobacter pylori in patients with colorectal polyps and colorectal carcinoma. *Am. J. Gastroenterol.* **2001**, *96*, 84–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Bae, R.C.; Jeon, S.W.; Cho, H.J.; Jung, M.K.; Kweon, Y.O.; Kim, S.K. Gastric dysplasia may be an independent risk factor of an advanced colorectal neoplasm. *World J. Gastroenterol.* **2009**, *15*, 5722–5726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Moss, S.F.; Neugut, A.I.; Garbowski, G.C.; Wang, S.; Treat, M.R.; Forde, K.A. Helicobacter pylori seroprevalence and colorectal neoplasia: Evidence against an association. *J. Natl. Cancer Inst.* **1995**, *87*, 762–763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Kim, T.J.; Kim, E.R.; Chang, D.K.; Kim, Y.-H.; Baek, S.-Y.; Kim, K.; Hong, S.N. Helicobacter pylori infection is an independent risk factor of early and advanced colorectal neoplasm. *Helicobacter* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Nam, J.H.; Hong, C.W.; Kim, B.C.; Shin, A.; Ryu, K.H.; Park, B.J.; Kim, B.; Sohn, D.K.; Han, K.S.; Kim, J.; et al. Helicobacter pylori infection is an independent risk factor for colonic adenomatous neoplasms. *Cancer Causes Control.* **2017**, *28*, 107–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
178. Yan, Y.; Chen, Y.-N.; Zhao, Q.; Chen, C.; Lin, C.-J.; Jin, Y.; Pan, S.; Wu, J.-S. Helicobacter pylori infection with intestinal metaplasia: An independent risk factor for colorectal adenomas. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 1443–1449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

179. Hartwich, A.; Konturek, S.; Pierzchalski, P.; Zuchowicz, M.; Labza, H.; Konturek, P.; Karczewska, E.; Bielanski, W.; Marlicz, K.; Starzynska, T.; et al. Helicobacter pylori infection, gastrin, cyclooxygenase-2, and apoptosis in colorectal cancer. *Int. J. Colorectal Dis.* **2001**, *16*, 202–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Koh, T.J.; Dockray, G.J.; Varro, A.; Cahill, R.J.; Dangler, C.A.; Fox, J.G.; Wang, T.C. Overexpression of glycine-extended gastrin in transgenic mice results in increased colonic proliferation. *J. Clin. Investig.* **1999**, *103*, 1119–1126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
181. Tatishchev, S.F.; VanBeek, C.; Wang, H.L. Helicobacter pylori infection and colorectal carcinoma: Is there a causal association? *J. Gastrointest. Oncol.* **2012**, *3*, 380–385. [[PubMed](#)]
182. Handa, O.; Naito, Y.; Yoshikawa, T. Helicobacter pylori: A ROS-inducing bacterial species in the stomach. *Inflamm. Res.* **2010**, *59*, 997–1003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Shmueli, H.; Passaro, D.; Figer, A.; Niv, Y.; Pitlik, S.; Samra, Z.; Koren, R.; Yahav, J. Relationship between Helicobacter pylori CagA status and colorectal cancer. *Am. J. Gastroenterol.* **2001**, *96*, 3406–3410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Cover, T.L.; Blanke, S.R. Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 320–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Evans, D.J.; Evans, D.G.; Takemura, T.; Nakano, H.; Lampert, H.C.; Graham, D.Y.; Granger, D.N.; Kvietys, P.R. Characterization of a Helicobacter pylori neutrophil-activating protein. *Infect. Immun.* **1995**, *63*, 2213–2220. [[PubMed](#)]
186. Wessler, S.; Krisch, L.M.; Elmer, D.P.; Aberger, F. From inflammation to gastric cancer—The importance of Hedgehog/GLI signaling in Helicobacter pylori-induced chronic inflammatory and neoplastic diseases. *Cell Commun. Signal.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Sousa, C.P. The versatile strategies of Escherichia coli pathotypes: A mini review. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* **2006**, *12*, 363–373. [[CrossRef](#)]
188. Escobar-Páramo, P.; Grenet, K.; Le Menac’h, A.; Rode, L.; Salgado, E.; Amorin, C.; Gouriou, S.; Picard, B.; Rahimy, M.C.; Andremont, A.; et al. Large-scale population structure of human commensal Escherichia coli isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 5698–5700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Darfeuille-Michaud, A.; Neut, C.; Barnich, N.; Lederman, E.; Di Martino, P.; Desreumaux, P.; Gambiez, L.; Joly, B.; Cortot, A.; Colombel, J.F. Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn’s disease. *Gastroenterology* **1998**, *115*, 1405–1413. [[CrossRef](#)]
190. Darfeuille-Michaud, A.; Boudeau, J.; Bulois, P.; Neut, C.; Glasser, A.-L.; Barnich, N.; Bringer, M.-A.; Swidsinski, A.; Beaugerie, L.; Colombel, J.-F. High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn’s disease. *Gastroenterology* **2004**, *127*, 412–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Swidsinski, A.; Khilkin, M.; Kerjaschki, D.; Schreiber, S.; Ortner, M.; Weber, J.; Lochs, H. Association between intraepithelial Escherichia coli and colorectal cancer. *Gastroenterology* **1998**, *115*, 281–286. [[CrossRef](#)]
192. Martin, H.M.; Campbell, B.J.; Hart, C.A.; Mpofu, C.; Nayar, M.; Singh, R.; Englyst, H.; Williams, H.F.; Rhodes, J.M. Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn’s disease and colon cancer. *Gastroenterology* **2004**, *127*, 80–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Maddocks, O.D.K.; Short, A.J.; Donnenberg, M.S.; Bader, S.; Harrison, D.J. Attaching and effacing Escherichia coli downregulate DNA mismatch repair protein in vitro and are associated with colorectal adenocarcinomas in humans. *PLoS ONE* **2009**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Buc, E.; Dubois, D.; Sauvanet, P.; Raisch, J.; Delmas, J.; Darfeuille-Michaud, A.; Pezet, D.; Bonnet, R. High Prevalence of Mucosa-Associated *E. coli* Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer. *PLoS ONE* **2013**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Prorok-Hamon, M.; Friswell, M.K.; Alswied, A.; Roberts, C.L.; Song, F.; Flanagan, P.K.; Knight, P.; Codling, C.; Marchesi, J.R.; Winstanley, C.; et al. Colonic mucosa-associated diffusely adherent *afaC+* *Escherichia coli* expressing *lpfA* and *pks* are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut* **2014**, *63*, 761–770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
196. Bonnet, M.; Buc, E.; Sauvanet, P.; Darcha, C.; Dubois, D.; Pereira, B.; Déchelotte, P.; Bonnet, R.; Pezet, D.; Darfeuille-Michaud, A. Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 859–867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Raisch, J.; Buc, E.; Bonnet, M.; Sauvanet, P.; Vazeille, E.; de Vallée, A.; Déchelotte, P.; Darcha, C.; Pezet, D.; Bonnet, R.; et al. Colon cancer-associated B2 *Escherichia coli* colonize gut mucosa and promote cell proliferation. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 6560–6572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

198. Marchès, O.; Ledger, T.N.; Boury, M.; Ohara, M.; Tu, X.; Goffaux, F.; Mainil, J.; Rosenshine, I.; Sugai, M.; De Rycke, J.; et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol. Microbiol.* **2003**, *50*, 1553–1567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
199. Flatau, G.; Lemichez, E.; Gauthier, M.; Chardin, P.; Paris, S.; Fiorentini, C.; Boquet, P. Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* **1997**, *387*, 729–733. [[PubMed](#)]
200. Taieb, F.; Petit, C.; Nougayrède, J.-P.; Oswald, E. The Enterobacterial Genotoxins: Cytolethal Distending Toxin and Colibactin. *EcoSal Plus* **2016**. [[CrossRef](#)]
201. Nougayrède, J.-P.; Homburg, S.; Taieb, F.; Boury, M.; Brzuszkiewicz, E.; Gottschalk, G.; Buchrieser, C.; Hacker, J.; Dobrindt, U.; Oswald, E. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* **2006**, *313*, 848–851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
202. Cuevas-Ramos, G.; Petit, C.R.; Marcq, I.; Boury, M.; Oswald, E.; Nougayrède, J.-P. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11537–11542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
203. Vizcaino, M.I.; Crawford, J.M. The colibactin warhead crosslinks DNA. *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 411–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Secher, T.; Samba-Louaka, A.; Oswald, E.; Nougayrède, J.-P. *Escherichia coli* producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. *PLoS ONE* **2013**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Cougnoux, A.; Dalmasso, G.; Martinez, R.; Buc, E.; Delmas, J.; Gibold, L.; Sauvanet, P.; Darcha, C.; Déchelotte, P.; Bonnet, M.; et al. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* **2014**, *63*, 1932–1942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
206. Raisch, J.; Rolhion, N.; Dubois, A.; Darfeuille-Michaud, A.; Bringer, M.-A. Intracellular colon cancer-associated *Escherichia coli* promote protumoral activities of human macrophages by inducing sustained COX-2 expression. *Lab. Investig.* **2015**, *95*, 296–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
207. Gagnière, J.; Bonnin, V.; Jarrousse, A.-S.; Cardamone, E.; Agus, A.; Uhrhammer, N.; Sauvanet, P.; Déchelotte, P.; Barnich, N.; Bonnet, R.; et al. Interactions between microsatellite instability and human gut colonization by *Escherichia coli* in colorectal cancer. *Clin. Sci. 1979* **2017**, *131*, 471–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
208. Tian, Y.; Wang, K.; Ji, G. P112 Short-chain fatty acids administration is protective in colitis-associated colorectal cancer development. *J. Crohns Colitis* **2017**. [[CrossRef](#)]
209. Goodwin, A.C.; Destefano Shields, C.E.; Wu, S.; Huso, D.L.; Wu, X.; Murray-Stewart, T.R.; Hacker-Prietz, A.; Rabizadeh, S.; Woster, P.M.; Sears, C.L.; et al. Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced colon tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 15354–15359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
210. Mauro, M.O.; Monreal, M.T.; Silva, M.T.; Pesarini, J.R.; Mantovani, M.S.; Ribeiro, L.R.; Dichi, J.B.; Carreira, C.M.; Oliveira, R.J. Evaluation of the antimutagenic and anticarcinogenic effects of inulin in vivo. *Genet. Mol. Res.* **2013**, *12*, 2281–2293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
211. Chen, Z.-Y.; Hsieh, Y.-M.; Huang, C.-C.; Tsai, C.-C. Inhibitory Effects of Probiotic *Lactobacillus* on the Growth of Human Colonic Carcinoma Cell Line HT-29. *Molecules* **2017**, *22*, 107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
212. Del Carmen, S.; de Moreno de LeBlanc, A.; Levit, R.; Azevedo, V.; Langella, P.; Bermúdez-Humarán, L.G.; LeBlanc, J.G. Anti-cancer effect of lactic acid bacteria expressing antioxidant enzymes or IL-10 in a colorectal cancer mouse model. *Int. Immunopharmacol.* **2017**, *42*, 122–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
213. Iida, N.; Dzutsev, A.; Stewart, C.A.; Smith, L.; Bouladoux, N.; Weingarten, R.A.; Molina, D.A.; Salcedo, R.; Back, T.; Cramer, S.; et al. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science* **2013**, *342*, 967–970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
214. West, N.R.; Powrie, F. Immunotherapy Not Working? Check Your Microbiota. *Cancer Cell* **2015**, *28*, 687–689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
215. Li, T.-T.; Ogino, S.; Qian, Z.R. Toll-like receptor signaling in colorectal cancer: Carcinogenesis to cancer therapy. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 17699–17708. [[PubMed](#)]
216. Fukata, M.; Shang, L.; Santaolalla, R.; Sotolongo, J.; Pastorini, C.; España, C.; Ungaro, R.; Harpaz, N.; Cooper, H.S.; Elson, G.; et al. Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2011**, *17*, 1464–1473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



# Travail expérimental

---

## Contexte scientifique

Le microbiote intestinal apparait depuis quelques années comme un nouveau facteur favorisant le développement du cancer colorectal (CCR). Plusieurs études ont mis en évidence une modification de la composition du microbiote associé à la muqueuse colique chez les patients atteints de CCR comparativement aux sujets contrôles avec notamment une prévalence augmentée des *Escherichia coli* producteurs de la génotoxine colibactine (*E. coli/pks+*). Ces bactéries sont préférentiellement retrouvées chez les patients atteints d'un CCR de stade avancé (stade III/IV) vs CCR de stade précoce (stade I) et induisent des cassures double brin de l'ADN, ayant pour conséquences l'accumulation d'aberrations chromosomiques, ainsi que la sénescence des cellules infectées. Les cellules sénescentes produisent alors des cytokines pro-inflammatoires ainsi que des facteurs de croissances stimulant ainsi la prolifération des cellules non infectées adjacentes. De plus, l'infection par des *E. coli/pks+* favorise le développement tumoral dans différents modèles murins prédisposés au développement du CCR. Si les propriétés génotoxiques et pro-tumorales des souches d'*E. coli/pks+* sont bien décrites, les mécanismes de défense de l'hôte contre l'infection par ces bactéries sont peu connus. Il est donc primordial de mieux comprendre ces mécanismes afin de développer de nouvelles perspectives thérapeutiques.

L'autophagie est un processus des cellules eucaryotes qui permet la dégradation d'éléments cytoplasmiques, tels que des protéines et des organelles anormales, par le lysosome. Ce processus est fortement activé pour permettre l'adaptation de la cellule à des changements environnementaux et/ou développementaux et en réponse à différents stress tels que l'infection par des pathogènes. Un dysfonctionnement de l'autophagie a été associé à plusieurs pathologies humaines notamment les cancers. A ce jour, aucune donnée n'est disponible sur le rôle de l'autophagie dans la défense de l'hôte suite à l'infection par des souches pathogènes d'*E. coli* isolées de patients atteints de CCR.

Dans ce contexte, les objectifs majeurs de mon projet de thèse ont été : **(1) d'étudier le rôle de l'autophagie dans la défense de l'hôte en réponse aux *E. coli* producteurs de colibactine, (2) d'examiner le rôle de l'autophagie dans la carcinogenèse colorectale induite par ces souches dans un modèle murin prédisposé au développement du CCR et (3) d'identifier les mécanismes par lesquels l'autophagie pourrait exercer son rôle dans la carcinogenèse colorectale induite par les *E. coli/pks+*.**

## Résultats expérimentaux

Dans cette étude, nous avons tout d'abord étudié le lien entre l'autophagie et la colonisation par les souches d'*E. coli* productrices de colibactine, appelées ainsi *E. coli/pks+*, isolées de patients atteints de CCR. Pour cela, nous avons analysé les niveaux d'expression des ARN messagers de différents gènes de l'autophagie par RT-PCRq dans les muqueuses coliques issues des patients atteints d'un CCR sporadique colonisées par des *E. coli/pks+* (n = 31 patients) ou colonisées par des souches d'*E. coli* ne portant pas l'îlot *pks* (*E. coli/pks-*, n = 34 patients). Nous avons observé une augmentation significative de l'expression des ARNm de certains gènes de l'autophagie, tels qu'*Atg12*, *Atg1611*, *Atg5*, *Atg7*, *Beclin1*, *WIPI1* et *Atg2b*, dans les muqueuses colonisées par des *E. coli/pks+* par rapport à celles colonisées par des *E. coli/pks-*. De plus, la proportion des patients ayant une forte expression des ARNm des gènes de l'autophagie est augmentée lorsque la muqueuse est colonisée par des *E. coli/pks+*, suggérant que l'autophagie est activée dans les muqueuses colonisées par des *E. coli/pks+*.

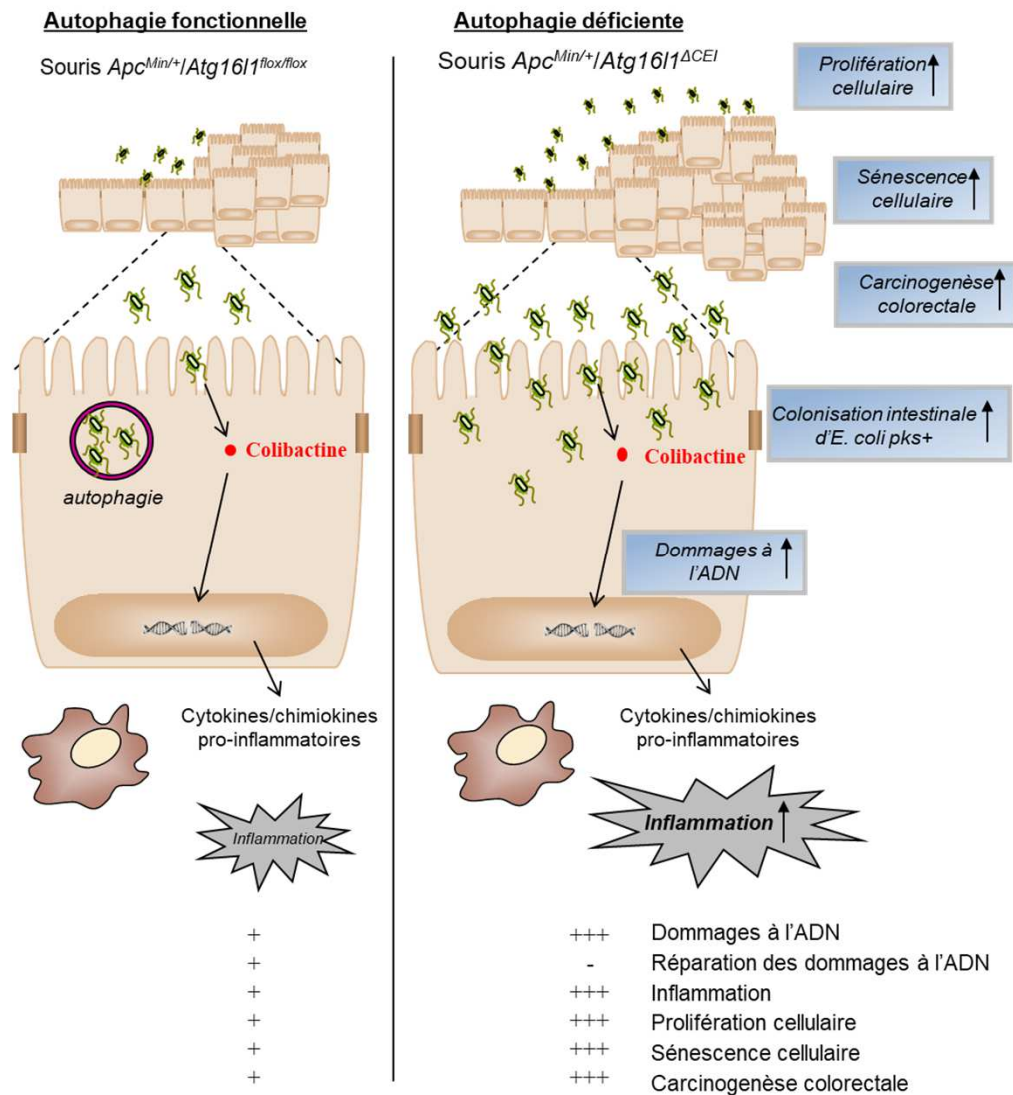
Afin d'explorer le lien entre l'autophagie et la colonisation par les souches d'*E. coli/pks+*, nous avons analysé l'activation de l'autophagie dans les cellules humaines de carcinome colique, HCT-116, suite à l'infection par différentes souches d'*E. coli* isolées de patients atteints de CCR. Parmi toutes les souches d'*E. coli* isolées, nous avons sélectionné les 10 souches d'*E. coli* ne possédant aucune des cyclomodulines décrites (*E. coli/pks-*) et les 7 souches d'*E. coli* porteuses uniquement de l'îlot *pks* (*E. coli/pks+*). Nous avons observé l'activation de l'autophagie, caractérisée par une augmentation du niveau de LC3-II, suite à l'infection par les souches d'*E. coli/pks+*. En revanche, l'infection des cellules HCT-116 par les souches d'*E. coli/pks-* n'induit pas une activation de l'autophagie significative comparativement aux cellules non infectées ou aux cellules infectées avec une souche d'*E. coli* commensale non pathogène K12 MG1655. L'autophagie semble donc être activée spécifiquement en réponse à l'infection par les souches d'*E. coli/pks+*. Afin de confirmer ces résultats, nous avons infecté les cellules HCT-116 avec une souche clinique d'*E. coli/pks+* 11G5, souche de référence du laboratoire, ou son mutant isogénique 11G5 $\Delta$ *clbQ*, déficient pour le gène *clbQ* de l'îlot *pks*, et donc incapable de produire la colibactine. Comme attendu, l'infection des cellules HCT-116 par la souche 11G5 entraîne l'activation de l'autophagie comparativement à l'infection par la souche non pathogène K12 MG1655. En revanche, l'infection par le mutant 11G5 $\Delta$ *clbQ* n'entraîne aucune activation de l'autophagie. Ces résultats montrent que l'infection par les souches d'*E. coli/pks+* active l'autophagie, et ceci nécessite la présence de l'îlot *pks*.

Nous avons ensuite analysé le rôle de l'autophagie dans la défense des cellules hôtes en réponse à l'infection par les *E. coli/pks+* en utilisant deux modèles cellulaires déficients pour l'autophagie : soit les cellules HCT-116 transfectées avec un siARN dirigé contre le gène de l'autophagie *ATG5*, soit les cellules épithéliales humaines Hela invalidées pour le gène de l'autophagie *ATG16L1* par la méthode CRISPR/Cas9 afin d'avoir une invalidation totale du gène. Suite à l'infection par la souche 11G5, nous avons observé une augmentation des dommages à l'ADN dans les cellules déficientes pour l'autophagie par rapport aux cellules sauvages, caractérisée par une augmentation de l'accumulation de  $\gamma$ H2AX, marqueur des dommages à l'ADN. Nous avons mis en évidence le recrutement au niveau du noyau de la protéine de réparation des cassures double brin de l'ADN, RAD51, suite à l'infection par la souche 11G5. Ceci n'était pas observé dans les cellules déficientes pour l'autophagie, suggérant que des défauts de réparation de l'ADN dans ces cellules pourraient être responsables de l'accumulation des cassures double brin de l'ADN. De plus, nous avons montré que l'accumulation du récepteur autophagique p62 dans les cellules déficientes pour l'autophagie empêche le recrutement de RAD51 dans le noyau pour répondre à l'infection par la souche 11G5, entraînant par conséquent l'accumulation des dommages à l'ADN.

Nous avons ensuite montré que la sénescence induite par la souche 11G5 était significativement plus importante dans les cellules déficientes pour l'autophagie comparativement aux cellules contrôles. De plus, nous avons mis en évidence une augmentation des niveaux de sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 suite à l'infection par la souche 11G5 dans les cellules déficientes pour l'autophagie comparativement aux cellules contrôles. Nous avons également observé une augmentation du nombre de bactéries 11G5 intracellulaires dans les cellules déficientes pour l'autophagie comparativement aux cellules contrôles.

Nous avons montré que le milieu conditionné issu des cellules transfectées avec le siARN dirigé contre le gène *ATG5* et infectées par la souche 11G5 augmente significativement la prolifération des cellules HCT-116 non infectées comparativement au milieu issu des cellules transfectées avec le siARN contrôle et infectées par la souche 11G5. Ces résultats n'ont pas été observés lorsque le milieu était issu des cellules infectées par la souche d'*E. coli* non pathogène K12 MG1655 ou par le mutant 11G5 $\Delta$ *clbQ*.

L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* montre que l'autophagie est activée dans les cellules hôtes suite à l'infection par les souches d'*E. coli pks+*, et que cette activation est nécessaire pour limiter les effets pro-tumoraux et pro-inflammatoires de ces souches pathogènes.



**Figure 49 : Modèle proposé pour le rôle de l'autophagie dans la carcinogenèse colorectale suite à l'infection par des *E. coli pks+***

Suite à l'infection par les *E. coli pks+*, dans un modèle murin prédisposé au développement de CCR, l'autophagie est activée afin de contrôler la colonisation intestinale par les bactéries, de protéger les cellules épithéliales intestinales des dommages à l'ADN en induisant les réparations des cassures de l'ADN, de réduire l'inflammation, la sénescence et la prolifération cellulaire, limitant ainsi la carcinogenèse colorectale. Un dysfonctionnement de l'autophagie entraîne une augmentation des effets pro-tumoraux et pro-inflammatoires des *E. coli pks+*, avec pour conséquence un développement tumoral plus important.



Nous avons ensuite étudié le rôle dans l'autophagie dans la tumorigénèse colorectale grâce à l'utilisation d'un modèle murin prédisposé au développement du CCR, le modèle  $APC^{Min/+}$ . Ce modèle murin développe spontanément des adénomes coliques induits par l'inactivation du gène suppresseur de tumeur  $APC$ . C'est le modèle le plus utilisé et le plus pertinent dans la recherche sur le CCR puisqu'il mime le développement du CCR décrit chez l'homme selon la « séquence adénome-cancer » où la mutation du gène  $APC$  intervient à un stade précoce.

L'utilisation du modèle murin  $APC^{Min/+}$ , invalidé pour le gène de l'autophagie  $Atg16l1$  spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales ( $Apc^{Min/+}/Atg16l1^{\Delta CEI}$ ) nous a permis de confirmer les résultats *in vitro*. Les souris  $Apc^{Min/+}/Atg16l1^{\Delta CEI}$  présentaient une augmentation de la susceptibilité à l'infection par la souche 11G5 comparativement aux souris contrôles ( $Apc^{Min/+}/Atg16l1^{lox/lox}$ ), montré par une perte du poids et une colonisation intestinale par les bactéries 11G5 plus importantes.

De plus, nous avons montré que la déficience de l'autophagie chez les souris  $Apc^{Min/+}$  entraîne une augmentation de la carcinogénèse colorectale induite par la souche 11G5. En effet, une augmentation du nombre et du volume des tumeurs colorectales était observée chez les souris  $Apc^{Min/+}/Atg16l1^{\Delta CEI}$  infectées par la souche 11G5 par rapport aux souris contrôles. Ceci était accompagné d'une augmentation des dommages à l'ADN, d'une prolifération cellulaire et d'une inflammation plus élevées dans les côlons des souris  $Apc^{Min/+}/Atg16l1^{\Delta CEI}$  par rapport aux souris contrôles. Ces résultats suggèrent que l'autophagie est nécessaire pour limiter la carcinogénèse colorectale induite par les *E. coli/pks+*.

**En conclusion, notre étude montre que l'autophagie est nécessaire pour limiter les effets pro-carcinogènes et pro-inflammatoires des souches d'*E. coli/pks+*, inhibant ainsi la carcinogénèse colorectale induite par ces dernières (figure 49).**

Les résultats de ce travail de recherche font l'objet d'un manuscrit actuellement en préparation pour la soumission dans le journal «The Journal of experimental medicine» : Lucas et al., « *Autophagy suppresses protumoral effects of colibactin genotoxin-producing Escherichia coli, inhibiting colorectal carcinogenesis* »

**Autophagy suppresses protumoral effects of colibactin genotoxin-producing *Escherichia coli*, inhibiting colorectal carcinogenesis**

Cécily Lucas<sup>1</sup>, Laurène Salesse<sup>1</sup>, Guillaume Dalmasso<sup>1</sup>, Mathilde Bonnet<sup>1</sup>, Pierre Sauvanet<sup>1,2</sup>, Anaïs Larabi<sup>1</sup>, Denis Pezet<sup>1,2</sup>, Philip Rosenstiel<sup>3</sup>, Nicolas Barnich<sup>1</sup>, Richard Bonnet<sup>1,4</sup>, Hang Thi Thu Nguyen<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>M2iSH, UMR 1071 Inserm, Université Clermont Auvergne, INRA USC 2018, Clermont-Ferrand 63001, France.

<sup>2</sup>Service de Chirurgie Digestive, Centre Hospitalier Universitaire, 63001 Clermont-Ferrand, France.

<sup>3</sup>Institute of Clinical Molecular Biology, Christian-Albrechts-University and University Hospital Schleswig-Holstein, Kiel, Germany.

<sup>4</sup>Centre Hospitalier Universitaire, Clermont-Ferrand 63000, France

**\*Address correspondence to:** Hang Nguyen, PhD. M2iSH, UMR 1071 Inserm, Université Clermont Auvergne, INRA USC 2018, Clermont-Ferrand 63001, France.

Phone: 33 4 73 17 83 72. Fax: 33 4 73 17 83 71. E-mail: [hang.nguyen@uca.fr](mailto:hang.nguyen@uca.fr) or [hang.nguyen@udamail.fr](mailto:hang.nguyen@udamail.fr).

**Running head: Autophagy inhibits colibactin-induced colorectal carcinogenesis**

**Acknowledgments:** This work was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie, Inserm (UMR1071) and INRA (USC 2018). We would like to thank Prof. Xavier Ramnik (Harvard Medical School, Boston, USA) for kindly providing us *ATG16L1/CrisprCas9* knock-out Hela cells.

## Abstract

The colonic mucosa of patients with colorectal cancer (CRC) is abnormally colonized by the *Escherichia coli* strains harboring the *pks* genomic island (*E. coli/pks+*), which are responsible for the synthesis of colibactin genotoxin. *E. coli/pks+* induce DNA damage and cellular senescence, enhancing cellular proliferation and carcinogenesis in CRC mouse models. Autophagy, which plays a crucial role in the maintenance of cellular homeostasis, is implicated in various human diseases including cancer. Here, we aimed at investigating the role of autophagy in host responses to *E. coli/pks+* infection. We showed that mRNA expression levels of several genes implicated in autophagy were increased in colonic mucosa from CRC patients colonized with *E. coli/pks+* compared with those colonized with *E. coli* without *pks* island (*E. coli/pks-*). Infection of human colon cancer HCT-116 cells with clinical *E. coli/pks+* strains resulted in autophagy activation, and this was dependent on the presence of the *pks* island. Autophagy-deficient cells exhibited increases in colibactin-induced DNA damage, which was associated with decrease in the recruitment of the DNA damage repair protein RAD51 into the nucleus, and increase in colibactin-induced cellular senescence. Consequently, conditioned media derived from autophagy-deficient cells infected with the clinical *E. coli/pks+* 11G5 strain promoted the proliferation of uninfected cells compared to that derived from 11G5-infected wild type cells. *Apc*<sup>Min/+</sup> mice deficient in *Atg16l1* specifically in intestinal epithelial cells (*Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>ΔIEC</sup>) infected with the 11G5 strain exhibited more body weight loss and increased bacterial colonization in the colon compared to their controls (*Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>fllox/fllox</sup> mice). 11G5 infection induced increased colorectal carcinogenesis, which was accompanied by increased DNA damages, enhanced cell proliferation and exacerbated inflammation in *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>ΔIEC</sup> mice compared to control mice. These results suggest that autophagy is necessary to limit the protumoral effects of *E. coli/pks+*, inhibiting colorectal carcinogenesis induced by the later.

## Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in both male and female, affecting about 1.36 million of new cases per year, and is the fourth leading cause of cancer-related death worldwide with 700,000 death per year (Ferlay et al., 2015). CRC is a multifactorial disease, for which several risk factors have been identified, such as age, genetic factors, unhealthy behaviors, microbial factors and inflammatory bowel disease (IBD).

Of the risk factors, the gut microbiota has been emerged as a key player in CRC development. A modification of gut microbiota composition or dysbiosis has been reported in CRC patients with, in particular, an increase in *Bacteroides fragilis*, *Streptococcus bovis/galloyticus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum* and a decrease in *Faecalibacterium prausnitzii* (Lucas et al., 2017). The involvement of gut microbiota in colon carcinogenesis was then determined using mouse models of CCR. One of the best-known CRC models is *Apc*<sup>Min/+</sup> mice (*Apc*: Adenomatous polyposis coli; *Min*: Multiple Intestinal Neoplasia) bearing a loss-of-function germinal mutation in the *Apc* gene (Moser et al., 1990), which is the most prevalent mutation and has been found in about 80% of CRC (Arvelo et al., 2015). Germ-free *Apc*<sup>Min/+</sup> mice display lower number of intestinal and colorectal tumors compared to *Apc*<sup>Min/+</sup> mice bearing a microbiota (Li et al., 2012). Similar results were obtained for the CRC mouse model chemically induced by Azoxymethane (AOM) and Dextran Sodium Sulfate (DSS) (Zackular et al., 2013). In addition, treatment with a cocktail of antibiotics also reduces the number and size of colorectal tumors in AOM/DSS-treated mice (Zackular et al., 2013). Germ-free mice colonized with fecal microbiota from AOM/DSS-treated mice exhibit enhanced colorectal tumorigenesis compared to those colonized with a healthy gut microbiome from untreated mice, suggesting that the dysbiotic microbiota directly contribute to tumorigenesis colorectal carcinogenesis (Zackular et al., 2013). A recent study showed that conventional mice treated with antibiotics and then with AOM or germ-free mice receiving fecal samples from CRC patients exhibit increases in polyp numbers, levels of intestinal dysplasia and proliferation, and inflammation, compared with those receiving fecal samples from healthy individuals (Wong et al., 2017). These studies provide evidence that a CRC-associated dysbiotic gut microbiota can promote colorectal carcinogenesis.

To date, no direct association between a particular bacterium and CRC development has been established. However, the development of CRC might be influenced by pro-carcinogenic properties of certain intestinal bacteria, such as *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus bovis/galloyticus* and *Escherichia coli*.

Concerning *E. coli*, although usually commensal and is not implied in diseases, some *E. coli* strains have acquired pathogenic properties with the ability to colonize the human intestinal tract and induce intra- and extra- intestinal diseases (Kaper et al., 2004). Studies have shown a higher prevalence of colonic mucosa-associated *E. coli* in CRC patients compared to control subjects (Arthur et al., 2012; Bonnet et al., 2014; Buc et al., 2013; Martin et al., 2004; Prorok-Hamon et al., 2014; Swidsinski et al., 1998). In particular, an abnormal colonization of CRC colonic mucosa with the pathogenic *E. coli* strains that produce toxins called cyclomodulins, has been shown. Cyclomodulin-producing *E. coli* strains are more prevalent on mucosa of patients with advanced stages (III/IV stages) compared to those with stage I of CRC, suggesting that pathogenic *E. coli* colonization could be used as a prognostic marker (Bonnet et al., 2014). Cyclomodulins, such as CIF (cycle-inhibiting factor), CNF (cytotoxic necrotizing factor), CDT (cytolethal distending toxin) and colibactin, are able to induce DNA damage and/or modulate cell-cycle progression, cell proliferation, and to affect colorectal carcinogenesis (Cuevas-Ramos et al., 2010; Falzano et al., 2006; Jubelin et al., 2010; Malorni and Fiorentini, 2006; Nougayrède et al., 2006; Thelestam and Frisan, 2004).

Of the cyclomodulins, the colibactin toxin, a hybride polyketide-non ribosomal peptide encoded by the polyketide synthase (*pks*) pathogenicity island, has attracted growing research interest. First described in 2006 by Nougayrede and colleagues (Nougayrède et al., 2006), colibactin has not yet been isolated or purified to date. *Pks*-harboring *E. coli* strains (*E. coli/pks+*) have been found in about 55.3% of colonic mucosa from CRC patients versus only 19.3% in those of patients with diverticulosis (Buc et al., 2013). *E. coli/pks+* have been shown to induce in eukaryotic cells double strand DNA breaks, chromosomal instability and cell cycle arrest (Cuevas-Ramos et al., 2010; Nougayrède et al., 2006). *E. coli/pks+* also induce senescence of infected cells accompanied with secretion of pro-inflammatory mediators and growth factors, thereby promoting proliferation of neighboring uninfected cells (Cougnoux et al., 2014; Secher et al., 2013). Importantly, *E. coli/pks+* are able to promote colon tumorigenesis in mouse models of CRC, such as *APC<sup>Min/+</sup>* mice (Bonnet et al., 2014), AOM-treated *il10<sup>-/-</sup>* mice (Arthur et al., 2012) or AOM/DSS-treated mice (Cougnoux et al., 2014).

Autophagy, a critical cellular catabolic process, involves the targeting of intracellular components, such as damaged organelles, misfolded proteins, toxic aggregates and intracellular pathogens, into double-membraned vesicles known as autophagosomes, which fuse with lysosomes to form autolysosomes, where the cargos are degraded. Autophagy process is considered as a major survival mechanism by conferring stress tolerance, limiting damage, and sustaining cellular viability under adverse conditions (Mizushima, 2018). As

autophagy deficiency causes oxidative stress, activation of the DNA damage response, and genome instability, autophagy deficiency is thought to contribute to the pathogenicity in many diseases including neurodegenerative diseases and liver disease but also cancer (Kelekar, 2005). A dysfunction or deregulation of autophagy has been associated with many human diseases, such as neurodegenerative diseases, cancers and infectious diseases (Kelekar, 2005). In tumorigenesis, autophagy has a complex and dual role. Indeed, some studies have highlighted the anti-tumoral role of this process by protecting cells from conditions contributing to transformation and carcinogenesis such as oxidative stress, DNA damage, genetic instability and inflammation. However, other studies have described a pro-tumoral role of autophagy with its ability to protect cancer cells from metabolic stress and hypoxia in the tumor microenvironment (White, 2015).

Recently, several studies have revealed a close link between autophagy and CRC. An increase in the level of LC3-II, the form associated with the autophagosomes and a marker of autophagy, was observed in colorectal tumors compared to normal tissues in CRC patients (Zheng et al., 2012). In the same study, a positive correlation between LC3 protein expression and tumor aggressiveness was also been reported (Zheng et al., 2012). Similarly, increased expression of the autophagy-related protein ATG10 in CCR was associated with tumor invasion and metastasis (Jo et al., 2012). In addition, 5-year survival rate of patients bearing tumors without ATG10 expression was significantly higher than patients with ATG10-expressing tumors (Jo et al., 2012). Nevertheless, it has been reported that CCR patients with higher expression of the autophagic proteins including Beclin 1, LC3B and Bcl-xL in both the center of tumor and adjacent noncancerous mucosa, compared to those with lower expression, have a better overall survival rate (Yang et al., 2015). So far, the role of autophagy in CCR is still poorly understood.

In this study, we investigated the implication of autophagy in host defense to pro-tumoral effects of CCR-associated *E. coli/pks+* and in colorectal carcinogenesis induced by the later. We reported that colonization of colonic mucosa from CCR patients with *E. coli/pks+* is associated with higher expression of several autophagy-related genes. CCR-associated *E. coli* infection of intestinal epithelial cells induces activation of autophagy in a *pks*-dependant manner. Deficiency of autophagy leads to increased DNA damage and cellular senescence induced by *E. coli/pks+* in host cells and increased colorectal carcinogenesis in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice infected with *E. coli/pks+*.

## Results

### **Colonization of non-tumoral colonic mucosa from CRC patients with *E. coli/pks+* is associated with high mRNA expression levels of several genes implicated in autophagy**

First, to investigate the potential link between autophagy and *E. coli/pks+* colonization, we analyzed mRNA expression levels of different autophagy genes (**Figures 1 and S1**) by qRT-PCR in normal mucosa from patients with sporadic CRC colonized with *E. coli* without the *pks* island designated *E. coli/pks-* (34 patients) or with *E. coli/pks+* (31 patients). A significant increase in mRNA expression levels of several autophagy-related genes was observed in the mucosa colonized with *E. coli/pks+* compared to that in mucosa colonized with *E. coli/pks-* (**Figure 1A**). Interestingly, the proportion of patients with high levels of 7 autophagy-related mRNA expression (> median) was increased in the group having mucosa-associated *E. coli/pks+* compared to that having mucosa-associated *E. coli/pks-* (**Figure 1B**). These data suggest that autophagy is activated in CRC mucosa colonized with *E. coli/pks+*.

### **Autophagy is activated in human colon cancer HCT-116 cells upon infection with *E. coli/pks+***

We next investigated whether autophagy is activated in human colon cancer HCT-116 cells following infection with CRC-associated *E. coli* strains by analyzing by Western blot the levels of the free-cytosolic LC3-I form and the autophagosomal LC3-II form. Infection of HCT-116 cells with different clinical CRC-associated *E. coli/pks+* strains (Buc et al., 2013; Raisch et al., 2014) resulted in increased LC3-II levels, indicating autophagy activation, compared to infection with the non-pathogenic *E. coli* K12 MG1655 strain or with the clinical *E. coli/pks-* strains (**Figure 2A, B**). Infection with the *E. coli/pks-* strains did not induce a significant increase in LC3-II levels compared to MG1655 infection (**Figure 2A, B**). This result suggests that autophagy is specifically activated in response to *E. coli/pks+* strains.

To confirm the implication of the *pks* island in autophagy activation, HCT-116 cells were infected with either the *E. coli/pks+* 11G5 strain or its isogenic mutant 11G5 $\Delta$ *clbQ* depleted for the *clbQ* gene in the *pks* island and unable to produce colibactin (Raisch et al., 2015). As expected, infection of HCT-116 cells with the wild-type 11G5 strain leads to autophagy activation, as evidenced by increased LC3-II level, compared to infection with the non-pathogenic MG1655 strain. This was not observed following infection with the mutant 11G5 $\Delta$ *clbQ* (**Figure 2C, D**). Infection with the trancomplemented strain resulted in similar results as the wild type 11G5 strain (data not shown).

## **A functional autophagy is necessary for DNA damage repair following infection with *E. coli/pks+*.**

To investigate whether autophagy is necessary for the repair of DNA damage induced by *E. coli/pks+*, we inhibited autophagy in HCT-116 cells by transfecting the cells every two days with *ATG5*-specific siRNA. *ATG5* protein expression was markedly reduced at 5 days after transfection in *ATG5* siRNA-transfected cells compared to those transfected with a scramble siRNA (**Figure S2**). In addition, the level of  $\gamma$ H2AX, a marker of DNA double-strand breaks (DSBs), was increased in scramble siRNA-transfected cells upon infection with the *E. coli/pks+* 11G5 strain compared to that in uninfected cells or cells infected with the non-pathogenic MG1655 strain or with the 11G5 $\Delta$ *clbQ* mutant (**Figure 3A, B**). Importantly, following 11G5 infection,  $\gamma$ H2AX level was markedly increased in *ATG5* siRNA-transfected cells compared to scramble siRNA-transfected cells (**Figure 3A, B**). These results were confirmed by using *ATG16L1*-knockout HeLa cells with the CRISPR-Cas9 gene editing system (**Figure S3**).

Immunofluorescent labeling of  $\gamma$ H2AX consistently showed an accumulation of  $\gamma$ H2AX foci, indicating phosphorylation of histone H2AX, in the nucleus following 11G5 infection in both *ATG5* siRNA-transfected and scramble siRNA-transfected HCT-116 cells. Importantly, this accumulation was more important in *ATG5* siRNA-transfected cells (**Figure 3C, D**).

Next, we analyzed the recruitment of RAD51 into the nucleus, which plays a central role in homologous recombination repair of DNA DSBs. Following 11G5 infection, Western blot analysis showed increased RAD51 level in the nuclear fraction in scramble siRNA-transfected cells, indicating DNA repair activation, and this was not observed in *ATG5* siRNA-transfected cells (**Figure 3E, F**). As accumulation of SQSTM1/p62 in autophagy-defective cells has been shown to inhibit the recruitment of DNA repair proteins, such as RAD51, to the sites of DNA DSBs, impairing DNA damage repair (Wang et al., 2016), we sought to investigate whether the observed effect was dependent on p62. As expected, in *ATG5* siRNA-transfected cells, we observed an accumulation of p62 in the nuclear fraction compared to that in control siRNA-transfected cells (**Figure 3E, F**). However, in cells transfected with both *ATG5* siRNA and *p62* siRNA, the protein level of p62 was markedly decreased (**Figure 3E, F**). Importantly, *p62* siRNA suppressed the inhibition of RAD51 recruitment into the nucleus in *ATG5* siRNA-transfected cells upon 11G5 infection, as we observed the recruitment of RAD51 into the nucleus in cells transfected with *ATG5* and *p62* siRNAs (**Figure 3E, F**). This shows that p62 accumulation in autophagy-deficient cells is



responsible for the inhibition of DNA damage repair induced following 11G5 infection. Immunofluorescent labeling of RAD51 consistently showed an accumulation of RAD51 foci in nucleus in scramble siRNA-transfected HCT-116 cells upon 11G5 infection, and this was blocked in *ATG5* siRNA-transfected cells (**Figure 3G, H**). However, inhibition of p62 expression in *ATG5* siRNA-transfected cells led to increased RAD51 foci number upon 11G5 infection, as observed in scramble siRNA-transfected cells. Together, these results show that upon *E. coli/pks+* infection, a functional autophagy is necessary to activate the DNA damage repair, and this is dependent on SQSTM1/p62.

**Autophagy deficiency leads to enhanced cellular senescence induced by *E. coli/pks+*, promoting proliferation of uninfected cells.**

To investigate the role of autophagy in host response to cellular senescence induced by *E. coli/pks+*, we infected HCT-116 cells pre-transfected with scramble siRNA or *ATG5* siRNA with the wild-type 11G5 strain or the 11G5 $\Delta$ *clbQ* mutant, and detected senescent cells by beta-galactosidase staining at pH 6. Infection with the 11G5 strain induced an increase in the number of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase-positive cells in scramble siRNA-transfected cells, and this number was markedly increased in *ATG5* siRNA-transfected cells (**Figure 4A, B**). These results were confirmed using *ATG16L1*-knock out HeLa cells (**Figure S4**).

Importantly, conditioned media derived from cells transfected with *ATG5* siRNA and infected with 11G5 enhanced proliferation of HCT-116 cells compared to that derived from cells transfected with scramble siRNA and infected with 11G5 (**Figure 4C**). Similar result was not observed for infections with the *E. coli* K12 MG1655 strain or the 11G5 $\Delta$ *clbQ* mutant. All together, these data show that autophagy deficiency enhances cellular senescence induced by *E. coli/pks+*, which consequently increases proliferation of uninfected cells.

**Autophagy is necessary to eliminate intracellular *E. coli/pks+* 11G5 and to inhibit 11G5-induced inflammation.**

As autophagy is a key process to eliminate intracellular pathogenic bacteria and to inhibit inflammation induced by infection, we sought to check the number of intracellular 11G5 and 11G5-induced pro-inflammatory cytokine production in autophagy-defective cells. An increase in 11G5 intracellular number was observed in *ATG5* siRNA-transfected HCT-116 cells compared to scramble siRNA-transfected cells (**Figure 5A**). No difference in the

adherence of 11G5 bacteria between scramble siRNA and *ATG5* siRNA-transfected cells was observed (data not shown). We observed increased levels of secreted pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 following 11G5 infection in scramble siRNA-transfected HCT-116 cells, and this increase was more pronounced in *ATG5* siRNA-transfected cells (**Figure 5B**).

Together, the *in vitro* data showed that autophagy is activated in host cells upon *E. coli/pks+* infection, and this is required to decrease the pro-tumoral and pro-inflammatory effects of the pathogenic bacteria.

### **Autophagy deficiency leads to increased susceptibility of *Apc*<sup>Min/+</sup> mice to infection with the *E. coli/pks+* 11G5 strain.**

In order to study the role of autophagy in host susceptibility to infection with *E. coli/pks+* strains, *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>ACEI</sup> mice having autophagy deficiency specifically in IECs and control mice (*Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>fllox/fllox</sup>) were orally administered by gavage with PBS (uninfected) or 11G5 bacteria. Under uninfected condition, *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>ACEI</sup> mice exhibited increased body weight compared to control mice at days 44, 50, 57 and 65 post-gavage (**Figure 6A**). In contrast, following 11G5 infection, a decrease in body weight in *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>ACEI</sup> versus control mice was observed at days 44, 50, 57 and 65 post-gavage (**Figure 6A**).

Second, we examined the role of autophagy in controlling the colonization of the gastrointestinal tract by the 11G5 strain. To follow the evolution of intestinal colonization by 11G5 in each mouse, the number of 11G5 bacteria in the feces was determined at different days post-infection and reported as percentage of 11G5 number determined at day 1 post-infection of the same mouse, defined as 100%. A significant decrease in 11G5 number at day 7 compared to day 1 post-infection regardless of mouse genotype was observed, indicating the elimination of most of 11G5 from the gastrointestinal tract (**Figure 6B**). However, in *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>ACEI</sup> mice, 11G5 colonization was increased at later time points post-infection, and this was significant at day 65 compared to day 7 post-infection (50.65% ± 30.28% versus 6.35% ± 3.45%, \**P* = 0.049). In contrast, in control mice, no increase in 11G5 colonization was observed although 11G5 colonized the gastrointestinal tract until day 65 post-infection. Importantly, 11G5 colonization in *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>ACEI</sup> mice was significantly higher compared to that in control mice at days 22, 36 and 65 post-infection (**Figure 6B**). These results suggest that autophagy deficiency leads to increased susceptibility of *Apc*<sup>Min/+</sup> mice to 11G5 infection.

### **Autophagy deficiency leads to increased colorectal tumorigenesis in *Apc*<sup>Min/+</sup> mice following infection with the *E. coli/pks+* 11G5 strain.**

First, the presence of rectal prolapse was determined on the day of sacrifice. Under uninfected condition, rectal prolapse was less frequently observed in *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg1611*<sup>ΔCEI</sup> (14.29%) compared to control mice (28.57%). Conversely, upon 11G5 infection, this was more common in *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg1611*<sup>ΔCEI</sup> (63.64%) than in control mice (38.47%). Shortening of the colon, a macroscopic parameter of tumor development, was more pronounced (\**P* = 0.036) in *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg1611*<sup>ΔCEI</sup> mice (colon length = 6.8 ± 0.28 cm, N = 11) compared to control mice (7.58 ± 0.59 cm, N = 13) following 11G5 infection. However, this difference was not found between the uninfected groups (control mice: 7.68 ± 0.72 cm *versus* *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg1611*<sup>ΔCEI</sup> mice: 7.87 ± 0.72 cm; N = 7 mice/group; *P* = 0.47). The representative photos of the colons of each group were shown in **Figure 6C**.

Compared to uninfected control mice, uninfected *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg1611*<sup>ΔCEI</sup> mice had a lower number of tumors per mouse and decreased tumor volume (**Figure 6D, E**). However, following 11G5 infection, increases in the number and the volume of tumors were observed in *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg1611*<sup>ΔCEI</sup> mice compared to control mice (**Figure 6D, E**). Histological examination consistently showed larger adenocarcinomas with increased inflammatory cell infiltration in the tumors in *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg1611*<sup>ΔCEI</sup> *versus* control mice under 11G5 infection condition (**Figure 7**). Under uninfected condition, this trend was reversed as compared to control mice, *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg1611*<sup>ΔCEI</sup> mice exhibited less and smaller adenocarcinomas (**Figure 7**).

### **Autophagy is necessary to limit colonic inflammation induced by the *E. coli/pks+* 11G5 strain in *Apc*<sup>Min/+</sup> mice.**

To study the mechanisms by which autophagy limits colorectal carcinogenesis induced by the 11G5 strain, we examined inflammation in the colonic mucosa of *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg1611*<sup>ΔCEI</sup> and control mice. Under uninfected condition, mRNA expression levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6, TNF-α and the chemokine KC were significantly decreased, while that of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was increased, in the non-tumoral colonic mucosa of *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg1611*<sup>ΔCEI</sup> mice compared to control mice (**Figure 8**). In contrast, following 11G5 infection, mRNA expression levels of IL-6, TNF-α and KC were increased, whereas that of IL-10 was decreased in the mucosa of *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg1611*<sup>ΔCEI</sup> mice compared to control mice (**Figure 8**). These results suggest that autophagy is necessary to limit inflammation induced by the 11G5 strain in *Apc*<sup>Min/+</sup> mice.

### **Autophagy is necessary to limit DNA damages in the colon induced by the *E. coli/pks+* 11G5 strain in *Apc*<sup>Min/+</sup> mice**

Next, we verified if a functional autophagy is required to inhibit DNA damage induced by the 11G5 strain *in vivo*. First, we examined autophagy activation in the colonic mucosa of mice by Western blot. In uninfected control mice, a low level of LC3-II showing basal autophagy activity in the colonic mucosa was observed (**Figure 9A, B**). This level was increased in the colonic mucosa of control mice following 11G5 infection (**Figure 9A, B**), confirming the *in vitro* data on activation of autophagy upon infection with the *E. coli/pks+* strains. As expected, we did not detect LC3-II in *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>ACE1</sup> mice under both uninfected and 11G5 infected conditions (**Figure 9A, B**).

Western blot analysis showed that  $\gamma$ H2AX levels in the non-tumoral colonic mucosa of uninfected groups were not different (**Figure 9C, D**). 11G5 infection led to increased  $\gamma$ H2AX levels in the non-tumoral colonic mucosa of control mice, confirming the *in vitro* data (**Figure 9C, D**). More importantly, the  $\gamma$ H2AX levels were increased in 11G5-infected *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>ACE1</sup> mice compared to 11G5-infected control mice (**Figure 9C, D**). This result was confirmed by immunohistochemical staining of the colonic sections for  $\gamma$ H2AX. **Figure 9E and F** show an increase in the number of  $\gamma$ H2AX foci per crypt in the non-tumoral colonic mucosa of control mice upon 11G5 infection, and this number was higher in 11G5-infected *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>ACE1</sup> versus 11G5-infected control mice. These results suggest that autophagy is necessary to limit DNA damage induced by the 11G5 strain in the colon of *Apc*<sup>Min/+</sup> mice.

### **Autophagy is necessary to inhibit the proliferation of colonic epithelial cells induced by the *E. coli/pks+* 11G5 strain in *Apc*<sup>Min/+</sup> mice.**

Finally, the role of autophagy in the control of cell proliferation was examined by analysis of the level of Cyclin D1, which is involved in regulating cell cycle progression. Western blot and qRT-PCR analyses consistently showed that Cyclin D1 expression in the non-tumoral colonic mucosa was not different between uninfected *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>ACE1</sup> and control mice (**Figure 10A-C**). 11G5 infection resulted in increased Cyclin D1 mRNA and protein expression in the colonic mucosa of control mice (**Figure 10A-C**). Importantly, Cyclin D1 expression was increased in 11G5-infected *Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>ACE1</sup> versus 11G5-infected control mice (**Figure 10A-C**). These results were confirmed by

immunohistochemical staining of Ki67, a marker of cell proliferation. The number of Ki67-positive cells in the non-tumoral colonic mucosa was not different between uninfected mice, but following 11G5 infection, this was increased in *Apc<sup>Min/+</sup>/Atg16l1<sup>ΔCEI</sup>* mice compared to control mice (**Figure 10D, E**). Importantly, the proliferation of tumor cells was also increased in *Apc<sup>Min/+</sup>/Atg16l1<sup>ΔCEI</sup>* mice compared to control mice following 11G5 infection, although this was not different between uninfected mouse groups (**Figure 10F, G**).

Together, these results suggest that autophagy is necessary to limit proliferation of colonic non-tumoral and tumoral cells induced by 11G5 infection in *Apc<sup>Min</sup>* mice.

## Experimental Procedures

### Bacterial strains and culture

The clinical *E. coli* strains isolated from CCR patients (Buc et al., 2013), the non-pathogenic *E. coli* K12 MG1655 strain, the commensal *E. coli* HS strain or the 11G5 $\Delta$ *clbQ* strain, which is the isogenic mutant of the 11G5 strain depleted for the *clbQ* gene in the *pks* island and unable to produce colibactin (Raisch et al., 2015) were used. Bacteria were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium overnight.

### Cell culture, infection and invasion assay

Human colorectal cancer HCT-116 cells and HeLa cells were cultured following ATCC guidelines and infected at a multiplicity of infection (MOI) of 100 bacteria per cell, as previously described (Cognoux et al., 2014). After 3 h of infection, cells were washed four times with PBS, and culture medium supplemented with 100  $\mu$ g/mL gentamicin was added for the indicated time. Cells were lysed with 1% Triton X-100 (Sigma) in deionized water. Samples were serially diluted and plated onto LB agar plates, and the number of bacteria was determined by counting the colony-forming units (CFU). The culture medium was changed every 2 days.

### SiRNA transfection

Control siRNA (Ambion, AM4611) and *ATG5* siRNA (Invitrogen, ATG5HSS114103) were used. HTC116 cells were transfected with vehicle or with 50 nM of control siRNA or *ATG5* siRNA using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 11668027) and Opti-MEM I reduced serum medium (Invitrogen, 319885062). After 8h, the cells were washed and incubated with culture medium. When indicated, cells were transfected every two days.

### Animal model, *in vivo* infection, and determination of intestinal colonization by 11G5 bacteria

Studies were performed using 6-week-old C57BL/6J-*Apc*<sup>Min/+</sup> mice deficient for ATG16L1 specifically in intestinal epithelial cells (*Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1* <sup>$\Delta$ IEC</sup>) and their littermate controls (*Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>flox/flox</sup>). Mice were infected or not with the clinical *E. coli* 11G5 strain harboring the *pks* island isolated from a CRC patient (Buc et al., 2013) as previously described (Bonnet et al., 2014). Briefly, mice were treated with streptomycin (2.5 g/L) in drinking water for 3 days, following by one day of water. Each mouse was orally administered by gavage with 10<sup>9</sup> CFU 11G5 bacteria diluted in 200  $\mu$ l of PBS or with PBS

alone. At day 65 post-infection, the mice were sacrificed. The length of the colon was measured. The colons were then removed from the caecum to the rectum, washed in PBS, and opened longitudinally. Tumor number and tumor volume  $[(width^2 \times length)/2]$  were determined using a dissecting microscope. The colons were fixed in 40% paraformaldehyde and then embedded in paraffin. Tumors and non-tumoral mucosa were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  to perform subsequent protein and total RNA extraction.

Feces harvested at different days post-infection were weighed, crushed in 1 mL of PBS and spread on LB agars supplemented with antibiotics (ampicillin 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and kanamycin 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to select 11G5 bacteria. After 24h at  $37^{\circ}\text{C}$ , the CFU were counted and normalized to gram of feces.

### **Protein extraction and Western blot analysis**

Extraction of protein from cells in culture or tissue samples and Western blot were performed as previously described (Bretin et al., 2016). The relevant primary antibodies used were anti-LC3 (Sigma-Aldrich, L8918), anti-SQSTM1/p62 (Santa Cruz, sc-28359), anti-phosphoH2AX (Cell Signaling, 2577), anti-RAD51 (abcam, ab63801), anti-ATG16L1 (Cell signaling, 8089S), anti-ATG5 (Cell signaling, 12994S), anti-CDKN2A/p16INK4a (Abcam, ab108349), anti-CYCLIN D1 (abcam, 134175), anti- $\beta$ -actine (Cell signaling, 4970) and anti-Lamin B1 (Abcam, ab133741). The secondary antibodies used were HRP-conjugated goat anti-rabbit (Cell Signaling, 7074) or rabbit anti-mouse (Cell Signaling, 7076). Blots were detected using the Enhanced Chemiluminescence Detection kit (Amersham Biosciences, RPN2108) and revealed by using the ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS System (BioRad).

### **Senescence-associated $\beta$ -galactosidase staining and cell proliferation examination by MTT test**

Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase staining was performed as previously described (Cougoux et al., 2014). Images of cells were acquired using an Olympus Bx51 optical microscope. Conditioned media from HCT-116 cells transfected with a scramble siRNA or ATG5 siRNA and then infected with different *E. coli* strains were collected and concentrated using the centrprep centrifugal filter devices 3K (Millipore). HCT-116 cells were incubated with the conditioned media for 24h, and their proliferation was examined using the XTT Cell Viability Assay Kit (Biotium).

### **Total RNA extraction, cDNA synthesis and qRT-PCR**

Total RNAs were extracted from human mucosa samples or mouse tissue samples using miRNeasy kit (Qiagen), and were reversely transcribed using the cDNA synthesis kit (Takara) according to the manufacturer's instructions. qRT-PCR was performed using 2 µl of cDNA, SYBR Green Master Mix (BioRad) and 200 nM specific primers (**Table S1**) using a thermocycler (BioRad) according to the following program: 95°C - 30 sec followed by 40 cycles of (90°C - 5 sec and 60°C - 30 sec). Human 18S and mouse 36B4 were used as internal controls. Fold-induction was calculated using the *Ct* method as previously described (Nguyen et al., 2014).

### **Immunofluorescence microscopy**

Cells seeded on coverslips were immunofluorescently stained for RAD51 and phospho-H2AX as previously described (Bretin et al., 2016). The primary antibodies used were anti-RAD51 (abcam, ab63801) and anti-phosphoH2AX (Cell Signaling, 2577). The secondary antibodies used were Cy3 donkey anti-rabbit (Sigma-Aldrich, AP182C). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, B2261). Coverslips were mounted using Eukitt (Dutscher, 045799). Images were taken using a Leica SPE confocal microscope.

### **Hematoxylin and eosin staining and immunohistochemical staining**

The paraffin-embedded colons were cut into 5 µm sections with a microtome, and colonic sections were H&E-stained. For immunohistochemical staining, the sections deparaffinized in xylene for 5 min, incubated in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 30 min, rehydrated in ethanol gradient (100%, 96%, 75% and 50%: 3 min each) and then incubated for 20 min at 95°C in Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-Base, 1 mM EDTA, pH 9). The sections were incubated with blocking buffer (1% bovine serum albumin in PBS) for 1h at room temperature, then with anti-Ki67 antibody (1/500, Cell Signaling) or anti-phosphoH2AX (1/500, Cell signaling) overnight at 4°C. After several washings with PBS, the sections were incubated for 2h at room temperature with the corresponding secondary antibody coupled with peroxidase (1/200<sup>th</sup>, Cell Signaling). Revelation was performed using 3,3'-Diaminobenzidine (Clinisciences). The sections were then counterstained with Mayer hematoxylin (Diapath) for 10 sec, rinsed under running water, dehydrated and then mounted in mounting solution Eukitt. The microscopic images were acquired using the Scanner Zeiss Axioscan Z1 (Zeiss) and analysed using the ZEN 2 software.

### **Ethical statement**



Animal protocols were carried out in strict accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Université Clermont-Auvergne, Clermont-Ferrand, France and were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the Department of Auvergne (Comité d'éthique en matière d'expérimentation animale CEMEA Auvergne, registered under the number C2EA - 02) and the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS#11254-2017091114561398).

Ethical approval for human study was granted by the research ethics committee at the University Hospital of Clermont-Ferrand (France). Patients underwent surgery for resectable CRC (n = 65) in the Digestive and Hepatobiliary Surgery Department of the University Hospital of Clermont-Ferrand, France, between March 2007 and March 2014. All of the patients were prospectively enrolled in the study. All of the patients were adult volunteers and signed informed consent prior to being included in the study. The exclusion criteria for the study included clinically suspected hereditary CRC using the revised Bethesda criteria [35 of Johan], neo-adjuvant chemotherapy, history of previous colonic resection, emergency surgery and use of antibiotics within 4 weeks prior to surgery. Macroscopically normal mucosa samples adjacent to the tumor (10 cm from the tumor) were collected as previously described (Bonnet et al., 2014; Gagnière et al., 2017). The mucosa-associated prevalence of *E. coli* harboring colibactin-encoding *pks* island was investigated as previously described (Gagnière et al., 2017).

### **Statistical analysis**

Results are presented as means  $\pm$  SEM or median. Statistical analyses between two or several groups were performed using Student's t-test (Mann-Whitney if not parametric) or ANOVA followed by a post-test Bonferroni (Kruskal-Wallis if not parametric) with GraphPad Prism version 6 software. A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant. \**P* < 0.05; \*\**P*  $\leq$  0.01; \*\*\**P*  $\leq$  0.001; \*\*\*\**P*  $\leq$  0.0001

## Discussion

Autophagy has a complex, dual and context-dependent role in carcinogenesis. Autophagy serves as a surveillance mechanism that protects normal cells from the transformation to malignancy by removing damaged organelles and aggregated proteins, and by reducing reactive oxygen species, mitochondrial abnormalities and DNA damage (Singh et al., 2018). In addition, autophagy has a crucial role in both innate and adaptive immune responses, by which it prevents the establishment and proliferation of malignant cells (Ma et al., 2013). Reversely, increasing evidence show that autophagy can promote tumorigenesis by supporting survival and growth of tumor cells under metabolic and hypoxic stress in the tumor microenvironment, by inhibiting cellular death and increasing anticancer drug resistance (Singh et al., 2018).

Autophagy plays a key role in the first line of host defense against pathogens (Deretic, 2010). However, a role for autophagy in host responses to colibactin-producing *E. coli/pks+*, which have been emerged as an important player in CRC (Lucas et al., 2017), has not yet investigated. Here, we show that colonization of colonic mucosa from CCR patients with *E. coli/pks+* is associated with higher expression of several autophagy-related genes. Modification of autophagy-related protein expression in CRC has been reported, although the results from different works are inconsistent. Indeed, increased expression of autophagy-related proteins has been shown in most CRC patients and CRC cells (Ahn et al., 2007; Guo et al., 2011; Jo et al., 2012; Li et al., 2009; Yang et al., 2015; Zheng et al., 2012). Activation of autophagy in the intestinal epithelium of *Apc<sup>Min/+</sup>* mouse model of CRC was also shown (Levy et al., 2015). However, downregulation of the autophagic protein BECLIN 1 and impairment of autophagy was reported in a small population of CRC (Chen et al., 2013). Together with these studies, our data indicate the importance of autophagy in CRC and in particular in CRC with abnormal colonization of *E. coli/pks+*.

We also showed that in human colon carcinoma HCT-116 cells, autophagy is activated in response to infection with CRC-associated *E. coli* strains, and this is dependent on the presence of the *pks* island. Previous studies have shown the activation of autophagy in host cells upon infection with adherent-invasive *E. coli* strains, which abnormally colonize the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease (Bretin et al., 2016; Lapaquette et al., 2010; Nguyen et al., 2013, 2014). Regarding the link between autophagy and CCR-associated bacteria, it is only beginning to be explored. To date, only two studies are available on the link of autophagy and *Fusobacterium nucleatum*, a CCR-associated bacterium that increases tumor development in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice (Kostic et al., 2013) and its abundance is correlated with

decreased 5-year survival rate of CCR patients (Mima et al., 2016). *F. nucleatum* infection was reported to activate autophagy, inducing *in vitro* resistance to chemotherapeutic drugs (Yu et al., 2017). In contrast, Tang *et al.* have shown that *F. nucleatum* blocks the autophagic process at the fusion stage between the autophagosome and the lysosome, and this promotes the pro-inflammatory response in the human Caco-2 CCR cell line (Tang et al., 2016). Thus, our study contributes to a better understanding of the role of autophagy in the infectious etiology of CRC, an area that is still little explored.

The *pks* island encodes enzymes necessary for the synthesis of the colibactin genotoxin, which has been shown to induce DNA DSBs *in vitro* in mammalian cell lines (Nougayrède et al., 2006) and *in vivo* in mouse enterocytes (Cuevas-Ramos et al., 2010). Here, we reported that autophagy is required for DNA damage response upon infection with the *E. coli/pks+* 11G5 strain by recruiting the DNA repair protein RAD51 into the nucleus. Our data are consistent with previous study showing that DNA repair proteins such as RAD51 cannot be recruited to the sites of DSBs in autophagy-deficient cells, leading to impaired DSB repair (Wang et al., 2016). Furthermore, we showed that the autophagy-mediated DSB repair is p62-dependent. p62 is a cargo receptor that targets ubiquitinated targets for degradation via both autophagy and proteasomal pathways (Cohen-Kaplan et al., 2016). The role of p62 and autophagy in DNA damage response have been shown. DNA damage and oxidative stress resulting from autophagy defects are suppressed by inhibiting p62 accumulation (Mathew et al., 2009). It was recently demonstrated that p62 rapidly shuttles between the cytoplasmic and nuclear compartments (Pankiv et al., 2010). Nuclear p62 facilitates proteasomal degradation of DNA repair machinery components, including Filamin A and RAD51, and inhibition of p62 increases the rate of DNA repair and specifically promotes homologous recombination (Hewitt et al., 2016). In another study, it was shown that p62 accumulates in autophagy-defective cells directly binds to and inhibits nuclear RNF168, an E3 ligase essential for histone H2A ubiquitination and DNA damage responses (Wang et al., 2016). This consequently inhibits the recruitment of DNA repair proteins, such as BRCA1, RAP80, and RAD51, to the sites of DNA DSBs, impairing DNA damage repair (Wang et al., 2016). It was also shown that upon DNA damage induction, p62 interacts with Filamin A (Hewitt et al., 2016), which has previously been shown to recruit the DNA repair protein RAD51 to DNA DSB sites and facilitate homologous recombination (Yue et al., 2009). An accumulation of p62 has been also linked to many human diseases with reduced DNA repair and genome instability including neurodegenerative disorders and cancers (Jackson and Bartek, 2009).

It has been shown that multiple DNA damage induced by *E. coli/pks+* causes cell cycle arrest and senescence of infected cells (Cougoux et al., 2014). The latter then acquires a senescence-associated secretory phenotype, which is accompanied by the secretion of growth factors that can stimulate the proliferation of uninfected cells (Cougoux et al., 2014). Here, we showed that inhibition of autophagy in HCT-116 cells leads to increased 11G5-induced senescence, which consequently promotes proliferation of uninfected cells. In addition, our group has shown *in vitro* that the CCR mucosa-associated *E. coli/pks+* strains are able to adhere to and to invade intestinal epithelial cells, although with a lower level compared to adherent-invasive *E. coli* (Raisch et al., 2014). However, they can induce a pro-inflammatory response in intestinal epithelial cells, although this is independent of the presence of the *pks* island (Cougoux et al., 2014; Raisch et al., 2014). In this study, we showed that deficiency of autophagy leads to increased intracellular 11G5 bacteria in host cells and enhanced secretion of pro-inflammatory cytokines. Together, our *in vitro* data suggest that upon *E. coli/pks+* infection, autophagy is activated in host cells, and this is important to inhibit the pro-tumoral and pro-inflammatory effects of *E. coli/pks+*.

It has been shown that *E. coli/pks+* induce tumorigenesis in mouse models of CRC (Arthur et al., 2012; Bonnet et al., 2014; Cougoux et al., 2014). However, to date, no data is available on the role of autophagy in colorectal carcinogenesis induced by *E. coli/pks+*. To study this, we used *Apc*<sup>Min/+</sup> mice deficient or not for autophagy specifically in intestinal epithelial cells. *Apc*<sup>Min/+</sup> mouse model is a relevant preclinical tumor model of CRC as mutations in the *APC* gene have been found in more than 80% of CRC. *Apc*<sup>Min/+</sup> mice develop multiple intestinal adenomatous polyps as observed for CRC patients with inactivated APC (Colnot et al., 2004; Moser et al., 1990).

First, our work shed light on the role of autophagy in colorectal carcinogenesis in *Apc*<sup>Min/+</sup> mice in uninfected condition. Indeed, without infection, the number and size of colorectal tumors were decreased in *Apc*<sup>Min/+</sup> *Atg16l1*<sup>ΔIEC</sup> mice compared to control (*Apc*<sup>Min/+</sup> *Atg16l1*<sup>fllox/fllox</sup>) mice. This was accompanied with decreased mRNA expression levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines and increased mRNA expression levels of anti-inflammatory cytokines in the colonic mucosa of *Apc*<sup>Min/+</sup> *Atg16l1*<sup>ΔIEC</sup> mice. These results were in agreement with the study by Levy *et al.* showing that conditional inactivation of the autophagy-related gene *Atg7* in intestinal epithelial cells prevents tumor development in *Apc*<sup>Min/+</sup> mice via the modulation of the inflammatory response (Lévy et al., 2015). In contrast, following 11G5 infection, *Apc*<sup>Min/+</sup> *Atg16l1*<sup>ΔIEC</sup> mice exhibited increased colorectal carcinogenesis with higher tumor number and size compared to control mice. This can be first

explained by increased susceptibility of *Apc<sup>Min/+</sup>Atg16l1<sup>ΔIEC</sup>* mice to 11G5 infection, characterized by increases in body weight loss and 11G5 colonization of the gastrointestinal tract, compared to control mice. Moreover, increases in 11G5-induced DNA damage and production of pro-inflammatory cytokines and chemokines in normal epithelium, and enhanced cellular proliferation in both normal mucosa and tumors were observed for 11G5-infected *Apc<sup>Min/+</sup>Atg16l1<sup>ΔIEC</sup>* versus control mice.

In conclusion, our work showed the complex role of autophagy in colorectal carcinogenesis. In normal condition, inhibition of autophagy suppresses colonic tumorigenesis in a susceptible mouse model of CRC, the *Apc<sup>Min/+</sup>* mice. However, in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice colonized with *E. coli/pks+*, autophagy is necessary to limit the pro-tumoral and pro-inflammatory effects of the bacteria, inhibiting the colorectal tumorigenesis (**Figure 11**). This study provides a better understanding of the role of autophagy in host defense to CCR-associated *E. coli/pks+* infection. In the future, this work could also contribute to the development of a personalized therapeutic strategies based on the modulation of autophagy for patients with *E. coli/pks+* colonization.

## Figure legends

**Figure 1: Colonization of non-tumoral colonic mucosa from CRC patients with *E. coli/pks+* is associated with high mRNA expression levels of several genes implicated in autophagy.**

(A) qRT-PCR analysis for mRNA expression levels of autophagy-related genes in normal colonic mucosa from patients with sporadic CRC colonized with *E. coli/pks-* (34 patients) or *E. coli/pks+* (31 patients) strains. Each dot in the graphs shows the value for each patient, line at median. Statistical analysis was performed using the non-parametric Mann-Whitney test.

(B) For each autophagy-related gene, the median of mRNA expression levels of all patients was determined, and the proportion of patients with a mRNA expression level higher or lower the median was determined. Statistical analysis was performed using the Fisher's exact test.

\* $P < 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ .

**Figure 2: Autophagy is activated in human colon cancer HCT-116 cells upon infection with *E. coli/pks+* strains.**

(A, B) HCT-116 cells were uninfected or infected with the non-pathogenic *E. coli* strains (K12 MG1655, commensal HS or K12 C600) or different *E. coli/pks-* and *E. coli/pks+* strains isolated from CRC patients for 3h and then incubated with gentamycin-containing media for 5h.

(C, D) HCT-116 cells were infected with the non-pathogenic *E. coli* K12 MG1655 strain, or the *E. coli/pks+* 11G5 strain and its isogenic mutant 11G5 $\Delta$ *clbQ* depleted for the *clbQ* gene in the *pks* island for 3h and then incubated with gentamycin-containing media for 1h (4h post-infection) or 5h (8h post-infection). Representative Western blot analysis (A, C) and quantification of LC3-II/ $\beta$ -actin band intensity from 3 independent blots (B, D) were shown.

(B, D) Values represent means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using the one-way Anova test followed by a Bonferroni post-test. \* $P < 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs +11G5 4h; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$  vs +11G5 8h.

**Figure 3: Autophagy is necessary to limit DNA damage induced by infection with the *E. coli/pks+* 11G5 strain.**

HCT-116 cells were transfected with a scramble siRNA or *ATG5* siRNA, or with both *ATG5* siRNA and *p62* siRNA, and then infected or not with the non-pathogenic *E. coli* K12 MG1655 strain, or the 11G5 strain or its isogenic mutant 11G5 $\Delta$ *clbQ*. Analyses were performed at day 5 post-infection. (A) Western blot analysis using total cell lysate and (B)

quantification of  $\gamma$ H2AX/ $\beta$ -actin band intensity from 3 independent blots. (C) Immunofluorescent labeling of  $\gamma$ H2AX (red). Nuclei were stained with Hoechst (blue). (D) Quantification of the number of  $\gamma$ H2AX foci per cell determined from 20 cells per condition and 2 independent experiments. (E) Western blot analysis using nuclear fraction lysate and (F) quantification of band intensity of RAD51 or p62 relative to Lamin B1 from 3 independent blots. (G) Immunofluorescent labeling of RAD51 (red). Nuclei were stained with Hoechst (blue). (H) Quantification of the number of RAD51 foci per nucleus determined from 20 nuclei per condition and 2 independent experiments. (B, D, F, H) Values represent means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using the one-way Anova test followed by a Bonferroni post-test. \* $P < 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; <sup>a</sup> $P \leq 0.001$  vs scramble siRNA +11G5; <sup>a\*</sup> $P \leq 0.01$  vs scramble siRNA +11G5; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$  vs ATG5 siRNA+p62 siRNA + 11G5; <sup>c</sup> $P \leq 0.001$  vs ATG5 siRNA uninfected; <sup>d</sup> $P \leq 0.001$  vs ATG5 siRNA + 11G5.

**Figure 4: Autophagy is necessary to limit senescence induced by infection with the *E. coli/pks+* 11G5 strain.**

HCT-116 cells were transfected with a scramble siRNA or *ATG5* siRNA and then infected or not with the 11G5 strain. (A) At day 5 post-infection, senescent cells were detected by beta-galactosidase staining at pH 6. (B) Quantification of the percentage of senescence-associated beta-galactosidase-positive cells determined from 4 images/condition and 3 independent experiments. (C) HCT-116 cells were cultured in the presence of conditioned media derived from HCT-116 cells transfected with a scramble siRNA or *ATG5* siRNA and infected or not with the *E. coli/pks+* 11G5 strain and its isogenic mutant 11G5 $\Delta$ *clbQ*. Cellular growth was assessed using the XTT Cell Viability Assay Kit after 24 h of incubation. Values represent means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using the one-way Anova test followed by a Bonferroni post-test. \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; <sup>a</sup> $P \leq 0.001$  vs cells incubated with conditioned media from cells transfected with scramble siRNA and infected with 11G5; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$  vs cells incubated with conditioned media from cells transfected with *ATG5* siRNA and infected with 11G5.

**Figure 5: Autophagy is necessary to eliminate intracellular 11G5 bacteria and to inhibit 11G5-induced inflammation.**

HCT-116 cells were transfected with a control siRNA or *ATG5* siRNA, and then infected or not with the non-pathogenic *E. coli* K12 MG1655 strain or the 11G5 strain for the indicated

time. **(A)** Intracellular bacterial number counted on LB agar plates. **(B)** Secreted IL-6 and IL-8 amounts in cell culture supernatant quantified by ELISA. Data are means  $\pm$  SEM of 6 replicates and are representative of 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using the one-way Anova test followed by a Bonferroni post-test.  $*P < 0.05$ ;  $***P < 0.001$ ;  $^aP \leq 0.001$  vs scramble siRNA + 11G5 at 0h;  $^bP \leq 0.001$  vs *ATG5* siRNA + 11G5 at 0h.

**Figure 6: Autophagy deficiency in *Apc*<sup>Min/+</sup> mice leads to increased susceptibility to infection with the *E. coli/pks+* 11G5 strain and enhanced 11G5-induced colorectal carcinogenesis.**

*Apc*<sup>Min/+</sup> *Atg16l1*<sup>AIEC</sup> and control (*Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>fllox/fllox</sup>) mice were treated with streptomycin for 3 days (day -4), then received H<sub>2</sub>O (day -1) for 24 h. The mice were orally administered (day 0) with PBS or with 10<sup>9</sup> 11G5 bacteria. **(A)** Body weight of each mouse at different time points was determined, and presented as percentage of body weight of the same mouse at day -4, defined as 100%. Data are means  $\pm$  SEM. ( $^aP < 0.05$ ,  $^{aa}P \leq 0.01$ ): comparison between uninfected groups. ( $^bP < 0.05$ ;  $^{bb}P \leq 0.01$ ;  $^{bbb}P \leq 0.001$ ): *Apc*<sup>Min/+</sup> *Atg16l1*<sup>AIEC</sup> + PBS vs *Apc*<sup>Min/+</sup> *Atg16l1*<sup>AIEC</sup> + 11G5. ( $^cP < 0.05$ ,  $^{cc}P \leq 0.01$ ): control + 11G5 vs *Apc*<sup>Min/+</sup> *Atg16l1*<sup>AIEC</sup> + 11G5. **(B)** The number of 11G5 bacteria in the feces was determined, and the results are presented as percentage of CFU of 11G5/gram of feces at different days post-infection compared to that at day 0 for each mouse, defined as 100%. **(C)** Representative photos of the colon of each mouse group taken at day of sacrifice (day 65). **(D)** The number of colorectal tumors determined using a binocular loupe. **(E)** Tumor volume (volume of all tumor/number of tumors of each mouse). Data are means  $\pm$  SEM of N = 7 mice for uninfected groups, N = 13 for control mice + 11G5 and N = 11 for *Apc*<sup>Min/+</sup> *Atg16l1*<sup>AIEC</sup> + 11G5 and are representatives of 2 independent experiments. Statistical analysis was performed using the one-way Anova test followed by a Bonferroni post-test.  $*P < 0.05$ ;  $**P \leq 0.01$ ;  $***P \leq 0.001$ .

**Figure 7: Histological analysis of colonic sections from *Apc*<sup>Min/+</sup> *Atg16l1*<sup>AIEC</sup> and control mice under uninfected and 11G5 infected condition.**

*Apc*<sup>Min/+</sup> *Atg16l1*<sup>AIEC</sup> and control (*Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>fllox/fllox</sup>) mice were infected or not with the 11G5 strain and sacrificed at day 65 post-infection. 5  $\mu$ m sections of mouse colon were stained with H&E. Representative microscopic images of the colon of each mouse group were



taken using an Olympus Bx51 optical microscope. \*Colorectal tumor; arrowheads show infiltration of immune cells within tumors; arrows show superficial ulcerations in the tumor.

**Figure 8: Autophagy is necessary to limit colonic inflammation induced by the *E. coli/pks+* 11G5 strain in *Apc*<sup>Min/+</sup> mice.**

*Apc*<sup>Min/+</sup> *Atg16l1*<sup>AIEC</sup> and control (*Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>lox/lox</sup>) mice were orally administered with PBS or with 10<sup>9</sup> 11G5 bacteria and sacrificed at day 65 post-treatment. mRNA levels of *Il-6*, *Tnf- $\alpha$*  *Kc* and *Il-10* in colonic mucosa were quantified by qRT-PCR. Data are means  $\pm$  SEM of N = 7 mice for uninfected groups, N = 13 for control mice + 11G5 group and N = 11 for *Apc*<sup>Min/+</sup> *Atg16l1*<sup>AIEC</sup> mice + 11G5 and are representatives of 2 independent experiments. Statistical analysis was performed using the one-way Anova test followed by a Bonferroni post-test. \* $P < 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ .

**Figure 9: Autophagy is necessary to limit DNA damages in the colon induced by the *E. coli/pks+* 11G5 strain in *Apc*<sup>Min/+</sup> mice.**

*Apc*<sup>Min/+</sup> *Atg16l1*<sup>AIEC</sup> and control (*Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>lox/lox</sup>) mice were orally administered with PBS or with 10<sup>9</sup> 11G5 bacteria and sacrificed at day 65 post-treatment. (A) Representative Western blot analysis of LC3 levels in the non-tumoral colonic mucosa and (B) quantification of LC3-II/ $\beta$ -actin band intensity from N = 7 /group for uninfected mice and N = 10/group for infected mice. (C) Representative Western blot analysis of  $\gamma$ H2AX levels in the non-tumoral colonic mucosa and (D) quantification of  $\gamma$ H2AX/ $\beta$ -actin band intensity from N = 7 /group for uninfected mice and N = 10/group for infected mice. (E)  $\gamma$ H2AX immunohistochemical staining of non-tumoral colonic mucosa and (F) quantification of the number of  $\gamma$ H2AX foci per crypt determined from 20 crypts per mouse and 6 mice/group. Values represent means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using the one-way Anova test followed by a Bonferroni post-test. \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ .

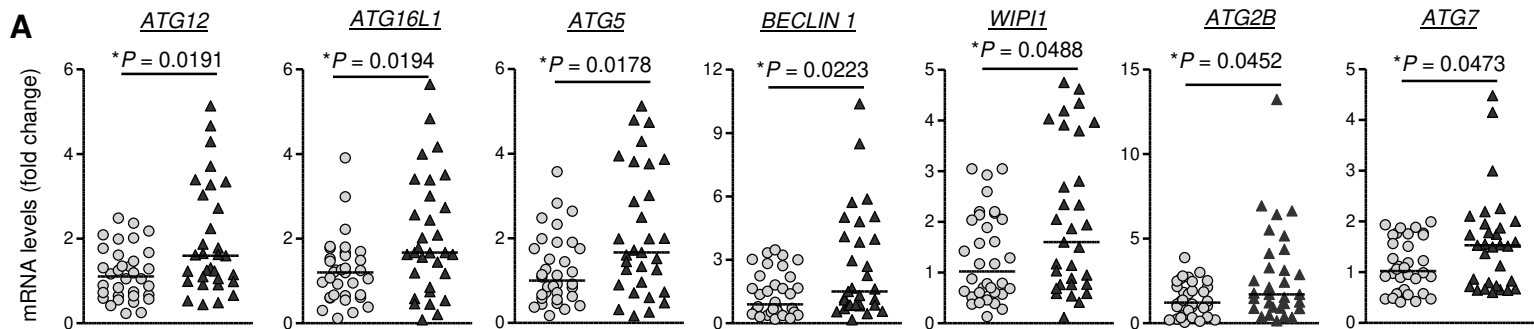
**Figure 10: Autophagy is necessary to inhibit colonic cell proliferation induced by the *E. coli/pks+* 11G5 strain in *Apc*<sup>Min/+</sup> mice**

*Apc*<sup>Min/+</sup> *Atg16l1*<sup>AIEC</sup> and control (*Apc*<sup>Min/+</sup>/*Atg16l1*<sup>lox/lox</sup>) mice were orally administered with PBS or with 10<sup>9</sup> 11G5 bacteria and sacrificed at day 65 post-treatment. (A) Representative Western blot analysis of Cyclin D1 level in non-tumoral colonic mucosa and (B) quantification of Cyclin D1/ $\beta$ -actin band intensity from N = 7 /group for uninfected mice and

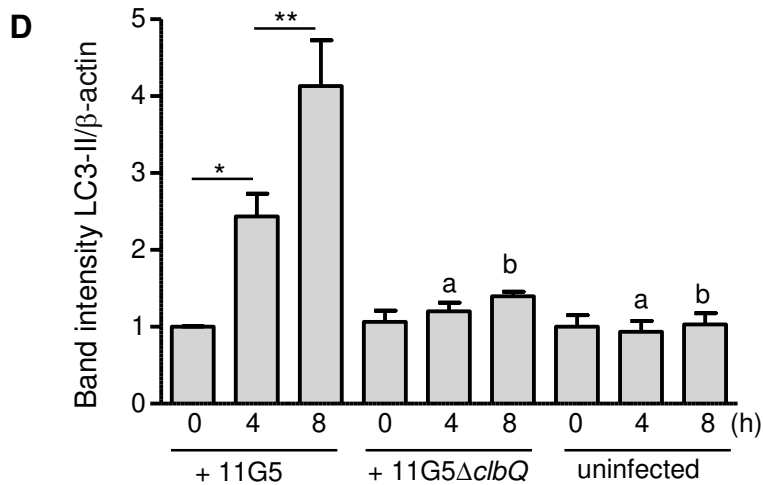
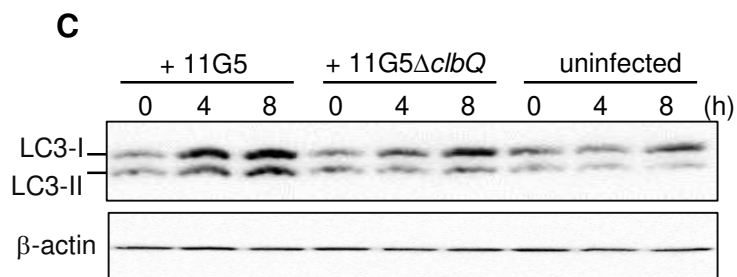
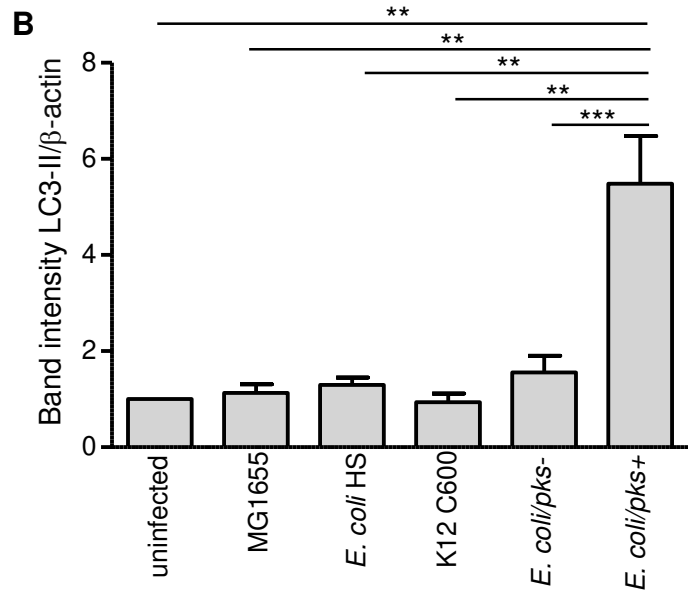
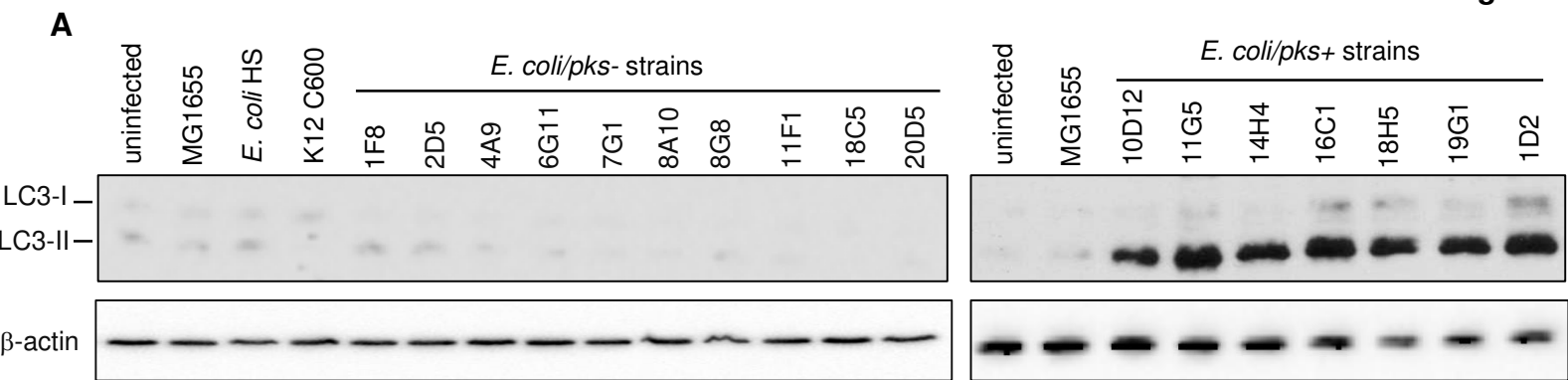
N = 10/group for infected mice. **(C)** Cyclin D1 mRNA level in the non-tumoral colonic mucosa were quantified by qRT-PCR. Data are means  $\pm$  SEM of N = 7 mice for uninfected groups, N = 13 for control mice + 11G5 group and N = 11 for *Apc*<sup>Min/+</sup>*Atg16l1*<sup>ΔIEC</sup> mice + 11G5 and are representatives of 2 independent experiments. **(D)** Ki67 immunohistochemical staining of colonic mucosa and **(E)** quantification of the number of cells positive for Ki67 (Ki67<sup>+</sup>) per crypt determined from 20 crypts per mouse and 6 mice/group. **(F)** Ki67 immunohistochemical staining of colonic tumors and **(G)** quantification of Ki67<sup>+</sup> number per mm<sup>2</sup> of tumor determined from 6 mice/group. Statistical analysis was performed using the one-way Anova test followed by a Bonferroni post-test. \**P* < 0.05; \*\**P* ≤ 0.01; \*\*\**P* ≤ 0.001.

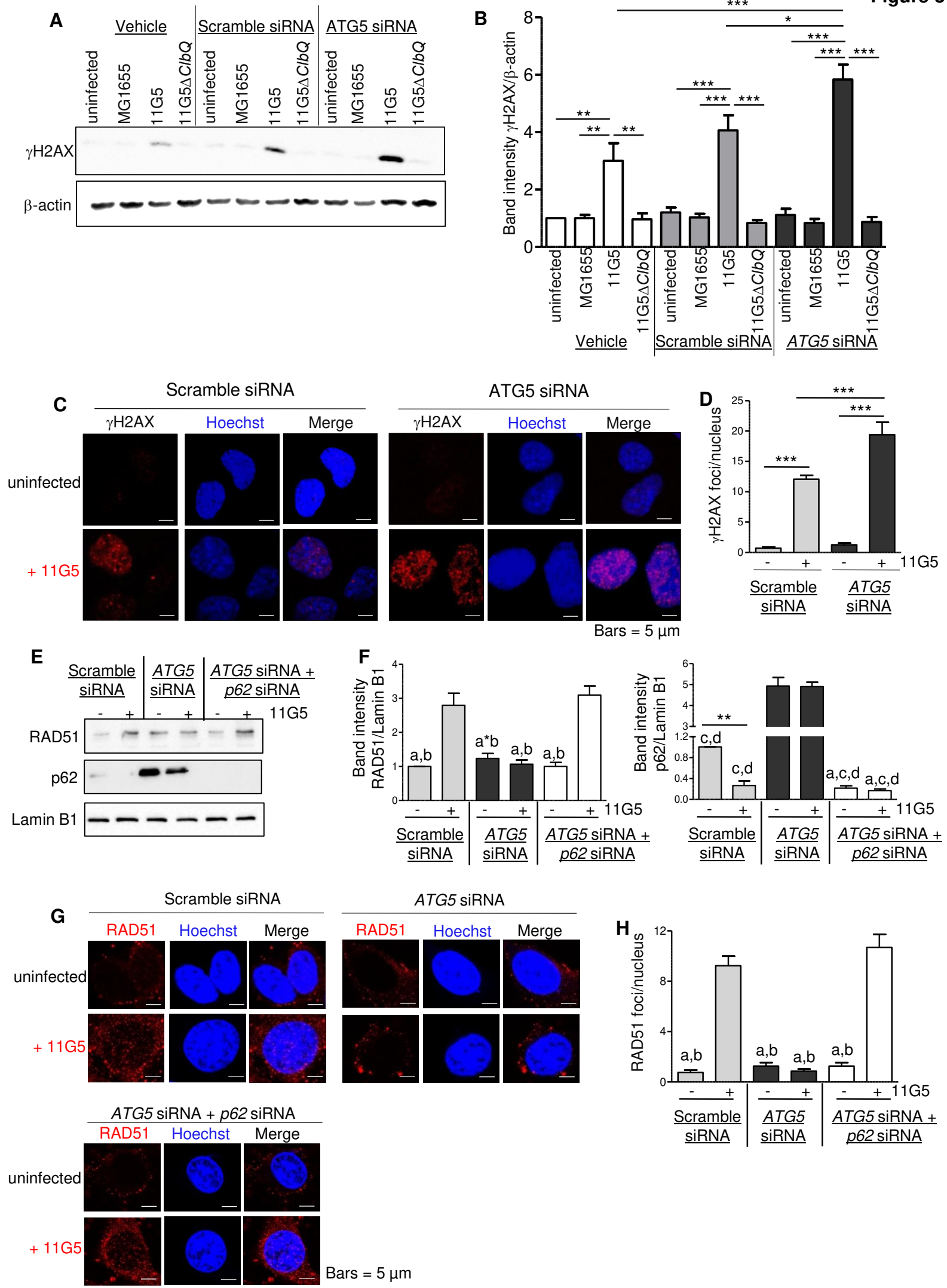
**Figure 11: Proposed model for the role of autophagy in colorectal carcinogenesis following infection with *E. coli/pks+* strains.**

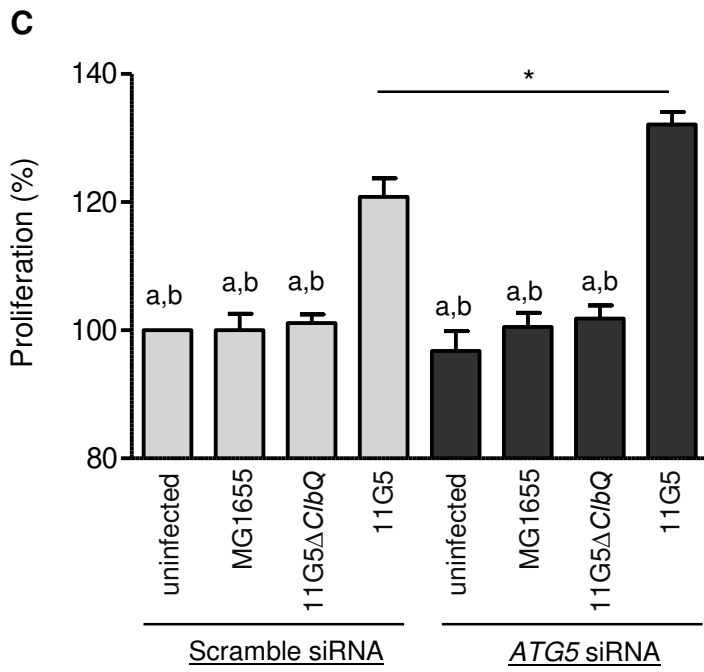
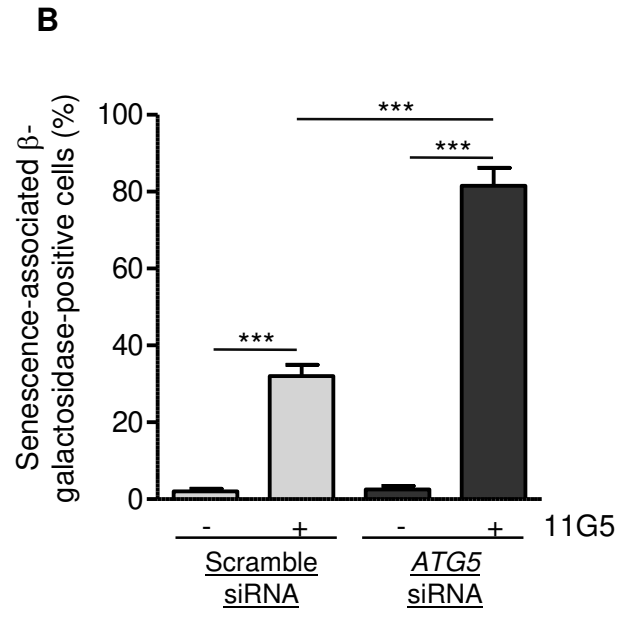
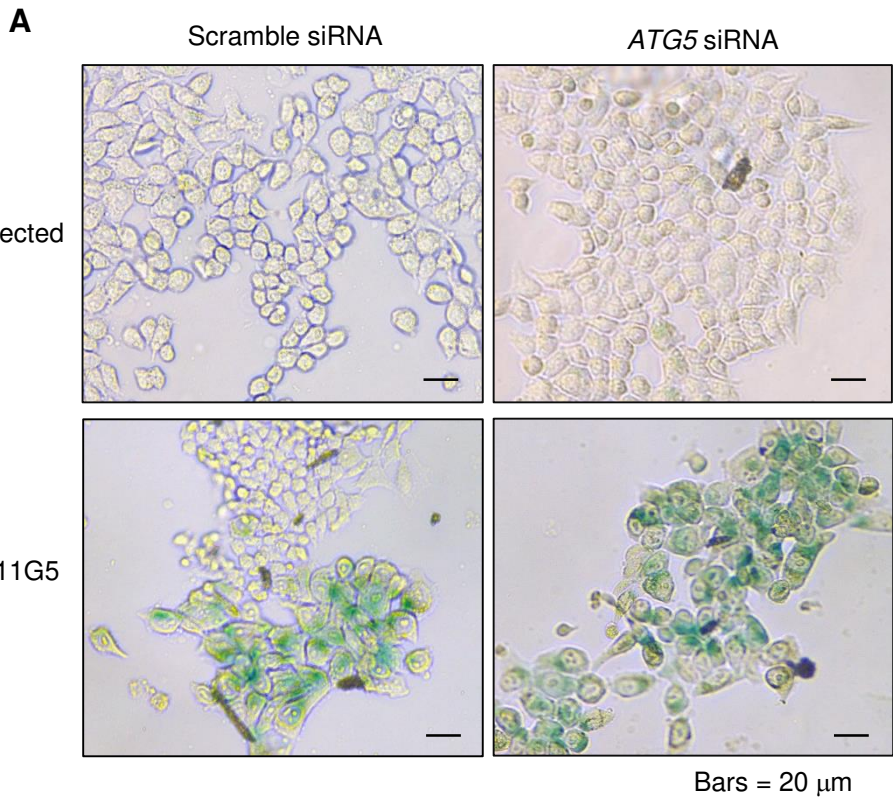
In a host predisposed to CCR development, following infection with the *E. coli/pks+* strains, autophagy is activated to control intestinal colonization by bacteria, to protect intestinal epithelial cells from DNA damage via activating the DNA repair, to reduce intestinal inflammation and cell proliferation, thus limiting colorectal carcinogenesis. Autophagy dysfunction leads to promoted colorectal carcinogenesis, which is associated with enhanced colonization of the gastrointestinal tract by *E. coli/pks+* and increases in epithelial DNA damage, intestinal inflammation and epithelial cell proliferation.

**B**

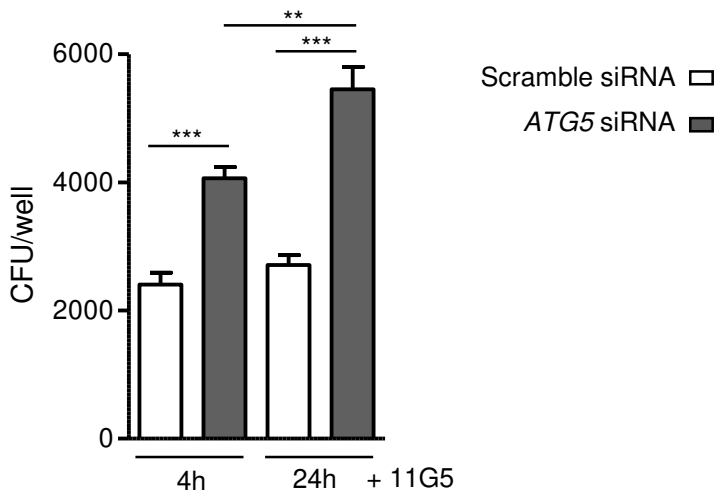
	<i>E. coli/pks-</i>		<i>E. coli/pks+</i>		<i>P</i> value
	< Median	> Median	< Median	> Median	
<i>ATG16L1</i>	64.71%	35.29%	32.26%	67.74%	< 0.0001 ****
<i>ATG5</i>	61.76%	38.24%	35.48%	64.52%	0.0002 ***
<i>ATG7</i>	61.76%	38.24%	38.71%	61.29%	0.0011 **
<i>ATG2B</i>	55.88%	44.12%	38.71%	61.29%	0.0155 *
<i>MAP1LC3B</i>	58.82%	41.18%	41.94%	58.06%	0.0157 *
<i>ATG13</i>	58.82%	41.18%	41.94%	58.06%	0.0157 *
<i>ATG12</i>	55.88%	44.12%	41.94%	58.06%	0.0465 *



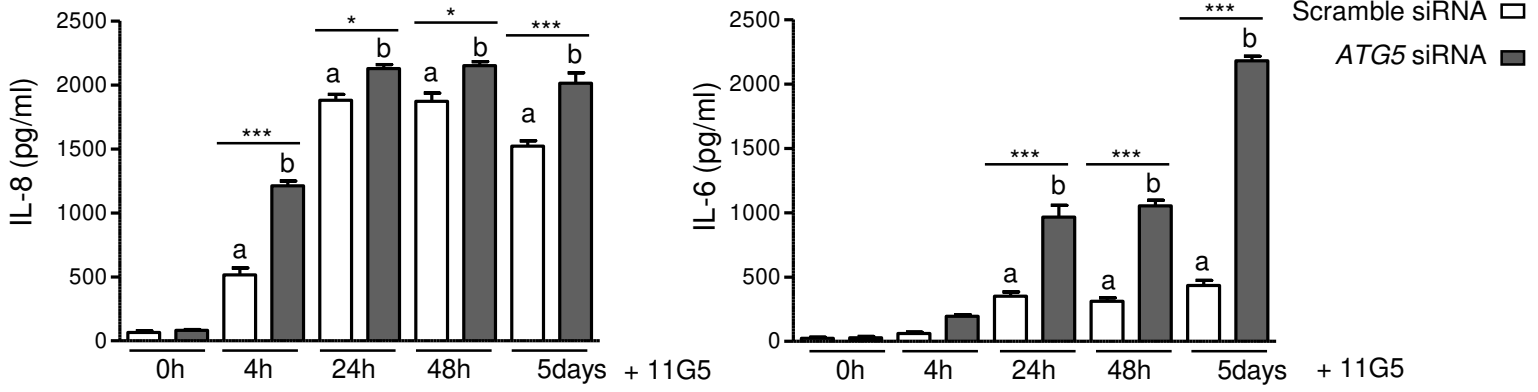


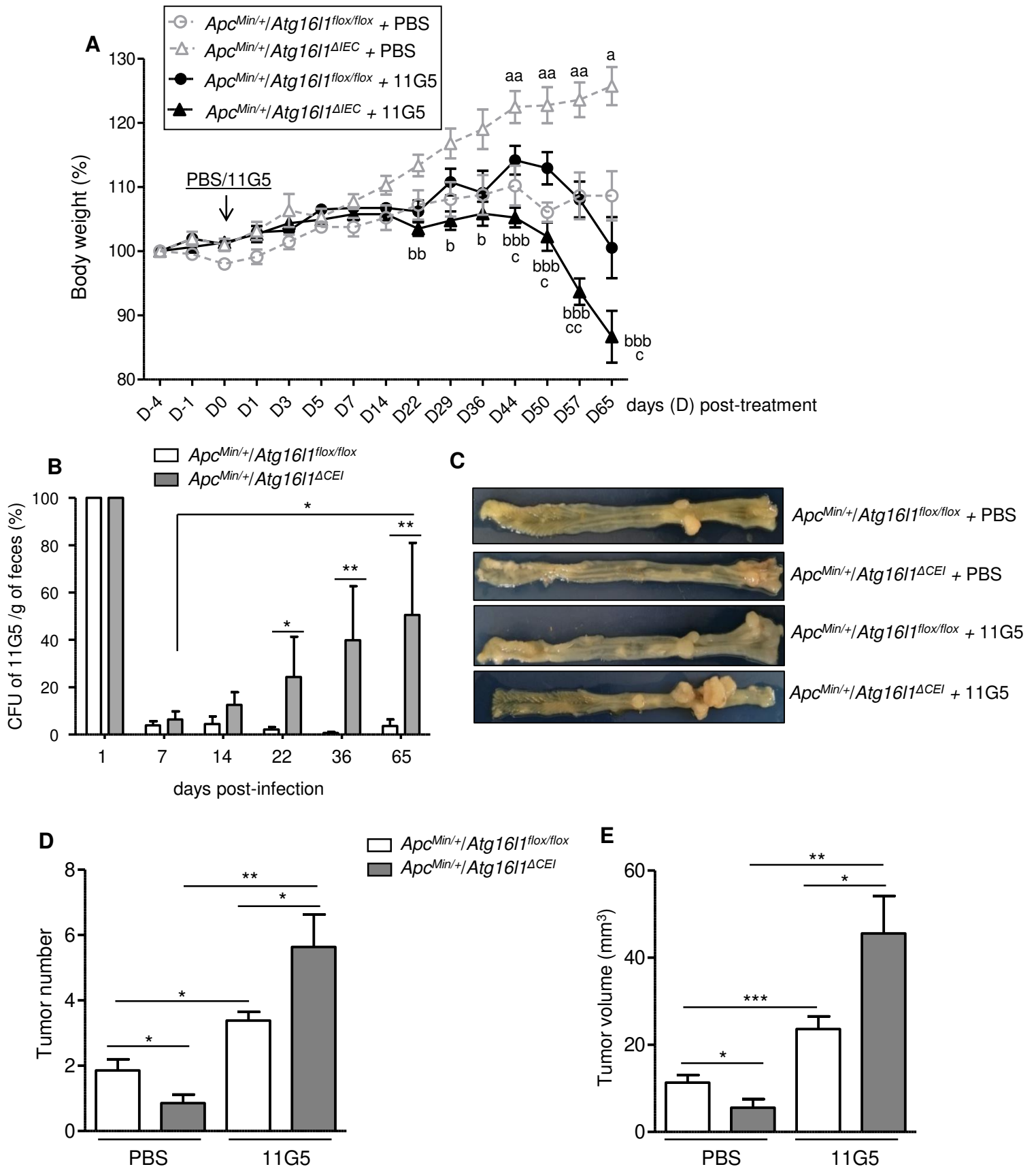


**A**



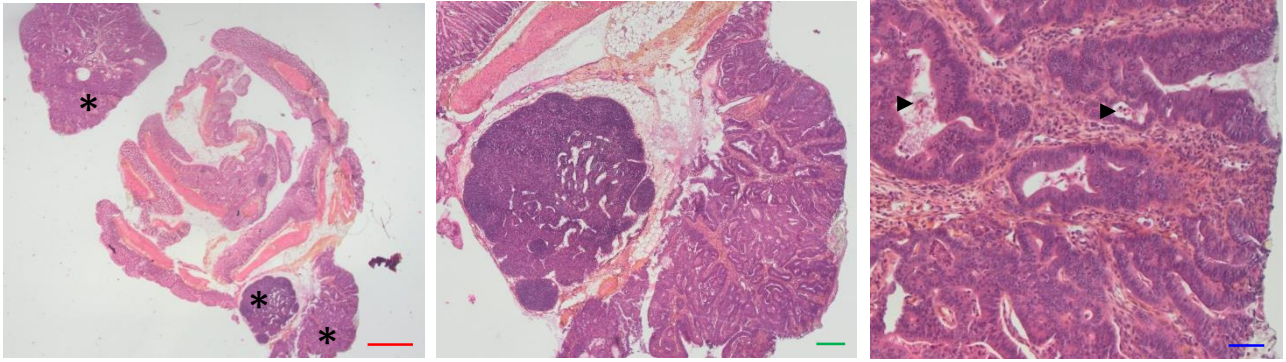
**B**



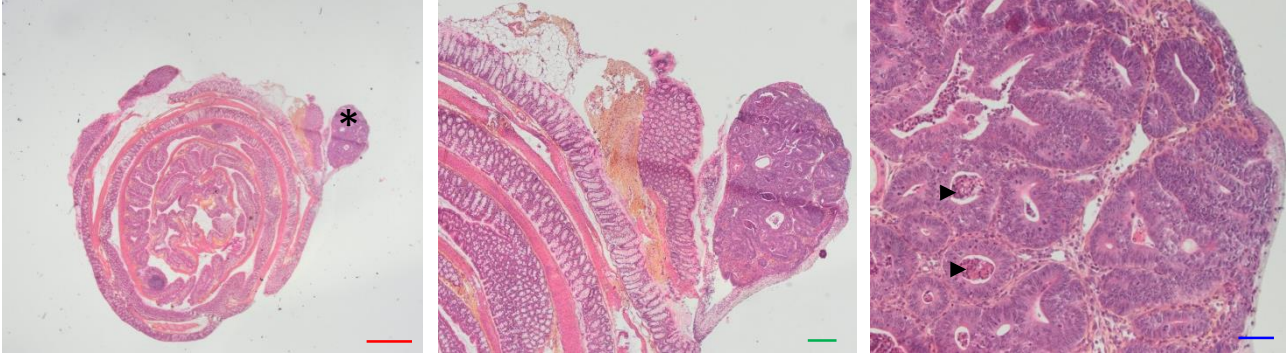




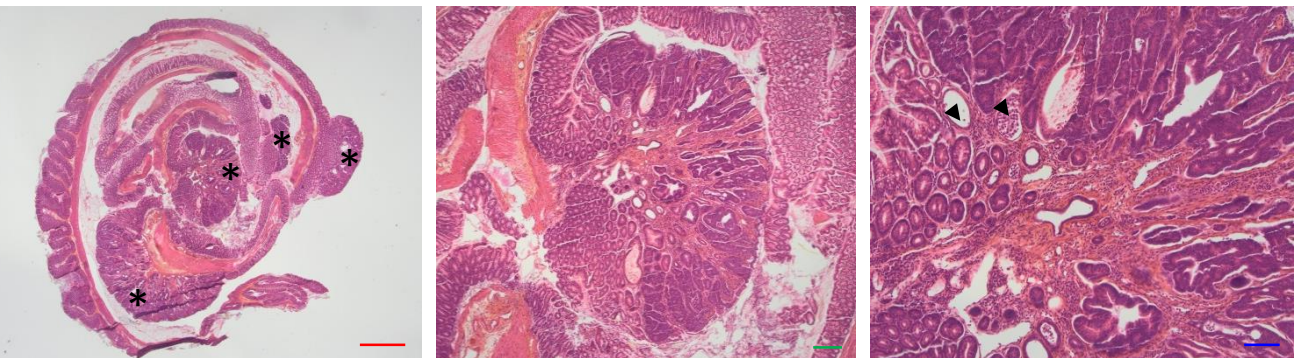
**A** *Apc<sup>Min/+</sup>/Atg16l1<sup>flox/flox</sup>* + PBS



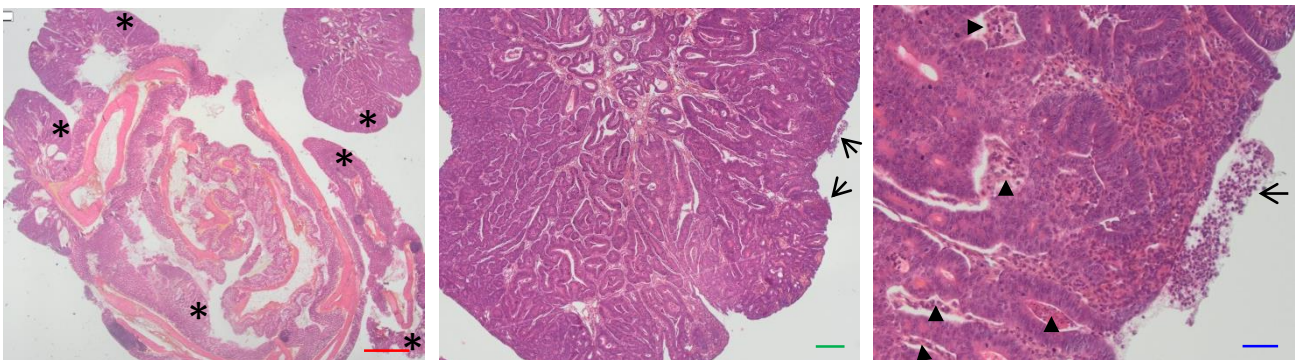
**B** *Apc<sup>Min/+</sup>/Atg16l1<sup>ΔCEI</sup>* + PBS



**C** *Apc<sup>Min/+</sup>/Atg16l1<sup>flox/flox</sup>* + 11G5



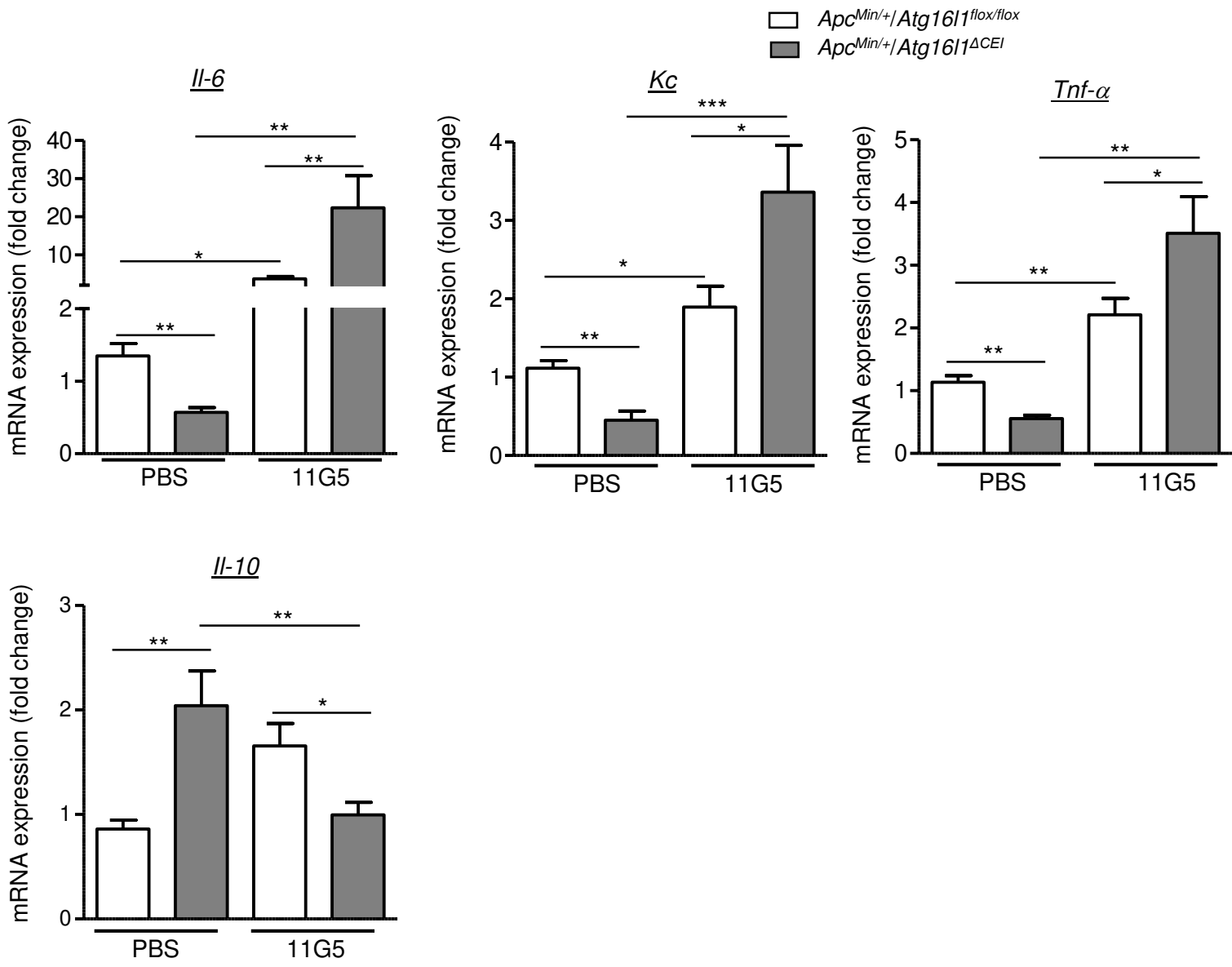
**D** *Apc<sup>Min/+</sup>/Atg16l1<sup>ΔCEI</sup>* + 11G5

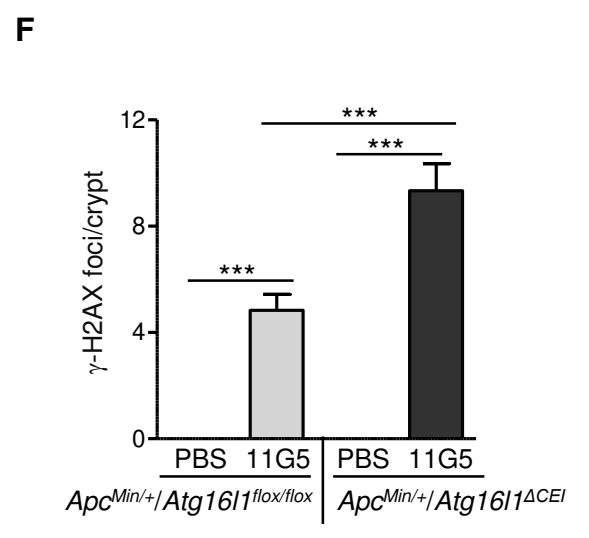
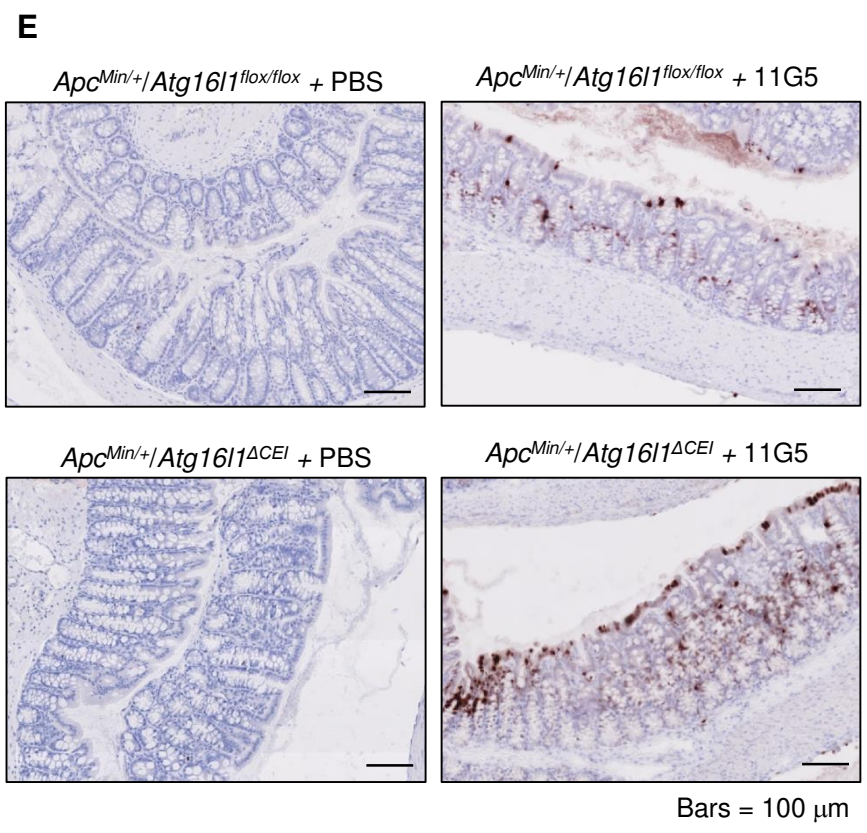
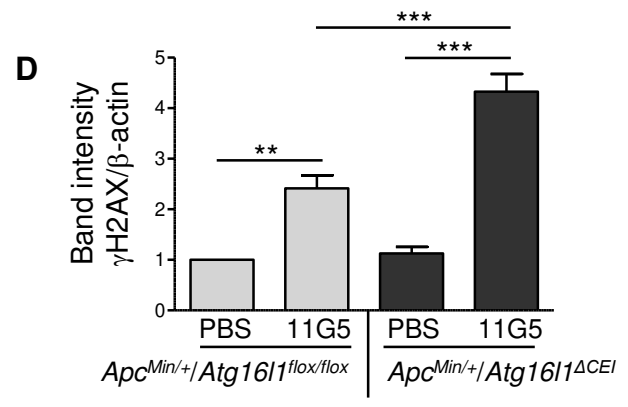
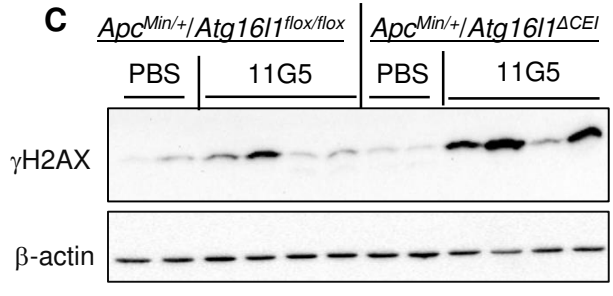
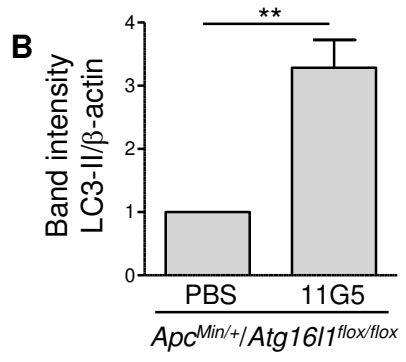
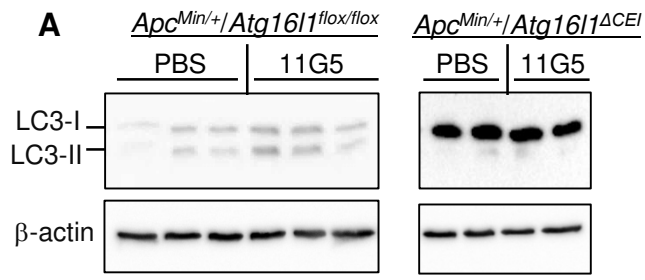


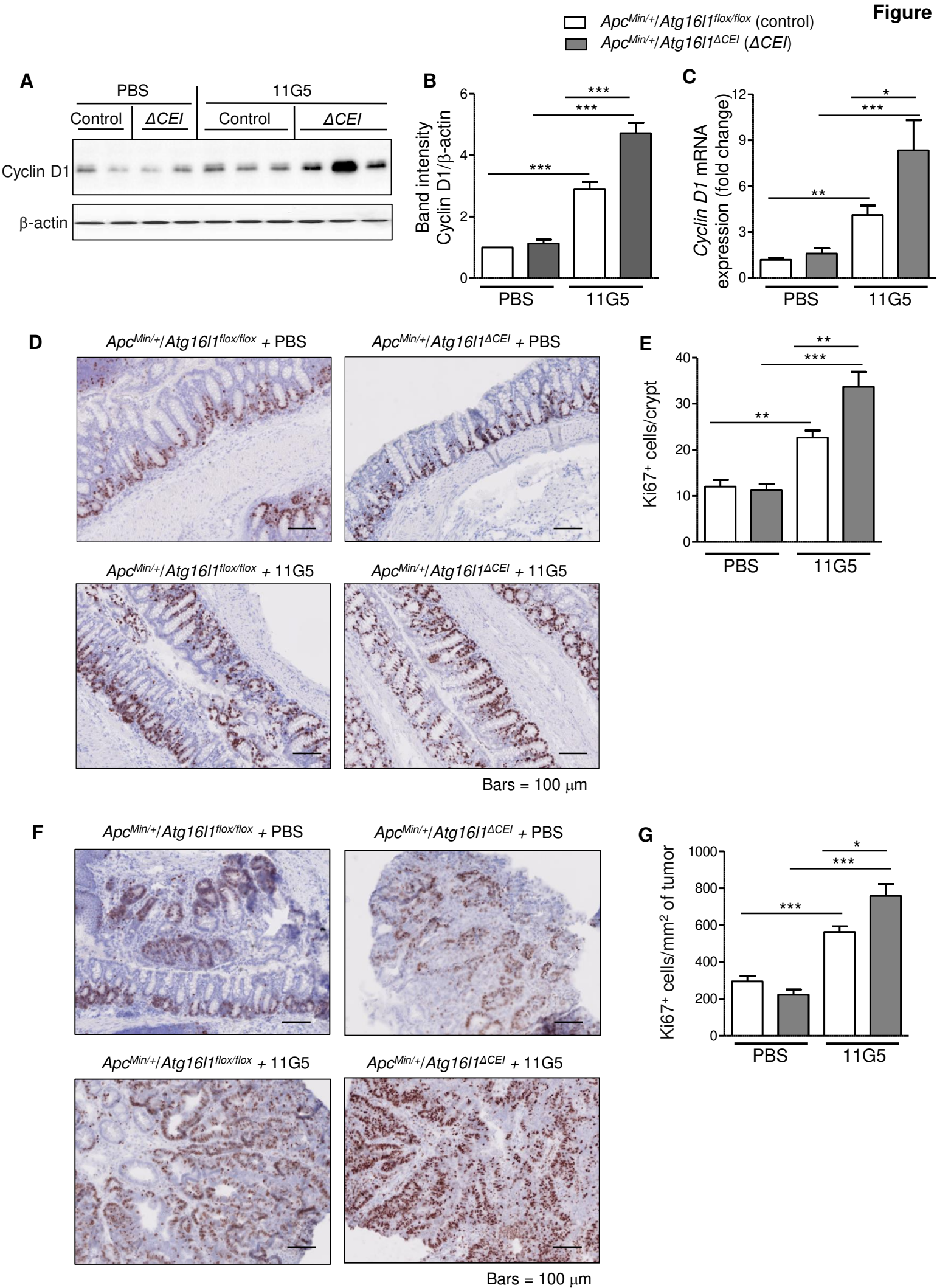
Bars = 1 mm

Bars = 200  $\mu$ m

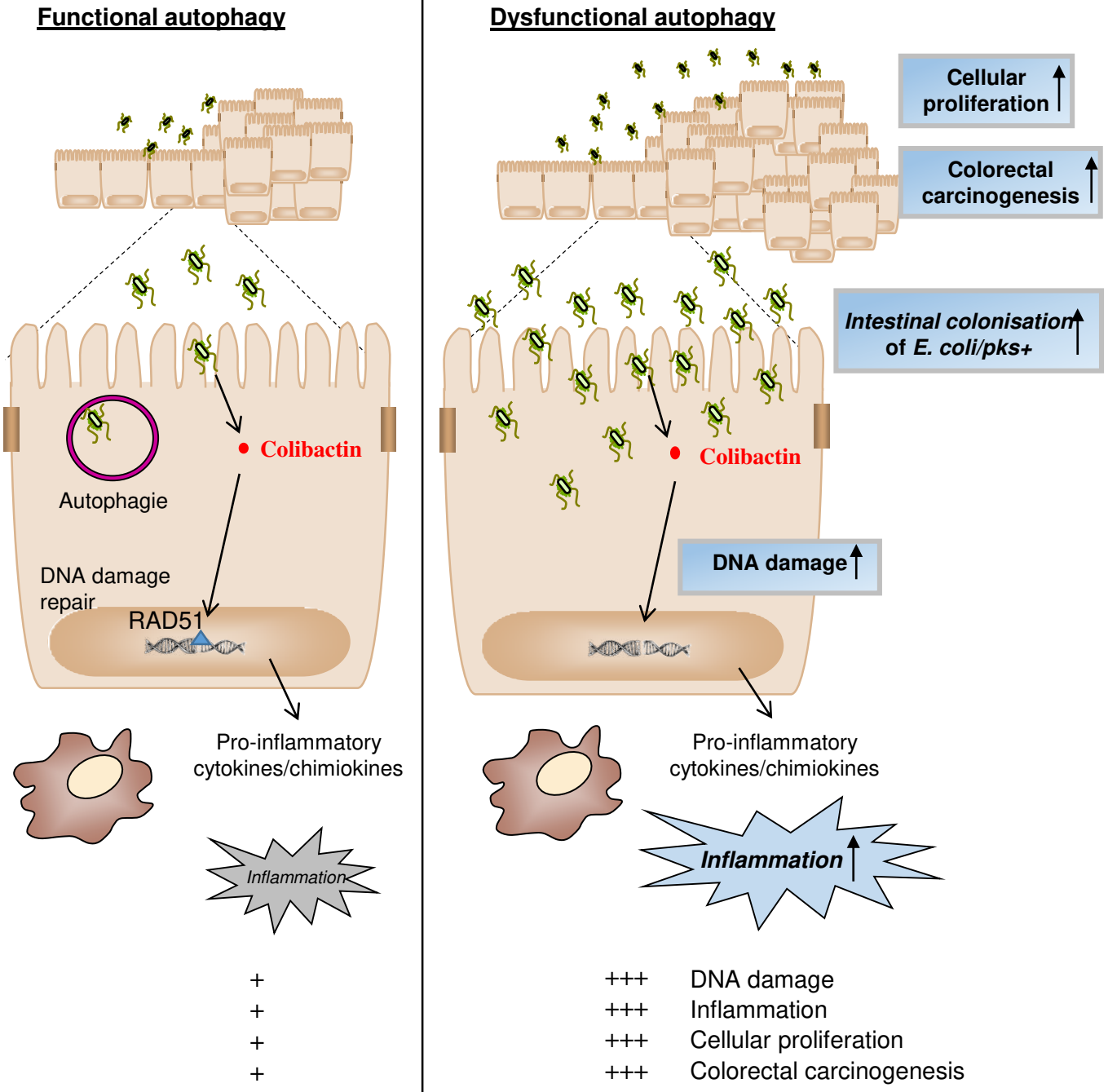
Bars = 100  $\mu$ m







Host predisposed to CCR development



## References

- Ahn, C.H., Jeong, E.G., Lee, J.W., Kim, M.S., Kim, S.H., Kim, S.S., Yoo, N.J., and Lee, S.H. (2007). Expression of beclin-1, an autophagy-related protein, in gastric and colorectal cancers. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *115*, 1344–1349.
- Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.-J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., et al. (2012). Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* *338*, 120–123.
- Arvelo, F., Sojo, F., and Cotte, C. (2015). Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalscience* *9*, 520.
- Bonnet, M., Buc, E., Sauvanet, P., Darcha, C., Dubois, D., Pereira, B., Déchelotte, P., Bonnet, R., Pezet, D., and Darfeuille-Michaud, A. (2014). Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *20*, 859–867.
- Bretin, A., Carrière, J., Dalmaso, G., Bergougnoux, A., B'chir, W., Maurin, A.-C., Müller, S., Seibold, F., Barnich, N., Bruhat, A., et al. (2016). Activation of the EIF2AK4-EIF2A/eIF2 $\alpha$ -ATF4 pathway triggers autophagy response to Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* infection. *Autophagy* *12*, 770–783.
- Buc, E., Dubois, D., Sauvanet, P., Raisch, J., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., Pezet, D., and Bonnet, R. (2013). High Prevalence of Mucosa-Associated *E. coli* Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer. *PLOS ONE* *8*, e56964.
- Chen, Z., Li, Y., Zhang, C., Yi, H., Wu, C., Wang, J., Liu, Y., Tan, J., and Wen, J. (2013). Downregulation of Beclin 1 and impairment of autophagy in a small population of colorectal cancer. *Dig. Dis. Sci.* *58*, 2887–2894.
- Cohen-Kaplan, V., Ciechanover, A., and Livneh, I. (2016). p62 at the crossroad of the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Oncotarget* *7*, 83833–83834.
- Colnot, S., Niwa-Kawakita, M., Hamard, G., Godard, C., Le Plenier, S., Houbron, C., Romagnolo, B., Berrebi, D., Giovannini, M., and Perret, C. (2004). Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *84*, 1619–1630.
- Cougnoux, A., Dalmaso, G., Martinez, R., Buc, E., Delmas, J., Gibold, L., Sauvanet, P., Darcha, C., Déchelotte, P., Bonnet, M., et al. (2014). Bacterial genotoxin colibactin promotes

colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* 63, 1932–1942.

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

Deretic, V. (2010). Autophagy in infection. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 252–262.

Falzano, L., Filippini, P., Travaglione, S., Miraglia, A.G., Fabbri, A., and Fiorentini, C. (2006). *Escherichia coli* Cytotoxic Necrotizing Factor 1 Blocks Cell Cycle G2/M Transition in Uroepithelial Cells. *Infect. Immun.* 74, 3765–3772.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359-386.

Gagnière, J., Bonnin, V., Jarrousse, A.-S., Cardamone, E., Agus, A., Uhrhammer, N., Sauvanet, P., Déchelotte, P., Barnich, N., Bonnet, R., et al. (2017). Interactions between microsatellite instability and human gut colonization by *Escherichia coli* in colorectal cancer. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 131, 471–485.

Guo, J.Y., Chen, H.-Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A.M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J.J., Chen, G., Lemons, J.M.S., Karantza, V., et al. (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev.* 25, 460–470.

Hewitt, G., Carroll, B., Sarallah, R., Correia-Melo, C., Ogrodnik, M., Nelson, G., Otten, E.G., Manni, D., Antrobus, R., Morgan, B.A., et al. (2016). SQSTM1/p62 mediates crosstalk between autophagy and the UPS in DNA repair. *Autophagy* 12, 1917–1930.

Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078.

Jo, Y.K., Kim, S.C., Park, I.J., Park, S.J., Jin, D.-H., Hong, S.-W., Cho, D.-H., and Kim, J.C. (2012). Increased expression of ATG10 in colorectal cancer is associated with lymphovascular invasion and lymph node metastasis. *PloS One* 7, e52705.

Jubelin, G., Taieb, F., Duda, D.M., Hsu, Y., Samba-Louaka, A., Nobe, R., Penary, M., Watrin, C., Nougayrède, J.-P., Schulman, B.A., et al. (2010). Pathogenic Bacteria Target NEDD8-Conjugated Cullins to Hijack Host-Cell Signaling Pathways. *PLOS Pathog.* 6, e1001128.

- Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* *2*, 123–140.
- Kelekar, A. (2005). Autophagy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1066*, 259–271.
- Kostic, A.D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J.N., Gallini, C.A., Michaud, M., Clancy, T.E., Chung, D.C., Lochhead, P., Hold, G.L., et al. (2013). *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor immune microenvironment. *Cell Host Microbe* *14*, 207–215.
- Lapaquette, P., Glasser, A.-L., Huett, A., Xavier, R.J., and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell. Microbiol.* *12*, 99–113.
- Lévy, J., Cacheux, W., Bara, M.A., L'Hermitte, A., Lepage, P., Fraudeau, M., Trentesaux, C., Lemarchand, J., Durand, A., Crain, A.-M., et al. (2015). Intestinal inhibition of Atg7 prevents tumour initiation through a microbiome-influenced immune response and suppresses tumour growth. *Nat. Cell Biol.* *17*, 1062–1073.
- Li, B.-X., Li, C.-Y., Peng, R.-Q., Wu, X.-J., Wang, H.-Y., Wan, D.-S., Zhu, X.-F., and Zhang, X.-S. (2009). The expression of beclin 1 is associated with favorable prognosis in stage IIIB colon cancers. *Autophagy* *5*, 303–306.
- Li, Y., Kundu, P., Seow, S.W., Matos, D., Teixeira, C., Aronsson, L., Chin, K.C., Kärre, K., Pettersson, S., and Greicius, G. (2012). Gut microbiota accelerate tumor growth via c-jun and STAT3 phosphorylation in APC Min/+ mice. *Carcinogenesis* *33*, 1231–1238.
- Lucas, C., Barnich, N., and Nguyen, H.T.T. (2017). Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Ma, Y., Galluzzi, L., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2013). Autophagy and cellular immune responses. *Immunity* *39*, 211–227.
- Malorni, W., and Fiorentini, C. (2006). Is the Rac GTPase-activating toxin CNF1 a smart hijacker of host cell fate? *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 606–609.
- Martin, H.M., Campbell, B.J., Hart, C.A., Mpofu, C., Nayar, M., Singh, R., Englyst, H., Williams, H.F., and Rhodes, J.M. (2004). Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* *127*, 80–93.



Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinias, C., et al. (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137, 1062–1075.

Mima, K., Cao, Y., Chan, A.T., Qian, Z.R., Nowak, J.A., Masugi, Y., Shi, Y., Song, M., da Silva, A., Gu, M., et al. (2016). *Fusobacterium nucleatum* in Colorectal Carcinoma Tissue According to Tumor Location. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 7, e200.

Mizushima, N. (2018). A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat. Cell Biol.* 20, 521–527.

Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247, 322–324.

Nguyen, H.T.T., Lapaquette, P., Bringer, M.-A., and Darfeuille-Michaud, A. (2013). Autophagy and Crohn's disease. *J. Innate Immun.* 5, 434–443.

Nguyen, H.T.T., Dalmasso, G., Müller, S., Carrière, J., Seibold, F., and Darfeuille-Michaud, A. (2014). Crohn's disease-associated adherent invasive *Escherichia coli* modulate levels of microRNAs in intestinal epithelial cells to reduce autophagy. *Gastroenterology* 146, 508–519.

Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., and Oswald, E. (2006). *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 313, 848–851.

Pankiv, S., Lamark, T., Bruun, J.-A., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2010). Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *J. Biol. Chem.* 285, 5941–5953.

Prorok-Hamon, M., Friswell, M.K., Alswied, A., Roberts, C.L., Song, F., Flanagan, P.K., Knight, P., Codling, C., Marchesi, J.R., Winstanley, C., et al. (2014). Colonic mucosa-associated diffusely adherent afaC<sup>+</sup> *Escherichia coli* expressing lpfA and pks are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut* 63, 761–770.

Raisch, J., Buc, E., Bonnet, M., Sauvanet, P., Vazelle, E., de Vallée, A., Déchelotte, P., Darcha, C., Pezet, D., Bonnet, R., et al. (2014). Colon cancer-associated B2 *Escherichia coli* colonize gut mucosa and promote cell proliferation. *World J. Gastroenterol.* 20, 6560–6572.

Raisch, J., Rolhion, N., Dubois, A., Darfeuille-Michaud, A., and Bringer, M.-A. (2015). Intracellular colon cancer-associated *Escherichia coli* promote protumoral activities of human

macrophages by inducing sustained COX-2 expression. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *95*, 296–307.

Secher, T., Samba-Louaka, A., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2013). *Escherichia coli* producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. *PloS One* *8*, e77157.

Singh, S.S., Vats, S., Chia, A.Y.-Q., Tan, T.Z., Deng, S., Ong, M.S., Arfuso, F., Yap, C.T., Goh, B.C., Sethi, G., et al. (2018). Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene* *37*, 1142–1158.

Swidsinski, A., Khilkin, M., Kerjaschki, D., Schreiber, S., Ortner, M., Weber, J., and Lochs, H. (1998). Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology* *115*, 281–286.

Tang, B., Wang, K., Jia, Y., Zhu, P., Fang, Y., Zhang, Z., Mao, X., Li, Q., and Zeng, D.-Z. (2016). *Fusobacterium nucleatum*-Induced Impairment of Autophagic Flux Enhances the Expression of Proinflammatory Cytokines via ROS in Caco-2 Cells. *PLoS ONE* *11*.

Thelestam, M., and Frisan, T. (2004). Cytolethal distending toxins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *152*, 111–133.

Wang, Y., Zhang, N., Zhang, L., Li, R., Fu, W., Ma, K., Li, X., Wang, L., Wang, J., Zhang, H., et al. (2016). Autophagy Regulates Chromatin Ubiquitination in DNA Damage Response through Elimination of SQSTM1/p62. *Mol. Cell* *63*, 34–48.

White, E. (2015). The role for autophagy in cancer. *J. Clin. Invest.* *125*, 42–46.

Wong, S.H., Zhao, L., Zhang, X., Nakatsu, G., Han, J., Xu, W., Xiao, X., Kwong, T.N.Y., Tsoi, H., Wu, W.K.K., et al. (2017). Gavage of Fecal Samples From Patients With Colorectal Cancer Promotes Intestinal Carcinogenesis in Germ-Free and Conventional Mice. *Gastroenterology* *153*, 1621-1633.e6.

Yang, M., Zhao, H., Guo, L., Zhang, Q., Zhao, L., Bai, S., Zhang, M., Xu, S., Wang, F., Wang, X., et al. (2015). Autophagy-based survival prognosis in human colorectal carcinoma. *Oncotarget* *6*, 7084–7103.

Yu, T., Guo, F., Yu, Y., Sun, T., Ma, D., Han, J., Qian, Y., Kryczek, I., Sun, D., Nagarsheth, N., et al. (2017). *Fusobacterium nucleatum* Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. *Cell* *170*, 548-563.e16.

Yue, J., Wang, Q., Lu, H., Brenneman, M., Fan, F., and Shen, Z. (2009). The Cytoskeleton Protein Filamin-A is Required for an Efficient Recombinational DNA Double Strand Break Repair. *Cancer Res.* *69*, 7978–7985.

Zackular, J.P., Baxter, N.T., Iverson, K.D., Sadler, W.D., Petrosino, J.F., Chen, G.Y., and Schloss, P.D. (2013). The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *MBio* *4*, e00692-00613.

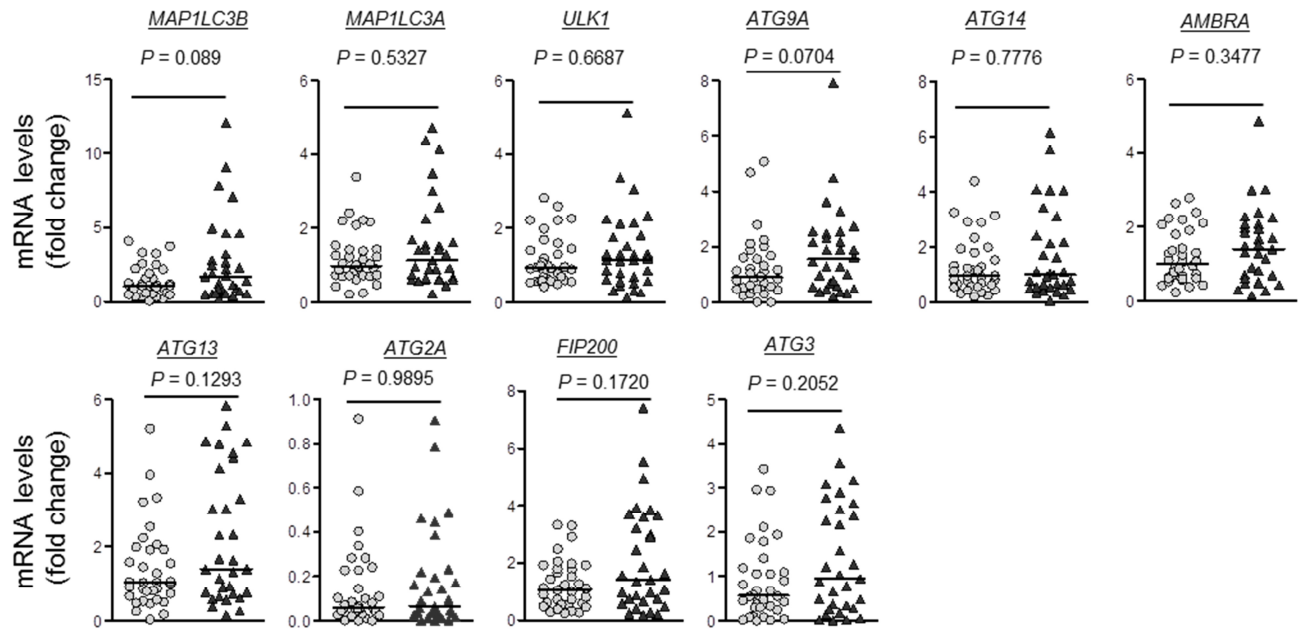
Zheng, H.-Y., Zhang, X.-Y., Wang, X.-F., and Sun, B.-C. (2012). Autophagy enhances the aggressiveness of human colorectal cancer cells and their ability to adapt to apoptotic stimulus. *Cancer Biol. Med.* *9*, 105–110.

## Supplementary information

**Table S1: Primers for qRT-PCR.**

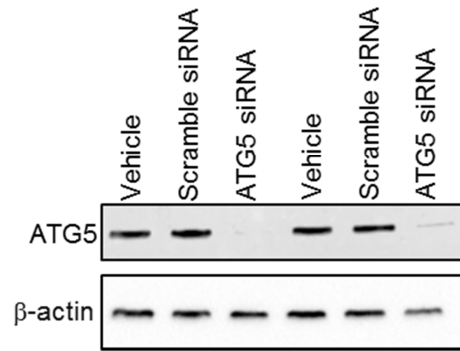
Primer	Sequence (5'-3')
<i>18S</i> -For <i>18S</i> -Rev	CCCCTCGATGCTCTTAGCTGAGTGT CGCCGGTCCAAGAATTCACCTCT
<i>36B4</i> -For <i>36B4</i> -Rev	TCCAGGCTTTGGGCATCA CTTTATCAGCTGCACATCACTCAGA
<i>ATG12</i> -For <i>ATG12</i> -Rev	TCTCTATGAGTGTTTTGGCAGTGA CTTTGTGGTTCATCCCCACG
<i>ATG16L1</i> -For <i>ATG16L1</i> -Rev	CCCCACATCAAGGTGGTGTT GAACCCAAGGTGTTGGGACA
<i>ATG5</i> -For <i>ATG5</i> -Rev	TACCGGACCACTGAAGGTCT TCGAGTGGCACATACTTCCA
<i>MAPIL3A</i> -For <i>MAPIL3A</i> -Rev	GTCACCGGGCGAGTTACC CTTGAAAGGCCGGTCTGAGG
<i>MAPIL3B</i> -For <i>MAPIL3B</i> -Rev	CAGGTTACAGAACCCGCC GTTGCGCTTCACAACTCAGG
<i>MAPIL3C</i> -For <i>MAPIL3C</i> -Rev	AGTTAGGTTCCCGTTGCG TGGGATTTTCTGTGGAGGCG
<i>BECLIN-1</i> -For <i>BECLIN-1</i> -Rev	GTCGCTGAAGACAGAGCGAT GTCACCCAAGTCCGGTCTAC
<i>ATG9A</i> -For <i>ATG9A</i> -Rev	GCTGGAGAGGAGCACATACT GCCTCTAGGCGTGGTATTC
<i>ATG9B</i> -For <i>ATG9B</i> -Rev	GCCTCTTGCACTGACTGAGA TCCTGCCCAACTAAAGCACC
<i>ULK-1</i> -For <i>ULK-1</i> -Rev	GTGATTTCTGCCCTTTGCG ACACCAGCCCAACAATTCCA
<i>ATG14</i> -For <i>ATG14</i> -Rev	TTTTGTTTGGGAGGGGTGAGT TTTCTTTGGTGTGTGGGGGA
<i>ATG2A</i> -For <i>ATG2A</i> -Rev	GCCTGGCGCCTAGAGAAG AGACCCGCTCTTTCACACAG
<i>ATG7</i> -For <i>ATG7</i> -Rev	ACAATGGTGA CTCTGCTGGG GGTGGGAGCACTCATGTCAA
<i>AMBRA</i> -For <i>AMBRA</i> -Rev	TTACATCAGGCTCCGACAGC AAAGGCACAGGATCCCAAGG
<i>ATG2B</i> -For <i>ATG2B</i> -Rev	ACACCTTCTAGCCGTGAAGA TCAAGGTCCATGTTTGGGGG
<i>ATG13</i> -For <i>ATG13</i> -Rev	CCCAGGACAGAAAGGACCTG CCGAGCCTGGACAATCACTT
<i>ATG3</i> -For <i>ATG3</i> -Rev	AAGATTAGTGGCAAAATGGCTGT GCTACTGCTACACATGGGGAC
<i>WIP1</i> -For <i>WIP1</i> -Rev	CAACTGGA ACTAAAGCCGGG TCTGCCGTGGTTTTGTGTGA
<i>FIP200</i> -For <i>FIP200</i> -Rev	CCTAGACGAACGCCATGACA GATCCAGGGCAGGTAGAGA
<i>Cyclin D1</i> -For <i>Cyclin D1</i> -Rev	CAGACGTT CAGAACCAGATTC CCCTCCAATAGCAGCGAAAAC
<i>Il-6</i> -For <i>Il-6</i> -Rev	ACAAGTCGGAGGCTTAATTACACAT TTGCCATTGCACA ACTCTTTT
<i>Tnf-α</i> -For <i>Tnf-α</i> -Rev	AGGCTGCCCCGACTACGT GACTTCTCCTGGTATGAGATAGCAA
<i>Kc</i> -For <i>Kc</i> -Rev	TTGTGCGAAAAGAAGTGCAG TACAAACACAGCCTCCCACA
<i>Il-10</i> -For <i>Il-10</i> -Rev	CCCTTTGCTATGGTGTCTT TGGTTTCTCTTCCCAAGACC

For, forward; Rev, reverse



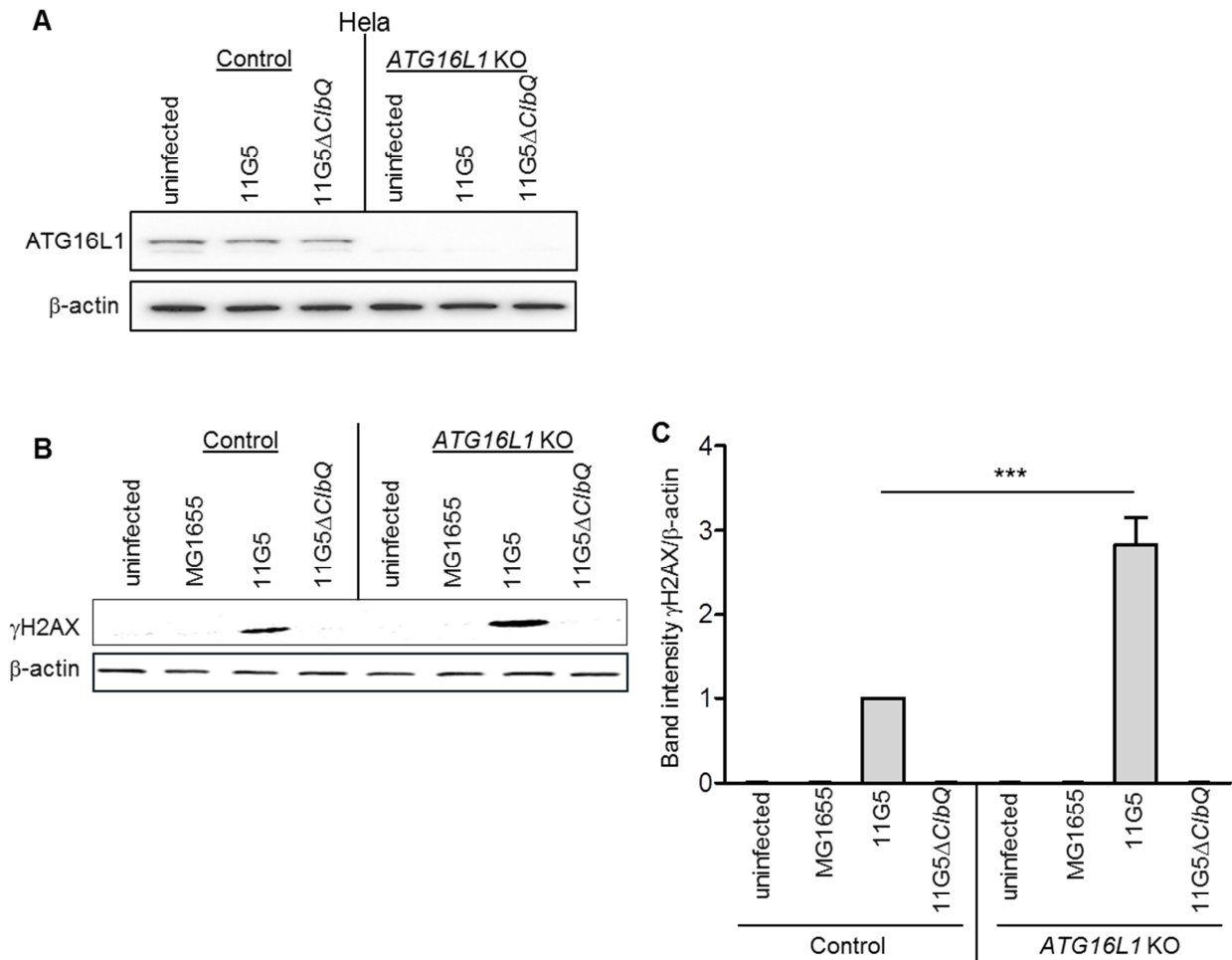
**Figure S1: mRNA expression levels of several genes implicated in autophagy in non-tumoral colonic mucosa from CRC patients.**

qRT-PCR analysis for mRNA expression levels of autophagy-related genes in normal colonic mucosa from patients with sporadic CRC colonized with *E. coli/pks-* (34 patients) or *E. coli/pks+* (31 patients) strains. Each dot in the graphs shows the value for each patient, line at median. Statistical analysis was performed using the non-parametric Mann-Whitney test.



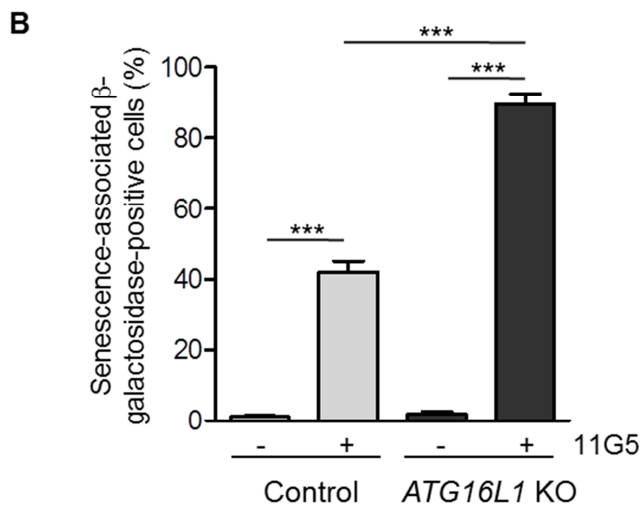
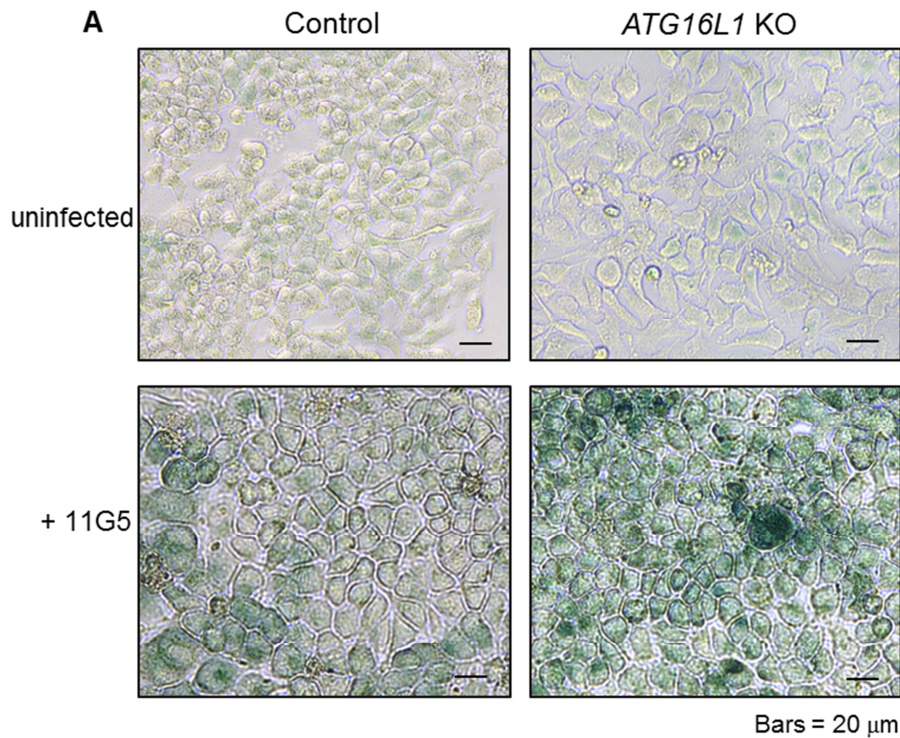
**Figure S2: Transfection of HCT-116 cells with *ATG5* inhibited *ATG5* protein expression.**

HCT-116 cells were transfected with vehicle or a scramble siRNA or with *ATG5*-specific siRNA every two day. *ATG5* protein expression was analysed by Western blot 5 days after the first transfection.



**Figure S3: Depletion of ATG16L1 in HeLa cells led to increased DNA damage induced by infection with the *E. coli/pks+* 11G5 strain.**

**(A)** Western blot analysis of ATG16L1 expression in HeLa cells depleted for *ATG16L1* using Crispr/Cas9 system (*ATG16L1* KO) and *ATG16L1* KO HCT-116 cells expressing wild type ATG16L1 (control). **(B, C)** *ATG16L1* KO and control cells were uninfected or infected with the non-pathogenic *E. coli* K12 MG1655 strain, or the *E. coli/pks+* 11G5 strain and its isogenic mutant 11G5Δ*clbQ*. γH2AX levels in these cells were analysed by Western blot **(B)** and quantification of γH2AX/β-actin band intensity from 3 independent blots **(C)**. Values represent means ± SEM. Statistical analysis was performed using the one-way Anova test followed by a Bonferroni post-test. \*\*\* $P \leq 0.001$ .



**Figure S4: Autophagy is necessary to limit senescence induced by infection with the *E. coli/pks+* 11G5 strain.**

Hela cells depleted for *ATG16L1* using Crispr/Cas9 system (*ATG16L1* KO) and *ATG16L1* KO HCT-116 cells expressing wild type *ATG16L1* (control) were infected or not with the 11G5 strain. **(A)** At day 5 post-infection, senescent cells were detected by beta-galactosidase staining at pH 6. **(B)** Quantification of the percentage of senescence-associated beta-galactosidase-positive cells determined from 3 independent experiments. Values represent means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using the one-way Anova test followed by a Bonferroni post-test. \*\*\* $P \leq 0.001$ .



## Discussion/perspectives

---

## *Discussion et perspectives*

### 1) Etablir une corrélation entre l'infection par des souches d'*E. coli* portant l'îlot *pks* et l'expression des gènes de l'autophagie

Plusieurs études ont révélé un lien entre l'autophagie et le CCR. Notamment, une augmentation du niveau de LC3-II, la forme associée à l'autophagosome, a été observée dans les tumeurs colorectales comparativement aux tissus sains chez des patients atteints de CCR (Zheng et al., 2012). Dans cette même étude, une corrélation positive entre l'expression de la protéine LC3 et l'agressivité tumorale a été rapportée (Zheng et al., 2012). De même, une augmentation de l'expression d'ATG10 a été observée comme étant associée à l'agressivité des tumeurs et à l'apparition de métastases (Jo et al., 2012b). De plus, le taux de survie à 5 ans des patients porteurs de tumeurs n'exprimant pas ATG10 était significativement plus élevé que ceux des patients porteurs de tumeurs exprimant ATG10 (Jo et al., 2012b). Néanmoins, il a été rapporté que la protéine autophagique ATG5 est bien exprimée dans les cellules épithéliales normales du côlon, alors qu'elle est absente dans 22% des carcinomes colorectaux (An et al., 2011). De plus, des patients atteints de CCR et présentant une expression élevée de *BECLIN 1*, comparativement à ceux ayant une expression plus faible, ont un meilleur taux de survie (Yang et al., 2015). Ainsi, le rôle de l'autophagie dans le CCR reste encore aujourd'hui mal connu.

Le lien entre l'autophagie et les bactéries associées au CCR commence seulement à être exploré. A ce jour, seules deux études menées sur *Fusobacterium nucleatum* ont été rapportées. *F. nucleatum* est une bactérie associée au CCR qui augmente le développement tumoral dans le modèle *Apc<sup>Min/+</sup>* (Kostic et al., 2013) et dont la présence est corrélée avec une diminution du taux de survie à 5 ans (Mima et al., 2016). Il a été rapporté que *F. nucleatum* active l'autophagie induisant *in vitro* une résistance aux drogues de chimiothérapies (Yu et al., 2017). En revanche, Tang et al. ont montré que *F. nucleatum* bloque le processus autophagique à l'étape de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome, favorisant une réponse pro-inflammatoire dans les cellules de CCR, Caco-2 (Tang et al., 2016).

Dans notre étude, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression des gènes de l'autophagie au sein des muqueuses de patients atteints de CCR colonisées par des *E. coli/pks+* comparativement aux muqueuses colonisées par des *E. coli/pks-*. Nous souhaitons compléter cette étude en effectuant des immunomarquages contre des protéines de

l'autophagie sur des coupes de côlon des patients atteints de CCR, disponibles au laboratoire. Nous souhaitons établir une corrélation entre l'expression des protéines autophagiques et la présence de l'îlot *pks*.

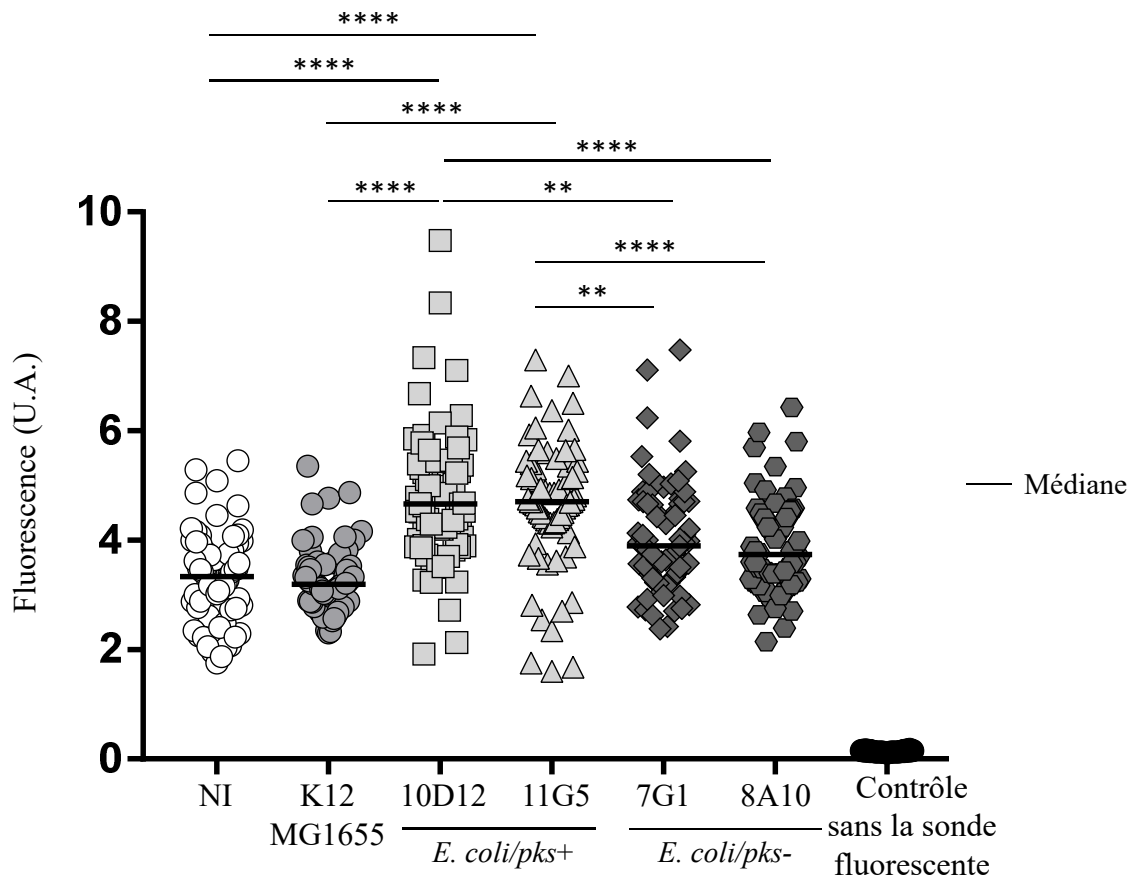
## 2) Etude des mécanismes de régulation de la réponse autophagique suite à l'infection par les souches d'*E. coli/pks+*

### *a) Etude des récepteurs autophagiques responsables de l'adressage des souches d'*E. coli/pks+* à l'autophagosome*

Notre étude a permis de mettre en évidence l'activation de l'autophagie dans les cellules épithéliales intestinales afin d'éliminer de manière sélective les *E. coli/pks+*. La dégradation sélective des pathogènes par l'autophagie, ou la xénophagie, dépend de la reconnaissance de la bactérie par les récepteurs autophagiques. Parmi ces derniers, plusieurs ont été décrits comme impliqués dans la xénophagie tels que SQSTM1/p62, NDP52 et Optineurine (Deretic, 2010). Nous proposons donc d'étudier quels récepteurs autophagiques sont responsables de la prise en charge et de l'adressage des souches d'*E. coli/pks+* aux autophagosomes. Pour cela, nous proposons, dans un premier temps, de mettre en évidence la co-localisation des *E. coli/pks+* avec la protéine LC3 et le récepteur autophagique dans les cellules hôtes par un marquage immunofluorescent. Dans un second temps, nous proposons d'utiliser des cellules épithéliales intestinales déficientes pour le gène codant pour le récepteur autophagique (par transfection avec un siARN spécifique ou par le système CRISPR/Cas9), et d'étudier l'impact d'une déficience d'un récepteur autophagique sur l'adressage des bactéries à l'autophagosome. Pour cela, les cellules déficientes pour le récepteur autophagique ainsi que les cellules contrôles seront infectées avec les souches d'*E. coli/pks+*, et le nombre de bactéries présentes dans les autophagosomes ou les vacuoles positives pour LC3 sera déterminé par un marquage immunofluorescent. De plus, la capacité des souches à survivre et à se multiplier au sein des cellules en absence du récepteur sera analysée afin de déterminer le récepteur responsable de la reconnaissance de ces bactéries.

### *b) Identification des régulateurs et/ou des voies de régulation impliqués dans l'activation de l'autophagie suite à l'infection par les *E. coli/pks+**

Des études de plusieurs groupes de recherche dont le notre ont mis en évidence une production de ROS dans les cellules suite à l'infection par des souches d'*E. coli/pks+* (Gagnière et al., 2017; Secher et al., 2013). Les ROS activent des voies de signalisation majeures impliquées dans la survie et la mort cellulaire ainsi que l'immunité. Leur



**Figure 50 : L'infection des cellules épithéliales intestinales par les souches d'*E. coli/pks+* induit la sécrétion de ROS.**

En utilisant la sonde fluorescente H<sub>2</sub>DCF-DA, nous avons montré que les cellules épithéliales intestinales HCT-116 infectées par les différentes souches d'*E. coli* isolées de patients atteints de CCR sécrètent significativement plus de ROS par rapport aux cellules non infectées (NI) ou aux cellules infectées avec la souche commensale non pathogène K12 MG1655. Cependant, la sécrétion des ROS par les cellules est plus élevée suite à l'infection par les souches d'*E. coli/pks+* (souches 10D12 et 11G5) comparativement aux ROS sécrétés lorsque les cellules sont infectées par les souches *E. coli/pks-* (souches 7G1 et 8A10). Un test ANOVA a été utilisé.

U.A.: Unité arbitraire ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

accumulation dans le cytoplasme peut entraîner des effets néfastes pour la cellule tels qu'une instabilité génomique ou encore une inflammation (Di Meo et al., 2016). Lors d'une accumulation de ROS dans la cellule, l'autophagie est activée afin de maintenir l'homéostasie cellulaire (Filomeni et al., 2015).

Récemment, une étude a mis en évidence l'activation de l'autophagie suite à une hyperproduction de ROS induite par une infection à *Streptococcus pneumoniae* (Li et al., 2015b). En effet, les auteurs ont mis en évidence que *S. pneumoniae* inhibe les acteurs de la voie PI3K/AKT/mTOR, eux-mêmes inhibiteurs de l'autophagie, entraînant l'activation de cette dernière. Lorsque les auteurs ont infecté les cellules avec un mutant de la souche bactérienne qui n'entraîne pas la production de ROS, la voie PI3K/AKT/mTOR n'était plus dérégulée et l'autophagie n'était plus activée. Les mêmes résultats ont été obtenus lorsqu'ils ont traité les cellules infectées avec un antioxydant, l'acétylcystéine, confirmant que l'activation de l'autophagie est médiée par une hyperproduction de ROS (Li et al., 2015b).

Ainsi, nous souhaiterions analyser l'impact de la production de ROS sur l'activation de l'autophagie. Des résultats préliminaires ont montré que dans les cellules HCT-116 infectées par deux souches différentes d'*E. coli* isolées de patients atteints de CCR, la production de ROS est plus élevée comparativement aux cellules non infectées ou aux cellules infectées par la souche commensale non pathogène K12 MG1655 (**figure 50**). De plus, l'induction des ROS est plus élevée suite à l'infection par les souches d'*E. coli/pks+* par rapport aux souches d'*E. coli/pks-* (**figure 50**). Pour continuer l'analyse, nous proposons de traiter les cellules HCT-116 avec l'acétylcystéine, de les infecter avec les souches d'*E. coli/pks+* et d'étudier l'activation de l'autophagie. Si l'activation de l'autophagie était médiée par les ROS, dans les cellules infectées ayant été traitées à l'acétylcystéine l'autophagie ne serait pas activée.

Plus récemment, une étude a mis en évidence l'activation de l'autophagie dans différentes lignées cellulaires de CCR suite à l'administration de la toxine CDT, caractérisée par une augmentation du niveau de LC3-II et une diminution du niveau de p62 (Seiwert et al., 2017). L'autophagie est activée suite à l'apparition de cassures double brin de l'ADN, entraînant l'activation du complexe ATM en réponse aux dommages à l'ADN. La conséquence est une diminution de la phosphorylation de la Serine-2448 de mTOR entraînant son inhibition (Seiwert et al., 2017). Nous proposons donc d'analyser la phosphorylation de mTOR suite à l'infection des cellules HCT-116 par les souches d'*E. coli/pks+*.

Par ailleurs, une étude menée au laboratoire a rapporté que l'infection des cellules épithéliales intestinales avec une souche d'*E. coli* adhérente et invasive associée à la maladie

de Crohn, LF82, active la voie de signalisation EIF2AK4 (Eukaryotic translation initiation factor alpha kinase 4) /EIF2 $\alpha$  (Eukaryotic translation initiation factor 2A)/ATF4 (Activating transcription factor 4), qui est nécessaire pour l'induction du processus autophagique (Bretin et al., 2016). Nous proposons d'étudier l'implication de cette voie dans l'activation de l'autophagie en réponse à l'infection par les souches d'*E. coli/pks+*. Pour cela, nous allons tout d'abord examiner l'activation de la voie suite à l'infection des cellules épithéliales intestinales humaines HCT-116 par la souche 11G5 ou son mutant isogénique 11G5 $\Delta$ *clbQ*. Si elle est activée suite à l'infection, nous allons analyser l'induction de l'autophagie suite à l'infection par la souche 11G5 dans les cellules déficientes pour le gène *EIF2AK4*. Les résultats *in vitro* pourront être validés *in vivo* en utilisant les souris *eif2ak4*<sup>-/-</sup> et en suivant un modèle d'infection établi au laboratoire (Bretin et al., 2016). Nous proposons aussi d'analyser le nombre de bactéries encapsulées dans les autophagosomes, les dommages à l'ADN, la sénescence cellulaire et l'inflammation dans les cellules contrôles et les cellules déficientes pour le gène *EIF2AK4* suite à l'infection par la souche 11G5 afin de confirmer l'implication de cette voie dans la réponse de l'hôte suite à l'infection par des *E. coli/pks+*.

D'autres voies pourraient conduire à l'induction de l'autophagie. En analysant les niveaux d'expression des ARNm et des miARN dans les cellules hôte en réponse à l'infection par les souches 11G5 et 11G5 $\Delta$ *clbQ*, via la réalisation de biopuces, nous pourrions étudier les voies biologiques impliquées dans la régulation du processus autophagique. Pour cela, une étude transcriptomique pourra être réalisée sur des cellules HCT-116 infectées avec les différentes souches.

### 3) Etude des mécanismes par lesquels l'autophagie est impliquée dans la mise en place des réparations des dommages à l'ADN.

Notre étude a mis en évidence que la déficience de l'autophagie entraîne une augmentation des cassures double brin de l'ADN induits par la souche d'*E. coli/pks+* 11G5 dans les cellules hôte, étant la conséquence d'un défaut des réparations des dommages à l'ADN. Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre l'autophagie et les réparations des dommages à l'ADN. Notamment, les deux systèmes de réparation de l'ADN dans lesquels le rôle de l'autophagie est le mieux décrit sont : le système de recombinaison homologue (HR ; Homologous recombination) et le système de jonction d'extrémités non homologue (NHEJ ; Non homologous end joining), bien que l'implication de l'autophagie dans les NHEJ soit encore discutée (Gomes et al., 2017). Le système HR est un système très conservé entre les différents organismes qui utilise une séquence homologue à la région de la cassure de l'ADN

pour permettre une réparation fidèle des cassures double brin. Si le système HR est décrit comme un système de réparation sans erreur, le NHEJ, lui, constitue une source d'erreur et pourrait contribuer à l'instabilité génomique (Rodgers and McVey, 2016).

Récemment, une étude a mis en évidence un rôle négatif de SQSTM1/p62 dans les réparations des cassures de l'ADN. En effet, des interactions entre p62 au niveau nucléaire avec RAD51 et la Filamine A ont été montrées. La Filamine A est requise pour le recrutement de RAD51 au niveau des sites des cassures double brin. Dans des fibroblastes embryonnaires murins, la déficience de p62 augmentait les niveaux de RAD51 et Filamine A dans la fraction nucléaire (Hewitt et al., 2016). De plus, cette étude a mis en évidence la dégradation protéasomale de la Filamine A via p62, entraînant des défauts de recrutement de RAD51 au niveau des cassures double brin de l'ADN. Ceci ayant pour conséquence une réparation des dommages à l'ADN ralentie (Hewitt et al., 2016).

Dans notre étude, suite à l'infection par la souche 11G5, nous avons observé le recrutement de RAD51 au niveau du noyau des cellules sauvages, signant la mise en place des réparations des cassures double brin de l'ADN. En revanche, dans les cellules déficientes pour l'autophagie, nous avons observé une accumulation de p62, qui est associée avec un défaut de recrutement de RAD51 au niveau du noyau. Afin de confirmer l'implication de p62 dans les défauts de recrutement de RAD51 au niveau du noyau, nous proposons de réaliser un marquage immunofluorescent pour montrer la co-localisation de p62 et RAD51. Nous proposons aussi d'évaluer les dommages à l'ADN dans les cellules co-transfectées avec les siARN dirigés contre *Atg5* et *p62*. Nous espérons que dans les cellules co-transfectées avec les siARN dirigés contre *Atg5* et *p62*, suite à l'infection, le recrutement de RAD51 au niveau du noyau va permettre de diminuer l'accumulation des dommages à l'ADN.

Afin d'approfondir l'étude, nous proposons d'analyser la localisation des protéines du complexe MRN de réparation de l'ADN, telles que MRE11, RAD50 et NBS1, par un immunomarquage fluorescent. Nous espérons mettre en évidence une co-localisation de ces protéines avec  $\gamma$ -H2AX au niveau du noyau suite à l'infection par la souche 11G5 dans les cellules sauvages, ce qui ne sera pas le cas dans les cellules déficientes pour l'autophagie. L'implication de p62 sera montrée par western blot ou immunomarquage fluorescent en utilisant les cellules transfectées avec un siARN dirigé contre *p62*. Cela nous permettra de confirmer que l'autophagie est impliquée dans le recrutement des médiateurs de la réparation des dommages.

Une étude plus récente a mis en évidence l'interaction de p62 avec l'E3 ligase, RNF168 (Ring finger protein 168), inhibant ainsi son activité d'ubiquitination des histones.

Les auteurs ont montré que l'accumulation de p62 dans les cellules déficientes pour l'autophagie entraîne l'inhibition de l'ubiquitination de la chromatine par RNF168, une E3 ligase essentielle pour la mise en place des réparations des dommages à l'ADN. Par conséquent, les différents médiateurs du système HR, RAP80, BRCA1 et RAD51, ne sont plus recrutés au niveau des cassures double brin et la réparation de l'ADN est retardée et réduite (Wang et al., 2016). Nous pourrions analyser l'interaction entre RNF168 et p62 par co-immunoprécipitation de la fraction nucléaire de p62.

Enfin, une étude a mis en évidence que la déficience de l'autophagie inhibe l'activation du système HR, tout en favorisant les réparations via le système NHEJ (Liu et al., 2015). En effet, les auteurs ont montré que les fibroblastes murins déficients pour le gène *Atg7* étaient autant capables de réparer les cassures double brin de l'ADN induits par l'irradiation que les fibroblastes sauvages suggérant qu'elles pourraient utiliser le système de réparation NHEJ (Liu et al., 2015). Il serait donc intéressant d'étudier l'implication potentielle du système de réparation NHEJ dans les cellules déficientes pour l'autophagie ainsi que les cellules sauvages suite à l'infection par des *E. coli/pks+*. Pour cela, nous proposons d'infecter les cellules déficientes ou non pour l'autophagie avec la souche 11G5, et de mettre en évidence une éventuelle localisation des différents acteurs, notamment les protéines KU, impliquées dans la reconnaissance des cassures double brin de l'ADN, au niveau du noyau, signant la mise en place de la réparation de l'ADN via le système NHEJ. Nous pourrions aussi analyser les niveaux des protéines impliquées dans la réparation NHEJ dans la fraction nucléaire extraite des cellules infectées par western blot. Pour approfondir l'analyse, nous pourrions utiliser des inhibiteurs des DNA-PKc (DNA-dependant protein kinase) (Davidson et al., 2013), indispensable pour la mise en place du système NHEJ. Les cellules déficientes pour l'autophagie ou non seront traitées avec un inhibiteur des DNA-PKc puis infectées avec la souche 11G5. L'accumulation des dommages à l'ADN sera ensuite analysée par western blot ou par un marquage immunofluorescent de  $\gamma$ H2AX.

#### 4) Etude du rôle de l'autophagie dans la tumorigénèse colorectale induite par les souches d'*E. coli/pks+*.

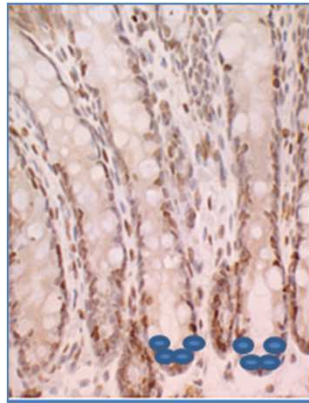
Notre étude a mis en évidence un rôle complexe de l'autophagie dans la tumorigénèse colorectale. Chez un hôte prédisposé au développement du CCR, à l'état basal, l'autophagie joue un rôle pro-tumoral car une inhibition de l'autophagie entraîne une diminution du nombre et du volume des tumeurs coliques, ce qui est en accord avec une étude précédente (Lévy et al., 2015). En revanche, suite à l'infection par la souche 11G5, l'autophagie joue un



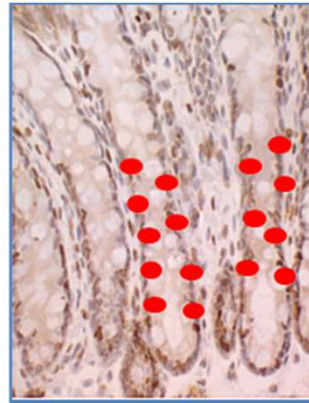
rôle anti-tumoral en inhibant les effets pro-tumoraux et pro-inflammatoires de cette souche. Afin d'approfondir l'étude, nous souhaiterions réaliser l'expérience avec le mutant de la souche 11G5, 11G5 $\Delta$ *clbQ*, incapable de produire la colibactine. L'emploi d'une souche d'*E. coli* commensale humaine telle que la souche d'*E. coli* O9:H4 (ou *E. coli* HS) (Rasko et al., 2008) ainsi que d'autres souches d'*E. coli/pks+* isolées des patients atteints de CCR serait aussi envisageable. Ainsi, nous pourrions savoir si les effets observés sont spécifiques aux souches d'*E. coli* associées au CCR et/ou dépendants de l'îlot *pks*.

L'ensemble de cette étude a été réalisée en infectant les souris avec une souche d'*E. coli/pks+* isolée d'un patient atteint de CCR. Il est important de noter que les souris ne possèdent pas le même environnement digestif que l'Homme. Il serait donc intéressant d'infecter les souris avec une souche d'*E. coli* d'origine murine portant l'îlot *pks* et de comparer les résultats avec ceux obtenus avec la souche 11G5. Pour cela, nous avons tenté d'isoler une souche d'*E. coli* porteuse de l'îlot *pks* à partir de tumeurs et de muqueuses coliques de souris *Apc*<sup>Min/+</sup>. Cependant, à ce jour, nous n'avons pas pu détecter des *E. coli* porteurs de l'îlot *pks*. Nous allons répéter l'expérience en utilisant des souris *Apc*<sup>Min/+</sup> plus âgées, ou utiliser la souche d'*E. coli* NC101 portant l'îlot *pks* isolée chez les souris *il10*<sup>-/-</sup> (Kim et al., 2005).

Le rôle pro-carcinogène des souches d'*E. coli pks+* a été mis en évidence dans plusieurs modèles murins prédisposés au développement du CCR, génétiquement modifiés (modèle *Apc*<sup>Min/+</sup>) ou induits chimiquement (AOM/DSS ou AOM/*il10*<sup>-/-</sup>). Il serait intéressant d'étudier le rôle pro-carcinogène des souches d'*E. coli pks+* dans un modèle murin sans prédisposition au développement de tumeurs colorectales. Nous avons réalisé une étude préliminaire en utilisant des souris déficientes pour l'autophagie spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales (souris *Atg16l1*<sup>ACE1</sup>) et les souris contrôles (*Atg16l1*<sup>flox/flox</sup>). Les souris ont été soumises à 11 cycles de DSS (1 cycle : 1 semaine de DSS, 2 semaines d'H<sub>2</sub>O) dans l'eau de boisson tout au long de l'expérimentation, et infectées 5 fois (1 fois par semaine) à partir du premier cycle avec la souche 11G5 ou le mutant 11G5 $\Delta$ *clbQ*. Ce protocole expérimental a été adapté à partir d'un protocole déjà publié (Nguyen et al., 2011). Une analyse histologique nous permettra de mettre en évidence d'éventuelles lésions sur les coupes de côlons. Les analyses moléculaires plus approfondies de l'inflammation, la prolifération cellulaire, les dommages à l'ADN et la sénescence seront réalisées.



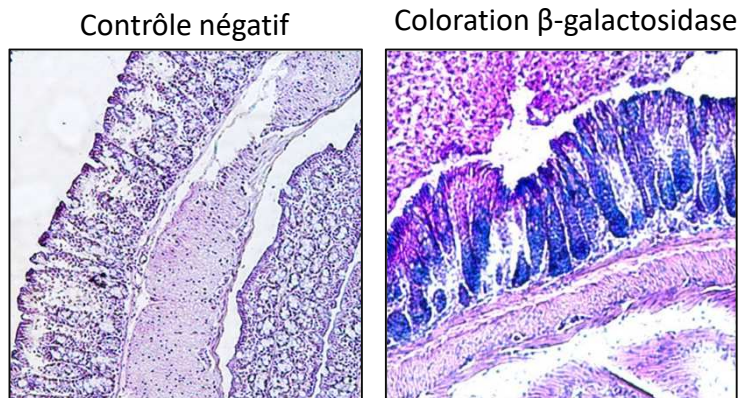
Test  $\beta$ -galactosidase à pH 6



Immunomarquage KI67

**Figure 51 : Hypothèse de l'implication de la sénescence dans la prolifération des cellules épithéliales intestinales.**

Le but est de mettre en évidence le rôle de la sénescence dans la prolifération cellulaire observée au niveau des muqueuses colique des souris *Apc<sup>Min/+</sup>* suite à l'infection par la souche 11G5. Pour cela, nous allons effectuer des coupes successives de côlons afin d'observer la sénescence cellulaire grâce au test  $\beta$ -galactosidase à pH 6 d'une part, et la prolifération cellulaire par un immunomarquage d'autre part. Nous pensons que les cellules sénescents se trouvent à la bases des cryptes et favorisent la prolifération des cellules différenciées tout au long des villosités.



**Figure 52 : Mise au point du protocole du test  $\beta$ -galactosidase à pH 6.**

Les tissus coliques fraîchement prélevés ont été immédiatement inclus en OCT puis coupés au cryostat. Après fixation des tissus, ceux-ci ont été incubés sur la nuit à 37° avec la solution de coloration comme préconisé dans le protocole de Debacq-Chainiaux publié en 2009. les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline et l'éosine puis déshydratées et montées entre lame et lamelle. Les photos ont été prises à l'aide d'un microscope optique Olympus Bx51 et d'une caméra ColorView I.

5) Etude des mécanismes par lesquels l'autophagie inhibe la carcinogenèse colorectale induite par la souche 11G5.

a) Analyse de la sénescence *in vivo*

Dans cette étude, suite à l'infection par la souche 11G5, nous avons mis en évidence l'augmentation de la tumorigénèse chez les souris  $Apc^{Min/+}Atg16l1^{\Delta CEI}$  comparativement aux souris contrôles, et ceci était associé à une augmentation de la prolifération cellulaire. Une étude précédente menée au laboratoire a montré que l'infection par les *E. coli/pks+* dans les cellules eucaryotes induit la sénescence des cellules infectées (Cognoux et al., 2014). Ces dernières acquièrent alors un phénotype sécrétoire associé à la sénescence, et sécrètent de nombreux facteurs de croissance, notamment le HGF, qui a la capacité d'augmenter la prolifération des cellules adjacentes non infectées (Cognoux et al., 2014). Il serait nécessaire de montrer l'implication de la sénescence dans l'augmentation de la prolifération cellulaire chez les souris  $Apc^{Min/+}Atg16l1^{\Delta CEI}$  par rapport aux souris contrôles suite à l'infection par la souche 11G5. Pour cela, nous souhaiterions effectuer des coupes successives de côlon afin de détecter sur ces coupes les cellules sénescents (par le test  $\beta$ -galactosidase à pH 6) et les cellules en prolifération (par un marquage immunohistochimique). Notre hypothèse est que les cellules prolifératives se trouvent adjacentes aux cellules sénescents (**figure 51**) et que le nombre de cellules sénescents sera augmenté chez les souris  $Apc^{Min/+}Atg16l1^{\Delta CEI}$  par rapport aux souris contrôles. A ce jour, nous avons pu mettre au point le protocole pour détecter les cellules sénescents à partir des coupes de côlon des souris en suivant le protocole décrit précédemment (Debacq-Chainiaux et al., 2009) (**figure 52**). La première difficulté de ce test est qu'il nécessite que les tissus soient directement traités car leur stockage à  $-80^{\circ}\text{C}$ , même pendant une nuit, peut détruire l'activité enzymatique. Une deuxième difficulté sera de définir le moment où la sénescence cellulaire est mise en place *in vivo*. Pour cela, des prélèvements aux différents stades de la carcinogenèse colorectale sont envisagés.

De plus, nous envisageons de traiter les souris avec un anticorps dirigé contre HGF avant de les infecter avec la souche 11G5, et analyser la carcinogenèse colorectale ainsi que la prolifération cellulaire. Il a été montré par le laboratoire que l'administration de l'anticorps anti-HGF abolit l'augmentation de la tumorigénèse chez un modèle murin de xéno greffe ayant été greffé en sous-cutané avec des cellules HCT-116 préalablement infectées avec la souche 11G5 (Cognoux et al., 2014). Nous pensons que le traitement avec l'anticorps anti-HGF va supprimer l'augmentation de la tumorigénèse chez les souris  $Apc^{Min/+}Atg16l1^{\Delta CEI}$  *versus* souris contrôles suite à l'infection par la souche 11G5.

### b) Analyse de la composition du microbiote intestinal

Une étude récente a mis en évidence l'implication du microbiote intestinal dans la carcinogenèse colique chez les souris déficientes pour le gène *Apc* spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales de manière inductible au tamoxifène (souris *VilCreER<sup>T2</sup>Apc<sup>lox/+</sup>* ou *Apc<sup>+/-</sup>*) et déficientes pour le gène *Atg7* uniquement dans les cellules épithéliales intestinales (*VilCreER<sup>T2</sup>Apc<sup>lox/+</sup>Atg7<sup>lox/lox</sup>* ou *Apc<sup>+/-</sup>Atg7<sup>ΔCEI</sup>*) (Lévy et al., 2015). Cette étude a montré que la déficience de l'autophagie entraîne la mise en place d'une dysbiose intestinale, qui est à l'origine d'une réponse immunitaire anti-tumorale, chez les souris *Apc<sup>+/-</sup>Atg7<sup>ΔCEI</sup>*. Ceci ayant pour conséquence un développement tumoral ralenti chez les souris *Apc<sup>+/-</sup>Atg7<sup>ΔCEI</sup>*. Dans notre étude, nous avons également mis en évidence une diminution de la tumorigénèse colorectale chez les souris *Apc<sup>Min/+</sup>Atg16l1<sup>ΔCEI</sup>* par rapport aux souris contrôles. Toutefois, suite à l'infection par la souche 11G5, les souris *Apc<sup>Min/+</sup>Atg16l1<sup>ΔCEI</sup>* développent plus de tumeurs colorectales que les souris contrôles. Afin d'étudier l'implication du microbiote intestinal dans les effets observés, nous avons extrait les ADN totaux à partir des tumeurs et des muqueuses saines afin de réaliser un séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S. Ceci nous permettra de mettre en évidence la présence d'une éventuelle dysbiose intestinale chez les souris *Apc<sup>Min/+</sup>Atg16l1<sup>ΔCEI</sup>* comparativement aux souris contrôles dans la condition non infectée ou suite à l'infection par la souche 11G5.

Afin de déterminer si la dysbiose est impliquée dans la tumorigénèse colorectale, nous proposons de réaliser un transfert de la flore intestinale issue de souris *Apc<sup>Min/+</sup>Atg16l1<sup>ΔIEC</sup>* et des souris contrôles infectées ou non par la souche 11G5 vers des souris axéniques. Pour cela, les échantillons fécaux fraîchement collectés seront resuspendus dans du PBS stérile à la concentration de 100 mg/mL, homogénéisés en utilisant un « Mini-Beadbeater-24 » sans ajouter les billes afin de prévenir la destruction des bactéries (Chassaing et al., 2015). Cette suspension bactérienne sera administrée par gavage aux souris axéniques (200  $\mu$ L/souris). Ces expériences seront réalisées en collaboration avec le professeur A. Gewirtz (Georgia State University, Atlanta, USA), un expert de l'étude du microbiote intestinal. Ensuite, les souris colonisées seront traitées avec l'agent carcinogène AOM, et la carcinogenèse colorectale sera analysée.

### c) Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal

L'analyse de la composition du microbiote intestinal par le séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S ne permet pas d'évaluer les modifications métaboliques du microbiote intestinal. Pour cela, nous proposons de nous focaliser sur certains métabolites

bactériens décrits comme étant modifiés dans le CCR. Notamment, les patients atteints de CCR ont des niveaux augmentés de certains acides aminés et une altération des niveaux de certains acides gras à chaîne courte dans les fèces par rapport aux sujets contrôles (Weir et al., 2013). La prévalence du butyrate et de certaines bactéries productrices de butyrate est plus élevée chez les sujets sains par rapport aux patients atteints de CCR (Chen et al., 2012). De plus, il a été rapporté que le butyrate et certaines bactéries productrices de butyrate étaient supprimés dans les fèces des patients atteints de CCR comparativement aux sujets contrôles (Weaver et al., 1988). Or, il a été montré que les acides gras à chaîne courte ont des effets bénéfiques pour l'intestin, tels que leurs rôles dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale, dans la production de mucus, dans l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B ou encore dans l'augmentation de la sécrétion d'IgA par les lymphocytes B (Sivaprakasam et al., 2016). A l'inverse, une diminution de la production des acides gras à chaîne courte, notamment du butyrate, est associée à un microbiote à caractère pro-inflammatoire (Agus et al., 2016).

Au laboratoire, une étude en cours vise à étudier le métabolome fécal des souris *Apc*<sup>Min/+</sup> avant et après l'infection par la souche 11G5 afin de mettre en évidence une possible implication de certains métabolites bactériens dans la tumorigénèse colorectale. En fonction des résultats obtenus, nous allons quantifier les métabolites identifiés dans notre modèle de souris *Apc*<sup>Min/+</sup> déficientes ou non pour l'autophagie.

#### d) Analyse de l'expression de la colibactine

Plusieurs études ont mis en évidence que la synthèse de la colibactine peut être régulée par le microenvironnement (Arthur et al., 2014; Garcie et al., 2016; Payros et al., 2017; Tronnet et al., 2016). Notamment, Arthur et collaborateurs ont mis en évidence une augmentation de l'expression de 5 gènes de l'îlot *pks* (*clbG*, *H*, *L*, *M*, et *S*) au cours du développement tumoral (Arthur et al., 2014). Plus récemment, une étude a montré la capacité d'un contaminant alimentaire à potentialiser les effets génotoxiques de la colibactine (Payros et al., 2017). Ces études montrent qu'il n'est pas suffisant de détecter la présence ou non de l'îlot *pks* mais d'étudier les taux d'expression des gènes qui le composent. Nous souhaiterions donc étudier les taux d'expression des ARNm des gènes de l'îlot *pks* au cours du développement tumoral chez les souris *Apc*<sup>Min/+</sup> et *Apc*<sup>Min/+</sup> *Atg1611* <sup>$\Delta$ CEI</sup> infectées ou non par la souche 11G5, le mutant 11G5 $\Delta$ *clbQ*, et une souche commensale non pathogène. Pour cela, nous proposons de prélever les fèces des souris à différents temps post-infection au cours du développement tumoral, en extraire l'ARN bactérien afin de réaliser des RT-qPCR dirigées contre les différents gènes de l'îlot *pks* tels que *ClbG*, *H*, *L*, *M*, *S* et *Q*.

#### e) Analyse de la réponse immunitaire

Lévy et collaborateurs ont montré la mise en place d'un microenvironnement immunitaire particulier suite à la dysbiose chez les souris  $ApC^{+/-}Atg7^{\Delta CEI}$  comparativement aux souris  $ApC^{Min/+}$  (Lévy et al., 2015). En effet, l'analyse des muqueuses saines avant le développement du CCR a mis en évidence l'activation de l'interféron de type 1, impliqué dans la réponse anti-tumorale, accompagnée par la production d'IL-12 et l'infiltration par des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, Th1 et T régulateurs chez les souris  $ApC^{+/-}Atg7^{\Delta CEI}$ . De plus, dans les muqueuses des souris  $ApC^{+/-}Atg7^{\Delta CEI}$ , une surexpression des chimiokines CX3CL1 (C-X3-C motif ligand 1), CXCL9 et CXCL10 a été observée. L'administration d'un anticorps anti-CD8 en intra-péritonéal, afin d'inhiber la population des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, a suffi à réprimer l'effet anti-tumoral dû à la déficience de l'autophagie.

Une étude en cours au laboratoire a montré une augmentation des neutrophiles dans la muqueuse et dans les follicules lymphoïdes des souris  $ApC^{Min/+}$  infectées par la souche 11G5. Les souris  $ApC^{Min/+}$  infectées par la souche 11G5 présentaient une diminution des lymphocytes T CD3+ anti-tumoraux au sein des tumeurs et des muqueuses. De plus, il a été observé une diminution significative des lymphocytes T anti-inflammatoires CD4+CD25+ au niveau des ganglions mésentériques des souris  $ApC^{Min/+}$  infectées par la souche 11G5. Ces résultats suggèrent que la réponse immunitaire pourrait jouer un rôle majeur dans la carcinogénèse induite par les *E. coli/pks+*.

Pour compléter notre étude, nous proposons d'étudier les profils de cytokines et chimiokines dans les tissus coliques en utilisant le mouse cytokine array kit (R&D), qui permettra de détecter les niveaux de 40 cytokines et chimiokines murines simultanément. Les populations de cellules immunitaires majeures ainsi que leurs fonctions, quand c'est possible, seront analysés dans notre modèle murin.

#### 6) Etude du rôle de l'autophagie dans les cellules immunitaires suite à l'infection par les souches d'*E. coli/pks+*.

Le microenvironnement immunitaire joue un rôle majeur dans la carcinogénèse colorectale. Dans les cellules immunitaires, l'autophagie joue un rôle primordial dans la réponse contre l'infection par des pathogènes et dans la présentation des antigènes. Plusieurs études ont mis en évidence une susceptibilité augmentée à l'infection par des pathogènes lorsque les macrophages et les neutrophiles sont déficients pour l'autophagie (Castillo et al., 2012; Kimmey et al., 2015). Par ailleurs, une étude précédente au laboratoire a montré

l'augmentation de l'expression de COX-2 dans les macrophages en réponse à l'infection par la souche 11G5 (Raisch et al., 2014).

Il serait intéressant d'étudier l'impact d'une déficience de l'autophagie spécifiquement dans les cellules immunitaires sur la carcinogenèse colorectale induite par les souches d'*E. coli/pks+*. Pour cela, nous avons généré les souris *Apc<sup>Min/+</sup>Atg16l1<sup>flox/flox</sup>CreLysM* (appelées ainsi souris *Apc<sup>Min/+</sup>Atg16l1<sup>ΔCM</sup>*) déficientes pour le gène *Atg16l1* spécifiquement dans la lignée myéloïde, qui donne la naissance aux granulocytes, cellules dendritiques et monocytes qui vont devenir des macrophages matures. Nous proposons d'infecter les souris *Apc<sup>Min/+</sup>Atg16l1<sup>ΔCM</sup>* et les souris contrôles avec la souche 11G5 ou le mutant 11G5 $\Delta$ *clbQ* afin d'analyser la carcinogenèse colorectale ainsi que les différents mécanismes pouvant être impliqués tels que les dommages à l'ADN, la sénescence et la prolifération cellulaire, le microenvironnement immunitaire ainsi que le microbiote intestinal comme décrits plus haut.

#### 7) Impact de l'induction de l'autophagie sur la carcinogenèse colorectale induite par les *E. coli/pks+*.

Nous proposons d'évaluer l'impact de la modulation de l'autophagie sur la réponse de l'hôte suite à l'infection par les *E. coli/pks+*. Pour cela, nous allons utiliser un agent pharmacologique, la rapamycine, un inducteur de l'autophagie largement utilisé dans les études *in vitro* et *in vivo* (Galluzzi et al., 2017). Dans un premier temps, nous proposons de traiter les cellules épithéliales intestinales avec la rapamycine et d'examiner l'impact de ce traitement sur les dommages à l'ADN, la sénescence cellulaire, la prolifération cellulaire, et l'inflammation induits par la souche 11G5. *In vivo*, nous proposons de traiter les souris *Apc<sup>Min/+</sup>* avec la rapamycine par voie intra-péritonéale selon un protocole publié en 2014 (3 mg/kg/jours ; Hardiman et al., 2014). Ces souris seront infectées, et la carcinogenèse colorectale ainsi que différents mécanismes pouvant l'influencer seront analysés.

C'est important de noter que l'utilisation de la rapamycine nous servira uniquement de preuve de concept car la rapamycine peut induire d'autres effets que l'induction de l'autophagie, tels qu'un effet immunosuppresseur (Galluzzi et al., 2017). Cependant, si nous montrons que la rapamycine permet de diminuer le développement tumoral suite à l'infection par la souche 11G5, des stratégies pour moduler spécifiquement l'autophagie pourraient être envisagées et développées pour les patients qui présentent une colonisation par des souches d'*E. coli/pks+*. De nouvelles stratégies vectorisées ou des interventions alimentaires basées sur des compléments alimentaires tels que les polyphénols végétaux ayant la capacité d'induire l'autophagie, pourraient être considérés.

### CM-encoding gene content of CRC and diverticulosis samples.

	Number (percentage) of specimens exhibiting CM-encoding genes				
	<i>pks</i>	<i>cnf</i>	<i>cdt</i>	<i>cif</i>	<i>cm</i> <sup>1,2</sup>
Diverticulosis (n=31)	6 (19.3)	4 (12.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (19.4)
CRC (n=38)	21 (55.3)	15 (39.5)	6 (15.8)	3 (7.9)	25 (65.8)
Distal colon cancer (n=17)	11 (64.7)	9 (52.9)	4 (23.5)	1 (5.9)	13 (76.5)
Proximal colon cancer (n=21)	10 (47.8)	6 (28.6)	2 (9.5)	2 (9.5)	12 (57.1)

<sup>1</sup>, cyclomodulin-encoding gene;

<sup>2</sup>, some *E. coli* strains harbored more than one CM-encoding genes.

### **Figure 53 : Prévalence des *E. coli* portant des cyclomodulines.**

L'abondance des souches d'*E. coli* porteuses de cyclomodulines telles que la CNF, la CDT et la CIF est augmentée chez les patients atteints d'un CCR comparativement aux sujets contrôles. Certaines souches d'*E. coli* portent plusieurs cyclomodulines.

(D'après Buc et al., 2013)



8) Etude du rôle de l'autophagie dans le contrôle des souches d'*E. coli* associées au CCR productrices d'autres cyclomodulines que la colibactine.

Enfin, au cours de ce projet de recherche, notre analyse s'est focalisée sur des souches isolées de patients atteints de CCR productrices uniquement de la génotoxine colibactine. Il serait intéressant d'étudier le rôle de l'autophagie en réponse à une infection par des souches d'*E. coli* associées au CCR et productrices d'autre cyclomodulines telles que la CIF, CNF et CDT. Une étude menée au laboratoire a mis en évidence une forte prévalence des *E. coli* producteurs de la CNF chez les patients atteints de CCR (39,5%) comparativement aux sujets contrôles (12,9%). De même, les *E. coli* producteurs de la CIF et CDT ont été retrouvés chez 7,9% et 15,8% des patients atteints de CCR respectivement, alors qu'ils n'étaient pas détectés chez les sujets contrôles (Buc et al., 2013) (**figure 53**). De manière intéressante, certaines souches d'*E. coli* isolées de patients atteints de CCR produisent plusieurs cyclomodulines (Buc et al., 2013). De plus, il a été montré récemment que l'autophagie est activée suite à l'administration de la CDT purifiée dans différentes lignées cellulaires de CCR en réponse à l'apparition des cassures double brin de l'ADN induites par la CDT (Seiwert et al., 2017).

Tout d'abord, nous proposons d'évaluer l'activation de l'autophagie suite à l'infection par différentes souches d'*E. coli* associées au CCR et productrices de la CIF, CNF ou CDT via l'analyse de la conversion de la forme LC3-I vers la forme LC3-II par western blot ou par un marquage immunofluorescent en mettant en évidence les points d'accumulation de la protéine LC3 appelés ainsi les « puncta ». Dans un second temps, nous proposons d'utiliser des lignées cellulaires de CCR déficientes pour un gène de l'autophagie afin d'étudier le rôle de l'autophagie dans le contrôle de la multiplication intracellulaire des souches d'*E. coli* associées au CCR ainsi que dans la réponse de l'hôte aux différents effets pathogéniques décrits de ces dernières. Enfin, nous proposons d'examiner le rôle de l'autophagie dans le contrôle de la carcinogénèse colorectale induite par ces souches. A ce jour, au laboratoire, une étude vise à examiner l'effet de différentes souches d'*E. coli* associées au CCR et productrices d'une ou plusieurs cyclomodulines sur la carcinogénèse colorectale dans le modèle murin *Apc<sup>Min/+</sup>*. La souche qui induit une tumorigénèse colorectale plus avancée sera sélectionnée et utilisée afin d'infecter les souris *Apc<sup>Min/+</sup>Atg1611<sup>ΔCEI</sup>* et les souris contrôles.

## Conclusion générale

---

## Conclusion générale

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence pour la première fois un lien entre les souches d'*E. coli* productrices de colibactine (*E. coli/pks+*) isolées de patients atteints de CCR et l'autophagie. Nous avons montré que l'autophagie est activée en réponse à l'infection par les souches d'*E. coli/pks+*. *In vitro*, nous avons montré que l'autophagie est nécessaire pour limiter la multiplication intracellulaire des souches d'*E. coli/pks+*, limiter l'accumulation des dommages à l'ADN via l'induction des systèmes de réparation de l'ADN, et limiter la sénescence induite par les souches d'*E. coli/pks+*. *In vivo*, l'analyse de la carcinogénèse colorectale chez les souris *Apc<sup>Min/+</sup>* déficientes ou non pour l'autophagie a montré que l'autophagie est importante pour limiter la tumorigénèse colique, la prolifération cellulaire et les dommages à l'ADN induits par les souches d'*E. coli/pks+*.

De nouvelles stratégies visant à moduler spécifiquement l'autophagie notamment l'utilisation de thérapies vectorisées ou de nutriments, tels que les polyphénols végétaux ayant la capacité d'induire l'autophagie, pourraient être considérés pour les patients qui présentent une colonisation par des souches d'*E. coli/pks+*.

## Valorisation scientifique

### PRIX SCIENTIFIQUES

- 2017** Bourse "Travel grant" – 1000 euros. Pour assister au congrès international UEGW "United European Gastroenterology Week" à Barcelone, Espagne
- 2016** Bourse couvrant les frais d'inscription au congrès – 150 euros. Congrès CFATG "Club Francophone de l'Autophagie" à Bordeaux, France

### PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

#### Publications

- 1- Cécily Lucas, Nicolas Barnich, Hang Thi Thu Nguyen. "*Microbiota, inflammation and colorectal cancer*". International Journal of Molecular Science. 2017.
- 2- Alexis Bretin, Cécily Lucas, Anaïs Larabi, Guillaume Dalmasso, Elisabeth Billard, Nicolas Barnich, Richard Bonnet, Hang Thi Thu Nguyen. "*AIEC infection triggers modification of gut microbiota composition in genetically predisposed mice, contributing to intestinal inflammation*". Scientific reports. 2017.

#### Manuscrit en soumission

- 1- Cécily Lucas, Laurène Salesse, Guillaume Dalmasso, Mathilde Bonnet, Pierre Sauvanet, Anaïs Larabi, Denis Pezet, Philip Rosenstiel, Nicolas Barnich, Richard Bonnet, Hang Thi Thu Nguyen. "*Autophagy suppresses protumoral effects of colibactin genotoxin-producing Escherichia coli, inhibiting colorectal carcinogenesis*".

#### Présentations à des congrès nationaux et internationaux

- 1- "Autophagy inhibits protumoral effects induced by colibactin-producing colorectal cancer-associated *Escherichia coli*" – UEGW, Barcelone 2017. Présentation orale.
- 3- Autophagy inhibits protumoral effects induced by colibactin-producing colorectal cancer-associated *Escherichia coli*" – CFATG, Paris 2017. Poster.
- 4- "Autophagy inhibits protumoral effects induced by colibactin-producing colorectal cancer-associated *Escherichia coli*" – EMBO, Dubrovnik-cavtat 2017. Poster.
- 5- "Autophagy inhibits DNA damage induced by colorectal cancer-associated *Escherichia coli*. CFATG Bordeaux 2016. Poster.

# Bibliographie

---

## Bibliographie

- Abdulmir, A.S., Hafidh, R.R., and Bakar, F.A. (2010). Molecular detection, quantification, and isolation of *Streptococcus gallolyticus* bacteria colonizing colorectal tumors: inflammation-driven potential of carcinogenesis via IL-1, COX-2, and IL-8. *Mol. Cancer* 9, 249.
- Adams, K.F., Leitzmann, M.F., Albanes, D., Kipnis, V., Mouw, T., Hollenbeck, A., and Schatzkin, A. (2007). Body mass and colorectal cancer risk in the NIH-AARP cohort. *Am. J. Epidemiol.* 166, 36–45.
- Agus, A., Denizot, J., Thévenot, J., Martinez-Medina, M., Massier, S., Sauvanet, P., Bernalier-Donadille, A., Denis, S., Hofman, P., Bonnet, R., et al. (2016). Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Sci. Rep.* 6, 19032.
- Ajouz, H., Mukherji, D., and Shamseddine, A. (2014). Secondary bile acids: an underrecognized cause of colon cancer. *World J. Surg. Oncol.* 12, 164.
- de Almeida, C.V., Taddei, A., and Amedei, A. (2018). The controversial role of *Enterococcus faecalis* in colorectal cancer. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 11.
- Amarnani, R., and Rapose, A. (2017). Colon cancer and *enterococcus* bacteremia co-affection: A dangerous alliance. *J. Infect. Public Health* 0.
- An, C.H., Kim, M.S., Yoo, N.J., Park, S.W., and Lee, S.H. (2011). Mutational and expressional analyses of *ATG5*, an autophagy-related gene, in gastrointestinal cancers. *Pathol. Res. Pract.* 207, 433–437.
- Andres-Franch, M., Galiana, A., Sanchez-Hellin, V., Ochoa, E., Hernandez-Illan, E., Lopez-Garcia, P., Castillejo, A., Castillejo, M.I., Barbera, V.M., Garcia-Dura, J., et al. (2017). *Streptococcus gallolyticus* infection in colorectal cancer and association with biological and clinical factors. *PLoS ONE* 12.
- Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.-J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., et al. (2012). Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 338, 120–123.
- Arthur, J.C., Gharaibeh, R.Z., Mühlbauer, M., Perez-Chanona, E., Uronis, J.M., McCafferty, J., Fodor, A.A., and Jobin, C. (2014). Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer. *Nat. Commun.* 5, 4724.
- Atreya, I., and Neurath, M.F. (2008). Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 8, 561–572.
- Averboukh, F., Ziv, Y., Kariv, Y., Zmora, O., Dotan, I., Klausner, J.M., Rabau, M., and Tulchinsky, H. (2011). Colorectal carcinoma in inflammatory bowel disease: a comparison between Crohn’s and ulcerative colitis. *Colorectal Dis. Off. J. Assoc. Coloproctology G. B. Irel.* 13, 1230–1235.
- Aymeric, L., Donnadieu, F., Mulet, C., du Merle, L., Nigro, G., Saffarian, A., Bérard, M., Poyart, C., Robine, S., Regnault, B., et al. (2018). Colorectal cancer specific conditions promote *Streptococcus gallolyticus* gut colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E283–E291.
- Bah, A., Lacarrière, C., and Vergne, I. (2016). Autophagy-Related Proteins Target Ubiquitin-Free Mycobacterial Compartment to Promote Killing in Macrophages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6.
- Bakowski, M.A., Braun, V., and Brumell, J.H. (2008). *Salmonella*-containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic Cph. Den.* 9, 2022–2031.
- Balamurugan, R., Rajendiran, E., George, S., Samuel, G.V., and Ramakrishna, B.S. (2008). Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, *Desulfovibrio* and *Enterococcus faecalis* in the feces of patients with colorectal cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23, 1298–1303.
- Balish, E., and Warner, T. (2002). *Enterococcus faecalis* induces inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice. *Am. J. Pathol.* 160, 2253–2257.
- Ballard, J., Bryant, A., Stevens, D., and Tweten, R.K. (1992). Purification and characterization of the lethal toxin (alpha-toxin) of *Clostridium septicum*. *Infect. Immun.* 60, 784–790.
- Bammann, L.L., Clark, W.B., and Gibbons, R.J. (1978). Impaired colonization of gnotobiotic and conventional rats by streptomycin-resistant strains of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 22, 721–726.
- Bansal, M., Moharir, S.C., and Swarup, G. (2018). Autophagy receptor optineurin promotes autophagosome formation by potentiating LC3-II production and phagophore maturation. *Commun. Integr. Biol.* 11, 1–4.
- Bardou, M., Barkun, A.N., and Martel, M. (2013). Obesity and colorectal cancer. *Gut* 62, 933–947.
- Barnett, T.C., Liebl, D., Seymour, L.M., Gillen, C.M., Lim, J.Y., Larock, C.N., Davies, M.R., Schulz, B.L., Nizet, V., Teasdale, R.D., et al. (2013). The globally disseminated MIT1 clone of group A *Streptococcus* evades autophagy for intracellular replication. *Cell Host Microbe* 14, 675–682.
- B’chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2013). The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* 41, 7683–7699.
- Beau, I., Mehropour, M., and Codogno, P. (2011). Autophagosomes and human diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 460–464.
- van der Beek, C.M., Dejong, C.H.C., Troost, F.J., Masclee, A.A.M., and Lenaerts, K. (2017). Role of short-chain fatty acids in colonic inflammation, carcinogenesis, and mucosal protection and healing. *Nutr. Rev.*
- Bellam, N., and Pasche, B. (2010). Tgf-beta signaling alterations and colon cancer. *Cancer Treat. Res.* 155, 85–103.
- Bellodi, C., Lidonnici, M.R., Hamilton, A., Helgason, G.V., Soliera, A.R., Ronchetti, M., Galavotti, S., Young, K.W., Selmi, T., Yacobi, R., et al. (2009). Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J. Clin. Invest.* 119, 1109–1123.
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., and Mazure, N.M. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2570–2581.
- Benjamin, J.L., Hedin, C.R.H., Koutsoumpas, A., Ng, S.C., McCarthy, N.E., Prescott, N.J., Pessoa-Lopes, P., Mathew, C.G., Sanderson, J., Hart, A.L., et al. (2012). Smokers with active Crohn’s disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 1092–1100.
- Berger, N.A. (2014). Obesity and cancer pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1311, 57–76.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2, 326–332.
- Bezine, E., Vignard, J., and Mirey, G. (2014). The cytolethal distending toxin effects on Mammalian cells: a DNA damage perspective. *Cells* 3, 592–615.

- Bezirtzoglou, E., Tsiotsias, A., and Welling, G.W. (2011). Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe* 17, 478–482.
- Biagi, E., Nylund, L., Candela, M., Ostan, R., Bucci, L., Pini, E., Nikkila, J., Monti, D., Satokari, R., Franceschi, C., et al. (2010). Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One* 5, e10667.
- Bian, X., Fu, J., Plaza, A., Herrmann, J., Pistorius, D., Stewart, A., Zhang, Y., and Müller, R. (2013). *In Vivo* Evidence for a Prodrug Activation Mechanism during Colibactin Maturation. *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.* 14.
- Bian, X., Plaza, A., Zhang, Y., and Müller, R. (2015). Two more pieces of the colibactin genotoxin puzzle from *Escherichia coli* show incorporation of an unusual 1-aminocyclopropanecarboxylic acid moiety. *Chem. Sci.* 6, 3154–3160.
- Biarc, J., Nguyen, I.S., Pini, A., Gossé, F., Richert, S., Thiersé, D., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., Raul, F., Klein, J.-P., et al. (2004). Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S.bovis*). *Carcinogenesis* 25, 1477–1484.
- Biedermann, L., Zeitz, J., Mwynyi, J., Sutter-Minder, E., Rehman, A., Ott, S.J., Steurer-Stey, C., Frei, A., Frei, P., Scharl, M., et al. (2013). Smoking Cessation Induces Profound Changes in the Composition of the Intestinal Microbiota in Humans. *PLoS ONE* 8.
- Biedermann, L., Brülisauer, K., Zeitz, J., Frei, P., Scharl, M., Vavricka, S.R., Fried, M., Loessner, M.J., Rogler, G., and Schuppeler, M. (2014). Smoking cessation alters intestinal microbiota: insights from quantitative investigations on human fecal samples using FISH. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 1496–1501.
- Bingham, S.A., Day, N.E., Luben, R., Ferrari, P., Slimani, N., Norat, T., Clavel-Chapelon, F., Kesse, E., Nieters, A., Boeing, H., et al. (2003). Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet Lond. Engl.* 361, 1496–1501.
- Birmingham, C.L., Smith, A.C., Bakowski, M.A., Yoshimori, T., and Brumell, J.H. (2006). Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the Salmonella-containing vacuole. *J. Biol. Chem.* 281, 11374–11383.
- Birmingham, C.L., Higgins, D.E., and Brumell, J.H. (2008). Avoiding death by autophagy: Interactions of *Listeria monocytogenes* with the macrophage autophagy system. *Autophagy* 4, 368–371.
- Boarbi, S., Fretin, D., and Mori, M. (2015). *Coxiella burnetii*, agent de la fièvre Q. *Can. J. Microbiol.* 62, 102–122.
- Boffetta, P., and Hashibe, M. (2006). Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* 7, 149–156.
- Boleij, A., van Gelder, M.M.H.J., Swinkels, D.W., and Tjalsma, H. (2011). Clinical Importance of *Streptococcus gallolyticus* infection among colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 53, 870–878.
- Boleij, A., Hechenbleikner, E.M., Goodwin, A.C., Badani, R., Stein, E.M., Lazarev, M.G., Ellis, B., Carroll, K.C., Albesiano, E., Wick, E.C., et al. (2015). The *Bacteroides fragilis* toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 60, 208–215.
- Bonnemaïson, E., Lanotte, P., Cantagrel, S., Thionois, S., Quentin, R., Chamboux, C., and Laugier, J. (2003). Comparison of fecal flora following administration of two antibiotic protocols for suspected maternofetal infection. *Biol. Neonate* 84, 304–310.
- Bonnet, M., Buc, E., Sauvanet, P., Darcha, C., Dubois, D., Pereira, B., Déchelotte, P., Bonnet, R., Pezet, D., and Darfeuille-Michaud, A. (2014). Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 20, 859–867.
- Boquet, P. (2001). The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxicology* 39, 1673–1680.
- Bossuet-Greif, N., Dubois, D., Petit, C., Tronnet, S., Martin, P., Bonnet, R., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2016). *Escherichia coli* ClbS is a colibactin resistance protein. *Mol. Microbiol.* 99, 897–908.
- Bossuet-Greif, N., Vignard, J., Taieb, F., Mirey, G., Dubois, D., Petit, C., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2018). The Colibactin Genotoxin Generates DNA Interstrand Cross-Links in Infected Cells. *MBio* 9.
- Botteri, E., Iodice, S., Bagnardi, V., Raimondi, S., Lowenfels, A.B., and Maisonneuve, P. (2008). Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA* 300, 2765–2778.
- Bouladoux, N., Hand, T.W., Naik, S., and Belkaid, Y. (2013). Microbiote et lymphocytes T: les meilleurs ennemis. *Med. Sci.* MS 29.
- Boya, P., Codogno, P., and Rodriguez-Muela, N. (2018). Autophagy in stem cells: repair, remodelling and metabolic reprogramming. *Dev. Camb. Engl.* 145.
- Boyle, K.B., and Randow, F. (2013). The role of “eat-me” signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 339–348.
- Brahmi, M., Bally, O., Eberst, L., and Cassier, P. (2017). [Therapeutic targeting of Notch signaling in cancer]. *Bull. Cancer (Paris)* 104, 883–891.
- Brest, P., Lapaquette, P., Souidi, M., Lebrigand, K., Cesaro, A., Vouret-Craviari, V., Mari, B., Barbry, P., Mosnier, J.-F., Hébuterne, X., et al. (2011). A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn’s disease. *Nat. Genet.* 43, 242–245.
- Bretin, A., Carrière, J., Dalmasso, G., Bergougnoux, A., B’chir, W., Maurin, A.-C., Müller, S., Seibold, F., Barnich, N., Bruhat, A., et al. (2016). Activation of the EIF2AK4-EIF2A/eIF2 $\alpha$ -ATF4 pathway triggers autophagy response to Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* infection. *Autophagy* 12, 770–783.
- Bronowski, C., Smith, S.L., Yokota, K., Corkill, J.E., Martin, H.M., Campbell, B.J., Rhodes, J.M., Hart, C.A., and Winstanley, C. (2008). A subset of mucosa-associated *Escherichia coli* isolates from patients with colon cancer, but not Crohn’s disease, share pathogenicity islands with urinary pathogenic *E. coli*. *Microbiol. Read. Engl.* 154, 571–583.
- Brosens, L.A.A., van Hattem, A., Hylind, L.M., Iacobuzio-Donahue, C., Romans, K.E., Axilbund, J., Cruz-Correa, M., Tersmette, A.C., Offerhaus, G.J.A., and Giardiello, F.M. (2007). Risk of colorectal cancer in juvenile polyposis. *Gut* 56, 965–967.
- Brotherton, C.A., and Balskus, E.P. (2013). A Prodrug Resistance Mechanism Is Involved in Colibactin Biosynthesis and Cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 3359–3362.
- Brotherton, C.A., Wilson, M., Byrd, G., and Balskus, E.P. (2015). Isolation of a Metabolite from the pks Island Provides Insights into Colibactin Biosynthesis and Activity. *Org. Lett.* 17, 1545–1548.
- Buc, E., Dubois, D., Sauvanet, P., Raisch, J., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., Pezet, D., and Bonnet, R. (2013). High Prevalence of Mucosa-Associated *E. coli* Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer. *PLOS ONE* 8, e56964.
- Bulua, A.C., Simon, A., Maddipati, R., Pelletier, M., Park, H., Kim, K.-Y., Sack, M.N., Kastner, D.L., and Siegel, R.M. (2011). Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J. Exp. Med.* 208, 519–533.

- Cam, H., and Houghton, P.J. (2011). Regulation of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) by hypoxia: causes and consequences. *Target. Oncol.* 6, 95–102.
- Canavan, C., Abrams, K.R., and Mayberry, J. (2006). Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 23, 1097–1104.
- Capaldo, C.T., Powell, D.N., and Kalman, D. (2017). Layered defense: how mucus and tight junctions seal the intestinal barrier. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 95, 927–934.
- Castellarin, M., Warren, R.L., Freeman, J.D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., Barnes, R., Watson, P., Allen-Vercove, E., Moore, R.A., et al. (2012). *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* 22, 299–306.
- Castillo, E.F., Dekonenko, A., Arko-Mensah, J., Mandell, M.A., Dupont, N., Jiang, S., Delgado-Vargas, M., Timmins, G.S., Bhattacharya, D., Yang, H., et al. (2012). Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E3168–3176.
- Cavallaro, U., and Christofori, G. (2000). Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression. *J. Neurooncol.* 50, 63–70.
- Chakravorty, A., Awad, M.M., Cheung, J.K., Hiscox, T.J., Lyras, D., and Rood, J.I. (2015). The Pore-Forming  $\alpha$ -Toxin from *Clostridium septicum* Activates the MAPK Pathway in a Ras-c-Raf-Dependent and Independent Manner. *Toxins* 7, 516–534.
- Chan, A.T., Ogino, S., and Fuchs, C.S. (2007). Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N. Engl. J. Med.* 356, 2131–2142.
- Chaplin, A., Parra, P., Serra, F., and Palou, A. (2015). Conjugated Linoleic Acid Supplementation under a High-Fat Diet Modulates Stomach Protein Expression and Intestinal Microbiota in Adult Mice. *PLoS One* 10, e0125091.
- Chassaing, B., Rolhion, N., de Vallée, A., Salim, S.Y., Prorok-Hamon, M., Neut, C., Campbell, B.J., Söderholm, J.D., Hugot, J.-P., Colombel, J.-F., et al. (2011). Crohn disease-associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J. Clin. Invest.* 121, 966–975.
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J.K., Poole, A.C., Srinivasan, S., Ley, R.E., and Gewirtz, A.T. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 519, 92–96.
- Chen, J., and Iverson, D. (2012). Estrogen in obesity-associated colon cancer: friend or foe? Protecting postmenopausal women but promoting late-stage colon cancer. *Cancer Causes Control CCC* 23, 1767–1773.
- Chen, G.Y., Shaw, M.H., Redondo, G., and Núñez, G. (2008). The innate immune receptor Nod1 protects the intestine from inflammation-induced tumorigenesis. *Cancer Res.* 68, 10060–10067.
- Chen, J., Röcken, C., Lofton-Day, C., Schulz, H.-U., Müller, O., Kutzner, N., Malfertheiner, P., and Ebert, M.P.A. (2005). Molecular analysis of APC promoter methylation and protein expression in colorectal cancer metastasis. *Carcinogenesis* 26, 37–43.
- Chen, W., Liu, F., Ling, Z., Tong, X., and Xiang, C. (2012). Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One* 7, e39743.
- Chen, X., He, Y., and Lu, F. (2018). Autophagy in Stem Cell Biology: A Perspective on Stem Cell Self-Renewal and Differentiation.
- Chen, Z., Li, Y., Zhang, C., Yi, H., Wu, C., Wang, J., Liu, Y., Tan, J., and Wen, J. (2013). Downregulation of Beclin 1 and impairment of autophagy in a small population of colorectal cancer. *Dig. Dis. Sci.* 58, 2887–2894.
- Chen, Z.-Y., Hsieh, Y.-M., Huang, C.-C., and Tsai, C.-C. (2017). Inhibitory Effects of Probiotic *Lactobacillus* on the Growth of Human Colonic Carcinoma Cell Line HT-29. *Molecules* 22, 107.
- Cheng, J., Palva, A.M., de Vos, W.M., and Satokari, R. (2013). Contribution of the Intestinal Microbiota to Human Health: From Birth to 100 Years of Age. In *Between Pathogenicity and Commensalism*, U. Dobrindt, J.H. Hacker, and C. Svanborg, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 323–346.
- Chew, S.S., and Lubowski, D.Z. (2001). *Clostridium septicum* and malignancy. *ANZ J. Surg.* 71, 647–649.
- Cho, E., Smith-Warner, S.A., Ritz, J., van den Brandt, P.A., Colditz, G.A., Folsom, A.R., Freudenheim, J.L., Giovannucci, E., Goldbohm, R.A., Graham, S., et al. (2004). Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann. Intern. Med.* 140, 603–613.
- Choy, A., Dancourt, J., Mugo, B., O'Connor, T.J., Isberg, R.R., Melia, T.J., and Roy, C.R. (2012). The *Legionella* effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation. *Science* 338, 1072–1076.
- Chuang, S.-Y., Yang, C.-H., Chou, C.-C., Chiang, Y.-P., Chuang, T.-H., and Hsu, L.-C. (2013). TLR-induced PAI-2 expression suppresses IL-1 $\beta$  processing via increasing autophagy and NLRP3 degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 16079–16084.
- Cianfanelli, V., Fuoco, C., Lorente, M., Salazar, M., Quondamatteo, F., Gherardini, P.F., De Zio, D., Nazio, F., Antonioli, M., D'Orazio, M., et al. (2015). AMBRA1 links autophagy to cell proliferation and tumorigenesis by promoting c-Myc dephosphorylation and degradation. *Nat. Cell Biol.* 17, 20–30.
- Clements, A., Young, J.C., Constantinou, N., and Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 3, 71–87.
- Clevers, H. (2004). At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell* 118, 671–674.
- Codella, R., Luzi, L., and Terruzzi, I. (2018). Exercise has the guts: How physical activity may positively modulate gut microbiota in chronic and immune-based diseases. *Dig. Liver Dis.* 50, 331–341.
- Comayras, C., Tasca, C., Pérès, S.Y., Ducommun, B., Oswald, E., and De Rycke, J. (1997). *Escherichia coli* cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G2/M transition by preventing cdc2 protein kinase dephosphorylation and activation. *Infect. Immun.* 65, 5088–5095.
- Conlon, M.A., and Bird, A.R. (2014). The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. *Nutrients* 7, 17–44.
- Conway, K.L., Kuballa, P., Song, J.-H., Patel, K.K., Castoreno, A.B., Yilmaz, O.H., Jijon, H.B., Zhang, M., Aldrich, L.N., Villablanca, E.J., et al. (2013). Atg16l1 is required for autophagy in intestinal epithelial cells and protection of mice from *Salmonella* infection. *Gastroenterology* 145, 1347–1357.
- Corredoira, J., Grau, I., García-Rodríguez, J.F., García-País, M.J., Rabuñal, R., Ardanuy, C., García-Garrote, F., Coira, A., Alonso, M.P., Boleij, A., et al. (2017). Colorectal neoplasm in cases of *Clostridium septicum* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bacteraemia. *Eur. J. Intern. Med.* 41, 68–73.
- Corredoira-Sánchez, J., García-Garrote, F., Rabuñal, R., López-Roses, L., García-País, M.J., Castro, E., González-Soler, R., Coira, A., Pita, J., López-Álvarez, M.J., et al. (2012). Association Between Bacteremia Due to *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis* I) and Colorectal Neoplasia: A Case-Control Study. *Clin. Infect. Dis.* 55, 491–496.
- Cougnoux, A., Dalmasso, G., Martínez, R., Buc, E., Delmas, J., Gibold, L., Sauvanet, P., Darcha, C., Déchelotte, P., Bonnet, M., et al. (2014). Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* 63, 1932–1942.



- Cougnoux, A., Delmas, J., Gibold, L., Faïf, T., Romagnoli, C., Robin, F., Cuevas-Ramos, G., Oswald, E., Darfeuille-Michaud, A., Prati, F., et al. (2016). Small-molecule inhibitors prevent the genotoxic and protumoural effects induced by colibactin-producing bacteria. *Gut* 65, 278–285.
- Crighton, D., Wilkinson, S., O’Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P.R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T., and Ryan, K.M. (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 126, 121–134.
- Criollo, A., Senovilla, L., Authier, H., Maiuri, M.C., Morselli, E., Vitale, I., Kepp, O., Tasmemir, E., Galluzzi, L., Shen, S., et al. (2010). The IKK complex contributes to the induction of autophagy. *EMBO J.* 29, 619–631.
- Crotzer, V.L., and Blum, J.S. (2009). Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 3335–3341.
- Croxen, M.A., and Finlay, B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 26–38.
- Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273, 501–503.
- Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (2000a). Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic Cph. Den.* 1, 570–583.
- Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (2000b). Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. *J. Cell Sci.* 113 Pt 24, 4441–4450.
- Cuervo, A.M., and Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* 24, 92–104.
- Cuevas-Ramos, G., Petit, C.R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2010). *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11537–11542.
- Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H.-J., Lynch, H.T., Minsky, B., Nordlinger, B., and Starling, N. (2010). Colorectal cancer. *Lancet Lond. Engl.* 375, 1030–1047.
- Dai, Z., Coker, O.O., Nakatsu, G., Wu, W.K.K., Zhao, L., Chen, Z., Chan, F.K.L., Kristiansen, K., Sung, J.J.Y., Wong, S.H., et al. (2018). Multi-cohort analysis of colorectal cancer metagenome identified altered bacteria across populations and universal bacterial markers. *Microbiome* 6.
- Dalmasso, G., Cougnoux, A., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., and Bonnet, R. (2014). The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment. *Gut Microbes* 5, 675–680.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J.F. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn’s disease. *Gastroenterology* 115, 1405–1413.
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn’s disease. *Gastroenterology* 127, 412–421.
- Davidson, D., Amrein, L., Panasci, L., and Aloyz, R. (2013). Small Molecules, Inhibitors of DNA-PK, Targeting DNA Repair, and Beyond. *Front. Pharmacol.* 4.
- Davies, A.A., Masson, J.Y., McIlwraith, M.J., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A.R., and West, S.C. (2001). Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol. Cell* 7, 273–282.
- De Rycke, J., Comtet, E., Chalareng, C., Boury, M., Tasca, C., and Milon, A. (1997). Enteropathogenic *Escherichia coli* O103 from rabbit elicits actin stress fibers and focal adhesions in HeLa epithelial cells, cytopathic effects that are linked to an analog of the locus of enterocyte effacement. *Infect. Immun.* 65, 2555–2563.
- Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J., and Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat. Protoc.* 4, 1798–1806.
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., et al. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 10, 51–64.
- DeGruttola, A.K., Low, D., Mizoguchi, A., and Mizoguchi, E. (2016). Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm. Bowel Dis.* 22, 1137–1150.
- Deplancke, B., and Gaskins, H.R. (2001). Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 1131S–1141S.
- Deretic, V. (2010). Autophagy in infection. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 252–262.
- Deretic, V., Saitoh, T., and Akira, S. (2013). Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 722–737.
- Deuring, J.J., Fuhler, G.M., Konstantinov, S.R., Peppelenbosch, M.P., Kuipers, E.J., de Haar, C., and van der Woude, C.J. (2014). Genomic ATG16L1 risk allele-restricted Paneth cell ER stress in quiescent Crohn’s disease. *Gut* 63, 1081–1091.
- Di Meo, S., Reed, T.T., Venditti, P., and Victor, V.M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1245049.
- Dixon, M.R., Haukoos, J.S., Udani, S.M., Naghi, J.J., Arnell, T.D., Kumar, R.R., and Stamos, M.J. (2003). Carcinoembryonic antigen and albumin predict survival in patients with advanced colon and rectal cancer. *Arch. Surg. Chic. Ill 1960* 138, 962–966.
- Dong, N., Zhu, Y., Lu, Q., Hu, L., Zheng, Y., and Shao, F. (2012). Structurally distinct bacterial TBC-like GAPs link Arf GTPase to Rab1 inactivation to counteract host defenses. *Cell* 150, 1029–1041.
- Dortet, L., Mostowy, S., and Cossart, P. (2012). *Listeria* and autophagy escape. *Autophagy* 8, 132–134.
- Doubeni, C.A., Laiyemo, A.O., Major, J.M., Schootman, M., Lian, M., Park, Y., Graubard, B.I., Hollenbeck, A.R., and Sinha, R. (2012). Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: An analysis of over one-half million adults in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Cancer* 118, 3636–3644.
- Dove, W.F., Clipson, L., Gould, K.A., Luongo, C., Marshall, D.J., Moser, A.R., Newton, M.A., and Jacoby, R.F. (1997). Intestinal neoplasia in the *ApcMin* mouse: independence from the microbial and natural killer (beige locus) status. *Cancer Res.* 57, 812–814.
- Dreyer, C., Sablin, M.-P., Faivre, S., and Raymond, É. (2009). Actualités sur la voie mTOR et ses inhibiteurs. *Bull. Cancer (Paris)* 96, 87–94.
- Dubouloz, F., Deloche, O., Wanke, V., Cameroni, E., and De Virgilio, C. (2005). The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Mol. Cell* 19, 15–26.
- Eaden, J.A., Abrams, K.R., and Mayberry, J.F. (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48, 526–535.
- Eklöf, V., Löfgren-Burström, A., Zingmark, C., Edin, S., Larsson, P., Karling, P., Alexeyev, O., Rutegård, J., Wikberg, M.L., and Palmqvist, R. (2017). Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection. *Int. J. Cancer* 141, 2528–2536.

- Ellmerich, S., Schöller, M., Duranton, B., Gossé, F., Galluser, M., Klein, J.P., and Raul, F. (2000). Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. *Carcinogenesis* 21, 753–756.
- English, L., Chemali, M., Duron, J., Rondeau, C., Laplante, A., Gingras, D., Alexander, D., Leib, D., Norbury, C., Lippé, R., et al. (2009). Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat. Immunol.* 10, 480–487.
- Ensari, A., and Marsh, M.N. (2018). Exploring the villus. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench* 11, 181–190.
- Escobar-Parámo, P., Grenet, K., Le Menac’h, A., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Rahimy, M.C., Andremont, A., et al. (2004). Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5698–5700.
- Esteller, M., and Herman, J.G. (2002). Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J. Pathol.* 196, 1–7.
- Esteller, M., Sparks, A., Toyota, M., Sanchez-Cespedes, M., Capella, G., Peinado, M.A., Gonzalez, S., Tarafa, G., Sidransky, D., Meltzer, S.J., et al. (2000). Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res.* 60, 4366–4371.
- Etienne-Mesmin, L., Chassaing, B., Sauvanet, P., Denizot, J., Blanquet-Diot, S., Darfeuille-Michaud, A., Pradel, N., and Livrelli, V. (2011). Interactions with M cells and macrophages as key steps in the pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *PLoS One* 6, e23594.
- Evans, C.C., LePard, K.J., Kwak, J.W., Stancukas, M.C., Laskowski, S., Dougherty, J., Moulton, L., Glawe, A., Wang, Y., Leone, V., et al. (2014). Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. *PLoS One* 9, e92193.
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J.P., Druart, C., Bindels, L.B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M., et al. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9066–9071.
- Favier, A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* 64, 390–396.
- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.
- Fedor, Y., Vignard, J., Nicolau-Travers, M.-L., Boutet-Robinet, E., Watrin, C., Salles, B., and Mirey, G. (2013). From single-strand breaks to double-strand breaks during S-phase: a new mode of action of the *Escherichia coli* Cytolethal Distending Toxin. *Cell. Microbiol.* 15, 1–15.
- Feng, Y., Yao, Z., and Klionsky, D.J. (2015). How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy. *Trends Cell Biol.* 25, 354–363.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015a). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359–E386.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015b). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359–386.
- Filomeni, G., De Zio, D., and Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ.* 22, 377–388.
- Flossmann, E., Rothwell, P.M., and British Doctors Aspirin Trial and the UK-TIA Aspirin Trial (2007). Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. *Lancet Lond. Engl.* 369, 1603–1613.
- Francescone, R., Hou, V., and Grivennikov, S.I. (2015). Cytokines, IBD and colitis-associated cancer. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 409–418.
- Franco, A.T., Israel, D.A., Washington, M.K., Krishna, U., Fox, J.G., Rogers, A.B., Neish, A.S., Collier-Hyams, L., Perez-Perez, G.I., Hatakeyama, M., et al. (2005). Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10646–10651.
- Frisan, T., Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Stenerlöw, B., and Thelestam, M. (2003). The Haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin induces DNA double-strand breaks and promotes ATM-dependent activation of RhoA. *Cell. Microbiol.* 5, 695–707.
- Fujiwara, Y., Kikuchi, H., Aizawa, S., Furuta, A., Hatanaka, Y., Konya, C., Uchida, K., Wada, K., and Kabuta, T. (2013a). Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. *Autophagy* 9, 1167–1171.
- Fujiwara, Y., Furuta, A., Kikuchi, H., Aizawa, S., Hatanaka, Y., Konya, C., Uchida, K., Yoshimura, A., Tamai, Y., Wada, K., et al. (2013b). Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy* 9, 403–409.
- Fukata, M., and Arditi, M. (2013). The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 6, 451–463.
- Gagnière, J., Bonnin, V., Jarrousse, A.-S., Cardamone, E., Agus, A., Uhrhammer, N., Sauvanet, P., Déchelotte, P., Barnich, N., Bonnet, R., et al. (2017). Interactions between microsatellite instability and human gut colonization by *Escherichia coli* in colorectal cancer. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 131, 471–485.
- Galavotti, S., Bartesaghi, S., Faccenda, D., Shaked-Rabi, M., Sanzone, S., McEvoy, A., Dinsdale, D., Condorelli, F., Brandner, S., Campanella, M., et al. (2013). The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells. *Oncogene* 32, 699–712.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Levine, B., Green, D.R., and Kroemer, G. (2017). Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 487–511.
- Gao, Z., Guo, B., Gao, R., Zhu, Q., and Qin, H. (2015). Microbiota dysbiosis is associated with colorectal cancer. *Front. Microbiol.* 6.
- Garcie, C., Tronnet, S., Garénaux, A., McCarthy, A.J., Brachmann, A.O., Pénary, M., Houle, S., Nougayrède, J.-P., Piel, J., Taylor, P.W., et al. (2016). The Bacterial Stress-Responsive Hsp90 Chaperone (HtpG) Is Required for the Production of the Genotoxin Colibactin and the Siderophore Yersiniabactin in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 214, 916–924.
- Gaudier, E., Jarry, A., Blottière, H.M., de Coppet, P., Buisine, M.P., Aubert, J.P., Laboisce, C., Cherbut, C., and Hoebler, C. (2004). Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, G1168–1174.
- Gerbe, F., Legraverend, C., and Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2907–2917.
- Gewirtz, D.A. (2009). Autophagy, senescence and tumor dormancy in cancer therapy. *Autophagy* 5, 1232–1234.
- Ghafari, M., Mohammadian, M., Valipour, A.A., and Mohammadian-Hafshejani, A. (2016). Physical Activity and Colorectal Cancer. *Iran. J. Public Health* 45, 1673–1674.
- Gianotti, R.J., and Moss, A.C. (2017). Fecal Microbiota Transplantation: From *Clostridium difficile* to Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Hepatol.* 13, 209–213.
- Gill, C.I.R., and Rowland, I.R. (2002). Diet and cancer: assessing the risk. *Br. J. Nutr.* 88 Suppl 1, S73–87.

- Goedert, J.J., Sampson, J.N., Moore, S.C., Xiao, Q., Xiong, X., Hayes, R.B., Ahn, J., Shi, J., and Sinha, R. (2014). Fecal metabolomics: assay performance and association with colorectal cancer. *Carcinogenesis* 35, 2089–2096.
- Golshiri, P., Rasooli, S., Emami, M., and Najimi, A. (2016). Effects of Physical Activity on Risk of Colorectal Cancer: A Case-control Study. *Int. J. Prev. Med.* 7, 32.
- Gomes, L.R., Menck, C.F.M., and Leandro, G.S. (2017). Autophagy Roles in the Modulation of DNA Repair Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Goodrich, J.K., Davenport, E.R., Beaumont, M., Jackson, M.A., Knight, R., Ober, C., Spector, T.D., Bell, J.T., Clark, A.G., and Ley, R.E. (2016). Genetic determinants of the gut microbiome in UK Twins. *Cell Host Microbe* 19, 731–743.
- Goodwin, A.C., Destefano Shields, C.E., Wu, S., Huso, D.L., Wu, X., Murray-Stewart, T.R., Hacker-Prietz, A., Rabizadeh, S., Woster, P.M., Sears, C.L., et al. (2011). Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced colon tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 15354–15359.
- Grady, W.M., and Markowitz, S.D. (2015). The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening. *Dig. Dis. Sci.* 60, 762–772.
- Guidi, R., Guerra, L., Levi, L., Stenerlöv, B., Fox, J.G., Josenhans, C., Masucci, M.G., and Frisan, T. (2013). Chronic exposure to the cytolethal distending toxins of Gram-negative bacteria promotes genomic instability and altered DNA damage response. *Cell. Microbiol.* 15, 98–113.
- Gunawardene, A.R., Corfe, B.M., and Staton, C.A. (2011). Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *Int. J. Exp. Pathol.* 92, 219–231.
- Guo, J.Y., Karsli-Uzunbas, G., Mathew, R., Aisner, S.C., Kamphorst, J.J., Strohecker, A.M., Chen, G., Price, S., Lu, W., Teng, X., et al. (2013). Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis. *Genes Dev.* 27, 1447–1461.
- Gustafsson, B.E., Daft, F.S., McDANIEL, E.G., Smith, J.C., and Fitzgerald, R.J. (1962). Effects of vitamin K-active compounds and intestinal microorganisms in vitamin K-deficient germfree rats. *J. Nutr.* 78, 461–468.
- Guthrie, L., Gupta, S., Daily, J., and Kelly, L. (2017). Human microbiome signatures of differential colorectal cancer drug metabolism. *Npj Biofilms Microbiomes* 3, 27.
- Gutierrez, M.G., Vázquez, C.L., Munafó, D.B., Zoppino, F.C.M., Berón, W., Rabinovitch, M., and Colombo, M.I. (2005). Autophagy induction favours the generation and maturation of the *Coxiella*-replicative vacuoles. *Cell. Microbiol.* 7, 981–993.
- Haghjoo, E., and Galán, J.E. (2004). *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4614–4619.
- Haglund, C.M., and Welch, M.D. (2011). Pathogens and polymers: microbe-host interactions illuminate the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 195, 7–17.
- Hagymási, K., and Tulassay, Z. (2014). *Helicobacter pylori* infection: new pathogenetic and clinical aspects. *World J. Gastroenterol.* 20, 6386–6399.
- Half, E., Bercovich, D., and Rozen, P. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J. Rare Dis.* 4, 22. *Tjalsma et al., 2012*
- Han, Y.W. (2015). *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Curr. Opin. Microbiol.* 0, 141–147.
- Han, Y.W., Shi, W., Huang, G.T., Kinder Haake, S., Park, N.H., Kuramitsu, H., and Genco, R.J. (2000). Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect. Immun.* 68, 3140–3146.
- Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., and Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 37298–37302.
- Hancock, V., Seshasayee, A.S., Ussery, D.W., Luscombe, N.M., and Klemm, P. (2008). Transcriptomics and adaptive genomics of the asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972. *Mol. Genet. Genomics* 279, 523–534.
- Hardiman, K.M., Liu, J., Feng, Y., Greenson, J.K., and Fearon, E.R. (2014). Rapamycin Inhibition of Polyposis and Progression to Dysplasia in a Mouse Model. *PLOS ONE* 9, e96023.
- Harris, J., Hartman, M., Roche, C., Zeng, S.G., O’Shea, A., Sharp, F.A., Lambe, E.M., Creagh, E.M., Golenbock, D.T., Tschopp, J., et al. (2011). Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *J. Biol. Chem.* 286, 9587–9597.
- Haslam, A., Robb, S.W., Hébert, J.R., Huang, H., Wirth, M.D., Shivappa, N., and Ebell, M.H. (2017). The association between Dietary Inflammatory Index scores and the prevalence of colorectal adenoma.
- HATAKEYAMA, M. (2017). Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 93, 196–219.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.* 11, 1433–1437.
- Heinimann, K. (2013). Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of Microsatellite Instability Status. *Front. Oncol.* 3.
- Helgason, G.V., Holyoake, T.L., and Ryan, K.M. (2013). Role of autophagy in cancer prevention, development and therapy. *Essays Biochem.* 55, 133–151.
- Hernández-Chirlaque, C., Aranda, C.J., Ocón, B., Capitán-Cañadas, F., Ortega-González, M., Carrero, J.J., Suárez, M.D., Zarzuelo, A., Sánchez de Medina, F., and Martínez-Augustín, O. (2016). Germ-free and Antibiotic-treated Mice are Highly Susceptible to Epithelial Injury in DSS Colitis. *J. Crohns Colitis* 10, 1324–1335.
- Hewitt, G., Carroll, B., Sarallah, R., Correia-Melo, C., Ogrodnik, M., Nelson, G., Otten, E.G., Manni, D., Antrobus, R., Morgan, B.A., et al. (2016). SQSTM1/p62 mediates crosstalk between autophagy and the UPS in DNA repair. *Autophagy* 12, 1917–1930.
- Hibberd, A.A., Lyrá, A., Ouwehand, A.C., Rolny, P., Lindegren, H., Cedgård, L., and Wettergren, Y. (2017). Intestinal microbiota is altered in patients with colon cancer and modified by probiotic intervention. *BMJ Open Gastroenterol.* 4, e000145.
- Holleran, G., Lopetuso, L., Petito, V., Graziani, C., Ianiro, G., McNamara, D., Gasbarrini, A., and Scaldaferrì, F. (2017). The Innate and Adaptive Immune System as Targets for Biologic Therapies in Inflammatory Bowel Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Homann, N., Tillonen, J., and Salaspuro, M. (2000). Microbially produced acetaldehyde from ethanol may increase the risk of colon cancer via folate deficiency. *Int. J. Cancer* 86, 169–173.
- Homburg, S., Oswald, E., Hacker, J., and Dobrindt, U. (2007). Expression analysis of the colibactin gene cluster coding for a novel polyketide in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 275, 255–262.
- Hoving, J.C., Wilson, G.J., and Brown, G.D. (2014). Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell. Microbiol.* 16, 185–194.

- Hu, Y.-L., Jahangiri, A., Delay, M., and Aghi, M.K. (2012). Tumor cell autophagy as an adaptive response mediating resistance to treatments such as antiangiogenic therapy. *Cancer Res.* *72*, 4294–4299.
- Huang, J., and Brumell, J.H. (2014). Bacteria-autophagy interplay: a battle for survival. *Nat. Rev. Microbiol.* *12*, 101–114.
- Huycke, M.M., Joyce, W., and Wack, M.F. (1996). Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of *Enterococcus faecalis*. *J. Infect. Dis.* *173*, 743–746.
- Huycke, M.M., Abrams, V., and Moore, D.R. (2002). *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis* *23*, 529–536.
- Iacopetta, B., Grieu, F., Li, W., Ruszkiewicz, A., Caruso, M., Moore, J., Watanabe, G., and Kawakami, K. (2006). APC gene methylation is inversely correlated with features of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* *119*, 2272–2278.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimomishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., et al. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* *408*, 488–492.
- Irrazábal, T., Belcheva, A., Girardin, S.E., Martin, A., and Philpott, D.J. (2014). The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer. *Mol. Cell* *54*, 309–320.
- Ishino, K., Mutoh, M., Totsuka, Y., and Nakagama, H. (2013). Metabolic syndrome: a novel high-risk state for colorectal cancer. *Cancer Lett.* *334*, 56–61.
- Isomoto, H., Moss, J., and Hirayama, T. (2010). Pleiotropic actions of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA. *Tohoku J. Exp. Med.* *220*, 3–14.
- Jänne, P.A., and Mayer, R.J. (2000). Chemoprevention of Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* *342*, 1960–1968.
- Jaspersion, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W., and Burt, R.W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* *138*, 2044–2058.
- Jinadasa, R.N., Bloom, S.E., Weiss, R.S., and Duhamel, G.E. (2011). Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiol. Read. Engl.* *157*, 1851–1875.
- Jo, E.-K., Yuk, J.-M., Shin, D.-M., and Sasakawa, C. (2013). Roles of Autophagy in Elimination of Intracellular Bacterial Pathogens. *Front. Immunol.* *4*, 97.
- Jo, Y.K., Kim, S.C., Park, I.J., Park, S.J., Jin, D.-H., Hong, S.-W., Cho, D.-H., and Kim, J.C. (2012a). Increased Expression of ATG10 in Colorectal Cancer Is Associated with Lymphovascular Invasion and Lymph Node Metastasis. *PLoS ONE* *7*.
- Jo, Y.K., Kim, S.C., Park, I.J., Park, S.J., Jin, D.-H., Hong, S.-W., Cho, D.-H., and Kim, J.C. (2012b). Increased expression of ATG10 in colorectal cancer is associated with lymphovascular invasion and lymph node metastasis. *PLoS One* *7*, e52705.
- Johansen, T., and Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* *7*, 279–296.
- Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 15064–15069.
- Joly, C., Gay-Quéheillard, J., Léké, A., Chardon, K., Delanaud, S., Bach, V., and Khorsi-Cauet, H. (2013). Impact of chronic exposure to low doses of chlorpyrifos on the intestinal microbiota in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) and in the rat. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* *20*, 2726–2734.
- Jones, B.D., Ghori, N., and Falkow, S. (1994). *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* *180*, 15–23.
- Jounai, N., Takeshita, F., Kobiyama, K., Sawano, A., Miyawaki, A., Xin, K.-Q., Ishii, K.J., Kawai, T., Akira, S., Suzuki, K., et al. (2007). The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 14050–14055.
- Jung, C.H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N.M., and Kim, D.-H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* *584*, 1287–1295.
- Kang, M.R., Kim, M.S., Oh, J.E., Kim, Y.R., Song, S.Y., Kim, S.S., Ahn, C.H., Yoo, N.J., and Lee, S.H. (2009). Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J. Pathol.* *217*, 702–706.
- Karam, S.M. (1999). Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *4*, D286–298.
- Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2012). Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* *22*, 407–417.
- Kawai, T., and Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* *21*, 317–337.
- Kenific, C.M., Thorburn, A., and Debnath, J. (2010). Autophagy and metastasis: another double-edged sword. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 241–245.
- Kennedy, C.L., Krejany, E.O., Young, L.F., O'Connor, J.R., Awad, M.M., Boyd, R.L., Emmins, J.J., Lyras, D., and Rood, J.I. (2005). The alpha-toxin of *Clostridium septicum* is essential for virulence. *Mol. Microbiol.* *57*, 1357–1366.
- Kim, D.H., and Jin, Y.H. (2001). Intestinal bacterial beta-glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch. Pharm. Res.* *24*, 564–567.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011a). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* *13*, 132–141.
- Kim, J.M., Lee, J.Y., and Kim, Y.-J. (2008). Inhibition of apoptosis in *Bacteroides fragilis* enterotoxin-stimulated intestinal epithelial cells through the induction of c-IAP-2. *Eur. J. Immunol.* *38*, 2190–2199.
- Kim, M.-J., Woo, S.-J., Yoon, C.-H., Lee, J.-S., An, S., Choi, Y.-H., Hwang, S.-G., Yoon, G., and Lee, S.-J. (2011b). Involvement of autophagy in oncogenic K-Ras-induced malignant cell transformation. *J. Biol. Chem.* *286*, 12924–12932.
- Kim, S.C., Tonkonogy, S.L., Albright, C.A., Tsang, J., Balish, E.J., Braun, J., Huycke, M.M., and Sartor, R.B. (2005). Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. *Gastroenterology* *128*, 891–906.
- Kimmey, J.M., Huynh, J.P., Weiss, L.A., Park, S., Kambal, A., Debnath, J., Virgin, H.W., and Stallings, C.L. (2015). Unique role for ATG5 in neutrophil-mediated immunopathology during *M. tuberculosis* infection. *Nature* *528*, 565–569.
- Kissová, I., Deffieu, M., Manon, S., and Camougrand, N. (2004). Uth1p Is Involved in the Autophagic Degradation of Mitochondria. *J. Biol. Chem.* *279*, 39068–39074.
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., and Hocevar, B.A. (2010). Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* *38*, 96–109.
- Klein, R.S., Recco, R.A., Catalano, M.T., Edberg, S.C., Casey, J.I., and Steigbigel, N.H. (1977). Association of *Streptococcus bovis* with carcinoma of the colon. *N. Engl. J. Med.* *297*, 800–802.
- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* *12*, 1–222.

- Knorr, R.L., Lipowsky, R., and Dimova, R. (2015). Autophagosome closure requires membrane scission. *Autophagy* *11*, 2134–2137.
- Knust, Z., and Schmidt, G. (2011). Cytotoxic Necrotizing Factors (CNFs)—A Growing Toxin Family. *Toxins* *2*, 116–127.
- Kostic, A.D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J.N., Gallini, C.A., Michaud, M., Clancy, T.E., Chung, D.C., Lochhead, P., Hold, G.L., et al. (2013). *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor immune microenvironment. *Cell Host Microbe* *14*, 207–215.
- Kreibich, S., Emmenlauer, M., Fredlund, J., Rämö, P., Münz, C., Dehio, C., Enninga, J., and Hardt, W.-D. (2015). Autophagy Proteins Promote Repair of Endosomal Membranes Damaged by the *Salmonella* Type Three Secretion System 1. *Cell Host Microbe* *18*, 527–537.
- Kruk, J., and Czerniak, U. (2013). Physical activity and its relation to cancer risk: updating the evidence. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* *14*, 3993–4003.
- Kubori, T., Bui, X.T., Hubber, A., and Nagai, H. (2017). *Legionella* RavZ Plays a Role in Preventing Ubiquitin Recruitment to Bacteria-Containing Vacuoles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *7*.
- Kucharzik, T., Lügering, N., Rautenberg, K., Lügering, A., Schmidt, M.A., Stoll, R., and Domschke, W. (2000). Role of M cells in intestinal barrier function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *915*, 171–183.
- Kune, G.A., and Vitetta, L. (1992). Alcohol consumption and the etiology of colorectal cancer: A review of the scientific evidence from 1957 to 1991. *Nutr. Cancer* *18*, 97–111.
- Kuusisto, E., Salminen, A., and Alafuzoff, I. (2001). Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. *Neuroreport* *12*, 2085–2090.
- Kyewski, B., and Klein, L. (2006). A central role for central tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 571–606.
- La Vecchia, C., Ferraroni, M., Mezzetti, M., Enard, L., Negri, E., Franceschi, S., and Decarli, A. (1996). Attributable risks for colorectal cancer in northern Italy. *Int. J. Cancer* *66*, 60–64.
- Ladoire, S., Enot, D., Senovilla, L., Chaix, M., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2016). Positive impact of autophagy in human breast cancer cells on local immunosurveillance. *Oncoimmunology* *5*.
- Lapaquette, P., Glasser, A.-L., Huett, A., Xavier, R.J., and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell. Microbiol.* *12*, 99–113.
- Lapaquette, P., Bringer, M.-A., and Darfeuille-Michaud, A. (2012). Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell. Microbiol.* *14*, 791–807.
- Larsen Haidle, J., and Howe, J.R. (1993). Juvenile Polyposis Syndrome. In *GeneReviews*®, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
- Lassen, K.G., Kuballa, P., Conway, K.L., Patel, K.K., Becker, C.E., Peloquin, J.M., Villablanca, E.J., Norman, J.M., Liu, T.-C., Heath, R.J., et al. (2014). Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 7741–7746.
- Lawley, T.D., Clare, S., Walker, A.W., Goulding, D., Stabler, R.A., Croucher, N., Mastroeni, P., Scott, P., Raisen, C., Mottram, L., et al. (2009). Antibiotic treatment of *clostridium difficile* carrier mice triggers a supershedder state, spore-mediated transmission, and severe disease in immunocompromised hosts. *Infect. Immun.* *77*, 3661–3669.
- Lazova, R., Klump, V., and Pawelek, J. (2010). Autophagy in cutaneous malignant melanoma. *J. Cutan. Pathol.* *37*, 256–268.
- Lee, C., Raffaghello, L., Brandhorst, S., Safdie, F.M., Bianchi, G., Martin-Montalvo, A., Pistoia, V., Wei, M., Hwang, S., Merlino, A., et al. (2012). Fasting Cycles Retard Growth of Tumors and Sensitize a Range of Cancer Cell Types to Chemotherapy. *Sci. Transl. Med.* *4*, 124ra27.
- Lenoir, M., Del Carmen, S., Cortes-Perez, N.G., Lozano-Ojalvo, D., Muñoz-Provencio, D., Chain, F., Langella, P., de Moreno de LeBlanc, A., LeBlanc, J.G., and Bermúdez-Humarán, L.G. (2016). *Lactobacillus casei* BL23 regulates Treg and Th17 T-cell populations and reduces DMH-associated colorectal cancer. *J. Gastroenterol.* *51*, 862–873.
- Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* *132*, 27–42.
- Lévy, J., Cacheux, W., Bara, M.A., L'Hermitte, A., Lepage, P., Fraudeau, M., Trentesaux, C., Lemarchand, J., Durand, A., Crain, A.-M., et al. (2015). Intestinal inhibition of Atg7 prevents tumour initiation through a microbiome-influenced immune response and suppresses tumour growth. *Nat. Cell Biol.* *17*, 1062–1073.
- Li, H., Liu, Q., Wang, Z., Fang, R., Shen, Y., Cai, X., Gao, Y., Li, Y., Zhang, X., and Ye, L. (2015a). The oncoprotein HBXIP modulates the feedback loop of MDM2/p53 to enhance the growth of breast cancer. *J. Biol. Chem.* *290*, 22649–22661.
- Li, P., Shi, J., He, Q., Hu, Q., Wang, Y.Y., Zhang, L.J., Chan, W.T., and Chen, W.-X. (2015b). *Streptococcus pneumoniae* induces autophagy through the inhibition of the PI3K-I/Akt/mTOR pathway and ROS hypergeneration in A549 cells. *PLoS One* *10*, e0122753.
- Li, W., Li, J., and Bao, J. (2012a). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *69*, 1125–1136.
- Li, X.-L., Zhou, J., Chen, Z.-R., and Chng, W.-J. (2015c). p53 mutations in colorectal cancer- molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J. Gastroenterol.* *WJG* *21*, 84–93.
- Li, Y., Kundu, P., Seow, S.W., Matos, D., Teixeira, C., Aronsson, L., Chin, K.C., Kärre, K., Pettersson, S., and Greicius, G. (2012b). Gut microbiota accelerate tumor growth via c-jun and STAT3 phosphorylation in APC Min/+ mice. *Carcinogenesis* *33*, 1231–1238.
- Li, Y.-Y., Ge, Q.-X., Cao, J., Zhou, Y.-J., Du, Y.-L., Shen, B., Wan, Y.-J.Y., and Nie, Y.-Q. (2016). Association of *Fusobacterium nucleatum* infection with colorectal cancer in Chinese patients. *World J. Gastroenterol.* *22*, 3227–3233.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* *402*, 672–676.
- Liberti, M.V., and Locasale, J.W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* *41*, 211–218.
- Lièvre, A., Blons, H., and Laurent-Puig, P. (2010). Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. *Oncogene* *29*, 3033–3043.
- Liu, E.Y., and Ryan, K.M. (2012). Autophagy and cancer--issues we need to digest. *J. Cell Sci.* *125*, 2349–2358.
- Liu, E.Y., Xu, N., O'Prey, J., Lao, L.Y., Joshi, S., Long, J.S., O'Prey, M., Croft, D.R., Beaumatin, F., Baudot, A.D., et al. (2015). Loss of autophagy causes a synthetic lethal deficiency in DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 773–778.
- Liu, H., He, Z., and Simon, H.-U. (2014). Autophagy suppresses melanoma tumorigenesis by inducing senescence. *Autophagy* *10*, 372–373.
- Lomonaco, S.L., Finnis, S., Xiang, C., DeCarvalho, A., Umansky, F., Kalkanis, S.N., Mikkelsen, T., and Brodie, C. (2009). The induction of autophagy by  $\gamma$ -radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. *Int. J. Cancer* *125*, 717–722.
- Louis, P., Hold, G.L., and Flint, H.J. (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat. Rev. Microbiol.* *12*, 661–672.

- Lu, S.-L., Kawabata, T., Cheng, Y.-L., Omori, H., Hamasaki, M., Kusaba, T., Iwamoto, R., Arimoto, H., Noda, T., Lin, Y.-S., et al. (2017). Endothelial cells are intrinsically defective in xenophagy of *Streptococcus pyogenes*. *PLoS Pathog.* *13*, e1006444.
- Lu, Y., Chen, J., Zheng, J., Hu, G., Wang, J., Huang, C., Lou, L., Wang, X., and Zeng, Y. (2016). Mucosal adherent bacterial dysbiosis in patients with colorectal adenomas. *Sci. Rep.* *6*, 26337.
- Lu, Z., Luo, R.Z., Lu, Y., Zhang, X., Yu, Q., Khare, S., Kondo, S., Kondo, Y., Yu, Y., Mills, G.B., et al. (2008). The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J. Clin. Invest.* *118*, 3917–3929.
- Lucas, C., Barnich, N., and Nguyen, H.T.T. (2017). Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Lv, L., Li, D., Zhao, D., Lin, R., Chu, Y., Zhang, H., Zha, Z., Liu, Y., Li, Z., Xu, Y., et al. (2011). Acetylation targets the M2 isoform of pyruvate kinase for degradation through chaperone-mediated autophagy and promotes tumor growth. *Mol. Cell* *42*, 719–730.
- Lv, Y., Ye, T., Wang, H.-P., Zhao, J.-Y., Chen, W.-J., Wang, X., Shen, C.-X., Wu, Y.-B., and Cai, Y.-K. (2017). Suppression of colorectal tumorigenesis by recombinant *Bacteroides fragilis* enterotoxin-2 in vivo. *World J. Gastroenterol.* *23*, 603–613.
- Ma, Y., Yang, Y., Wang, F., Zhang, P., Shi, C., Zou, Y., and Qin, H. (2013). Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review of Prospective Studies. *PLOS ONE* *8*, e53916.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* *17*, 9–26.
- Macpherson, A.J., and Harris, N.L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 478–485.
- Maddocks, O.D.K., Short, A.J., Donnenberg, M.S., Bader, S., and Harrison, D.J. (2009). Attaching and effacing *Escherichia coli* downregulate DNA mismatch repair protein *in vitro* and are associated with colorectal adenocarcinomas in humans. *PloS One* *4*, e5517.
- Maddocks, O.D.K., Scanlon, K.M., and Donnenberg, M.S. (2013). An *Escherichia coli* effector protein promotes host mutation via depletion of DNA mismatch repair proteins. *MBio* *4*, e00152-00113.
- Mäkkivuo, H., Tiihonen, K., Tynkkynen, S., Paulin, L., and Rautonen, N. (2010). The effect of age and non-steroidal anti-inflammatory drugs on human intestinal microbiota composition. *Br. J. Nutr.* *103*, 227–234.
- Man, S.M., and Kanneganti, T.-D. (2015). Regulation of inflammasome activation. *Immunol. Rev.* *265*, 6–21.
- Manfredi, J.J. (2010). The Mdm2–p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes Dev.* *24*, 1580–1589.
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimaraes, V., Sokol, H., Doré, J., Corthier, G., and Furet, J.-P. (2009). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* *9*, 123.
- Marinković, M., Šprung, M., Buljubašić, M., and Novak, I. (2018). Autophagy Modulation in Cancer: Current Knowledge on Action and Therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2018*, 8023821.
- Markman, B., Javier Ramos, F., Capdevila, J., and Taberero, J. (2010). EGFR and KRAS in colorectal cancer. *Adv. Clin. Chem.* *51*, 71–119.
- Marshman, E., Booth, C., and Potten, C.S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *24*, 91–98.
- Martin, H.M., Campbell, B.J., Hart, C.A., Mpofu, C., Nayar, M., Singh, R., Englyst, H., Williams, H.F., and Rhodes, J.M. (2004). Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* *127*, 80–93.
- Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C.M., Bray, K., Degenhardt, K., Chen, G., Jin, S., and White, E. (2007). Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.* *21*, 1367–1381.
- Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinis, C., et al. (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* *137*, 1062–1075.
- MATSUMOTO, M., INOUE, R., TSUKAHARA, T., USHIDA, K., CHIJI, H., MATSUBARA, N., and HARA, H. (2008). Voluntary Running Exercise Alters Microbiota Composition and Increases n-Butyrate Concentration in the Rat Cecum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *72*, 572–576.
- Mauro, M.O., Monreal, M.T.F.D., Silva, M.T.P., Pesarini, J.R., Mantovani, M.S., Ribeiro, L.R., Dichi, J.B., Carreira, C.M., and Oliveira, R.J. (2013). Evaluation of the antimutagenic and anticarcinogenic effects of inulin in vivo. *Genet. Mol. Res. GMR* *12*, 2281–2293.
- May, R.C., Hall, M.E., Higgs, H.N., Pollard, T.D., Chakraborty, T., Wehland, J., Machesky, L.M., and Sechi, A.S. (1999). The Arp2/3 complex is essential for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *Curr. Biol. CB* *9*, 759–762.
- Mazumder, T.H., Nath, S., Nath, N., and Kumar, M. (2014). Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Prognosis using molecular approach. *Cent. Eur. J. Biol.* *9*, 593–613.
- McCormick, T.S., and Weinberg, A. (2010). Epithelial cell-derived antimicrobial peptides are multifunctional agents that bridge innate and adaptive immunity. *Periodontol.* *2000* *54*, 195–206.
- McCOY, W.C., and Mason, J.M. (1951). Enterococcal endocarditis associated with carcinoma of the sigmoid; report of a case. *J. Med. Assoc. State Ala.* *21*, 162–166.
- McCoy, A.N., Araújo-Pérez, F., Azcárate-Peril, A., Yeh, J.J., Sandler, R.S., and Keku, T.O. (2013). *Fusobacterium* Is Associated with Colorectal Adenomas. *PLoS ONE* *8*.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W.T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., et al. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 1263–1284.
- Medina, P.P., Nolde, M., and Slack, F.J. (2010). OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* *467*, 86–90.
- Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., and Codogno, P. (2010). Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: an overview. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *298*, C776–C785.
- de Meij, T.G., Larbi, I.B., van der Schee, M.P., Lentferink, Y.E., Paff, T., Terhaar Sive Droste, J.S., Mulder, C.J., van Bodegraven, A.A., and de Boer, N.K. (2014). Electronic nose can discriminate colorectal carcinoma and advanced adenomas by fecal volatile biomarker analysis: proof of principle study. *Int. J. Cancer* *134*, 1132–1138.
- Meira, L.B., Bugni, J.M., Green, S.L., Lee, C.-W., Pang, B., Borenshtein, D., Rickman, B.H., Rogers, A.B., Moroski-Erkul, C.A., McFaline, J.L., et al. (2008). DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 2516–2525.
- Mellitzer, G., Beucher, A., Lobstein, V., Michel, P., Robine, S., Kedinger, M., and Gradwohl, G. (2010). Loss of enteroendocrine cells in mice alters lipid absorption and glucose homeostasis and impairs postnatal survival. *J. Clin. Invest.* *120*, 1708–1721.
- van de Merwe, J.P., Stegeman, J.H., and Hazenberg, M.P. (1983). The resident faecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for Crohn's disease? *Antonie Van Leeuwenhoek* *49*, 119–124.

- Mima, K., Cao, Y., Chan, A.T., Qian, Z.R., Nowak, J.A., Masugi, Y., Shi, Y., Song, M., da Silva, A., Gu, M., et al. (2016). Fusobacterium nucleatum in Colorectal Carcinoma Tissue According to Tumor Location. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 7, e200.
- Miraglia, A.G., Travaglione, S., Meschini, S., Falzano, L., Matarrese, P., Quaranta, M.G., Viora, M., Fiorentini, C., and Fabbri, A. (2007). Cytotoxic Necrotizing Factor 1 Prevents Apoptosis via the Akt/I $\kappa$ B Kinase Pathway: Role of Nuclear Factor- $\kappa$ B and Bcl-2. *Mol. Biol. Cell* 18, 2735–2744.
- Mirza, N.N., McCloud, J.M., and Cheetham, M.J. (2009). *Clostridium septicum* sepsis and colorectal cancer - a reminder. *World J. Surg. Oncol.* 7, 73.
- Mizushima, N. (2005). The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ.* 12 Suppl 2, 1535–1541.
- Mizushima, N. (2018). A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat. Cell Biol.* 20, 521–527.
- Mizushima, N., and Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat. Cell Biol.* 12, 823–830.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395–398.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* 27, 421–429.
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.* 116, 1679–1688.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2004). In Vivo Analysis of Autophagy in Response to Nutrient Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosome Marker. *Mol. Biol. Cell* 15, 1101–1111.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 107–132.
- Modi, S.R., Collins, J.J., and Relman, D.A. (2014). Antibiotics and the gut microbiota. *J. Clin. Invest.* 124, 4212–4218.
- Molloy, S. (2012). Bacterial pathogenicity: A competent escape for *Listeria*.
- Monleón, D., Morales, J.M., Barrasa, A., López, J.A., Vázquez, C., and Celda, B. (2009). Metabolite profiling of fecal water extracts from human colorectal cancer. *NMR Biomed.* 22, 342–348.
- Moore, W.E., and Moore, L.H. (1995). Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3202–3207.
- Moscat, J., and Diaz-Meco, M.T. (2009). p62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. *Cell* 137, 1001–1004.
- Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247, 322–324.
- Mostowy, S., Sancho-Shimizu, V., Hamon, M.A., Simeone, R., Brosch, R., Johansen, T., and Cossart, P. (2011). p62 and NDP52 proteins target intracytosolic *Shigella* and *Listeria* to different autophagy pathways. *J. Biol. Chem.* 286, 26987–26995.
- Mousa, J.J., Yang, Y., Tomkovich, S., Shima, A., Newsome, R.C., Tripathi, P., Oswald, E., Bruner, S.D., and Jobin, C. (2016). MATE transport of the *E. coli*-derived genotoxin colibactin. *Nat. Microbiol.* 1, 15009.
- Mowers, E.E., Sharifi, M.N., and Macleod, K.F. (2016). Novel insights into how autophagy regulates tumor cell motility. *Autophagy* 12, 1679–1680.
- Mowers, E.E., Sharifi, M.N., and Macleod, K.F. (2017). Autophagy in cancer metastasis. *Oncogene* 36, 1619–1630.
- Mühlbauer, M., Allard, B., Bosserhoff, A.K., Kiessling, S., Herfarth, H., Rogler, G., Schölmerich, J., Jobin, C., and Hellerbrand, C. (2004). Differential effects of deoxycholic acid and taurodeoxycholic acid on NF-kappa B signal transduction and IL-8 gene expression in colonic epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286, G1000-1008.
- Muller, S. (2017). Autophagie, auto-immunité et maladies auto-immunes. *médecine/sciences* 33, 319–327.
- Müller, A., Giuffrè, G., Edmonston, T.B., Mathiak, M., Roggendorf, B., Heinmöller, E., Brodegger, T., Tuccari, G., Mangold, E., Buettner, R., et al. (2004). Challenges and pitfalls in HNPCC screening by microsatellite analysis and immunohistochemistry. *J. Mol. Diagn. JMD* 6, 308–315.
- Münz, C. (2010). Antigen processing via autophagy--not only for MHC class II presentation anymore? *Curr. Opin. Immunol.* 22, 89–93.
- Nakahira, K., Haspel, J.A., Rathinam, V.A.K., Lee, S.-J., Dolinay, T., Lam, H.C., Englert, J.A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H.P., et al. (2011). Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* 12, 222–230.
- Narahara, H., Tatsuta, M., Iishi, H., Baba, M., Uedo, N., Sakai, N., Yano, H., and Ishiguro, S. (2000). K-ras point mutation is associated with enhancement by deoxycholic acid of colon carcinogenesis induced by azoxymethane, but not with its attenuation by all-trans-retinoic acid. *Int. J. Cancer* 88, 157–161.
- Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N., and Klein, L. (2008). Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* 455, 396–400.
- Netea-Maier, R.T., Plantinga, T.S., van de Veerdonk, F.L., Smit, J.W., and Netea, M.G. (2016). Modulation of inflammation by autophagy: Consequences for human disease. *Autophagy* 12, 245–260.
- Nguyen, H.T.T., Dalmaso, G., Torkvist, L., Halfvarson, J., Yan, Y., Laroui, H., Shmerling, D., Tallone, T., D’Amato, M., Sitaraman, S.V., et al. (2011). CD98 expression modulates intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 1733–1747.
- Nguyen, H.T.T., Dalmaso, G., Müller, S., Carrière, J., Seibold, F., and Darfeuille-Michaud, A. (2014). Crohn’s disease-associated adherent invasive *Escherichia coli* modulate levels of microRNAs in intestinal epithelial cells to reduce autophagy. *Gastroenterology* 146, 508–519.
- Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2009). Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* 461, 654–658.
- Nishikawa, T., Tsuno, N.H., Okaji, Y., Sunami, E., Shuno, Y., Sasaki, K., Hongo, K., Kaneko, M., Hiyoshi, M., Kawai, K., et al. (2010). The inhibition of autophagy potentiates anti-angiogenic effects of sulforaphane by inducing apoptosis. *Angiogenesis* 13, 227–238.
- Nougayrède, J.-P., Taieb, F., De Rycke, J., and Oswald, E. (2005). Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends Microbiol.* 13, 103–110.
- Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., and Oswald, E. (2006). *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 313, 848–851.
- O’Hara, A.M., and Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7, 688–693.
- Obiso, R.J., Azghani, A.O., and Wilkins, T.D. (1997). The *Bacteroides fragilis* toxin fragilysin disrupts the paracellular barrier of epithelial cells. *Infect. Immun.* 65, 1431–1439.

- Ocvirk, S., and O'Keefe, S.J. (2017). Influence of Bile Acids on Colorectal Cancer Risk: Potential Mechanisms Mediated by Diet - Gut Microbiota Interactions. *Curr. Nutr. Rep.* 6, 315–322.
- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., and Sasakawa, C. (2005). Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science* 307, 727–731.
- Oswald, E., Nougayrède, J.-P., Taieb, F., and Sugai, M. (2005). Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 83–91.
- Pankiv, S., Lamark, T., Bruun, J.-A., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2010). Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *J. Biol. Chem.* 285, 5941–5953.
- Park, J., Kotani, T., Konno, T., Setiawan, J., Kitamura, Y., Imada, S., Usui, Y., Hatano, N., Shinohara, M., Saito, Y., et al. (2016). Promotion of Intestinal Epithelial Cell Turnover by Commensal Bacteria: Role of Short-Chain Fatty Acids. *PLoS ONE* 11.
- Patingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927–939.
- Payne, C.M., Weber, C., Crowley-Skillicorn, C., Dvorak, K., Bernstein, H., Bernstein, C., Holubec, H., Dvorakova, B., and Garewal, H. (2007). Deoxycholate induces mitochondrial oxidative stress and activates NF-κB through multiple mechanisms in HCT-116 colon epithelial cells. *Carcinogenesis* 28, 215–222.
- Payros, D., Dobrindt, U., Martin, P., Secher, T., Bracarense, A.P.F.L., Boury, M., Laffitte, J., Pinton, P., Oswald, E., and Oswald, I.P. (2017). The Food Contaminant Deoxynivalenol Exacerbates the Genotoxicity of Gut Microbiota. *MBio* 8, e00007-17.
- Pericleous, M., Mandair, D., and Caplin, M.E. (2013). Diet and supplements and their impact on colorectal cancer. *J. Gastrointest. Oncol.* 4, 409–423.
- Peters, U., McGlynn, K.A., Chatterjee, N., Gunter, E., Garcia-Closas, M., Rothman, N., and Sinha, R. (2001). Vitamin D, calcium, and vitamin D receptor polymorphism in colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 10, 1267–1274.
- Piao, J., Nakatsu, Y., Ohno, M., Taguchi, K., and Tsuzuki, T. (2013). Mismatch Repair Deficient Mice Show Susceptibility to Oxidative Stress-Induced Intestinal Carcinogenesis. *Int. J. Biol. Sci.* 10, 73–79.
- Pietrocola, F., Pol, J., Vacchelli, E., Rao, S., Enot, D.P., Baracco, E.E., Levesque, S., Castoldi, F., Jacquelot, N., Yamazaki, T., et al. (2016). Caloric Restriction Mimetics Enhance Anticancer Immunosurveillance. *Cancer Cell* 30, 147–160.
- Pino, M.S., and Chung, D.C. (2010). THE CHROMOSOMAL INSTABILITY PATHWAY IN COLON CANCER. *Gastroenterology* 138, 2059–2072.
- Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., and Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob. Health* 4, e609-616.
- Prorok-Hamon, M., Friswell, M.K., Alswied, A., Roberts, C.L., Song, F., Flanagan, P.K., Knight, P., Codling, C., Marchesi, J.R., Winstanley, C., et al. (2014). Colonic mucosa-associated diffusely adherent afaC+ *Escherichia coli* expressing lpfA and pks are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut* 63, 761–770.
- Pua, H.H., Dzhagalov, I., Chuck, M., Mizushima, N., and He, Y.-W. (2007). A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *J. Exp. Med.* 204, 25–31.
- Pua, H.H., Guo, J., Komatsu, M., and He, Y.-W. (2009). Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 4046–4055.
- Purcell, R.V., Pearson, J., Aitchison, A., Dixon, L., Frizelle, F.A., and Keenan, J.I. (2017). Colonization with enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* is associated with early-stage colorectal neoplasia. *PLoS ONE* 12.
- Qamar, T.R., Syed, F., Nasir, M., Rehman, H., Zahid, M.N., Liu, R.H., and Iqbal, S. (2016). Novel Combination of Prebiotics Galacto-Oligosaccharides and Inulin-Inhibited Aberrant Crypt Foci Formation and Biomarkers of Colon Cancer in Wistar Rats. *Nutrients* 8.
- Qiao, D., Gaitonde, S.V., Qi, W., and Martinez, J.D. (2001). Deoxycholic acid suppresses p53 by stimulating proteasome-mediated p53 protein degradation. *Carcinogenesis* 22, 957–964.
- Raisch, J., Buc, E., Bonnet, M., Sauvanet, P., Vazeille, E., de Vallée, A., Déchelotte, P., Darcha, C., Pezet, D., Bonnet, R., et al. (2014). Colon cancer-associated B2 *Escherichia coli* colonize gut mucosa and promote cell proliferation. *World J. Gastroenterol.* 20, 6560–6572.
- Rao, S.G., and Jackson, J.G. (2016). SASP: Tumor Suppressor or Promoter? Yes! *Trends Cancer* 2, 676–687.
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Myers, G.S.A., Mongodin, E.F., Fricke, W.F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebahia, M., Thomson, N.R., Chaudhuri, R., et al. (2008). The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J. Bacteriol.* 190, 6881–6893.
- Rathinam, V.A.K., Vanaja, S.K., and Fitzgerald, K.A. (2012). Regulation of inflammasome signaling. *Nat. Immunol.* 13, 333–342.
- Reuter, C., Alzheimer, M., Walles, H., and Oelschlaeger, T.A. (2018). An adherent mucus layer attenuates the genotoxic effect of colibactin. *Cell. Microbiol.* 20, e12812.
- Rich, K.A., Burkett, C., and Webster, P. (2003). Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cell. Microbiol.* 5, 455–468.
- Riegler, M., Lotz, M., Sears, C., Pothoulakis, C., Castagliuolo, I., Wang, C.C., Sedivy, R., Sogukoglu, T., Cosentini, E., Bischof, G., et al. (1999). *Bacteroides fragilis* toxin 2 damages human colonic mucosa in vitro. *Gut* 44, 504–510.
- Rikihisa, Y. (1984). Glycogen autophagosomes in polymorphonuclear leukocytes induced by rickettsiae. *Anat. Rec.* 208, 319–327.
- Robbins, J.R., Monack, D., McCallum, S.J., Vegas, A., Pham, E., Goldberg, M.B., and Theriot, J.A. (2001). The making of a gradient: IcsA (VirG) polarity in *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* 41, 861–872.
- Roberts, P., Moshitch-Moshkovitz, S., Kvam, E., O'Toole, E., Winey, M., and Goldfarb, D.S. (2003). Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 14, 129–141.
- Roca-Saavedra, P., Mendez-Vilabrille, V., Miranda, J.M., Nebot, C., Cardelle-Cobas, A., Franco, C.M., and Cepeda, A. (2018). Food additives, contaminants and other minor components: effects on human gut microbiota—a review. *J. Physiol. Biochem.* 74, 69–83.
- Rodgers, K., and McVey, M. (2016). Error-Prone Repair of DNA Double-Strand Breaks. *J. Cell. Physiol.* 231, 15–24.
- Rostom, A., Dubé, C., Lewin, G., Tsertsvadze, A., Barrowman, N., Code, C., Sampson, M., Moher, D., and U.S. Preventive Services Task Force (2007). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med.* 146, 376–389.
- Rouschop, K.M.A., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W., et al. (2010). The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J. Clin. Invest.* 120, 127–141.
- Routy, B., Chatelier, E.L., Derosa, L., Duong, C.P.M., Alou, M.T., Daillère, R., Fluckiger, A., Messaoudene, M., Rauber, C., Roberti, M.P., et al. (2018). Gut microbiome influences efficacy of PD-1–based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* 359, 91–97.



- Rubinstein, M.R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., and Han, Y.W. (2013). *Fusobacterium nucleatum* Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Signaling via its FadA Adhesin. *Cell Host Microbe* 14, 195–206.
- Rubinsztein, D.C., Shpilka, T., and Elazar, Z. (2012). Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr. Biol.* CB 22, R29–34.
- Ruiz, P.A., Shkoda, A., Kim, S.C., Sartor, R.B., and Haller, D. (2005). IL-10 gene-deficient mice lack TGF- $\beta$ /Smad signaling and fail to inhibit proinflammatory gene expression in intestinal epithelial cells after the colonization with colitogenic *Enterococcus faecalis*. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 174, 2990–2999.
- Ruiz, P.A., Shkoda, A., Kim, S.C., Sartor, R.B., and Haller, D. (2006). IL-10 gene-deficient mice lack TGF- $\beta$ /Smad-mediated TLR2 degradation and fail to inhibit proinflammatory gene expression in intestinal epithelial cells under conditions of chronic inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1072, 389–394.
- Rupnik, M., Wilcox, M.H., and Gerding, D.N. (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 526–536.
- Russell, R.C., Yuan, H.-X., and Guan, K.-L. (2014). Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res.* 24, 42–57.
- Russo, A., Bazan, V., Iacopetta, B., Kerr, D., Soussi, T., Gebbia, N., and TP53-CRC Collaborative Study Group (2005). The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 7518–7528.
- Rusten, T.E., and Simonsen, A. (2008). ESCRT functions in autophagy and associated disease. *Cell Cycle Georget. Tex* 7, 1166–1172.
- Ryan-Harshman, M., and Aldoori, W. (2007). Diet and colorectal cancer. *Can. Fam. Physician* 53, 1913–1920.
- Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M.H., Uematsu, S., Yang, B.-G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., et al. (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nature* 456, 264–268.
- Saitoh, T., Fujita, N., Hayashi, T., Takahara, K., Satoh, T., Lee, H., Matsunaga, K., Kageyama, S., Omori, H., Noda, T., et al. (2009). Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20842–20846.
- Sakai, Y., Koller, A., Rangell, L.K., Keller, G.A., and Subramani, S. (1998). Peroxisome Degradation by Microautophagy in *Pichia pastoris*: Identification of Specific Steps and Morphological Intermediates. *J. Cell Biol.* 141, 625–636.
- Sakitani, K., Hirata, Y., Hikiba, Y., Hayakawa, Y., Ihara, S., Suzuki, H., Suzuki, N., Serizawa, T., Kinoshita, H., Sakamoto, K., et al. (2015). Inhibition of autophagy exerts anti-colon cancer effects via apoptosis induced by p53 activation and ER stress. *BMC Cancer* 15.
- Sakurai, A., Maruyama, F., Funao, J., Nozawa, T., Aikawa, C., Okahashi, N., Shintani, S., Hamada, S., Ooshima, T., and Nakagawa, I. (2010). Specific behavior of intracellular *Streptococcus pyogenes* that has undergone autophagic degradation is associated with bacterial streptolysin O and host small G proteins Rab5 and Rab7. *J. Biol. Chem.* 285, 22666–22675.
- Samuels, Y., and Ericson, K. (2006). Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 18, 77–82.
- Sandhu, M.S., White, I.R., and McPherson, K. (2001). Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 10, 439–446.
- Sartor, R.B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134, 577–594.
- Sasaki, K., Tsuno, N.H., Sunami, E., Kawai, K., Hongo, K., Hiyoshi, M., Kaneko, M., Murono, K., Tada, N., Nirei, T., et al. (2012). Resistance of colon cancer to 5-fluorouracil may be overcome by combination with chloroquine, an in vivo study. *Anticancer. Drugs* 23, 675–682.
- Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415–418.
- Savin, Z., Kivity, S., Yonath, H., and Yehuda, S. (2018). Smoking and the intestinal microbiome. *Arch. Microbiol.* 200, 677–684.
- Schmid, D., and Münz, C. (2007). Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* 27, 11–21.
- Schnupf, P., Gaboriau-Routhiau, V., Gros, M., Friedman, R., Moya-Nilges, M., Nigro, G., Cerf-Bensussan, N., and Sansonetti, P.J. (2015). Growth and host interaction of mouse segmented filamentous bacteria in vitro. *Nature* 520, 99–103.
- Schonewolf, C.A., Mehta, M., Schiff, D., Wu, H., Haffty, B.G., Karantz, V., and Jabbour, S.K. (2014). Autophagy inhibition by chloroquine sensitizes HT-29 colorectal cancer cells to concurrent chemoradiation. *World J. Gastrointest. Oncol.* 6, 74–82.
- Schottenfeld, D., and Beebe-Dimmer, J. (2015). The cancer burden attributable to biologic agents. *Ann. Epidemiol.* 25, 183–187.
- Schwabe, R.F., and Jobin, C. (2013). The microbiome and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13, 800–812.
- Sears, C.L. (2001). The toxins of *Bacteroides fragilis*. *Toxicol. Off. J. Int. Soc. Toxicology* 39, 1737–1746.
- Sears, C.L., and Garrett, W.S. (2014). Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host Microbe* 15, 317–328.
- Secher, T., Samba-Louaka, A., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2013). *Escherichia coli* producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. *PLoS One* 8, e77157.
- Seekatz, A.M., Rao, K., Santhosh, K., and Young, V.B. (2016). Dynamics of the fecal microbiome in patients with recurrent and nonrecurrent *Clostridium difficile* infection. *Genome Med.* 8, 47.
- Seitz, H.K., and Becker, P. (2007). Alcohol Metabolism and Cancer Risk. *Alcohol Res. Health* 30, 38–47.
- Seiwert, N., Neitzel, C., Stroh, S., Frisan, T., Audebert, M., Toulany, M., Kaina, B., and Fahrner, J. (2017). AKT2 suppresses pro-survival autophagy triggered by DNA double-strand breaks in colorectal cancer cells. *Cell Death Dis.* 8, e3019.
- Serafin, V., Persano, L., Moserle, L., Esposito, G., Ghisi, M., Curtarello, M., Bonanno, L., Masiero, M., Ribatti, D., Stürzl, M., et al. (2011). Notch3 signalling promotes tumour growth in colorectal cancer. *J. Pathol.* 224, 448–460.
- Seraj, M.J., Umemoto, A., Kajikawa, A., Mimura, S., Kinouchi, T., Ohnishi, Y., and Monden, Y. (1997). Effects of dietary bile acids on formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in F344 rats. *Cancer Lett.* 115, 97–103.
- Shaid, S., Brandts, C.H., Serve, H., and Dikic, I. (2013). Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ.* 20, 21–30.
- Shaw, S.Y., Blanchard, J.F., and Bernstein, C.N. (2010). Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 2687–2692.
- Shi, C.-S., Shenderov, K., Huang, N.-N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K.A., Sher, A., and Kehrl, J.H. (2012). Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat. Immunol.* 13, 255–263.
- Singh, S.B., Davis, A.S., Taylor, G.A., and Deretic, V. (2006). Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular *mycobacteria*. *Science* 313, 1438–1441.
- Singh, S.S., Vats, S., Chia, A.Y.-Q., Tan, T.Z., Deng, S., Ong, M.S., Arfuso, F., Yap, C.T., Goh, B.C., Sethi, G., et al. (2018). Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene* 37, 1142–1158.
- Sinha, S., and Levine, B. (2008). The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* 27 Suppl 1, S137–148.

- Sivan, A., Corrales, L., Hubert, N., Williams, J.B., Aquino-Michaels, K., Earley, Z.M., Benyamin, F.W., Lei, Y.M., Jabri, B., Alegre, M.-L., et al. (2015). Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* 350, 1084–1089.
- Sivaprakasam, S., Prasad, P.D., and Singh, N. (2016). Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharmacol. Ther.* 164, 144–151.
- Sobhani, I., Tap, J., Roudot-Thoraval, F., Roperch, J.P., Letulle, S., Langella, P., Corthier, G., Tran Van Nhieu, J., and Furet, J.P. (2011). Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PloS One* 6, e16393.
- Sousa, C.P. (2006). The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 12, 363–373.
- Starr, T., Child, R., Wehrly, T.D., Hansen, B., Hwang, S., López-Otin, C., Virgin, H.W., and Celli, J. (2012). Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell Host Microbe* 11, 33–45.
- Stephenson, L.M., Miller, B.C., Ng, A., Eisenberg, J., Zhao, Z., Cadwell, K., Graham, D.B., Mizushima, N.N., Xavier, R., Virgin, H.W., et al. (2009). Identification of Atg5-dependent transcriptional changes and increases in mitochondrial mass in Atg5-deficient T lymphocytes. *Autophagy* 5, 625–635.
- Stewart, C.J., Auchtung, T.A., Ajami, N.J., Velasquez, K., Smith, D.P., De La Garza, R., Salas, R., and Petrosino, J.F. (2018). Effects of tobacco smoke and electronic cigarette vapor exposure on the oral and gut microbiota in humans: a pilot study. *PeerJ* 6.
- Stroupe, C. (2011). Autophagy: cells SNARE selves. *Curr. Biol. CB* 21, R697-699.
- Sun, Y., and O’Riordan, M.X.D. (2013). Regulation of Bacterial Pathogenesis by Intestinal Short-Chain Fatty Acids. *Adv. Appl. Microbiol.* 85, 93–118.
- Suzuki, K., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2004). Interrelationships among Atg proteins during autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Chichester Engl.* 21, 1057–1065.
- Swidsinski, A., Khilkin, M., Kerjaschki, D., Schreiber, S., Ortner, M., Weber, J., and Lochs, H. (1998). Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology* 115, 281–286.
- Taieb, F., Nougayrède, J.-P., and Oswald, E. (2011). Cycle Inhibiting Factors (Cifs): Cyclomodulins That Usurp the Ubiquitin-Dependent Degradation Pathway of Host Cells. *Toxins* 3, 356–368.
- Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H.D., Sun, M., Sato, Y., Liang, C., Jung, J.U., Cheng, J.Q., Mulé, J.J., et al. (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* 9, 1142–1151.
- Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K., and Mizushima, N. (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* 25, 795–800.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820.
- Tal, M.C., Sasai, M., Lee, H.K., Yordy, B., Shadel, G.S., and Iwasaki, A. (2009). Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2770–2775.
- Tal, S., Melzer, E., Chsherbakov, T., and Malnick, S. (2014). Metabolic syndrome is associated with increased prevalence of advanced colorectal polyps. *J. Nutr. Health Aging* 18, 22–25.
- Tan, Q., Wang, M., Yu, M., Zhang, J., Bristow, R.G., Hill, R.P., and Tannock, I.F. (2016). Role of Autophagy as a Survival Mechanism for Hypoxic Cells in Tumors. *Neoplasia N. Y. N* 18, 347–355.
- Tang, B., Wang, K., Jia, Y., Zhu, P., Fang, Y., Zhang, Z., Mao, X., Li, Q., and Zeng, D.-Z. (2016). *Fusobacterium nucleatum*-Induced Impairment of Autophagic Flux Enhances the Expression of Proinflammatory Cytokines via ROS in Caco-2 Cells. *PLoS ONE* 11.
- Tanida, I., Mizushima, N., Kiyooka, M., Ohsumi, M., Ueno, T., Ohsumi, Y., and Kominami, E. (1999). Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol. Biol. Cell* 10, 1367–1379.
- Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D’Amelio, M., Criollo, A., Morselli, E., Zhu, C., Harper, F., et al. (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat. Cell Biol.* 10, 676–687.
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., and Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2101-2114.e5.
- Teter, S.A., Eggerton, K.P., Scott, S.V., Kim, J., Fischer, A.M., and Klionsky, D.J. (2001). Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase. *J. Biol. Chem.* 276, 2083–2087.
- Thompson, L.M., Aiken, C.T., Kaltenbach, L.S., Agrawal, N., Illes, K., Khoshnan, A., Martinez-Vincente, M., Arrasate, M., O’Rourke, J.G., Khashwji, H., et al. (2009). IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *J. Cell Biol.* 187, 1083–1099.
- Tian, Y., Xu, Q., Sun, L., Ye, Y., and Ji, G. (2018). Short-chain fatty acids administration is protective in colitis-associated colorectal cancer development. *J. Nutr. Biochem.* 57, 103–109.
- Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J.R., and Dutilh, B.E. (2012). A bacterial driver–passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 575–582.
- Tomkovich, S., Yang, Y., Winglee, K., Gauthier, J., Mühlbauer, M., Sun, X., Mohamadzadeh, M., Liu, X., Martin, P., Wang, G.P., et al. (2017). Locoregional Effects of Microbiota in a Preclinical Model of Colon Carcinogenesis. *Cancer Res.* 77, 2620–2632.
- Toprak, N.U., Yagci, A., Gulluoglu, B.M., Akin, M.L., Demirkalem, P., Celenk, T., and Soyletir, G. (2006). A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12, 782–786.
- Travassos, L.H., Carneiro, L.A.M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.-G., Magalhães, J.G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., et al. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* 11, 55–62.
- Tronnet, S., Garcie, C., Rehm, N., Dobrindt, U., Oswald, E., and Martin, P. (2016). Iron Homeostasis Regulates the Genotoxicity of *Escherichia coli* That Produces Colibactin. *Infect. Immun.* 84, 3358–3368.
- Tronnet, S., Garcie, C., Brachmann, A.O., Piel, J., Oswald, E., and Martin, P. (2017). High iron supply inhibits the synthesis of the genotoxin colibactin by pathogenic *Escherichia coli* through a non-canonical Fur/RyhB-mediated pathway. *Pathog. Dis.* 75.
- Tsuchiya, M., Ogawa, H., Koujin, T., Mori, C., Osakada, H., Kobayashi, S., Hiraoka, Y., and Haraguchi, T. (2018). p62/SQSTM1 promotes rapid ubiquitin conjugation to target proteins after endosome rupture during xenophagy. *FEBS Open Bio* 8, 470–480.
- Tsuruya, A., Kuwahara, A., Saito, Y., Yamaguchi, H., Tsubo, T., Suga, S., Inai, M., Aoki, Y., Takahashi, S., Tsutsumi, E., et al. (2016). Ecophysiological consequences of alcoholism on human gut microbiota: implications for ethanol-related pathogenesis of colon cancer. *Sci. Rep.* 6, 27923.
- Tumbarello, D.A., Waxse, B.J., Arden, S.D., Bright, N.A., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2012). Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat. Cell Biol.* 14, 1024–1035.
- Umar, S. (2010). Intestinal Stem Cells. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12, 340–348.

- Vadysirisack, D.D., and Ellisen, L.W. (2012). mTOR activity under hypoxia. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 821, 45–58.
- Vandal, O.H., Pierini, L.M., Schnappinger, D., Nathan, C.F., and Ehrh, S. (2008). A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Med.* 14, 849–854.
- Vannucci, L., Stepankova, R., Kozakova, H., Fiserova, A., Rossmann, P., and Tlaskalova-Hogenova, H. (2008). Colorectal carcinogenesis in germ-free and conventionally reared rats: different intestinal environments affect the systemic immunity. *Int. J. Oncol.* 32, 609–617.
- Vázquez, C.L., and Colombo, M.I. (2010). *Coxiella burnetii* modulates Beclin 1 and Bcl-2, preventing host cell apoptosis to generate a persistent bacterial infection. *Cell Death Differ.* 17, 421–438.
- Vera-Ramirez, L., Vodnala, S.K., Nini, R., Hunter, K.W., and Green, J.E. (2018). Autophagy promotes the survival of dormant breast cancer cells and metastatic tumour recurrence. *Nat. Commun.* 9, 1944.
- Vergne, I., Chua, J., Singh, S.B., and Deretic, V. (2004). Cell biology of *mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 367–394.
- Verlhac, P., Grégoire, I.P., Azocar, O., Petkova, D.S., Baguet, J., Viret, C., and Faure, M. (2015). Autophagy receptor NDP52 regulates pathogen-containing autophagosome maturation. *Cell Host Microbe* 17, 515–525.
- Vétizou, M., Pitt, J.M., Daillère, R., Lepage, P., Waldschmitt, N., Flament, C., Rusakiewicz, S., Routy, B., Roberti, M.P., Duong, C.P.M., et al. (2015). Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* 350, 1079–1084.
- Vigié, P., and Camougrand, N. (2017). Mitophagie et contrôle qualité des mitochondries. *médecine/sciences* 33, 231–237.
- Viljoen, K.S., Dakshinamurthy, A., Goldberg, P., and Blackburn, J.M. (2015). Quantitative profiling of colorectal cancer-associated bacteria reveals associations between fusobacterium spp., enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) and clinicopathological features of colorectal cancer. *PLoS One* 10, e0119462.
- Villéger, R., Lopès, A., Veziat, J., Gagnière, J., Barnich, N., Billard, E., Boucher, D., and Bonnet, M. (2018). Microbial markers in colorectal cancer detection and/or prognosis. *World J. Gastroenterol.* 24, 2327–2347.
- Vinson, K.E., George, D.C., Fender, A.W., Bertrand, F.E., and Sigounas, G. (2016). The Notch pathway in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 138, 1835–1842.
- Vizcaino, M.I., and Crawford, J.M. (2015). The colibactin warhead crosslinks DNA. *Nat. Chem.* 7, 411–417.
- Vizcaino, M.I., Engel, P., Trautman, E., and Crawford, J.M. (2014). Comparative Metabolomics and Structural Characterizations Illuminate Colibactin Pathway-Dependent Small Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 9244–9247.
- Wallace, B.D., Wang, H., Lane, K.T., Scott, J.E., Orans, J., Koo, J.S., Venkatesh, M., Jobin, C., Yeh, L.-A., Mani, S., et al. (2010). Alleviating Cancer Drug Toxicity by Inhibiting a Bacterial Enzyme. *Science* 330, 831–835.
- Walter, V., Jansen, L., Knebel, P., Chang-Claude, J., Hoffmeister, M., and Brenner, H. (2017). Physical activity and survival of colorectal cancer patients: Population-based study from Germany. *Int. J. Cancer.*
- Wang, D., and DuBois, R.N. (2010). The Role of COX-2 in Intestinal Inflammation and Colorectal Cancer. *Oncogene* 29, 781–788.
- Wang, X., and Huycke, M.M. (2007). Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* promotes chromosomal instability in mammalian cells. *Gastroenterology* 132, 551–561.
- Wang, H.-B., Wang, P.-Y., Wang, X., Wan, Y.-L., and Liu, Y.-C. (2012a). Butyrate Enhances Intestinal Epithelial Barrier Function via Up-Regulation of Tight Junction Protein Claudin-1 Transcription. *Dig. Dis. Sci.* 57, 3126–3135.
- Wang, R.C., Wei, Y., An, Z., Zou, Z., Xiao, G., Bhagat, G., White, M., Reichelt, J., and Levine, B. (2012b). Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science* 338, 956–959.
- Wang, T., Cai, G., Qiu, Y., Fei, N., Zhang, M., Pang, X., Jia, W., Cai, S., and Zhao, L. (2012c). Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J.* 6, 320–329.
- Wang, W.-S., Lin, J.-K., Chiou, T.-J., Liu, J.-H., Fan, F.S., Yen, C.-C., Lin, T.-C., Jiang, J.-K., Yang, S.-H., Wang, H.-S., et al. (2002). CA19-9 as the most significant prognostic indicator of metastatic colorectal cancer. *Hepatogastroenterology.* 49, 160–164.
- Wang, X., Yang, Y., and Huycke, M.M. (2015). Commensal bacteria drive endogenous transformation and tumour stem cell marker expression through a bystander effect. *Gut* 64, 459–468.
- Wang, X., Yang, Y., and Huycke, M.M. (2017). Commensal-infected macrophages induce dedifferentiation and reprogramming of epithelial cells during colorectal carcinogenesis. *Oncotarget* 8, 102176–102190.
- Wang, Y., Zhang, N., Zhang, L., Li, R., Fu, W., Ma, K., Li, X., Wang, L., Wang, J., Zhang, H., et al. (2016). Autophagy Regulates Chromatin Ubiquitination in DNA Damage Response through Elimination of SQSTM1/p62. *Mol. Cell* 63, 34–48.
- Watson, R.O., Manzanillo, P.S., and Cox, J.S. (2012). Extracellular *M. tuberculosis* DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell* 150, 803–815.
- Weaver, G.A., Krause, J.A., Miller, T.L., and Wolin, M.J. (1988). Short chain fatty acid distributions of enema samples from a sigmoidoscopy population: an association of high acetate and low butyrate ratios with adenomatous polyps and colon cancer. *Gut* 29, 1539–1543.
- Wei, H., Wei, S., Gan, B., Peng, X., Zou, W., and Guan, J.-L. (2011). Suppression of autophagy by FIP200 deletion inhibits mammary tumorigenesis. *Genes Dev.* 25, 1510–1527.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., and Levine, B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol. Cell* 30, 678–688.
- Wei, Z., Cao, S., Liu, S., Yao, Z., Sun, T., Li, Y., Li, J., Zhang, D., and Zhou, Y. (2016). Could gut microbiota serve as prognostic biomarker associated with colorectal cancer patients' survival? A pilot study on relevant mechanism. *Oncotarget* 7, 46158–46172.
- Weir, T.L., Manter, D.K., Sheflin, A.M., Barnett, B.A., Heuberger, A.L., and Ryan, E.P. (2013). Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults. *PLoS One* 8, e70803.
- Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Höhler, T., Galle, P.R., and Büchler, M.W. (2005). Colorectal cancer. *Lancet Lond. Engl.* 365, 153–165.
- Wells, C., van de Westerlo, E., Jechorek, R., Feltis, B., Wilkins, T., and Erlandsen, S. (1996). *Bacteroides fragilis* enterotoxin modulates epithelial permeability and bacterial internalization by HT-29 enterocytes. *Gastroenterology* 110, 1429–1437.
- Wenger, T., Terawaki, S., Camosseto, V., Abdelrassoul, R., Mies, A., Catalan, N., Claudio, N., Clavarino, G., de Gassart, A., Rigotti, F. de A., et al. (2012). Autophagy inhibition promotes defective neosynthesized proteins storage in ALIS, and induces redirection toward proteasome processing and MHC-I-restricted presentation. *Autophagy* 8, 350–363.
- Wexler, H.M. (2007). Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 593–621.
- White, E. (2015). The role for autophagy in cancer. *J. Clin. Invest.* 125, 42–46.
- Wong, H.P.S., Yu, L., Lam, E.K.Y., Tai, E.K.K., Wu, W.K.K., and Cho, C.-H. (2007). Nicotine Promotes Colon Tumor Growth and Angiogenesis through  $\beta$ -Adrenergic Activation. *Toxicol. Sci.* 97, 279–287.


- Wong, S.H., Zhao, L., Zhang, X., Nakatsu, G., Han, J., Xu, W., Xiao, X., Kwong, T.N.Y., Tsoi, H., Wu, W.K.K., et al. (2017a). Gavage of Fecal Samples From Patients With Colorectal Cancer Promotes Intestinal Carcinogenesis in Germ-Free and Conventional Mice. *Gastroenterology* *153*, 1621-1633.e6.
- Wong, S.H., Kwong, T.N.Y., Chow, T.-C., Luk, A.K.C., Dai, R.Z.W., Nakatsu, G., Lam, T.Y.T., Zhang, L., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., et al. (2017b). Quantitation of faecal *Fusobacterium* improves faecal immunochemical test in detecting advanced colorectal neoplasia. *Gut* *66*, 1441-1448.
- Wu, S., Morin, P.J., Maouyo, D., and Sears, C.L. (2003). *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology* *124*, 392-400.
- Wu, S., Rhee, K.-J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H.-R., Huso, D.L., Brancati, F.L., Wick, E., McAllister, F., et al. (2009). A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat. Med.* *15*, 1016-1022.
- Xie, R., Wang, F., McKeehan, W.L., and Liu, L. (2011). Autophagy Enhanced by Microtubule and Mitochondrion-associated MAP1S Suppresses Genome Instability and Hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* *71*, 7537-7546.
- Yamanaka, T., Helgeland, L., Farstad, I.N., Fukushima, H., Midtvedt, T., and Brandtzaeg, P. (2003). Microbial colonization drives lymphocyte accumulation and differentiation in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 816-822.
- Yang, I., Corwin, E.J., Brennan, P.A., Jordan, S., Murphy, J.R., and Dunlop, A. (2016). The Infant Microbiome: Implications for Infant Health and Neurocognitive Development. *Nurs. Res.* *65*, 76-88.
- Yang, M., Zhao, H., Guo, L., Zhang, Q., Zhao, L., Bai, S., Zhang, M., Xu, S., Wang, F., Wang, X., et al. (2015). Autophagy-based survival prognosis in human colorectal carcinoma. *Oncotarget* *6*, 7084-7103.
- Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J.M., Dell'antonio, G., et al. (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev.* *25*, 717-729.
- Yang, Y., Weng, W., Peng, J., Hong, L., Yang, L., Toyama, Y., Gao, R., Liu, M., Yin, M., Pan, C., et al. (2017). *Fusobacterium nucleatum* Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor- $\kappa$ B, and Up-regulating Expression of MicroRNA-21. *Gastroenterology* *152*, 851-866.e24.
- Ye, Q., Cai, W., Zheng, Y., Evers, B.M., and She, Q.-B. (2014). ERK and AKT signaling cooperate to translationally regulate survivin expression for metastatic progression of colorectal cancer. *Oncogene* *33*, 1828-1839.
- Ying, H., and Yue, B.Y.J.T. (2016). Optineurin: the Autophagy Connection. *Exp. Eye Res.* *144*, 73-80.
- Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Eskelinen, E.-L. (2009). 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* *5*, 1180-1185.
- Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Chakraborty, T., and Sasakawa, C. (2009). *Listeria monocytogenes* ActA is a key player in evading autophagic recognition. *Autophagy* *5*, 1220-1221.
- Young, A.R.J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F.J., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M., et al. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* *23*, 798-803.
- Yu, L., McPhee, C.K., Zheng, L., Mardones, G.A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., et al. (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* *465*, 942-946.
- Yu, T., Guo, F., Yu, Y., Sun, T., Ma, D., Han, J., Qian, Y., Kryczek, I., Sun, D., Nagarsheth, N., et al. (2017). *Fusobacterium nucleatum* Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. *Cell* *170*, 548-563.e16.
- Yu, Z.-Q., Ni, T., Hong, B., Wang, H.-Y., Jiang, F.-J., Zou, S., Chen, Y., Zheng, X.-L., Klionsky, D.J., Liang, Y., et al. (2012). Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy* *8*, 883-892.
- Zalckvar, E., Berissi, H., Eisenstein, M., and Kimchi, A. (2009). Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL. *Autophagy* *5*, 720-722.
- Zatloukal, K., Stumptner, C., Fuchsichler, A., Heid, H., Schnoelzer, M., Kenner, L., Kleinert, R., Prinz, M., Aguzzi, A., and Denk, H. (2002). p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am. J. Pathol.* *160*, 255-263.
- Zha, L., Wilson, M.R., Brotherton, C.A., and Balskus, E.P. (2016). Characterization of Polyketide Synthase Machinery from the *pkS* Island Facilitates Isolation of a Candidate Precolibactin. *ACS Chem. Biol.* *11*, 1287-1295.
- Zhai, H., Fesler, A., Ba, Y., Wu, S., and Ju, J. (2015). Inhibition of colorectal cancer stem cell survival and invasive potential by hsa-miR-140-5p mediated suppression of Smad2 and autophagy. *Oncotarget* *6*, 19735-19746.
- Zhang, F.-M., Wang, H.-G., Wang, M., Cui, B.-T., Fan, Z.-N., and Ji, G.-Z. (2013). Fecal microbiota transplantation for severe enterocolonic fistulizing Crohn's disease. *World J. Gastroenterol. WJG* *19*, 7213-7216.
- Zhang, L., Nichols, R.G., Correll, J., Murray, I.A., Tanaka, N., Smith, P.B., Hubbard, T.D., Sebastian, A., Albert, I., Hatzakis, E., et al. (2015). Persistent Organic Pollutants Modify Gut Microbiota-Host Metabolic Homeostasis in Mice Through Aryl Hydrocarbon Receptor Activation. *Environ. Health Perspect.* *123*, 679-688.
- Zheng, H., Zhang, X., Wang, X., and Sun, B. (2012). Autophagy Enhances the Aggressiveness of Human Colorectal Cancer Cells and Their Ability to Adapt to Apoptotic Stimulus. *Cancer Biol. Med.* *9*, 105-110.
- Zhou, D., Kang, K.H., and Spector, S.A. (2012). Production of interferon  $\alpha$  by human immunodeficiency virus type 1 in human plasmacytoid dendritic cells is dependent on induction of autophagy. *J. Infect. Dis.* *205*, 1258-1267.
- Zhou, Y., He, H., Xu, H., Li, Y., Li, Z., Du, Y., He, J., Zhou, Y., Wang, H., Nie, Y., et al. (2016). Association of oncogenic bacteria with colorectal cancer in South China. *Oncotarget* *7*, 80794-80802.
- Zhu, Q., Gao, R., Wu, W., and Qin, H. (2013). The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *34*, 1285-1300.
- Zsivkovits, M., Fekadu, K., Sontag, G., Nabinger, U., Huber, W.W., Kundi, M., Chakraborty, A., Foissy, H., and Knasmüller, S. (2003). Prevention of heterocyclic amine-induced DNA damage in colon and liver of rats by different *Lactobacillus* strains. *Carcinogenesis* *24*, 1913-1918.
- <http://www.corpshumain.ca> et <http://www.medillus.com/portfolio/histologie/>
- <https://www.museum.toulouse.fr/-/le-microbiote-intestinal-un-organe-a-part-entiere>
- <https://www.biocodexmicrobiotainstitute.com/intestinal>
- [https://rnbio.upmc.fr/bio-cell\\_cycle-cellulaire\\_introduction](https://rnbio.upmc.fr/bio-cell_cycle-cellulaire_introduction)
- [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx?cancer=colorectal](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal)
- <https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/pathways/TGF-beta-signaling>
- [www.e-cancer.fr/content/download/.../2/.../Rapport-scientifique-INCa-2013-Francais.pdf](http://www.e-cancer.fr/content/download/.../2/.../Rapport-scientifique-INCa-2013-Francais.pdf)

## *Annexe*

Alexis Bretin, Cécily Lucas, Anais Larabi, Guillaume Dalmaso, Elisabeth Billard, Nicolas Barnich, Richard Bonnet, Hang Thi Thu Nguyen. "*AIEC infection triggers modification of gut microbiota composition in genetically predisposed mice, contributing to intestinal inflammation*". Scientific reports. 2017.


Contribution : Participation aux expériences complémentaires demandées par les reviewers.

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## AIEC infection triggers modification of gut microbiota composition in genetically predisposed mice, contributing to intestinal inflammation

Alexis Bretin<sup>1</sup>, Cécily Lucas<sup>1</sup>, Anaïs Larabi<sup>1</sup>, Guillaume Dalmasso<sup>1</sup> , Elisabeth Billard<sup>1</sup>, Nicolas Barnich<sup>1</sup>, Richard Bonnet<sup>1,2</sup> & Hang Thi Thu Nguyen<sup>1</sup>

A high prevalence of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in the intestinal mucosa of Crohn's disease patients has been shown. AIEC colonize the intestine and induce inflammation in genetically predisposed mouse models including CEABAC10 transgenic (Tg) mice expressing human CEACAM6-receptor for AIEC and *EIF2AK4*<sup>-/-</sup> mice exhibiting autophagy defect in response to AIEC infection. Here, we aimed at investigating whether gut microbiota modification contributes to AIEC-induced intestinal inflammation in these mouse models. For this, *EIF2AK4*<sup>+/+</sup> and *EIF2AK4*<sup>-/-</sup> mice or CEABAC10 Tg mice invalidated for *Eif2ak4* gene (*Tg|eif2ak4*<sup>-/-</sup>) or not (*Tg|eif2ak4*<sup>+/+</sup>) were infected with the AIEC reference strain LF82 or the non-pathogenic *E. coli* K12 MG1655 strain. In all mouse groups, LF82 colonized the gut better and longer than MG1655. No difference in fecal microbiota composition was observed in *EIF2AK4*<sup>+/+</sup> and *EIF2AK4*<sup>-/-</sup> mice before infection and at day 1 and 4 post-infection. LF82-infected *EIF2AK4*<sup>-/-</sup> mice exhibited altered fecal microbiota composition at day 14 and 21 post-infection and increased fecal lipocalin-2 level at day 21 post-infection compared to other groups, indicating that intestinal inflammation developed after microbiota modification. Similar results were obtained for LF82-infected *Tg|eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice. These results suggest that in genetically predisposed hosts, AIEC colonization might induce chronic intestinal inflammation by altering the gut microbiota composition.

The human gastrointestinal tract is inhabited by 10<sup>13</sup>–10<sup>14</sup> microorganisms, which together make up the intestinal microbiota<sup>1</sup>. The intestinal microbiota is in a symbiotic relationship with its host and is involved in host nutrition metabolism, maintenance of structural integrity of the gut mucosal barrier, immunomodulation, and protection against pathogens<sup>2</sup>. Thus, an alteration in the composition of the intestinal microbiota, or dysbiosis, is associated with an increased risk of developing diseases such as diabetes, obesity, or chronic diseases of the intestinal tract including ulcerative colitis, Crohn's disease (CD), celiac disease and irritable bowel syndrome<sup>3</sup>.

CD is a multifactorial disease, of which the etiology involves environmental, genetic, immunological and infectious factors<sup>4</sup>. Intestinal dysbiosis has been observed in CD patients, with most studies have shown reduced diversity of the gut microbiota, a decrease in *Firmicutes* and an increase in *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*<sup>5–11</sup>. In addition, evidence has shown an increase in intestinal mucosa-associated *Escherichia coli* in CD patients relative to control subjects, in particular adherent-invasive *E. coli* (AIEC) strains with specific pathogenic characteristics<sup>12–20</sup>. The prevalence of the AIEC strains is increased in ileal lesions of CD patients (36–52%) compared to control subjects (6–17%)<sup>14,16,17,21</sup>. The characterization of the AIEC strains has shown that they are able to adhere to and invade intestinal epithelial cells<sup>22</sup>, survive and multiply in macrophages<sup>23</sup>, and to induce a strong proinflammatory response<sup>23</sup>. In genetically susceptible CEABAC10 transgenic (Tg) mice expressing the human

<sup>1</sup>M2iSH (Microbes, intestine, inflammation and Susceptibility of the Host), UMR 1071 Inserm, Université Clermont Auvergne, INRA USC 2018, Clermont-Ferrand, 63001, France. <sup>2</sup>Centre Hospitalier Universitaire (CHU), Clermont-Ferrand, 63001, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to H.T.T.N. (email: [hang.nguyen@uca.fr](mailto:hang.nguyen@uca.fr))

CEACAM6, which is abnormally expressed in ileal epithelial cells of CD patients<sup>24</sup>, AIEC colonize the gut and induce intestinal inflammation<sup>25</sup>.

The multiplication of AIEC inside host cells has been shown to be controlled by autophagy, a homeostatic process responsible for the elimination of damaged cytoplasmic components or intracellular pathogens via the lysosomal pathway<sup>26–29</sup>. Our recent study showed that the EIF2AK4-EIF2A-ATF4 signaling pathway is induced in intestinal epithelial cells following infection with AIEC, activating autophagy to control AIEC intracellular replication and to inhibit AIEC-induced inflammation<sup>30</sup>. EIF2AK4 (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4) belongs to a family of protein kinases that phosphorylate the alpha subunit of EIF2 (eukaryotic translation initiation factor 2) in response to various stress stimuli. Phosphorylation of EIF2A in response to EIF2AK4 activation subsequently increases translation of specific mRNAs that have been known to be important for stress remediation such as the activating transcription factor 4 (ATF4)<sup>31</sup>. We showed that the role of the EIF2AK4-EIF2A-ATF4 pathway in autophagy activation in response to AIEC infection is mediated via the ATF4-dependent induced transcription of several autophagy genes<sup>30</sup>. *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice infected with the AIEC reference strain LF82 exhibit a defect in the induction of autophagy gene transcription and autophagy response in enterocytes, which are accompanied with increased intestinal colonization by LF82 bacteria and aggravated inflammation compared to wild type mice<sup>30</sup>. In addition, studies have begun to show the importance of EIF2AK4 in CD. Indeed, an increase in the expression of EIF2AK4 in patients with CD compared to the controls has been reported<sup>32–34</sup>. Our group also showed activation of the EIF2AK4-EIF2A-ATF4 pathway in ileal biopsies from patients with non-inflamed CD compared to control subjects. However, this was not observed in ileal biopsies from patients with inflamed CD, suggesting that a defect in activation of this pathway could be one of the mechanisms contributing to the active disease<sup>30</sup>.

As gut microbiota has been implicated in the etiopathogenesis of CD, we aimed at investigating whether it is associated with the AIEC-induced intestinal inflammation in genetically predisposed mouse models with *Eif2ak4* gene deficiency.

## Results

***Eif2ak4* gene deficiency has no impact on the gut microbiota composition of mice.** To verify whether *Eif2ak4* gene deficiency could have an impact on the gut microbiota composition, we used wild type (*eif2ak4*<sup>+/+</sup>) and *Eif2ak4*-deficient (*eif2ak4*<sup>-/-</sup>) mice, which were housed in specific pathogen-free conditions. Mice were 12 weeks old as it was previously shown that mice acquire a relatively stable gut microbiota at this age<sup>35</sup>. Fecal samples were collected before any treatment (Day 0) from *eif2ak4*<sup>+/+</sup> and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice, and fecal microbiota analysis was performed by 16S rRNA gene sequencing using Illumina technology. Sequence data were analyzed via the QIIME (quantification insight into microbial ecology) data processing pipeline. Analysis at the genus level by weighted UniFrac and PCoA (principal coordinate analysis) indicated that there was not any pattern of clustering between *eif2ak4*<sup>+/+</sup> and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 1A). Taxonomic analysis showed a high prevalence of bacteria from the Firmicutes and Bacteroidetes phyla in the gut microbiota of *eif2ak4*<sup>+/+</sup> and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice without any significant difference between these two groups (Fig. 1B). This result showed that the deletion of *Eif2ak4* gene in mice does not induce any change in the composition of the gut microbiota.

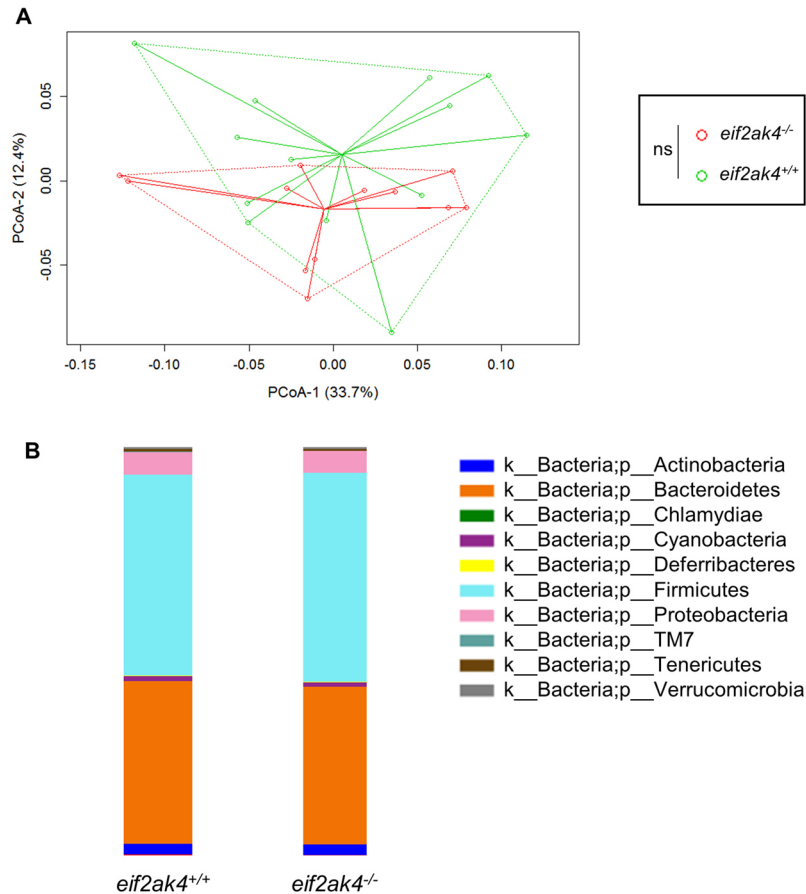
**Colonization of *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice with AIEC results in a significant modification of the gut microbiota composition and triggers intestinal inflammation.** In a previous study, we demonstrated that the EIF2AK4/EIF2A/ATF4 pathway is involved in the autophagy-mediated control of AIEC intracellular replication and inflammatory response, and that AIEC infection of *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice triggers intestinal inflammation<sup>30</sup>. As gut microbiota has been implicated in the etiopathogenesis of CD<sup>4</sup>, we investigated whether it contributes to intestinal inflammation triggered by AIEC infection in *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice.

In our previous studies<sup>25,30</sup>, the mouse models of AIEC infection involved the treatment of mice with an antibiotic cocktail before AIEC infection to facilitate gut colonization by AIEC. However, as it has been shown that antibiotic use has a huge impact on gut microbiota, we decided to not use any such compound. *eif2ak4*<sup>+/+</sup> and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice were divided into sub groups that were challenged with 10<sup>9</sup> colony-forming units (CFU) of the AIEC reference strain LF82 or the non-pathogenic *E. coli* K12 MG1655 strain or vehicle (PBS) by gavage for 3 days. The mice were then placed in specific pathogen-free housing condition, and the feces were collected at different time points post-infection and used to evaluate inflammation by quantifying lipocalin (Lcn)-2 level and to analyze the gut microbiota composition by sequencing the 16S rRNA gene using the Illumina technology.

First, we determined the bacterial CFU in mouse feces, which reflect bacterial persistence in the gut. In both *eif2ak4*<sup>+/+</sup> and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice, the colonization of AIEC LF82 bacteria was higher and lasted longer compared to that of the non-pathogenic K12 MG1655 bacteria as the LF82 strain was detectable up to day 4 post-infection, whereas the K12 MG1655 strain was cleared since day 1 post-infection (Fig. 2A). Furthermore, the increased gut colonization by AIEC in *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice compared to *eif2ak4*<sup>+/+</sup> mice as we previously reported using a model of infection following antibiotic treatment<sup>30</sup> was not observed in the condition of this study (Fig. 2A).

Secondly, we quantified the fecal Lcn-2 level, which has been shown as a marker of intestinal inflammation in several mouse models<sup>36</sup>. The results showed no difference in fecal Lcn-2 levels in *eif2ak4*<sup>+/+</sup> mice upon AIEC LF82 or K12 MG1655 infection up to 40 days post-infection (Fig. 2B). However, in *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice, the fecal Lcn-2 level was significantly increased at day 21 and 40 post-LF82 infection, and this was not observed for K12 MG1655 infection (Fig. 2B). Importantly, the increased Lcn-2 level in LF82-infected *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice lasted for at least twenty days, suggesting that a chronic inflammation is set up in *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice after AIEC infection.

Next, we analyzed the fecal microbiota composition in these mouse groups at the same time post-infection to investigate whether an altered microbiota composition could occur before or after the increase in Lcn-2 level in LF82-infected *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice. Because colonization with the K12 MG1655 strain did not induce any inflammation in either *eif2ak4*<sup>+/+</sup> or *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice, we decided to remove the K12 condition from the

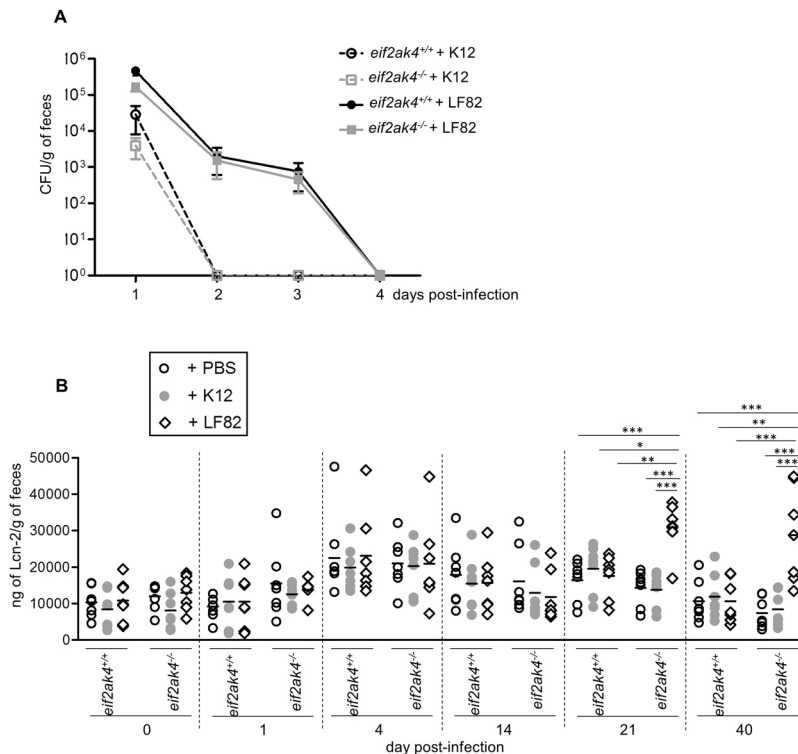


**Figure 1.** *Eif2ak4* gene deficiency has no impact on the gut microbiota composition of mice. *eif2ak4*<sup>+/+</sup> (N = 13) and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> (N = 13) mice were housed in specific-pathogen free conditions. Feces were collected from 12-week old mice for the analysis of the bacterial microbiota composition based on Illumina sequencing of the 16S rRNA gene. **(A)** Mouse fecal bacterial communities were clustered using PCoA of the weighted UniFrac distance matrix. PCoA-1 and PCoA-2 were plotted, and the percentage of the variation explained by the plotted principal coordinates was indicated in the Y-X-axis labels. Groups were compared using permanova method. Ns, not significant. **(B)** Relative abundance of phyla in fecal samples from *eif2ak4*<sup>+/+</sup> and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice.

microbiota composition analysis. Fecal samples collected over time from *eif2ak4*<sup>+/+</sup> and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice that had been challenged with AIEC LF82 or PBS were subjected to Illumina sequencing of the 16S rRNA genes. Sequence data was analyzed via the QIIME data processing pipeline. Analysis at the genus level by weighted UniFrac and PCoA did not show any pattern of clustering in any of the 4 mouse groups: *eif2ak4*<sup>+/+</sup> + LF82, *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82, *eif2ak4*<sup>+/+</sup> + PBS, *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + PBS at day 1 and 4 post-infection (Fig. S1). In contrast, after 14 and 21 days of infection, a clear pattern of clustering in *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82 group compared to the other groups (*eif2ak4*<sup>+/+</sup> + LF82, *eif2ak4*<sup>+/+</sup> + PBS and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + PBS) was observed (Fig. 3). In detail, at day 14 and 21 post-infection, two dimensional (2D) plotting of PCoA-1 versus PCoA-2 failed to show a pattern of clustering between *eif2ak4*<sup>+/+</sup> + PBS and *eif2ak4*<sup>+/+</sup> + LF82 groups (Fig. 3B,F), indicating that colonization by AIEC may not alter microbiota composition in wild type host. In contrast, AIEC LF82 colonization resulted in altered microbiota composition in *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice at days 14 and 21 post-AIEC administration. 2D plotting of PCoA-1 versus PCoA-2 showed a clear difference in the microbiota composition between *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + PBS and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82 groups at day 14 (Fig. 3C) and 21 (Fig. 3G) post-infection. Furthermore, 2D plotting of PCoA-1 versus PCoA-2 also showed a difference in the gut microbiota composition between *eif2ak4*<sup>+/+</sup> and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice after 14 (Fig. 3D) or 21 (Fig. 3H) days of AIEC administration. Taxonomic analysis at the genus level showed that most of the differences observed in PCoA were explained by an increase in *Turicibacter* and *Clostridium* in *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82 group compared to the other groups at days 14 (Fig. 4A,B) and 21 (Fig. 4C,D) post-infection. These results show that neither *Eif2ak4* gene deficiency nor AIEC colonization alone is sufficient to induce a modification in the gut microbiota composition. However, the combination of the genetic and infectious factors leads to a significant shift in the gut microbiota of the mice. Interestingly, this shift occurred at day 14 post-infection before the appearance of inflammation at day 21 post-infection.

In an effort to explain the change in gut microbiota composition in *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82 group, we performed qPCR to quantify AIEC LF82-specific *pMT* gene expression using specific primers as previously described<sup>37</sup>. Interestingly, qPCR data showed *pMT* gene amplification at day 14 and 21 post-infection in both *eif2ak4*<sup>+/+</sup> and





**Figure 2.** Colonization of *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice with AIEC triggers chronic gut inflammation. *eif2ak4*<sup>+/+</sup> and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice were challenged by oral gavage for 3 days (once per day) with PBS (N = 6 mice per group) or with 10<sup>9</sup> CFU of the AIEC LF82 strain (N = 7 mice per group) or the non-pathogenic *E. coli* K12 MG1655 strain (N = 6 mice per group). (A) The numbers of AIEC LF82 and *E. coli* K12 were determined in the feces collected every day post-infection by plating on LB media containing selective antibiotics. Data are represented as means  $\pm$  SEM. (B) Fecal lcn-2 levels were measured by ELISA. Means were shown as lines. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA test followed by Bonferroni's post-hoc comparisons. \**P* < 0.05; \*\**P*  $\leq$  0.01; \*\*\**P*  $\leq$  0.001.

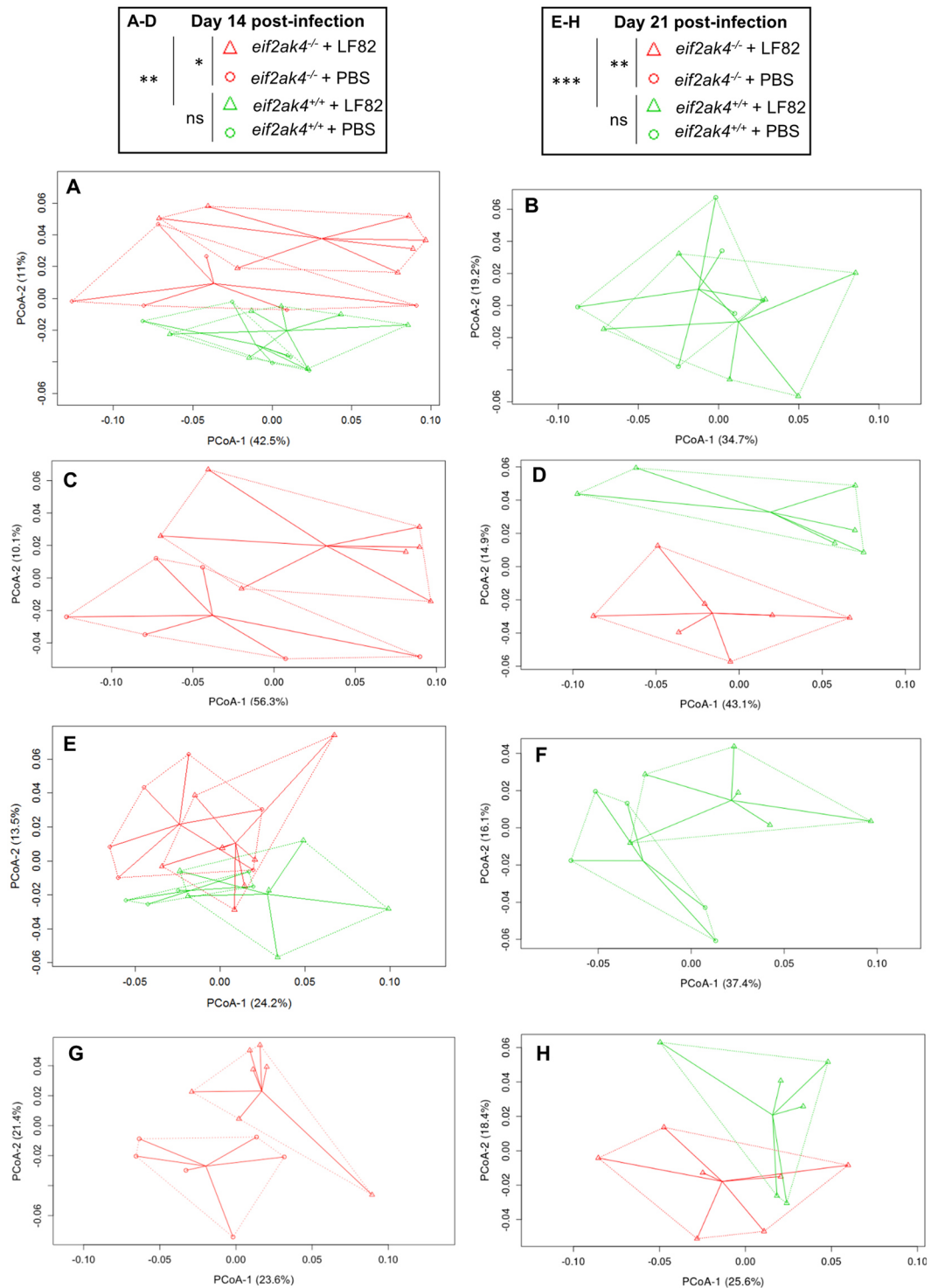
*eif2ak4*<sup>-/-</sup> groups, and the *pMT* gene expression level was increased in *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice compared to *eif2ak4*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 4E). In addition, LF82-specific *pMT* gene expression level in *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice was increased at day 21 post-infection compared to that at day 14 post-infection (Fig. 4E). However, in *eif2ak4*<sup>+/+</sup> mice, this level was not increased at day 21 compared to day 14 post-infection (Fig. 4E). This suggests that LF82 bacteria create a colonization niche in *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice, promoting their expansion at later time.

Together, these data suggest that AIEC colonization in the genetically predisposed host with *Eif2ak4* gene deficiency induces a change in the gut microbiota composition, which is associated with the development of chronic intestinal inflammation.

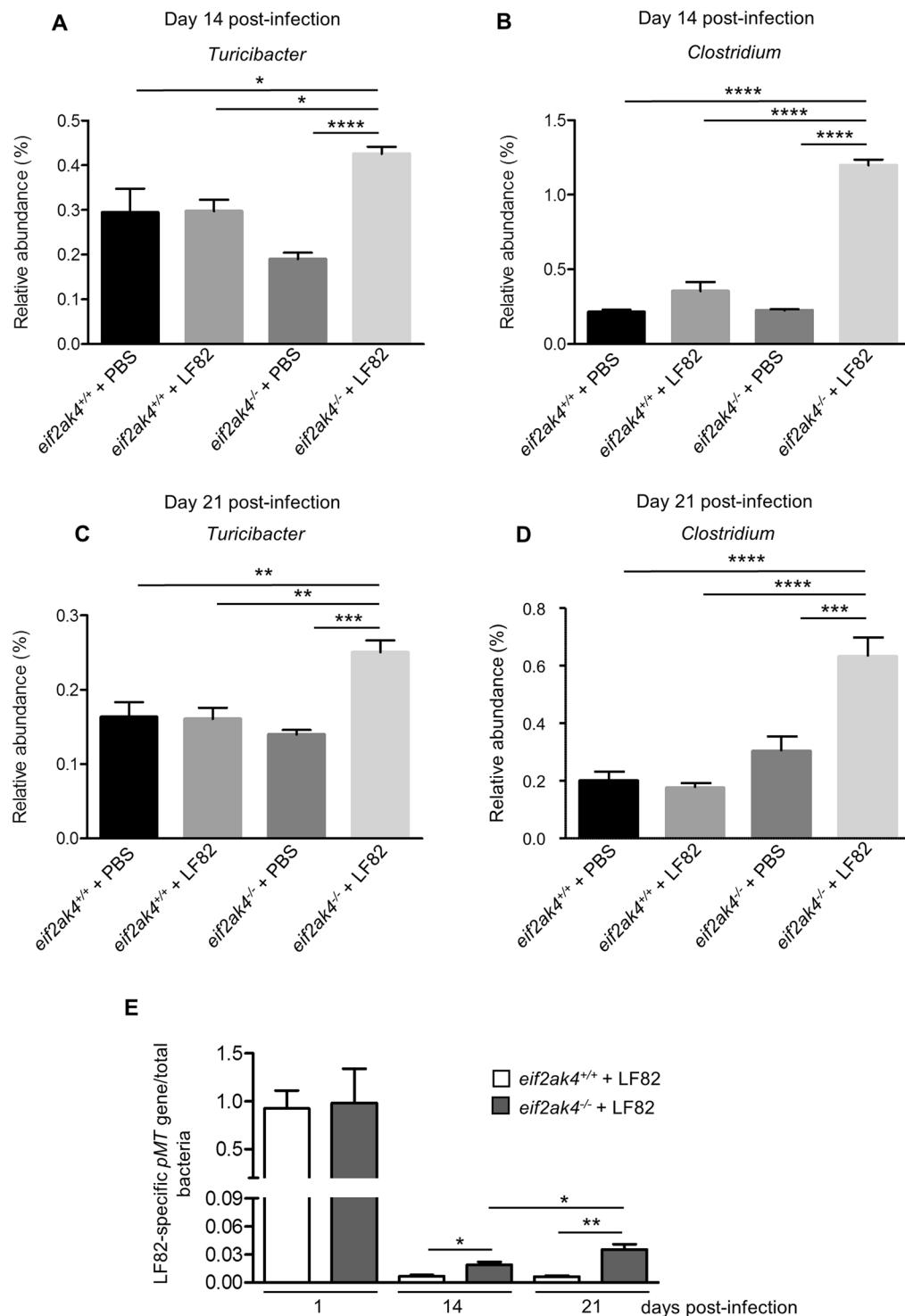
**AIEC colonization in CEABAC10 transgenic mice deficient in *Eif2ak4* gene induces a modification of the gut microbiota composition and triggers intestinal inflammation.** As AIEC colonize the gut and induce intestinal inflammation in CEABAC10 transgenic (Tg) mice expressing human CEACAM6<sup>25</sup>, host epithelial receptor for AIEC adherence<sup>24</sup>, we sought to verify our results in CEABAC10 Tg mice with *Eif2ak4* gene deficiency. For that, we generated Tg/*eif2ak4*<sup>+/+</sup> and Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice and infected them with the AIEC LF82 strain or the K12 MG1655 strain using the same infection protocol as applied for *eif2ak4*<sup>+/+</sup> and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice, in which antibiotics were not used. Feces were collected at different time points post-infection and used to evaluate inflammation by quantifying lcn-2 level and to analyze the gut microbiota composition by Illumina sequencing of the 16S rRNA gene.

First, we quantified bacterial CFU in mouse feces, which reflect bacterial persistence in the gut. In both Tg/*eif2ak4*<sup>+/+</sup> and Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice, LF82 bacteria were detectable in the feces up to day 4 post-infection, with no significant difference between the two groups (Fig. 5A). The K12 MG1655 strain was cleared since day 1 post-infection in both Tg/*eif2ak4*<sup>+/+</sup> and Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5A).

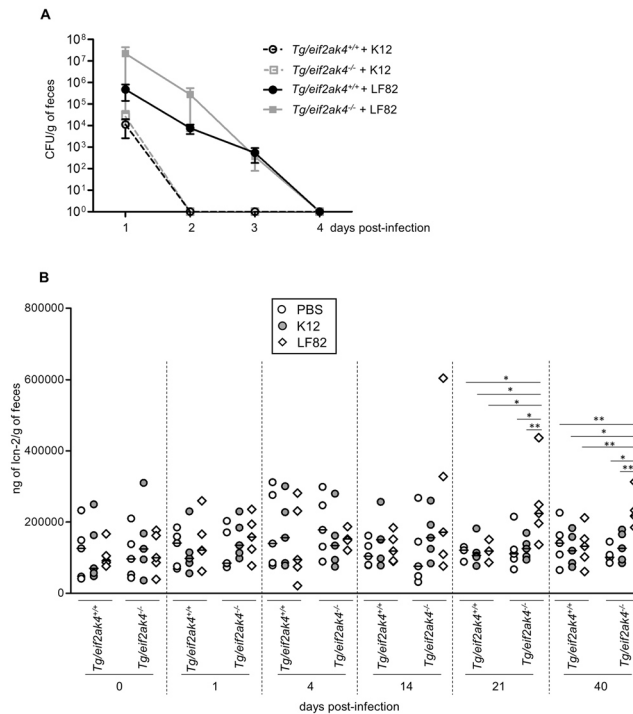
Next, fecal lcn-2 level quantification did not show any difference in Tg/*eif2ak4*<sup>+/+</sup> mice upon AIEC LF82 infection up to 40 days post-infection (Fig. 5B). However, in Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice, a significant increase in fecal lcn-2 level upon AIEC LF82 infection was observed at day 21 post-infection, and this lasted up to day 40 post-infection (Fig. 5B). Although it was performed in two independent experiments, the fecal lcn-2 level of Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5B) appeared to significantly higher than that of *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2B), around 10 times. This suggests that Tg mice may favor AIEC-induced inflammation. Infection of both Tg/*eif2ak4*<sup>+/+</sup> and Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> with the K12 MG1655 strain did not induce any significant change in fecal lcn-2 level up to 40 days post-infection



**Figure 3.** Colonization of *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice with AIEC results in modification of the gut microbiota composition at day 14 and 21 post-infection. *eif2ak4*<sup>+/+</sup> and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice were challenged by oral gavage for 3 days (once per day) with PBS (N = 6 mice per group) or with 10<sup>9</sup> CFU of the AIEC LF82 strain (N = 7 mice per group). Feces were collected at day 14 (A–D) and 21 (E–H) post-infection for the analysis of the bacterial microbiota composition based on Illumina sequencing of the 16S rRNA gene. Mouse fecal bacterial communities were clustered using PCoA of the weighted UniFrac distance matrix. PCoA-1 and PCoA-2 were plotted, and the percentage of the variation explained by the plotted principal coordinates was indicated in the Y-X-axis labels. (A,E) Comparison between mouse groups: *eif2ak4*<sup>+/+</sup> + PBS, *eif2ak4*<sup>+/+</sup> + LF82, *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + PBS and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82. (B,F) Comparison between mouse groups: *eif2ak4*<sup>+/+</sup> + PBS and *eif2ak4*<sup>+/+</sup> + LF82. (C,G) Comparison between mouse groups: *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + PBS and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82. (D,H) Comparison between mouse groups: *eif2ak4*<sup>+/+</sup> + LF82 and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82. Groups were compared using permanova method. Ns, not significant; \**P* < 0.05; \*\**P* ≤ 0.01; \*\*\**P* ≤ 0.001.



**Figure 4.** Colonization of *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice with AIEC results in modification of *Turicibacter* and *Clostridium* abundance at day 14 and 21 post-infection. *eif2ak4*<sup>+/+</sup> and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice were challenged by oral gavage for 3 days (once per day) with PBS (N = 6 mice per group) or with 10<sup>9</sup> CFU of the AIEC LF82 strain (N = 7 mice per group). Feces were collected at day 14 (A,B) and 21 (C,D) post-infection for the analysis of the bacterial microbiota composition based on Illumina sequencing of the 16S rRNA gene. Relative abundance of *Turicibacter* (A,C) and *Clostridium* (B,D) between mouse groups: *eif2ak4*<sup>+/+</sup> + PBS, *eif2ak4*<sup>+/+</sup> + LF82, *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + PBS and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82. (E) qPCR analysis of the LF82-specific *pMT* gene expression level in the feces at the indicated time. Data were normalized to total bacterial. Fold-induction was calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method. Values were expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA test followed by Bonferroni's post-hoc comparisons. Ns, not significant; \**P* < 0.05; \*\**P*  $\leq$  0.01; \*\*\**P*  $\leq$  0.001; \*\*\*\**P*  $\leq$  0.0001.



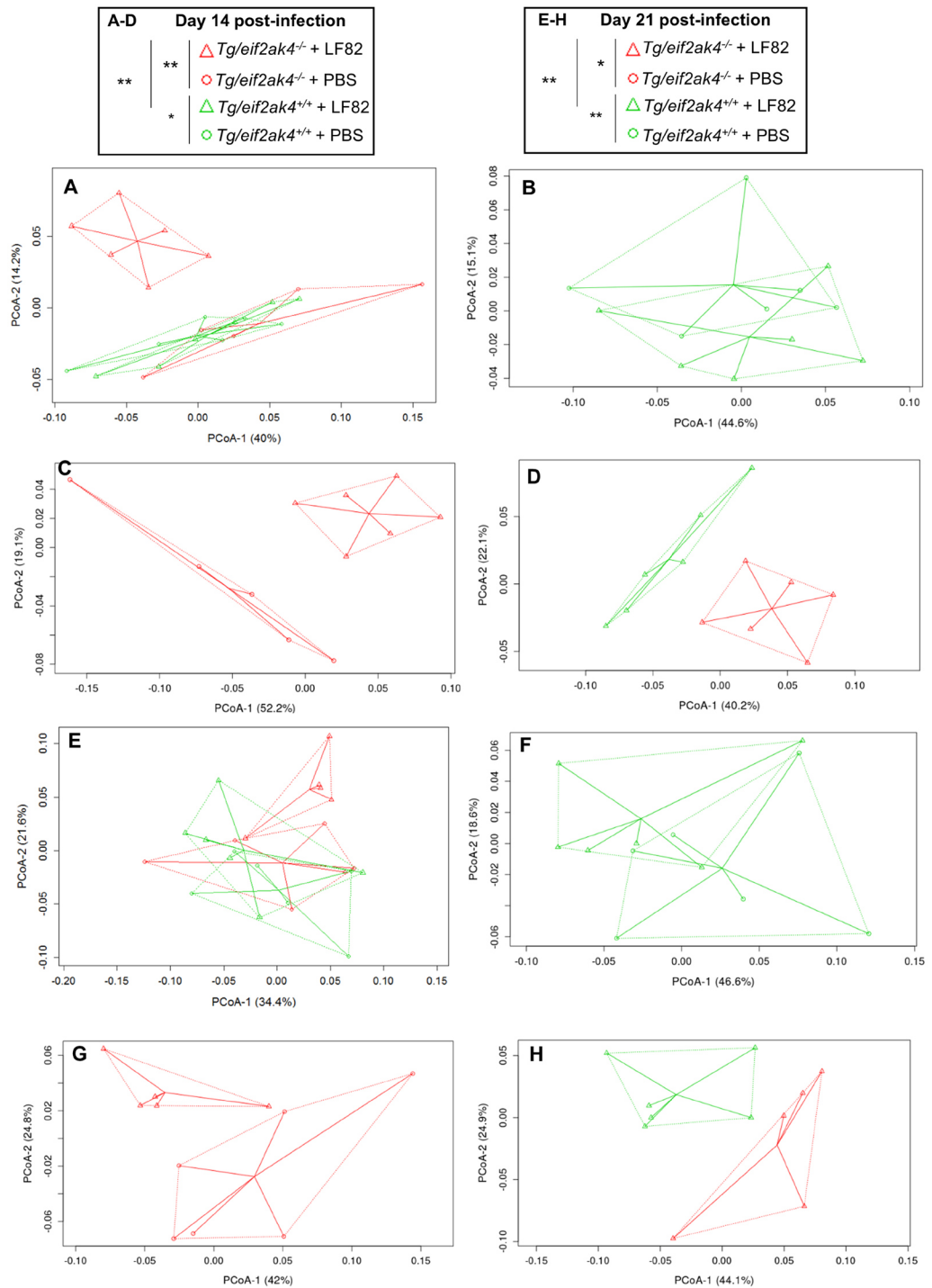
**Figure 5.** Colonization of CEABAC10 transgenic (Tg) mice deficient in *Eif2ak4* gene with AIEC triggers chronic gut inflammation. Tg/*eif2ak4*<sup>+/+</sup> and Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice were challenged by oral gavage for 3 days (once per day) with PBS or with 10<sup>9</sup> CFU of the AIEC LF82 strain or the non-pathogenic *E. coli* K12 MG1655 strain (N = 5 mice per group). (A) The number of AIEC LF82 bacteria was determined in the feces collected every day post-infection by plating on LB media containing selective antibiotics. (B) Fecal lcn-2 levels were measured by ELISA. Means were shown as lines. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA test followed by Bonferroni's post-hoc comparisons. \**P* < 0.05; \*\**P* ≤ 0.01.

(Fig. 5B). These results were consistent with the results obtained with *eif2ak4*<sup>+/+</sup> and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice, indicating that AIEC colonization triggers a chronic inflammation response in a genetically predisposed host deficient in *Eif2ak4* gene.

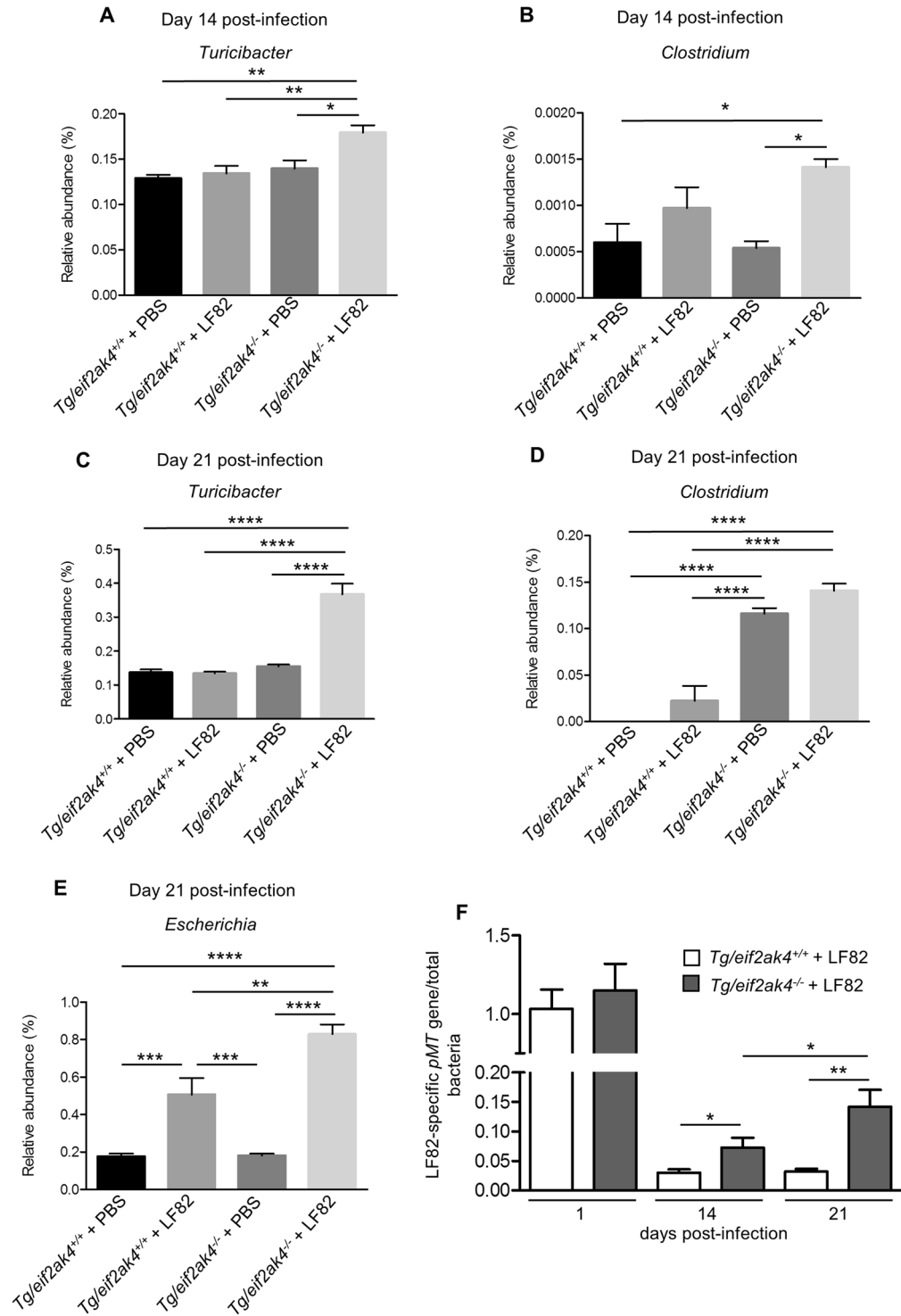
Finally, microbiota composition analysis using fecal samples from Tg/*eif2ak4*<sup>+/+</sup> and Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice before any treatment (day 0) by weighted UniFrac and PCoA did not show any pattern of clustering between the two genotypes (Fig. S2). At day 1 and 4 post-infection, we did not observe any pattern of clustering between uninfected (+PBS) or LF82-infected Tg/*eif2ak4*<sup>+/+</sup> and Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> groups (Fig. S3). In contrast, at day 14 and 21 post-infection, patterns of clustering between *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82, *eif2ak4*<sup>+/+</sup> + LF82, *eif2ak4*<sup>+/+</sup> + PBS and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + PBS groups were observed (Fig. 6A,E). Interestingly, in Tg/*eif2ak4*<sup>+/+</sup> mice, in contrast to *eif2ak4*<sup>+/+</sup> mice, the microbiota of uninfected and LF82-infected groups diverged at day 14 and 21 post-infection (Fig. 6B,F). As it was shown for *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice, AIEC colonization also induced a change in the microbiota composition in Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice. These changes were readily apparent by 14 and 21 days post-infection, as 2D plotting of PCoA-1 versus PCoA-2 showed a shift in the gut microbiota composition of Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice compared to the other groups (Fig. 6C,G). Furthermore, 2D plotting of PCoA-1 versus PCoA-2 of Tg/*eif2ak4*<sup>+/+</sup> + LF82 and Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82 groups also showed a significant difference in the gut microbiota between these two groups (Fig. 6D,H). Taxonomic analyses at the genus level were consistent with those performed with *eif2ak4*<sup>+/+</sup> and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice as most of the differences observed in PCoA were explained by an increase in *Turicibacter* and *Clostridium* in Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82 group compared to the other groups (Fig. 7A–D). Nevertheless, we observed an increase of *Escherichia* in Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82 group compared to the other groups at day 21 post-infection (Fig. 7E), and this was not observed for *eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82 mice).

In addition, we determined AIEC LF82 colonization by quantifying *pMT* gene expression by qPCR at day 14 and 21 post-infection in both Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> and Tg/*eif2ak4*<sup>+/+</sup> groups. LF82-specific *pMT* gene expression level was increased in Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> compared to Tg/*eif2ak4*<sup>+/+</sup> mice at day 14 and 21 post-infection, although no significant difference was detected at day 1 post-infection (Fig. 7F). In addition, in Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82 mice, *pMT* gene expression level was increased at day 21 compared to day 14 post-infection, and this was not observed for Tg/*eif2ak4*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 7F). This suggests that LF82 bacteria can persist in the gastrointestinal tract of Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice and expand their colonization at later time.

These results, which were consistent with those obtained with non-transgenic mice, confirm that AIEC colonization in a genetically predisposed host with *Eif2ak4* gene deficiency induces a shift in the gut microbiota composition, which may select a pro-inflammatory microbiota, and this is accompanied with chronic gut inflammation.



**Figure 6.** Colonization of CEABC10 transgenic (Tg) mice deficient in *Eif2ak4* gene with AIEC LF82 results in modification of the gut microbiota composition at days 14 and 21 post-infection. *Tg/eif2ak4*<sup>+/+</sup> and *Tg/eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice were challenged by oral gavage for 3 days (once per day) with PBS (N = 6 mice per group) or with 10<sup>9</sup> CFU of the AIEC LF82 strain (N = 6 mice per group). Feces were collected at days 14 (A–D) and 21 (E–H) post-infection for the analysis of the bacterial microbiota composition based on Illumina sequencing of the 16S rRNA gene. (A–H) Mouse fecal bacterial communities were clustered using PCoA of the weighted UniFrac distance matrix. PCoA-1 and PCoA-2 were plotted, and the percentage of the variation explained by the plotted principal coordinates was indicated in the Y–X-axis labels. Groups were compared using permanova method. Ns, not significant; \**P* < 0.05; \*\**P* ≤ 0.01. (A,E) Comparison between mouse groups: *Tg/eif2ak4*<sup>+/+</sup> + PBS, *Tg/eif2ak4*<sup>+/+</sup> + LF82, *Tg/eif2ak4*<sup>-/-</sup> + PBS and *Tg/eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82. (B,F) Comparison between mouse groups: *Tg/eif2ak4*<sup>+/+</sup> + PBS and *Tg/eif2ak4*<sup>+/+</sup> + LF82. (C,G) Comparison between mouse groups: *Tg/eif2ak4*<sup>-/-</sup> + PBS and *Tg/eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82. (D,H) Comparison between mouse groups: *Tg/eif2ak4*<sup>+/+</sup> + LF82 and *Tg/eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82.



**Figure 7.** Colonization of Tg/eif2ak4<sup>-/-</sup> mice with AIEC results in modification of *Turicibacter*, *Clostridium* and *Escherichia* abundance. Tg/eif2ak4<sup>+/+</sup> and Tg/eif2ak4<sup>-/-</sup> mice were challenged by oral gavage for 3 days (once per day) with PBS (N = 6 mice per group) or with 10<sup>9</sup> CFU of the AIEC LF82 strain (N = 6 mice per group). Feces were collected at day 14 (A,B) and 21 (C–E) post-infection for the analysis of the bacterial microbiota composition based on Illumina sequencing of the 16S rRNA gene. Relative abundance of *Turicibacter* (A,C), *Clostridium* (B,D) and *Escherichia* (E) between mouse groups: Tg/eif2ak4<sup>+/+</sup> + PBS, Tg/eif2ak4<sup>+/+</sup> + LF82, Tg/eif2ak4<sup>-/-</sup> + PBS and Tg/eif2ak4<sup>-/-</sup> + LF82. (F) qPCR analysis of the LF82-specific pMT gene expression level in the feces at the indicated time. Data were normalized to total bacterial. Fold-induction was calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method. Values were expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA test followed by Bonferroni's post-hoc comparisons. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ .

## Discussion

Extensive studies have suggested that the etiology of CD involves environmental and genetic factors that lead to dysfunction of the intestinal epithelial barrier with consequent deregulation of the mucosal immune system and responses to gut microbiota. The AIEC strains, which abnormally colonize the ileal mucosa of CD patients, have emerged as “pathobionts” implied in the pathogenesis of CD<sup>4</sup>.

Our recent study showed that the EIF2AK4-EIF2A-ATF4 signaling pathway is induced in intestinal epithelial cells following infection with AIEC, leading to autophagy activation to control AIEC intracellular replication and to inhibit AIEC-induced inflammation<sup>30</sup>. *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice exhibit a defect in autophagy response to AIEC infection, accompanied with increased intestinal colonization by AIEC and aggravated inflammation compared to wild type mice. In the current study, we aimed at investigating whether a modification in the gut microbiota composition could contribute to the AIEC-induced intestinal inflammation in genetically predisposed mice with *Eif2ak4* gene deficiency.

In the past decades, numerous studies have tried to show a role for the gut microbiota in the development of CD. Indeed, it has been shown that a treatment with antibiotics such as ciprofloxacin or metronidazole is efficient to treat CD patients<sup>38</sup>. It has also been shown that antibiotic use in early childhood is a risk factor for inflammatory bowel disease development in adults<sup>39</sup>. It has become evident that CD patients exhibit intestinal dysbiosis with a decrease in the number of potentially beneficial bacteria such as *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* and *Firmicutes* and an increase in that of putative pathogenic bacteria such as *Bacteroides* and *Escherichia coli*<sup>4</sup>. The key role of the gut microbiota trigger in CD development has also been shown in mouse models. For example, the TNF<sup>deltaARE</sup> mice carrying a deletion in the TNF AU (adenosin-uracil)-rich elements (ARE) develop transmural inflammation in the distal ileum that shares some clinical features with human CD only after colonization with specific-pathogen free microbiota, and germ-free TNF<sup>deltaARE</sup> mice were protected from intestinal inflammation<sup>40</sup>. A modification in the gut microbiota composition, with an increase in *Bacteroidetes* and *E. coli*, triggered by a high fat/high sugar diet, has been shown to induce enhanced susceptibility to AIEC infection and intestinal inflammation in CEABAC10 transgenic mice<sup>41,42</sup>. It was also shown that, in mice lacking the bacterial flagellin receptor TLR5 (*tlr5*<sup>-/-</sup> mice), AIEC colonization induces a chronic inflammation and a gut microbiota modification toward a microbiota that expresses increased lipopolysaccharide and flagellin levels, and these effects lasted even many days after the AIEC clearance<sup>43</sup>.

In the present study, we reported that AIEC colonization triggers a gut microbiota modification in *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice. This modification comes along with increased abundance of *Clostridium* and *Turicibacter*, which have been shown to be increased under inflammatory condition<sup>44</sup>. In addition, analysis of fecal microbiota composition from 235 patients with inflammatory bowel disease (149 with Crohn’s disease and 86 with ulcerative colitis) and 38 healthy subjects (HS) using 16S rRNA gene sequencing showed an increase in *Turicibacter* in ileum CD group compared to HS group (Kruskal-Wallis test with Dunn’s multiple comparison test, \**P* < 0.05; data not shown from the study by Sokol *et al.* published in *Gut* in 2017)<sup>45</sup>. No difference in *Turicibacter* between HS group and colon CD group or ulcerative colitis group was observed<sup>45</sup>. Further investigations are necessary to show whether the elevated *Turicibacter* and *Clostridium* abundance is sufficient to cause intestinal inflammation or contribute to the development of intestinal inflammation in genetically modified mouse models.

In *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice expressing human CEACAM6 (Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice), which mimic abnormal expression of CEACAM6 in ileal epithelial cells in CD<sup>24</sup>, we also observed a modification of gut microbiota composition upon AIEC colonization. This was accompanied with increased abundance of *Escherichia* in Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> + LF82 mice, which was not observed in *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice colonized with AIEC LF82. It is worthy to note that the *Escherichia* data resulted from Illumina 16S rRNA gene sequencing cannot distinguish between autochthonous *E. coli* and AIEC LF82 abundance. This result could be explained by the fact that Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice express human CEACAM6, which is the receptor for AIEC to colonize the ileal epithelium<sup>24</sup>, and this receptor could promote *Escherichia* colonization in these mice.

Importantly, AIEC colonization triggers a chronic inflammation in both *eif2ak4*<sup>-/-</sup> and Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice, which lasted for days. Furthermore, inflammation occurred in *eif2ak4*<sup>-/-</sup> and Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice colonized with AIEC after the appearance of gut microbiota modification. These results suggest that the altered microbiota composition in the genetically predisposed hosts colonized with AIEC might contribute to the development of chronic intestinal inflammation. It was previously shown that AIEC colonization of germ-free *tlr5*<sup>-/-</sup> mice drives chronic inflammation which correlates with microbiota components<sup>43</sup>. This study was performed in germ-free animals, which have been largely used to characterize the specific effects of known strains of bacteria or of the gut microbiota as a whole upon colonization<sup>46</sup>. However, they exhibit defects in the immune system<sup>47</sup>, which is not always the case in genetically predisposed hosts. Herein, we showed the contribution of gut dysbiosis triggered by AIEC colonization in the development of chronic inflammation in genetically predisposed hosts carrying a microbiota, which was not previously shown. Our study also showed that neither the genetic factors (deficiency in *Eif2ak4* gene with or without abnormal human CEACAM6 expression) nor the microbial factor (AIEC colonization) alone is sufficient to induce a modification in the gut microbiota composition, reinforcing the notion of the multifactorial and complex etiology of CD.

The underlying mechanism by which AIEC colonization modifies the gut microbiota composition in *eif2ak4*<sup>-/-</sup> and Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice remains uninvestigated. We hypothesize that a defect in autophagy response in mice with *Eif2ak4* deficiency upon AIEC infection, which was previously shown<sup>30</sup>, may affect immune response to gut microbiota and thereby contribute to gut dysbiosis. In this regard, it has been reported that a defect in autophagy genes, such as *Nod2* or *Atg16l1*, induced a shift in gut microbiota<sup>35,48,49</sup>. Indeed, it has been shown that the bacterial microbiota composition was altered in *Nod2* knockout mice compared to wild type mice<sup>35,48</sup>. This change was present in adult mice but also in weaning mice, indicating a crucial role for *Nod2* in the early development and composition of the intestinal microbiota<sup>35</sup>. Importantly, the authors showed that *NOD2* genotypes also influence the microbial composition in humans as the CD patients homozygous for the CD-associated

*NOD2* allele exhibited differences in bacterial composition in non-inflamed ileal mucosa or in the feces compared to those homozygous for the wild type *NOD2* allele<sup>35</sup>. A more recent study also showed that CD patients homozygous for the *ATG16L1* risk allele showed impaired clearance of pathosymbionts with an altered bacterial composition in inflamed ileal tissue compared to those homozygous for the *ATG16L1* protective allele<sup>49</sup>. These studies highlight the preponderant role of autophagy in the control of gut microbiota homeostasis and to a larger extent in CD development.

The mechanism by which AIEC colonization modifies the gut microbiota composition in *Eif2ak4*-deficient mouse models remains uninvestigated. However, we can hypothesize that the colonization of AIEC might generate a specific “micro-environment” in the gut that allows the selection of a pro-inflammatory bacterial population. This action was indirect given by the fact that the gut microbiota modification in these genetically predisposed mouse models appeared numerous days after AIEC became undetectable in the feces. Our data are supported by the study by Chassaing and colleagues, which showed that a transient AIEC colonization induces an alteration in bacterial microbiota composition in germ-free *tlr5*<sup>-/-</sup> mice<sup>43</sup>.

Although so far no *EIF2AK4* variant is associated with CD susceptibility<sup>50</sup>, studies have begun to show the importance of EIF2AK4 in CD. Indeed, an increase in the expression of EIF2AK4 in patients with CD compared to the controls has been reported<sup>32–34</sup>. Our group previously showed a defect in the activation of the EIF2AK4-EIF2A-ATF4 pathway under inflammatory condition in CD patients<sup>30</sup>. In mice, we showed that the mouse models with *Eif2ak4* deficiency exhibit increased susceptibility to AIEC infection with increased gut colonization by AIEC and increased AIEC-induced inflammation due to autophagy defect<sup>30</sup> and gut dysbiosis upon a AIEC colonization, which might contribute to the development of chronic inflammation (data from the current study). These results together suggest that *Eif2ak4*-deficient mice could be considered as genetically predisposed mouse models to study the implication of AIEC in the etiopathogenesis of CD.

To summarize, this study showed that AIEC colonization leads to a modification of the gut microbiota composition in *Eif2ak4*-deficient mice. This may result in the selection of a pro-inflammatory bacterial population, thereby contributing to the development of chronic intestinal inflammation.

## Materials and Methods

**Mice.** *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice<sup>51</sup> were kindly provided by Dr. D. Ron (Institute of Metabolic Science, Cambridge, UK). Heterozygote CEABAC10 transgenic (Tg) male mice<sup>25</sup> were backcrossed for ten generations with 5-week-old female C57BL/6 mice (Charles River Laboratories). Tg mice at the tenth backcross were then crossed with *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice to generate Tg/*eif2ak4*<sup>+/+</sup> and Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice. All mice were housed under specific pathogen-free conditions in the animal care facility at the University of Clermont Auvergne (Clermont-Ferrand, France).

**In vivo infection and bacterial colonization evaluation.** At age of 12 weeks, *eif2ak4*<sup>+/+</sup> and *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice, or Tg/*eif2ak4*<sup>+/+</sup> and Tg/*eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice were administered orally by gavage during three days (once per day) with either 10<sup>9</sup> of ampicillin-erythromycin-resistant AIEC LF82 strain isolated from a CD patient<sup>14</sup> or the rifampicin-resistant non-pathogenic *E. coli* K12 MG1655 strain. Bacterial persistence in the gut was evaluated every day post-infection. For this, fresh fecal samples (100–200 mg) were homogenized in PBS. After serial dilutions, fecal samples were plated on LB agar plates containing 50 µg/ml ampicillin and 20 µg/ml erythromycin (Euromedex, E002) to isolate LF82 bacteria, or containing 300 µg/ml rifampicin (Euromedex, 1059-B) to isolate *E. coli* K12 bacteria, and were incubated overnight at 37 °C. The number of bacteria was determined by counting the colony-forming units (CFU).

**Quantification of fecal lipocalin-2.** The levels of the inflammatory marker Lcn-2 were measured in feces by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) as previously described<sup>41</sup>. For this, frozen fecal samples were reconstituted in PBS containing 0.1% Tween 20 (Euromedex, 2001-A) and were disrupted to obtain a homogeneous fecal suspension. These samples were then centrifuged for 10 minutes at 12,000 rpm at 4 °C. Clear supernatants were collected and stored at –80 °C until analysis. Lcn-2 levels in the supernatants were measured using a mouse Duoset Lcn-2 ELISA kit (R&D Systems, USA) according to the manufacturer’s instructions.

**Microbiota composition analysis by Illumina Sequencing.** DNA was extracted from frozen mouse fecal samples using NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel GmbH & Co, Germany) following manufacturer’s instructions. DNA samples were used for 16S rRNA gene sequencing using the Illumina technology as previously described<sup>41</sup>. Briefly, the 16S rRNA gene V4 variable region PCR primers F515/R806<sup>52</sup> with barcode on the forward primer were used in a PCR using the HotStartTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, USA) under the following conditions: 94 °C for 3 minutes, followed by 28 cycles of 94 °C for 30 seconds, 53 °C for 40 seconds and 72 °C for 1 minute, after which a final elongation step at 72 °C for 5 minutes was performed. After amplification, PCR products were checked in 2% agarose gel to determine the success of amplification and the relative intensity of bands. All samples were pooled together in equal proportions based on their molecular weight and DNA concentrations. Pooled samples were purified using calibrated Ampure XP beads (Agencourt Bioscience Corporation, USA). Then the pooled and purified PCR product was used to prepare DNA library by following Illumina TruSeq DNA library preparation protocol. Sequencing was performed at MR DNA ([www.mrdnalab.com](http://www.mrdnalab.com), Shallowater, TX, USA) on a MiSeq following the manufacturer’s guidelines. Sequence data were processed using MR DNA analysis pipeline (MR DNA, Shallowater, TX, USA). In summary, sequences were joined, depleted of barcodes then sequences <150 bp were removed, sequences with ambiguous base calls were removed. The software package, Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) was used for filtering and analysis of attained sequences. Chimeras were removed and Operational taxonomic units (OTUs) were generated by clustering at 3% divergence



(97% similarity). Final OTUs were taxonomically classified using BLASTn against a curated database derived from GreenGenes<sup>53</sup>, RDPII and NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), <http://rdp.cme.msu.edu>).

Singletons and any OTUs present in all samples <0.1% were removed before further analyses. Subsequent analyses of diversity were performed at a depth of 20,000 sequences per sample. Beta diversity was performed with QIIME using a Principal Coordinate Analysis (PCoA), measuring dissimilarities at phylogenetic distances based on weighted UniFrac analysis. QIIME was also used to provide the relative abundance of bacterial groups at different taxonomic levels between each group of mice.

**Quantification of target bacterial group by qPCR.** DNA extracted from frozen mouse fecal samples as described above was used for qPCR to quantify target bacterial group. Each qPCR reaction mixture consisted of iQ SYBR Green Supermix (Biorad), 0.25  $\mu$ M of each primer and 10 ng of extracted DNA. To detect AIEC LF82, primers binding to the LF82-specific *pMT* gene (forward 5'-CCATTCATGCAGCAGCTCTTT-3' and reverse 5'-ATCGGACAACATTAGCGGTGT-3') were used<sup>37</sup>. A region of the 16S rRNA gene of all bacteria was amplified using the universal primers (Forward: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAG-3' and reverse 5'-GACTACCAGGGTATCTAATCC-3')<sup>54</sup>. Amplification programs included an initial denaturation at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles consisting of denaturation at 95 °C for 30 sec, annealing at 55 °C (all bacteria) and 60 °C (LF82-specific gene *pMT*) for 30 sec and extension at 72 °C for 5 min. Data were normalized to total bacterial. Fold-induction was calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method as follows:  $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{pMT}} - C_{t_{total\ bacteria}})_{group\ 2} - (C_{t_{pMT}} - C_{t_{total\ bacteria}})_{group\ 1}$ , and the final data were derived from  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

**Ethical statement.** Animal protocols were carried out in strict accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Université Clermont-Auvergne, Clermont-Ferrand, France and were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the Department of Auvergne (Comité d'éthique en matière d'expérimentation animale CEMEA Auvergne, registered under the number C2EA - 02) and the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS#2500-20 15070710163594).

**Statistical analysis.** For bacterial CFUs, lcn-2 levels and relative abundance of bacterial genus data, values were expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA test followed by Bonferroni's post-hoc comparisons with GraphPad Prism version 5.01 software (GraphPad Software, San Diego, CA). PCoA data of mouse groups were compared, and statistical significance of clustering was determined using Permanova method using QIIME software package. A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant. \**P* < 0.05; \*\**P*  $\leq$  0.01; \*\*\**P*  $\leq$  0.001; \*\*\*\**P*  $\leq$  0.0001.

## References

- Gill, S. R. *et al.* Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* **312**, 1355–1359 (2006).
- Rajilić-Stojanović, M. Function of the microbiota. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **27**, 5–16 (2013).
- Sommer, F., Anderson, J. M., Bharti, R., Raes, J. & Rosenstiel, P. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.58> (2017)
- Carriere, J., Darfeuille-Michaud, A. & Nguyen, H. T. Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol* **20**, 12102–17 (2014).
- Frank, D. N. *et al.* Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 13780–13785 (2007).
- Manichanh, C. *et al.* Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* **55**, 205–211 (2006).
- Willing, B. P. *et al.* A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* **139**, 1844–1854.e1 (2010).
- Tong, M. *et al.* A modular organization of the human intestinal mucosal microbiota and its association with inflammatory bowel disease. *PLoS One* **8**, e80702 (2013).
- Gophna, U., Sommerfeld, K., Gophna, S., Doolittle, W. F. & Veldhuyzen van Zanten, S. J. O. Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 4136–4141 (2006).
- Scanlan, P. D., Shanahan, F., O'Mahony, C. & Marchesi, J. R. Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3980–3988 (2006).
- Peterson, D. A., Frank, D. N., Pace, N. R. & Gordon, J. I. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe* **3**, 417–427 (2008).
- Baumgart, M. *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.* **1**, 403–418 (2007).
- Conte, M. P. *et al.* Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **55**, 1760–1767 (2006).
- Darfeuille-Michaud, A. *et al.* Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **115**, 1405–13 (1998).
- Kotlowski, R., Bernstein, C. N., Sepehri, S. & Krause, D. O. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2 + D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* **56**, 669–675 (2007).
- Martin, H. M. *et al.* Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* **127**, 80–93 (2004).
- Martinez-Medina, M. *et al.* Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **15**, 872–82 (2009).
- Neut, C. *et al.* Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* **97**, 939–946 (2002).
- Sasaki, M. *et al.* Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* **87**, 1042–1054 (2007).
- Swidsinski, A. *et al.* Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**, 44–54 (2002).
- O'Brien, C. L. *et al.* Comparative genomics of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Gut*, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-311059> (2016).
- Darfeuille-Michaud, A. *et al.* High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127**, 412–21 (2004).

23. Glasser, A. L. *et al.* Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun* **69**, 5529–37 (2001).
24. Barnich, N. *et al.* CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* **117**, 1566–74 (2007).
25. Carvalho, F. A. *et al.* Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med* **206**, 2179–89 (2009).
26. Lapaquette, P., Glasser, A. L., Huett, A., Xavier, R. J. & Darfeuille-Michaud, A. Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol* **12**, 99–113 (2010).
27. Lapaquette, P., Bringer, M.-A. & Darfeuille-Michaud, A. Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell Microbiol* **14**, 791–807 (2012).
28. Nguyen, H. T. *et al.* Crohn's disease-associated adherent invasive *Escherichia coli* modulate levels of microRNAs in intestinal epithelial cells to reduce autophagy. *Gastroenterology* **146**, 508–19 (2014).
29. Nguyen, H. T., Lapaquette, P., Bringer, M. A. & Darfeuille-Michaud, A. Autophagy and Crohn's disease. *J Innate Immun* **5**, 434–43 (2013).
30. Bretin, A. *et al.* Activation of the EIF2AK4-EIF2A/eIF2 $\alpha$ -ATF4 pathway triggers autophagy response to Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* infection. *Autophagy* **12**, 770–783 (2016).
31. Tsalikis, J., Croitoru, D. O., Philpott, D. J. & Girardin, S. E. Nutrient sensing and metabolic stress pathways in innate immunity. *Cell Microbiol* **15**, 1632–41 (2013).
32. Funke, B. *et al.* Functional characterisation of decoy receptor 3 in Crohn's disease. *Gut* **58**, 483–491 (2009).
33. Kugathasan, S. *et al.* Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease. *Nat. Genet.* **40**, 1211–1215 (2008).
34. Ravindran, R. *et al.* The amino acid sensor GCN2 controls gut inflammation by inhibiting inflammasome activation. *Nature* **531**, 523–527 (2016).
35. Rehman, A. *et al.* Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut* **60**, 1354–1362 (2011).
36. Chassaing, B. *et al.* Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. *PLoS One* **7**, e44328 (2012).
37. Galtier, M. *et al.* Bacteriophages targeting adherent invasive *Escherichia coli* strains as a promising new treatment for Crohn's disease. *J. Crohns Colitis*, <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw224> (2017).
38. Fedorak, R. N. & Ismond, K. P. Practical Considerations and the Intestinal Microbiome in Disease: Antibiotics for IBD Therapy. *Dig. Dis. Basel Switz.* **34**, 112–121 (2016).
39. Kronman, M. P., Zaoutis, T. E., Haynes, K., Feng, R. & Coffin, S. E. Antibiotic exposure and IBD development among children: a population-based cohort study. *Pediatrics* **130**, e794–803 (2012).
40. Schaubeck, M. *et al.* Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut* **65**, 225–237 (2016).
41. Agus, A. *et al.* Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Sci. Rep.* **6**, 19032 (2016).
42. Martinez-Medina, M. *et al.* Western diet induces dysbiosis with increased *E coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut* **63**, 116–124 (2014).
43. Chassaing, B., Koren, O., Carvalho, F. A., Ley, R. E. & Gewirtz, A. T. AIEC pathobiont instigates chronic colitis in susceptible hosts by altering microbiota composition. *Gut* **63**, 1069–1080 (2014).
44. Munyaka, P. M., Rabbi, M. F., Khafipour, E. & Ghia, J.-E. Acute dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis promotes gut microbial dysbiosis in mice. *J. Basic Microbiol.* **56**, 986–998 (2016).
45. Sokol, H. *et al.* Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310746> (2017).
46. Al-Asmakh, M. & Zadjali, F. Use of Germ-Free Animal Models in Microbiota-Related Research. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 1583–1588 (2015).
47. Round, J. L. & Mazmanian, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 313–323 (2009).
48. Mondot, S. *et al.* Altered gut microbiota composition in immune-impaired Nod2(–/–) mice. *Gut* **61**, 634–635 (2012).
49. Sadaghian Sadabad, M. *et al.* The ATG16L1-T300A allele impairs clearance of pathosymbionts in the inflamed ileal mucosa of Crohn's disease patients. *Gut* **64**, 1546–1552 (2015).
50. Ellinghaus, D., Bethune, J., Petersen, B.-S. & Franke, A. The genetics of Crohn's disease and ulcerative colitis—status quo and beyond. *Scand. J. Gastroenterol.* **50**, 13–23 (2015).
51. Harding, H. P. *et al.* Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* **6**, 1099–1108 (2000).
52. Caporaso, J. G. *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**(Suppl 1), 4516–4522 (2011).
53. DeSantis, T. Z. *et al.* Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5069–5072 (2006).
54. Zwielerhner, J. *et al.* Changes in human fecal microbiota due to chemotherapy analyzed by TaqMan-PCR, 454 sequencing and PCR-DGGE fingerprinting. *PLoS One* **6**, e28654 (2011).

## Acknowledgements

This work was supported by Université Clermont Auvergne, Inserm (UMR1071), INRA (USC 2018) and “Nouveau chercheur” grant from Conseil Régional Auvergne (to Hang Nguyen). We would like to thank Dr. Alain Bruhat and Dr. Elisabeth Billard for their help with the mice.

## Author Contributions

A. Bretin performed experiments, acquired, analyzed and interpreted data and wrote the manuscript. C. Lucas and A. Larabi performed experiments. G. Dalmaso and N. Barnich critically revised the manuscript for important intellectual content. R. Bonnet analyzed and interpreted data and revised the manuscript for important intellectual content. H.T.T. Nguyen developed experimental concepts and designs, analyzed and interpreted data and wrote the manuscript.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30055-y>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018