

Année 2018-2019

École Doctorale  
Des Sciences de la Vie et de la Santé  
*Thèse*

Présentée à l'Université Clermont Auvergne  
Pour l'obtention du grade de DOCTEUR  
(Décret du 5 Juillet 1984)

Spécialités : **Immunologie, Cancérologie, Microbiologie**

Soutenue le 12 Décembre 2018

**Amélie LOPÈS**

---

**Infection chronique par les souches  
*Escherichia coli* colibactine-positives :  
Impacts sur le micro-environnement immunitaire  
colique dans le contexte du cancer colorectal**

---

Rapporteurs :

Mme Muriel MATHONNET, PU-PH, CHU de Limoges/ Université de Limoges  
Mr Jean-Claude SIRARD, DR2, Institut Pasteur de Lille

Examineurs :

Mme Nathalie ROLHION, Chercheur, Institut Pasteur de Paris  
Mr Axel HARTKE, PU, Université de Caen

Co-directeurs de thèse :

Mme Mathilde BONNET, MCU, Université Clermont Auvergne  
Mr Bruno DUMAS, Chef de groupe, Sanofi R&D

Membre invité :

Mme Elisabeth BILLARD, MCU, Université Clermont Auvergne

**Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte**  
M2isH, Clermont Auvergne, Inserm U1071, USC-INRA 2018  
28, place Henri Dunant – 63001 Clermont Ferrand Cedex  
Sanofi R&D, 13 quai Jules Guesde, Vitry-sur-Seine - 94400





## Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier Madame le professeur **Muriel Mathonnet**, et Monsieur le docteur **Jean-Claude Sirard** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de Doctorat et d'avoir consacré du temps à la lecture et à l'analyse de ce manuscrit. Je tiens également à remercier Madame le docteur **Nathalie Rolhion** et Monsieur le professeur **Axel Hartke** d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse également mes remerciements à Madame **Katarina Radošević** pour votre soutien lors de la demande de financement de cette thèse CIFRE à Sanofi, ainsi que pour votre implication et vos échanges enrichissants lors de l'organisation des journées et réunions dédiées aux thèses de l'Unité Global Biotherapeutics. Je tiens également à remercier **Nicolas Barnich** et **Alain Fournier** pour m'avoir accueillie chaleureusement dans vos laboratoires respectifs : M2iSH et Expression system, ainsi que pour nos discussions échangées.

Merci à **Emmanuelle Vigne** pour ton accueil dans cette nouvelle équipe Enabling technologies, pour nos nombreuses discussions, ton soutien et tes précieux conseils depuis l'apprentissage ingénieur jusqu'à cette fin de thèse.

Merci également à **Souad Naimi** qui m'a ouvert les portes de la plate-forme d'imagerie de Sanofi et m'a accueillie dans son équipe comme un membre à part entière alors que je n'étais qu'un petit bloc de paraffine rapporté. Merci de ton enthousiasme pour notre projet, de nos échanges, de ton soutien et de ta confiance en me laissant libre accès à un savoir-faire et à des ressources incroyables qui ont été pour moi un enrichissement professionnel et personnel important.

Je tiens à remercier particulièrement mes deux co-directeurs de thèse **Mathilde Bonnet** et **Bruno Dumas**, très souvent surnommés « Maman et Papa » par la majorité des membres des deux labos... Vous êtes en effet les parents fondateurs de ma merveilleuse aventure avec la biologie, de mes balbutiements lorsque je découvrais ébahie l'existence de la pipette et de comment l'utiliser, à mes premiers pas dans des hypothèses farfelues (toujours un peu désorganisées de prime abord, je l'avoue), à l'envol avec la rédaction de ce manuscrit de thèse, et vous le resterez à chaque nouveau pas. Les mots ne seront jamais assez forts pour vous transmettre mes remerciements, mon respect et ma reconnaissance sincère. Travailler avec vous a été une aventure extraordinaire, très animée quelques fois mais tellement formatrice et enrichissante. J'ai beaucoup appris à vos côtés aussi bien professionnellement, que personnellement et humainement.

**Mathilde**, tout a commencé il y a huit ans (si je ne m'abuse mais tu connais mon handicap de mémoire avec les chiffres ...), sur les bancs d'un amphitheâtre de bio cell où j'étais loin de me douter que ta rencontre allait être l'une des plus importantes de ma jeune vie professionnelle. Puis il y a eu ce stage de DUT où tu m'as transmis ce virus (ou plutôt cette bactérie) brûlant de la passion pour la recherche qui à mon plus grand plaisir ne m'a jamais lâché et s'est transformé en une véritable symbiose. Depuis ce stage, tu as été un véritable soutien tout au long de mon parcours par la suite, répondant à mes inquiétudes même à distance (oups déjà) et je t'en remercie. Merci également de ta confiance et de m'avoir une nouvelle fois accueillie parmi tes troupes, mais cette fois pour une thèse et « en garde alternée » dans un Paris-Clermont que tu connais bien toi aussi. Merci pour ta patience et ta disponibilité sans relâche pour les révisions des écrits et oraux (pardon pour ma logique tellement logique ?). Merci de ton exigence et de ta rigueur qui m'ont permis d'évoluer tout au long de cette thèse. Merci de ta force incroyable à gérer tant de choses différentes en même temps et tenir fermement le cap dans les moments les plus compliqués, elle a toujours été une source d'inspiration pour moi. Merci pour nos discussions, tes conseils, ton écoute et tes attentions aussi bien professionnelles que personnelles. J'aurai appris également de toi, qu'apprendre à accepter ses faiblesses et les prendre en compte étaient à la fois un gain d'efficacité et une preuve de maturité. Merci pour tout.



**Bruno**, je me rappelle encore de cet entretien pour le poste d'apprenti il y a cinq ans, souvenir inoubliable qui marqua le début là encore d'une des rencontres les plus déterminantes de mon jeune parcours scientifique. Merci pour ces deux ans d'apprentissage aux côtés de ta passion et de ta créativité inébranlable, que j'ai toujours admirée ; qui ont confirmé ma vocation pour la recherche. Merci de ta bonne humeur et de tes blagues (qui méritent qu'on sorte le « dapi rouge »). Merci de la conviction avec laquelle tu as cru en moi, me laissant œuvrer librement dans ta forteresse « immunotechnologique », encourageant chacune de mes idées même les plus farfelues, et me donnant l'opportunité de participer à des projets et rencontres plus stimulantes les unes que les autres, qui m'ont tant fait mûrir (encore plus efficace qu'un switch isotypique). Merci également de ta confiance lors de l'initiation de cette demande de CIFRE à Sanofi alors qu'il s'agissait d'un véritable « Ovni » pour tes activités de recherches habituelles. Merci pour tes conseils bienveillants et tes paroles réconfortantes, entre deux coups de pédale sur les quais de Vitry et Alfortville. Je te remercie pour tous ces échanges si riches et toutes ces idées et hypothèses folles partagées autour d'un déca le soir, certaines restantes inachevées sur un morceau de chocolat. Merci de m'avoir poussé à m'affirmer même si j'ai encore des progrès à faire... J'aurai appris de toi que la confiance en soi n'est pas de la prétention mais une nécessité et que « je peux me le permettre » (promis je ne l'oublierai pas et ferai en sorte de l'appliquer). Merci pour tout.

Je tiens ensuite à remercier **Elisabeth** et **Al Hassan**, qui ont également participé à l'encadrement de cette thèse à milles facettes et dont l'expertise respective en immunologie ou imagerie/quantification par algorithme ont été des piliers.

**Elisabeth... Zabou**, comment t'exprimer toute ma reconnaissance et mes remerciements... Toi qui dès 8h00 du matin en amphî, me remplissait les yeux d'étoiles par ton récit fascinant sur ces vaillant guerriers immunitaires (je n'oublierai jamais ton mime de l'anticorps...) et qui a stimulé ma curiosité telles les signaux de costimulation animent les lymphocytes. Merci de m'avoir fait découvrir cet univers avec cette énergie et cette passion qui donnent tant le sourire. Merci pour toutes nos heures voir nuits au cytomètre, et de ta bonne humeur à chaque instant, même lorsque nos synapses étaient bien fatiguées. Merci de te poser autant de questions que moi et de trouver ça normal. Merci pour tous ces moments passés sur les travaux écrits et oraux, des corrections aux finalisations, en passant par ces échanges toujours très formateurs. J'ai toujours admiré la rapidité et la précision avec laquelle tu utilises ces vastes étendues de connaissances « immuno-biologiques » qui peuplent ta matière grise, travailler avec toi a été un réel plaisir et tellement enrichissant. Merci pour nos délires d'immunologistes, de tes attentions et de tous ces moments où tu as su trouver les mots pour me réconforter. Merci pour ces matins où j'aurai pu être « ronchon » mais où une simple blague échangée en salle café me remotivait pour la journée. Tu as été un véritable ange gardien pour moi lors de cette thèse. Merci pour tout.

**Al Hassan**, mille mercis ne seraient pas suffisants... alors on va dire que si l'on passe un tissu entier en 300 D sous le microscope le compte sera peut-être satisfaisant. Merci de m'avoir si bien accueillie dans cette équipe experte en imagerie, que j'ai découverte lors de mon début de thèse, et de m'avoir tant appris dans toutes les dimensions. Je te remercie également de m'avoir laissé libre accès à tant de matériel de pointe et surtout à vos savoir-faire si précieux, qui ont permis une avancée non négligeable dans ces travaux de thèse. Merci de ton engouement pour notre projet et ton énergie positive. Merci de m'avoir livré tous les mystères de l'univers des codes et de l'incroyable Donald... Merci pour tous ces sandwiches partagés devant un algorithme dans une superbe ambiance et toujours avec le sourire. Merci de ton soutien sans relâche et de tes bonnes vibrations informatiques qui ont souvent interférées dans les ondes de ma poisse légendaire avec les ordinateurs... qui se sont des fois étendues jusqu'au scanner de lames ... (le bug de la lame disparue a-t-il de nouveau frappé ?). Merci de ta disponibilité et de ta philosophie de vie si bienveillante. Merci pour tout.



*Je tiens également à remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai interagis lors de cette thèse, au sein des différents laboratoires : **M2iSH, Enabling technologies, Biologics Research, Translational Science** mais aussi dans d'autres équipes. Mes pages me sont comptées je ne pourrai pas être aussi exhaustive mais sachez que chacun d'entre vous à contribué de près ou de loin à faire de cette aventure la plus belle qu'il soit pour moi.*

*Merci à toute l'équipe **Translational Science** qui m'a si bien adoptée, m'a beaucoup soutenue et m'a fait découvrir l'univers merveilleux de la fluorescence et de l'analyse d'image.*

*Merci à **Élisabeth**, de m'avoir formé à toutes ces techniques d'immunohistochimie avec le sourire et une joie de vivre toujours plus forte. Merci pour tous tes conseils. Merci pour nos tisanes/ fruits ré-énergisantes. Je n'oublierai jamais ces moments passés derrière le microtome à papoter et même à refaire le monde.*

*Merci à mes deux acolytes de bureau **Rabab alias Rababounette et Christelle alias Tata Chrichri**. Merci pour tous ces moments de chansons, ces fous rires, ces grandes discussions et ces paroles réconfortantes.*

*Merci à toi **Rababounette** d'avoir partagé ce Ventana si précieux qui faisait des bruits dignes de R2D2. Merci à nos « délires imagériques » qui m'ont souvent fait rire. Merci pour nos longues discussions sur le trajet, entre deux RER.*

*Merci à toi **Tata Chrichri** pour tous tes conseils pour manier les anticorps fluorescents tel un sabre laser de padawan. Merci d'avoir accepté de me faire visiter la plate-forme d'imagerie quand j'étais en apprentissage d'ingénieur en échange de quelques cellules fluorescentes, ce qui marqua le début d'une belle amitié (qui aurais pu nous dire qu'on serait amenées à « microtomer » ensemble au son de Jean Jacques Goldman ou des enfoirés à ce moment-là ?), merci de ta disponibilité et de toutes ces belles choses que tu m'as dites. Merci de la force avec laquelle tu crois en moi et d'avoir toujours su trouver les mots pour me rassurer. Sache que même si je pars « là-bas » (tu te rappelles de ce concert dans le labo ?) j'aurai toujours une petite pensée pour toi.*

*Merci à **Corinne**, mon double de scan. Merci d'avoir été si arrangeante pour que je puisse passer toutes mes lames avec cette merveille de la technologie moderne surnommée « homme de ma vie » par certaines ou « machine à torture » par d'autres : le scanner de lame. Merci de ce petit regard compatissant à chaque message d'erreur ou de lames cachées dans la boîte noire par le bras farceur qui se manifestait souvent le midi quand tu venais me chercher pour manger. Merci également de ta bonne humeur et pour nos fous rires.*

*Merci à **Anne** pour toutes ces discussions échangées. Merci d'avoir partagée tes souvenirs de thèse avec moi et d'avoir cru en ma petite bactérie. Merci de l'intérêt que tu as porté à notre projet et de la considération que tu m'as apportée. Merci d'avoir toujours eu une attention pour moi et de m'avoir parfois sorti la tête du scanner certains vendredi soir.*

*Merci à **Anne-Laure** d'avoir pris du temps pour me conter les secrets du tissu colique et des adénocarcinomes à travers le regard curieux des multi-têtes.*

*Merci également à **Armelle, Hi, Françoise, Patricia, Sylvie, Véronique et Johan** pour votre accueil si chaleureux et votre bonne humeur. Merci d'avoir participé à donner une touche de douceur fluorescente à ce parcours de thèse. A nos pauses café et à nos scénarios loufoques.*



Merci à toute l'équipe **Enabling Technologies et mes anciens compagnons de Biologics research** qui pour la plupart m'accompagnent depuis mon arrivée à Sanofi et avec qui j'ai tissé des liens sincères. Merci également à d'autres personnes rencontrées sur le site de Vitry-Sur-Seine.

**Nabil... Nabilou...** là encore c'est avec beaucoup de tendresse que j'écris ces lignes... les mots me manquent pour te remercier... merci pour tout ce que tu as fait pour moi dès mon arrivée à Sanofi. Tu as été un pilier pendant mes deux années d'apprentissage et je ne compte plus les souvenirs heureux partagés à tes côtés. Merci pour tout ce que tu m'as appris aussi bien techniquement, que fondamentalement et humainement. Merci de m'avoir soutenue lors de la préparation de l'oral d'entrée du Master 2 d'immuno et d'avoir toujours cru en moi. Merci pour tous ces fous rires sous le PSM, en labo de biomiol ou en culture cell (un petit medley qui te rappellera des choses : « clone 95 .... Toi qui viens du 9...5... », « il s'appelle Alex » ou encore « allez petit soldat... »). Merci pour ces chocolats et ces jus de carottes...qui n'ont jamais voulu tomber du distributeur. Merci pour nos retrouvailles à Sanofi lors de la thèse et nos rires. Merci pour toutes ces fois où je n'ai pas eu à te parler pour que tu me comprennes. Merci pour ton soutien inaltérable. Travailler à tes côtés a été un immense bonheur.

**Isabelle M.**, merci pour tes attentions dès l'apprentissage et d'avoir toujours été aux petits soins envers moi. Merci en particulier d'avoir veillé sur moi lors de ce jour de manip intense où j'avais fait la rencontre inopinée d'un poteau en longeant la Seine à vélo, avant de venir prendre soin de mes clones (j'imagine déjà ton sourire en lisant ces lignes... « non je n'ai pas vu le poteau »...). Merci d'avoir été là lors de ce mois de mars difficile, à mon retour d'Aurillac, ton soutien a été une force indescriptible et je ne t'en remercierai jamais assez. Merci pour toutes nos discussions et nos réflexions. Merci d'avoir été encore plus présente lors de ma thèse, pour tous ces moments échangés qui ont définitivement scellés un lien important. Merci de tes récits de voyage chaque midi, qui m'ont toujours fait rêver. Merci pour tous nos emménagements et déménagements de bureau. Excuse-moi d'avoir été quelque fois têtue et de ne pas t'avoir toujours écouté quand tu me disais de rentrer de peur que je passe mon week-end sur mes algorithmes. Merci d'avoir veillé sur moi.

**Elisabeth R.** là encore, quelle belle rencontre...Nous n'étions que des voisines de couloirs mais nous sommes vite devenues proches après quelques repas et pauses café échangés lors de l'apprentissage. Merci pour tous tes conseils et nos conversations rassurantes sur mes projets professionnels. Merci d'avoir partagé tes expériences passées très enrichissantes, parfois même hors du commun. Merci pour nos débats scientifiques qui m'ont fait beaucoup réfléchir. Merci pour ton soutien de tous les jours et de tous ces messages que tu m'as envoyé quand j'étais à Clermont en pleine rédaction de thèse, tu n'imagines pas à quel point ils m'ont touché.

**Dorothée**, merci pour nos discussions cytométriques lors du master 2 et pour toutes les autres qui ont suivies lors de la thèse sur les cellules immunitaires et le microbiote. Merci de ta bonne humeur et d'avoir toujours eu du temps pour répondre à mes questions.

**Neila**, ma voisine de bureau, merci pour tous ces rires quand le « trouillomètre du thésard » frôlait ce que tu aimes appeler la « zone rouge ». Merci de m'avoir partagé tes doutes d'ex-thésarde et tes joies de jeune recrue.

**Marie-Christine**, alias « **Madame poop** », mon lien d'ancrage microbiote à Sanofi. Merci d'avoir été, dès mon master 2 un véritable soutien. Merci pour toutes ces discussions passionnantes échangées et pour nos hypothèses « microbiotiques ». Merci pour les rencontres que tu m'as permise de faire. Merci de croire en moi.

Merci à **Isabelle S.** pour tous ces billets de trains, réservations d'hôtel, problèmes techniques, problèmes matériels... pour lesquels tu m'as aidé à merveille. Tu as été une véritable petite fée de voyage et « my travel » ne m'a jamais paru aussi clair qu'à travers tes yeux. Merci pour tout.





Merci également à tous les apprentis ingénieurs et de licence qui ont animé l'équipe de leur bonne humeur, leurs jeux de mots et même leur magie ... **Marianne, Alison, Alice, Sofia, Marie, Louise, Océane, Ahmed, Amélie, Léa, Michaël, Jonathan, Emmanuel.**

Merci également à **Jean-François, Benoît, Klervi, Erwan, Eve, Anne-Brie, Qing, Nadine, Mélody, Isabelle A., Florence, Nicolas, Charlotte et Raphaëlla,** pour votre bonne humeur et ses discussions échangées.

Merci également à **Georges, Thierry et Sühk** pour l'intérêt que vous avez porté à notre projet, le temps que vous nous avez consacré et ce petit cadeau d'oncologie dont vous nous avez fait don.

Merci à tous les membres de l'équipe **M2iSH**, avec lesquels j'ai passé la plus grande partie de mon temps pendant cette thèse (pour ceux qui se le demande encore, je vais lever le suspens je n'ai jamais dormi au labo c'est promis) et que je n'oublierai jamais. J'ai rencontré la plupart d'entre vous lorsque je portais encore des couches culottes sous ma blouse d'étudiante de DUT, alors il me semblait si naturel de réaliser ma thèse à vos côtés, cela a été un réel bonheur.

**Jérem**, quelle joie de t'avoir retrouvé au labo, pour ma thèse. Merci pour nos pauses passerelles et nos discussions qui m'ont toujours remonté le moral. Là encore les mots me manquent pour t'exprimer à quel point tes paroles ont été un réel réconfort et à quel point je t'en remercie. Merci aussi d'avoir toujours été là pour nos soirées labos et nos moments de rires. Merci pour tes conseils et cette touche de douceur que tu apportes au labo.

**Valérie**, merci pour ces instants si drôles auxquels personne ne s'attend (j'aurai toujours une pensée amusée pour la fois où tu nous as décrit cette envie soudaine d'être une caisse...LA caisse...tu te souviens...?). Merci de ta bonne humeur et d'être toujours partante pour aller boire un verre. Merci pour toutes ces discussions variées de l'actualité, à la vie en générale, en passant par le cinéma et le rugby.

**Delphine**, merci pour nos « papotages » à cœur ouvert sur la façon de gérer sa thèse et sa vie de chercheur avec sa vie privée. Merci de m'avoir parlé de ton expérience de façon très sincère, sans chercher à influencer mes choix pour la suite, ces discussions ont toujours apportées beaucoup d'éléments de réponse à mes questions personnelles. Merci pour cette soirée de karaoké tellement drôle, j'espère qu'un jour tu me livreras le secret de tant de succès...

**Hang**, merci pour tes compliments toujours très sincères à chacune de mes présentations ou répétitions d'oraux qui m'ont toujours rassuré. Merci également pour tes expressions bien à toi qui peuvent se montrer très drôles. Merci pour ces paroles réconfortantes que tu as lors d'un trajet en voiture et qui m'ont apaisée pour la suite.

**Guillaume**, merci pour ses mots improbables que tu inventais à partir des mots croisés. Merci pour ses parties de rires lors des repas de midi. Merci pour cette légèreté que tu apportes au labo.

**Émilie V.**, merci pour tes conseils précieux en western blot et pour nos partages de PSM. Merci également pour tes remarques toujours très bienveillantes après mes présentations au labo.

**Caro**, merci pour tous ces soucis techniques résolus grâce à toi, et parfois même ces situations cocasses dont tu as réussi à me sortir. Petite pensée pour ce moment où la photocopieuse/imprimante s'est remise miraculeusement à fonctionner juste en te voyant alors qu'elle me narguait de son clignotant rouge depuis longtemps...Merci pour ces verres échangés au Brew Pub.



*Adeline*, le véritable petit boute-en-train du labo. Merci pour cette énergie à 10<sup>14</sup> volts que tu dégages. Merci pour toutes ces discussions sur la méditation et la pleine conscience. Tu es indéniablement celle qui me comprend le plus quand je prône les bienfaits de petit bambou. Merci pour ces « poillades » mémorables et ces soirées hors labo. Merci de ton soutien aussi bien dans l'organisation de sorties que dans les moments les plus compliqués. Merci aussi d'avoir su repérer les moments où j'avais juste besoin de souffler ou de rire sans que je ne dise rien. Merci pour tout.

*Gwen*, alias *ma Gwenita del sol...* et plus récemment *mon petit kinder* (cachottière...) que te dire ma poulette... j'ai adoré travailler avec toi. Dès ton arrivée au laboratoire une petite brise de printemps est venue se joindre à ma thèse. Merci énormément pour tout. Merci d'avoir gardé nos petits bébés APC pendant que je partais pour les contrées parisiennes (« quelle mère indigne »...) ou infectieuse. Merci de ton aide lors des expérimentations vivo et de cette rigueur si caractéristique de ton travail. Sans toi cette thèse aurait été bien plus compliquée. Réaliser ma dernière manip de thèse avec toi a été la cerise sur le gâteau je ne pouvais pas rêver mieux aussi bien professionnellement mais aussi et surtout personnellement. Merci également de ton soutien, de nos délires (puis-je avouer que nous avons essayé de décrocher le million en jouant les numéros de tatouages des souris APC au loto ?), de nos fous rires (ne perds jamais ce rire si contagieux), de nos chansons, de nos repas de midi.... Plus qu'une collègue tu es devenue une véritable amie.

*Alex*, merci pour ces séries de tatouages APC, et pour avoir été également aux petits soins de nos bébés APC quand nous ne pouvions pas l'être. Merci de ton non filtre qui signe le début de grands fous rires.

*Virginie...* Oh *ma Vivie...* Ah toi... Merci du début à la fin de cette thèse. Merci de m'avoir chaleureusement accueillie au laboratoire et de ton soutien dans les moments compliqués aussi bien professionnels que personnels. Merci de ce petit rayon de soleil que tu dégages à chacune de tes apparitions. Merci de m'avoir toujours proposée ton épaule pour me reposer et vider mon sac (tu as toujours su me faire sortir les vers du nez... coquine). Merci de ces fous rires qui rien qu'en y pensant me décrochent la mâchoire. Merci pour nos chansons, nos soirées qui m'ont toujours réconfortée. Merci de tous ces petits moments de la vie partagés ensemble, les bons comme les moins bons qui ont construit cette si belle amitié qui nous lie à présent. Merci d'avoir été ma coéquipière de la Cellule Anim' et je compte sur toi pour la faire perdurer, il est si important de passer également un peu de temps hors du labo pour apprendre à se connaître et créer une belle ambiance de travail. Merci de ton soutien ma Vivie. J'en profite pour remercier également ta moitié, *Clément*, que j'ai appris à connaître au fil de nos sorties et avec qui j'ai beaucoup discuté et ris. Merci à toi de partager cette folle passion du pâté en croûte. N'oubliez pas tous les deux, que où que je sois il y aura toujours une petite place pour vous accueillir.

*Stéphanie*, ma *petite Steph...* tellement de remerciements se bousculent également pour toi. Que de bons moments partagés... Merci pour ces instants drôles dans le grand labo, merci pour ta bonne humeur et de toujours proposer ton aide. Merci pour nos soirées, merci pour ce repas pizza tard au labo et de ce week-end passé à rédiger chez toi lorsque j'avais le plus besoin de soutien. Merci pour nos trajets direction Vic-le-Comte pour des moments de soft boxing aussi drôles que libérateurs. Je n'oublierai jamais le fameux trajet où j'avais malencontreusement « oublié » un objet sur mon toit de voiture... et de notre sauvetage à haut risque. Merci pour ces réflexions et ces discussions philosophiques et/ou politiques jusqu'à tard le soir des fois. Merci d'avoir toujours été là et d'avoir été un véritable et puissant soutien tout au long de cette thèse. Merci pour tout. J'en profite pour remercier *Cédric* alias « *ton poilu* », tu as toujours été de bons conseils et si prévenant. Merci pour tes questions loufoques et au fait « connais-tu vraiment le pourquoi du pourquoi ? ». Il y aura toujours une Chouffe dans mon frigo pour vous.



***Sandrine**, merci pour ces discussions le soir en partant du labo et d'avoir partagées tes anciens doutes d'ancienne thésarde qui m'ont fait beaucoup relativiser sur les miens. C'est promis, quand les choses me paraîtront un peu sombres, je « laisserai décanter ».*

***Anne-Sophie**, alias **Anne-So**, merci de ce grain de folie qui t'anime et de toutes les fois où tu as poussé la chansonnette dans le laboratoire ou la salle de pause. Tu resteras à jamais la référente Disney par excellence. Je n'oublie pas également ces moments où tu as su m'écouter et me soutenir, ces appels passés entre Clermont-Paris et tous nos fous rires, merci d'avoir été là.*

***Michaël**, alias **le Portugesh'**, merci pour tous les kits ELISA aliquotés et ces mortiers sortis de l'autoclave. Merci pour tes accueils toujours très chaleureux dans ton fief portugais (jamais plus je ne lancerai un coussin...) et pour tes enchiladas tellement bien cuisinées.*

***Cécily**... tant de moments passés ensemble dans et hors du labo. Merci pour ces heures passées jusqu'à tard le soir au labo ou dans le bureau étudiants, en début de thèse, qui ont signées de belles blagues (« C'est L'Amora à la plage... »), nos plus beaux délires et chansons réinventées (« J'irai au bout de ma thèseeeee... Tout au bout de ma thèseeeee »). Merci pour ton soutien lors des moments de doutes, pour quelqu'un qui n'aime pas les gens tu as plutôt été très douée avec moi et je ne compte plus les fois où Los Dos a été notre point de chute après des journées compliquées (« Patatas Braaavas ... Patatas Braaaaavas ! »). Merci aussi pour ces promenades nocturnes anti-stress.*

***Florie**, merci pour cette ambiance sportive à chaque entrée dans le bureau et cette balade au lac de Servières entre deux analyses de résultats, accompagné de Milo. Merci pour tous tes petits messages lors de la rédaction de thèse qui m'ont fait beaucoup plaisir.*

***Manon**, merci pour ces créneaux en A2 arrangés et ces prêts de l'appareil à anesthésie. Merci de nos discussions d'immunologistes.*

***Elodie B.**, merci pour nos discussions et ces questions sur le parking tard le soir. Merci des moments de partages échangés (ta couverture et tes chaussons sont acceptés pour mon pot de thèse et il y aura peut-être même de la pizza).*

***Maëva**, merci pour ces fous rires et cette énergie inépuisable que tu dégages. Merci de m'avoir épargné de tes blagues informatiques et « postitiques ». Merci pour ces chansons venues de nulle part (l'air de ton dernier cru, que je garderai secret me vient direct dans la tête...). Merci pour tes venues au bureau toujours très agréables et nos échappées humoristiques.*

***Romain**, alias **Rominou** (désolée de ce surnom adopté de tous à présent, j'assume mon entière responsabilité, mais il te va si bien). Là aussi quelle rencontre... Je tiens à te dire que lorsque tu as décidé de troquer ton chapeau de cow-boy et tes rangers du Texas pour chausser tes chaussons d'escalade clermontois tu as eu une excellente idée. Merci pour ton aide de chaque instant et ta bonne humeur à toutes épreuves. Ce fut un plaisir de faire ma dernière manip de thèse à tes côtés. Merci pour ces heures indénombrables passées au téléphone que je sois à Paris ou même à Clermont-Ferrand, quelle que soit l'heure et quelles que soient les raisons. Merci de ta gentillesse et d'avoir toujours été là pour me reconforter. Merci également pour ces folles soirées (d'ailleurs on retourne au Dôme quand tu veux). Merci à toi Rominou et n'oublie pas que je serai toujours là pour toi, même très loin.*



*Elodie G., ma Bibiche en sucre d'orge, encore une très belle rencontre et amitié... merci pour tous ces moments partagés, ces pauses passerelles, ces tisanes, ces discussions nocturnes. Merci de ton soutien sans relâche et de ton franc parlé sans filtre et sans manière. Merci pour ce barbeuc-piscine qui m'a tant fait relâcher la pression à un des moments les plus tendus de la thèse. Merci d'avoir été aux petits soins à chaque instant, et d'avoir participé à me faire tenir le cap avec le sourire lors de la période de rédaction, me faisant même rire de mes doutes insensés certaines fois. Merci de tous ces moments où tu m'as compris en un regard. Merci de m'avoir kidnappé de mon ordinateur pour me faire prendre l'air le temps d'un instant. Merci pour tes « Oui-oui », tes « La-La » et tes répliques de Kaamelott. Merci de toutes tes petites attentions ma Bibiche, sache que même si tu n'as pas l'âme d'une aventurière ma porte te sera toujours ouverte et je me ferai une joie de te retrouver dans d'autres contrées.*

*Clara... ma Clarus....Roh toi... une magnifique rencontre... tu fais partis de ces personnes qui m'ont touchées et que je n'oublierai jamais. Merci pour tous ces moments anti-stress : des mots croisés, aux méditations, jusqu'à nos chorégraphies dans le bureau (« Roh non... Ce n'est pas significatif... » « Arf Choré ? » ; « Youhou trop beau .... Trois étoiles » « Yesss Amélys Choré ? »). Merci de ces longues discussions et prises de recul lors de nos trajets pour la boxe. Merci d'avoir été attentive à mes théories d'immuno un peu folles. Merci d'avoir toujours été ma voisine de bureau même à travers nos déménagements (la responsabilité de fou...), et d'avoir encouragé mes moments de folies/craquage du soir. Excuse-moi de t'avoir volé ton agrafeuse durant tant de mois...Merci de Ton amitié sincère, de ton soutien et de tes bons conseils. Merci pour tous ces moments passés avec toi et cette planche de charcuteries partagée à Défonce de Rire. J'en profite également pour remercier **JP**, pour sa force tranquille et son enthousiasme contagieux. A très vite pour de nouvelles aventures mes petits loups, vous allez beaucoup me manquer.*

*Merci également aux autres habitants de notre bureau des étudiants, **Anaïs, Laurène, Célia, Karine et Gwenaëlle** pour nos discussions et d'avoir supporté avec le sourire l'animation de ma rédaction de thèse et mes nombreux appels avec les équipes de Paris.*

*Merci également aux Doc's de l'équipe. **Julie** et **Guillaume**, merci d'avoir dompté la bioluminescence in vivo, ainsi que pour nos échanges. **Johan** merci de m'avoir initié au western blot et pour nos échanges sur ce projet si passionnant. **Anthony**, merci pour ta bonne humeur à chacun de tes passages (Et... « Salut, ça va ? »).*

*Merci également à ces personnes du labo, qui étaient là à un moment de ma thèse et sont partis à la conquête de nouveaux territoires. **Émilie C.** ou **Lucky Luke du vivo**, merci pour ton aide lors des expérimentations vivo et pour ces gestes techniques précis que tu m'as appris. **Agnès**, pour mes débuts d'éleveuse de souris APC et ces bons moments à l'animalerie. **Mathilde P.** merci pour nos discussions et ces passages furtifs au cytomètre qui m'ont permis de mieux te connaître. Merci à **Jessica** qui m'a accueillie au laboratoire dans la sphère des doctorants et a su rassurer certains de mes doutes et craintes.*

*Allison...Ma Poulette... quelle superbe rencontre là encore... Merci pour tous ces moments dans le bureau à chanter la « Zoubida ». Merci pour tous nos fous rires, toutes nos remises en question, toutes ces recettes de cuisine ratées dans ta « cave » clermontoise. Merci pour nos Mac Donald's post cytométriques (je me rappellerais toujours cette nuit à faire la queue pour un Big Mac sans frites ...). Merci pour tous ces appels quand j'étais à Paris, et de ton soutien inestimable. Merci de ta gentillesse sans limite qui contribuait à éclaircir les journées un peu moins claires. Tu m'as beaucoup manqué quand tu es partie pour Paris mais quelle joie de t'y retrouver lors de mes périodes à Sanofi. Cette nouvelle étape de notre amitié nous a prouvé à quel point ce qui nous liait est fort et à quel point nous pouvions compter l'une sur l'autre. Merci pour tout ma Poulette, et sache que tu pourras toujours compter sur moi. « Et n'oublies pas on est des Tigers ».*





Merci à **Jeannette** et **Marie-Patricia** pour leur bonne humeur et leur franche camaraderie. Merci pour toutes les commandes passées et réceptionnées et d'avoir pris soin de mes petits anticorps fluorescents si précieux. Merci pour ces mots échangés sur les grilles de mots croisés et ces fous-rires (le mouvement gilet jaune dans le bureau restera mythique).

Merci au quatrio féminin du CICS, **Christelle**, **Sophie**, **Lorraine** et **Claire** pour leur bonne humeur, leur soutien, et ces nombreuses heures au cytomètre.

Je tiens à présent à remercier mes amis et ma famille qui me supportent depuis tant d'années, m'ont vu grandir et m'ont fait évoluer tout au long de ma jeune vie. Leur soutien avant et durant cette thèse ont une valeur inestimable. Je resterai pudique mais vous savez à quel point vous tenez une place importante dans ma vie et mon cœur.

Merci à mes amis de toujours qui ont cru en moi et m'ont « hissé-haut » lors de mes périodes de doutes comme de joie, formant une véritable seconde famille autour de moi.

**Cédric**, mon **Cyrano**... tant d'années partagées et de moments passés. Tant d'émotions en y repensant. Merci d'avoir toujours été présent pour moi et de m'avoir tant apporté. Je me souviens encore de ce jour où tu m'as amenée à Paris pour préparer ma rentrée à l'Agro... et de cette fierté que tu as eu lorsque tu m'as accompagnée à ma remise de diplôme (je n'oublierai jamais ce regard si important à ce moment-là). Merci pour tous ces moments où tu as cru en moi et ton soutien pour repousser l'impossible. Merci aussi pour nos échanges si sincères et d'avoir tant pris soin de me connaître sous toutes mes facettes. Merci pour ta patience et de m'avoir ouvert les yeux... Merci pour tous ces fous rires, ces escapades, ces moments « grognons » tout mignon, ces théâtres. Ces discussions jusqu'à tard dans la nuit. Ces moments de réconforts autour d'un bon restau ou ailleurs. Les mots me manquent pour t'exprimer à quel point je te remercie et à quel point ta rencontre est l'une des plus belles de ma jeune vie. Plus qu'un véritable ami, tu es devenu un grand frère (ou un petit frère des fois « Cédric tu as contrôlé ton liquide de refroidissement ? » « Euhhh... »), auquel je peux faire confiance les yeux fermés. Merci pour tout.

**Amandine**, ma **Mandine**... **Mi corazon**... merci pour tout... Je me rappelle de cette rencontre timide dans un cours d'Anglais de l'Agro, après lequel nous ne nous sommes plus quittées. Merci pour tous ces fous rires qui partaient souvent de rien et de ton rire qui me réchauffe le cœur à chaque fois (mon antidépresseur même à distance...). Merci pour ta spontanéité et ton ouverture sur le monde qui permet de relativiser bien des choses. Merci de cet amour des latinos, de la musique latine (mais s'il te plaît ne m'emmène plus danser la batchata), et de ces beaux pays, qui te caractérisent tant et reflète le soleil que tu es. Merci pour ces soirées à l'Agro et ces moments sur les quais de Seine pendant ma thèse où tu n'as cessé de me répéter « Tu te rends compte quand même... ». Merci de ces moments légers et pleins de folie (promets-moi de ne pas venir avec un Caméléon le jour de ma thèse...). Merci d'avoir su percer ma carapace mystérieuse et d'avoir été si tendre à mon égard. Merci de faire partie de ma vie et de l'éclairer à chaque moment passé ensemble.

**Margot** et **Julie**, alias **les Kiwis**, merci pour ces moments complices pendant lesquels vous m'avez dorloté, que ce soit pendant l'Agro ou pendant ma thèse. Votre amitié a toujours été un refuge pour moi, un phare dans mes périodes de doutes. Merci pour ces moments « découverte de la nature dans les grands espaces » et ces moments de « recentrage sur soi ». Merci, bien évidemment, pour ces soirées hallucinantes à l'Agro et votre compréhension pour celles où je n'ai pas pu venir. Merci pour vos messages « tout mimi » tout le long de la thèse et de votre présence.



**Elise**, mon **Pikachu** adoré. Merci de tous ces moments de lâcher prise et de ta capacité à te détacher des choses angoissantes. J'ai encore beaucoup à apprendre de toi... Merci pour toutes ces sorties totalement improbables sur les quais de Seine à l'Agro (As-tu encore cette fameuse table en bois ?). Merci pour ton soutien lors de la thèse et ta porte toujours ouverte quand je venais sur Paris pour mes périodes « Sanofiennes ». Merci d'être venue tant de fois me voir sur Clermont-Ferrand même si je n'ai pas toujours été très disponible. Merci d'avoir été si compréhensive et un soutien si fort pendant ces trois ans de thèse où tu as découvert mon stress et ma tête en l'air, que tu n'avais pas vu de si près lors de l'école d'Ingé. Merci pour tout, et si, les Etats-Unis te tentent n'hésites surtout pas, tu sais que je serai ravie de faire cette aventure avec toi.

**Agathe**, ma **Chewie**... mon acolyte immunologiste depuis le Master 2. Quelle rencontre au top lors de ce TP d'immunomonitoring et quel coup de foudre amical. Je n'oublierai jamais cette année de M2 où nous étions H24 ensemble soit pour les projets, soit pour les sorties après l'apprentissage. Tous ces moments passés, ont tissé cette amitié si forte qui nous lie. Merci pour nos appels et nos retrouvailles à Dijon, Clermont ou Paris, et ces nuits à refaire notre vie et débattre sur nos thèses. Merci d'avoir partagé nos doutes, nos peurs mais aussi nos moments de joie et de réussite. Merci de m'avoir épaulé dans toutes les choses que j'entreprenais et de m'avoir toujours fait relever la tête quand je commençais à fatiguer... Merci pour tout.

**Aïla** et **Joffrey**... **Ma Papillote** et **Monsieur Grognon**... mon binôme de DUT... un énorme merci à vous aussi. Merci d'avoir été là depuis le début et d'avoir toujours les mots justes. Merci de tous ces fous rires que je ne compte plus et de cette complicité que le temps n'a jamais épuisée. Merci d'avoir compris très vite la passion qui m'anime et de m'avoir soutenue à chaque nouveau pas. Merci pour tous ces moments autour d'un chocolat chaud ou d'une bonne bière, à parler de la vie, du beau temps et de la science. Merci pour tout.

Merci à **toi** qui n'a pas voulu être citée mais qui m'a tellement épaulée et soutenue lors de cette thèse, nuit et jour.

Merci à ma famille, qui m'a souvent considérée comme un extra-terrestre mais m'a donnée un amour sans limite et la chaleur du Portugal et de l'Italie.

**Élodie**, **Élo**, ma petite sœur, j'aimerais te remercier pour tous ces moments où nous avons parlé ensemble à cœur ouvert et où nous nous sommes soutenues. Merci pour ces instants de folies qui m'ont fait lever « la tête du guidon » comme tu dis. Merci petite sœur d'avoir tant fait pour ces moments si précieux en famille. Je suis tellement fière de la femme que tu es devenue et de ton courage, ne lâche rien tu as déjà fait tant de choses...

Merci également à **Olivier**, alias **Chéri-doudou**, le beau-frère le plus génial de la Terre. Merci d'avoir su me faire rire en toutes circonstances, même pendant les moments compliqués, et de m'avoir fait voir la thèse sous d'autre angle. Merci également pour l'amour et la tendresse que tu portes à ma sœur, qui m'ont rassuré.

**Anthony**, **Toto**, le plus vieux des trois petits frères. Tu es devenu un bel homme à présent, que le temps passe si vite... Merci pour ces blagues à toutes heures et à tes pas de danse mythique. N'oublies pas de te méfier de la salade verte... Merci pour tous tes « coups de main mécaniques » qui m'ont allégé le quotidien. Prends soin de toi et de ta petite famille, je suis si fière de toi également et du beau chemin que tu as accompli. J'en profite pour remercier également **Allison**, ma petite belle-sœur, pour ces moments de rires.

**Yohan** et **Lorenzo**, mes petits frères je vous remercie pour ces moments passés en votre compagnie et ces heures de jeux qui ont été pour moi une véritable bouffée d'air frais. Sachez que je serai toujours là pour vous, même si je vous vois grandir à distance.



**Cyril**, merci pour tout ce que tu nous apportes au quotidien, pour ta bonne humeur, tes blagues et ta légèreté. Merci de prendre si soin de notre famille. Merci de ton soutien qui a été essentiel à une période très difficile lors du début de la thèse et d'avoir veiller sur chacun de nous. Merci d'avoir toujours pris le temps de jauger mon baromètre de joie et de faire en sorte que je revienne d'Aurillac avec un sourire et des bons souvenirs pour recommencer la semaine.

**Maman**... Quelles années ces dernières années... mais tu as tenu le coup, comme d'habitude, ta force de lionne que j'admire tant a vaincu ces moments compliqués et le soleil brille de nouveau timidement. Merci pour ton courage et de nous transmettre à quel point la force de l'Amour est la source même de la vie et peut tout surmonter. Merci de m'avoir toujours laissé faire ce que je voulais dans ma vie même si cela était l'opposé de ce que tu avais prévu pour moi (« Une thèse ? C'est quoi ça une thèse ? Il y en a à Aurillac ?»). Merci d'en avoir été fière et d'avoir su panser mes plaies quand la vie a été plus compliquée.

**Tata Sylvie** ... tu as été un soutien infatigable tout au long de ma jeune vie. Merci d'avoir toujours trouvé les mots justes pour me faire repartir de plus belles lors de mes périodes de creux. Merci d'avoir toujours cru en moi et pour tous ces appels indénombrables depuis tant d'années. Merci d'avoir toujours ouvert grande ta porte pour que je vienne me ressourcer auprès de toi et mes cousins, cousines à qui je tiens tant : **Lucile, Noémie, Éloïse et Giovanni**. Merci énormément à vous.

**A mon père**... toi qui es parti si tôt alors que rien n'était dit... merci pour cette force de vivre que tu m'as transmise et toutes ces questions qui ont construit ma curiosité. Merci pour ces balades nocturnes pour apaiser mon stress (déjà là très jeune) et de ces discussions sur la vie et mon avenir. Je garderai toujours en mémoire, cette discussion devant le CHU, où je t'ai parlé de mon attirance naissante pour la recherche (arrivée à peine en DUT). Merci pour n'avoir jamais accepté les codes et nous avoir toujours laissé gérer notre vie en liberté. Merci pour tes conseils.

**A ma grand-mère**... merci pour toutes les belles choses que tu m'as apprises avant de partir. Merci pour ton amour de la poésie et de Georges Brassens. Merci pour tous ces poèmes récités et ces nombreuses pages de lecture. Merci de m'avoir appris qu'il fallait toujours faire plus mais avec plaisir. Merci de cette force que j'ai toujours admirée chez toi et de ces valeurs que tu nous as transmises qui ont toujours raisonnées en moi.

Je vous remercie tous encore une fois d'avoir fait partie de cette si belle aventure... En espérant n'avoir oublié personne...

**« Il faut toujours viser la lune, car même en cas d'échec, on atterrit dans les étoiles »**

**Oscar Wilde**



# SOMMAIRE

---

SOMMAIRE.....	1
RÉSUMÉ .....	1
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	2
INDEX DES TABLEAUX .....	6
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
<b>I- Le cancer colorectal .....</b>	<b>8</b>
<b>I.1- Généralités .....</b>	<b>8</b>
I.1.1) Épidémiologie .....	8
I.1.2) Facteurs de risques.....	8
<i>I.1.2.a. Les antécédents personnels et familiaux en lien avec le CCR .....</i>	<i>8</i>
<i>I.1.2.b. Les syndromes héréditaires : Lynch et polypose adénomateuse familiale .....</i>	<i>9</i>
<i>I.1.2.c. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) .....</i>	<i>10</i>
<i>I.1.2.d. Les facteurs environnementaux .....</i>	<i>11</i>
I.1.3) Facteurs pronostiques .....	12
<i>I.1.3.a. Les facteurs cliniques .....</i>	<i>12</i>
<i>I.1.3.b. Les facteurs histopronostiques.....</i>	<i>12</i>
<i>I.1.3.c. Les facteurs sériques et moléculaires.....</i>	<i>14</i>
I.1.4) Traitements .....	16
<b>I.2 - Structure et physiologie du côlon.....</b>	<b>17</b>
I.2.1) Généralités .....	17
I.2.2) Caractéristiques de l'épithélium colique .....	18
I.2.3) Tissus intestinaux impliqués dans la réponse immunitaire .....	19
<b>I.3 - Étapes de la carcinogenèse colique .....</b>	<b>20</b>
I.3.1) Modifications histologiques lors de la carcinogenèse colique .....	21
<i>I.3.1.a. Les foyers de cryptes aberrantes.....</i>	<i>21</i>
<i>I.3.1.b. L'adénome .....</i>	<i>21</i>
<i>I.3.1.c. L'adénocarcinome (ADK) et les métastases.....</i>	<i>21</i>
I.3.2) La séquence adénome-cancer .....	22
<i>I.3.2.a. La voie WNT/<math>\beta</math>-Caténine .....</i>	<i>22</i>
<i>I.3.2.b. Autres voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse colique .....</i>	<i>24</i>
I.3.3) Les différents phénotypes de tumeurs CCR .....	25
<i>I.3.3.a. L'instabilité chromosomique (CIN) .....</i>	<i>25</i>
<i>I.3.3.b. L'instabilité microsatellitaire (MSI) .....</i>	<i>25</i>
<i>I.3.3.c. L'hyperméthylation des îlots CpG (CIMP).....</i>	<i>26</i>
<b>II - Rôle du système immunitaire dans la carcinogenèse colique.....</b>	<b>26</b>
<b>II.1- Cellules immunitaires impliquées dans le CCR.....</b>	<b>26</b>





II.1.1) Rôles des lymphocytes dans le CCR.....	27
<b>II.1.1.a. Les NK et NKT</b> .....	27
<b>II.1.1.b. Les LT CD8<sup>+</sup></b> .....	28
<b>II.1.1.c. Les LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires: Th1, Th2 et Th17</b> .....	29
<b>II.1.1.e. Les LT régulateurs</b> .....	31
<b>II.1.1.f. Les LB</b> .....	33
II.1.2) Rôles des cellules myéloïdes dans le CCR .....	34
<b>II.1.2.a. Les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs)</b> .....	34
<b>II.1.2.b. Les neutrophiles</b> .....	35
<b>II.1.2.c. Les macrophages</b> .....	37
<b>II.2- Interactions entre système immunitaire et cellules tumorales, généralités : le concept d'immunoédition ou des 3E</b> .....	38
II.2.1) Mise en évidence du concept d'immunosurveillance et d'immunoédition.....	38
<b>II.2.1.a. Immunosurveillance dans des modèles murins</b> .....	38
<b>II.2.1 .b. Immunoédition dans les modèles murins</b> .....	39
<b>II.2.1.c. Immunosurveillance anti-tumorale et immunoédition chez l'homme</b> .....	40
II.2.2) Les étapes de l'immunoédition (3E) .....	42
<b>II.2.2.a. La phase d'élimination</b> .....	42
<b>II.2.2.b. Les phases d'équilibre et d'échappement</b> .....	43
II.2.3) Immunosurveillance anti-tumorale et immunoédition dans le cancer colorectal .....	45
<b>II. 3 – Importance de l'inflammation dans la carcinogenèse du côlon</b> .....	47
II.3.1) Mise en évidence .....	47
II.3.2) Rôle de l'inflammation chronique dans la carcinogenèse colique .....	48
II.3.3) Les médiateurs de l'inflammation chronique dans le CCR.....	48
<b>II.3.3.a. La cyclo-oxygénase-2 (COX-2) et les prostaglandines 2 (PGE2)</b> .....	48
<b>II.3.3.b. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS)</b> .....	50
<b>II.4 - Valeur pronostique des cellules immunitaires dans le CCR</b> .....	53
<b>III - E. coli et cancer colorectal</b> .....	55
<b>III.1 - Implication du microbiote intestinal dans la carcinogenèse</b> .....	55
III.1.1) Présentation et fonctions du microbiote intestinal .....	55
<b>III.1.1.a. Généralités</b> .....	55
<b>III.1.1.b. Rôle du microbiote dans l'homéostasie immunitaire</b> .....	57
III.1.2) Composition du microbiote intestinal et CCR.....	59
<b>III.1.2.a Analyse globale de la composition du microbiote</b> .....	59
<b>III.1.2.b Etude de la prévalence de certaines espèces bactériennes</b> .....	62
III.1.3) Mécanismes impliqués dans la carcinogenèse colique .....	65
<b>III.1.3.a. Modèles Dysbiotique et « Driver-passenger »</b> .....	65
<b>III.1.3.b. Facteurs de virulence et toxines</b> .....	67



<b>III.1.3.c. Métabolites bactériens</b> .....	69
<b>III.1.3.d. Stress oxydant</b> .....	71
<b>III.1.3.e. Inflammation chronique</b> .....	73
<b>III.1.3.f. Immunité anti-tumorale</b> .....	75
<b>III.2 -Escherichia coli et cancer colorectal</b> .....	77
III.2.1) Présentation générale des <i>Escherichia coli</i> .....	77
<b>III.2.1.a. Généralités</b> .....	77
<b>III.2.1.b. Les souches d'Escherichia coli pathogènes</b> .....	78
III.2.2) Implication des <i>Escherichia coli</i> dans le CCR .....	79
III.2.3) Pouvoir pro-carcinogène d'Escherichia coli : mécanismes impliqués .....	80
<b>III.3.1.a. E. coli et cyclomodulines : focus sur la colibactine</b> .....	80
<b>III.3.1.b. E. coli et stress oxydant</b> .....	85
<b>III.3.1.c. E. coli, inflammation et immunosurveillance</b> .....	86
<b>III.3- Microbiote intestinal: un nouveau facteur pronostique</b> .....	88
III.3.1) Implication des dysbioses dans la réponse aux traitements.....	88
<b>III.3.1.a.Cicatrisation et complication après chirurgie</b> .....	88
<b>III.3.1.b.Réponse aux chimiothérapies</b> .....	89
<b>III.3.1.c.Réponse aux immunothérapies</b> .....	90
III.3.2) Le microbiote : un nouveau facteur pronostique .....	91
<b>PRÉSENTATION DU TRAVAIL</b> .....	93
<b>TRAVAIL EXPERIMENTAL</b> .....	97
<b>I - Article 1 : Analyse du micro-environnement immunitaire par traitement d'image numérique d'une coupe entière de tissu : application sur côlon de souris</b> .....	98
<b>I.1- Contexte de l'étude</b> .....	98
<b>Article 1</b> .....	100
<b>I.2- Commentaires</b> .....	101
<b>II- Infection chronique par les souches d'Escherichia coli colibactine-positives : Impacts sur le micro-environnement immunitaire colique dans le contexte du cancer colorectal</b> .....	105
<b>II.1- Contexte de l'étude</b> .....	105
<b>Article 2</b> .....	107
<b>II.2- Commentaires</b> .....	107
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	114
<b>I- Mécanismes impliqués dans la modulation des cellules immunitaires par les Escherichia coli colibactine-positives en contexte d'infection chronique du côlon, et impact sur la carcinogénèse</b> .....	115
<b>I.1-Etude des modulations à des stades plus précoces de l'infection</b> .....	115
<b>I.2- Implication des cellules épithéliales coliques dans la modulation du micro-environnement immunitaire et de la carcinogénèse</b> .....	117



<b>I.3-Mécanismes impliqués dans la modulation des cellules LT .....</b>	<b>118</b>
<b><i>I.3.a) Implication de l'augmentation des cellules myéloïdes induites par les cellules épithéliales coliques sénescents .....</i></b>	<b>118</b>
<b><i>I.3.b) Impact direct des bactéries E. coli colibactine-positives sur la réponse LT .....</i></b>	<b>119</b>
<b>I.4- Implication de facteurs microbiens associés à l'infection chronique par des E. coli colibactine-positives .....</b>	<b>120</b>
<b><i>I.4.a) Interaction des souches E. coli colibactine-positives avec d'autres bactéries coliques .....</i></b>	<b>120</b>
<b><i>I.4.b) Précision concernant l'implication des facteurs de virulence des souches E. coli colibactine-positives.....</i></b>	<b>121</b>
<b>II- Étude de la fonctionnalité des cellules immunitaires modulées par l'infection chronique ...</b>	<b>122</b>
<b>II.1- Étude de la fonctionnalité des LT anti-tumoraux (LT CD8+, LT CD4+CD25+, et LT CD8+CD25+).....</b>	<b>123</b>
<b>II.2- Étude de la fonctionnalité des neutrophiles .....</b>	<b>123</b>
<b>III - Induction d'une résistance aux immunothérapies ciblant le couple de checkpoints immunologique PD-1/PDL-1.....</b>	<b>124</b>
<b>III.1- Confirmation de la résistance induite par l'infection par les E. coli colibactine-positives sur la réponse à l'immunothérapie anti-PD-1 dans d'autres modèles.....</b>	<b>124</b>
<b>III.2- Étude des mécanismes liés à la résistance à l'immunothérapie anti-PD-1.....</b>	<b>125</b>
<b><i>III.2.a) Implication de la diminution de l'infiltrat de LT dans la tumeur en contexte d'infection chronique par E. coli colibactine-positive .....</i></b>	<b>125</b>
<b><i>III.2.b) Modulation de l'expression du ligand PDL-1 par E. coli colibactine-positive .....</i></b>	<b>126</b>
<b><i>III.2.c) Implication du microbiote associé à l'infection par E. coli colibactine-positive .....</i></b>	<b>126</b>
<b>IV- Escherichia coli colibactine-positive : nouveau marqueur de mauvais pronostic pour la réponse aux immunothérapies anti-PD-1 chez les patients atteints de CCR ? .....</b>	<b>128</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>130</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>132</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>196</b>
<b>I- Annexe 1 : Liste des communications sur ces travaux .....</b>	<b>197</b>
1- Publications .....	197
2- Communications orales .....	198
a) Internationales.....	198
b) Autres (Ecole doctorale et Sanofi).....	198
3- Communications affichées.....	199
a) Internationales.....	199
b) Sanofi .....	199
<b>II- Annexe 2 : Revue de la littérature sur les marqueurs microbiens dans la détection et le pronostic du cancer colorectal .....</b>	<b>200</b>



# RÉSUMÉ

L'implication du microbiote intestinal dans le développement du cancer colorectal (CCR) et dans la réponse aux traitements anti-cancéreux est de plus en plus évidente. Plusieurs études indépendantes ont montré que la muqueuse intestinale de patients atteints de CCR est anormalement colonisée par des souches d'*Escherichia coli* pouvant présenter des propriétés invasives et ayant acquis des facteurs de virulence. Plus de la moitié de ces souches sont porteuses de l'îlot *pks* responsable de la synthèse d'une génotoxine : la colibactine, qui peut interférer directement avec l'ADN ou avec le cycle cellulaire des cellules de l'hôte, et générer des mutations. Plusieurs études  ndependantes sur différents modèles animaux de CCR ou sur lignées cellulaires ont décrit d'autres mécanismes d'action de ces bactéries qui pourraient jouer un rôle dans la carcinog nese colique : interactions avec le système immunitaire et l'inflammation et induction de la sénescence cellulaire qui s'accompagne de la libération de facteurs de croissance ayant un effet pro-tumoral sur les cellules épithéliales. Cependant, faute de lien entre ces études physiopathologiques parcellaires, l'étude de l'association des bactéries *E. coli* avec le CCR doit être poursuivie.

Le but de ces travaux de thèse était de préciser l'effet d'une infection chronique par *E. coli* colibactine-positif, notamment sur le micro-environnement immunitaire colique et son implication sur la carcinog nese colique, et sur l'efficacité anti-tumorale d'une stratégie d'immunothérapie ciblant le *checkpoint* immunologique PD-1. Afin d'étudier les interactions microbiote-système immunitaire-hôte, nous avons choisi de travailler sur le modèle APC<sup>Min/+</sup>, modèle murin de référence du CCR.

Dans un premier temps, nous avons développé et validé une nouvelle méthode pour quantifier les cellules immunitaires dans le côlon de ce modèle. Cette méthode, basée sur des marquages immunofluorescents et une analyse numérique d'image dotée d'un apprentissage automatique (dit « *machine learning* »), nous a permis de distinguer, quantifier et localiser ces cellules dans trois compartiments d'intérêt d'une section colique entière : la muqueuse, les follicules lympho ides et les tumeurs. Après validation, cette méthode d'imagerie nous a permis d'obtenir une analyse précise de l'environnement immunitaire colique dans le modèle de souris APC<sup>Min/+</sup> chroniquement infectées par une souche *E. coli* colibactine-positif isolée d'une muqueuse de patients CCR. Nous avons montré *in vivo* que cette bactérie induit un environnement pro-carcinogène dépendant de la présence de la colibactine, avec une augmentation de populations pro-inflammatoires telles que les neutrophiles et d'enzyme pro-inflammatoire (myéloperoxydase), accompagnée de la diminution de cytokines anti-inflammatoires. Ce contexte pro-carcinogène est renforcé par la diminution des Lymphocytes T (LT) anti-tumoraux dans la muqueuse et la tumeur. Cet effet a également été observé chez les patients atteints de CCR porteurs de souches *E. coli* colibactine-positives avec une baisse de la population des LT CD3<sup>+</sup>. Enfin, nous avons démontré qu'une infection par *E. coli* colibactine-positives induit une résistance à une immunothérapie anti-tumorale ciblant le *checkpoint* immunologique PD-1. Ces résultats suggèrent que la diminution des LT induite par l'infection chronique du tube digestif par des *E. coli* colibactine-positives pourrait être liée à cette résistance au traitement.

Ainsi, les travaux effectués lors de cette thèse permettent de confirmer le rôle clé de certaines bactéries du microbiote intestinal et du dialogue complexe de celui-ci avec le système immunitaire, dans la carcinog nese colique et la réponse aux traitements anti-cancéreux.   plus long terme, ces résultats pourraient permettre d'utiliser la détection des *E. coli* colibactine-positives comme marqueur de mauvais pronostic du CCR notamment vis-à-vis de la réponse aux thérapies ciblant le *checkpoint* immunologique PD-1/PDL1.





# LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

<b>ACE</b> : Antigène carcino-embryonnaire	<b>CTLA-4</b> : Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein
<b>ADK</b> : Adénocarcinome	
<b>ADN</b> : Acide désoxyribonucléique	
<b>AEEC</b> : Attaching and Effacing <i>E. coli</i>	
<b>AIEC</b> : Adherent and invasive <i>Escherichia coli</i>	<b>DAEC</b> : Diffusely-adherent <i>Escherichia coli</i>
<b>AINS</b> : Anti-inflammatoires non stéroïdiens	<b>DAPI</b> : 4',6-diamidino-2-phénylindole
<b>AGCC</b> : Acides gras à chaîne courte	<b>DC</b> : Cellule dendritique
<b>AJCC</b> : American Joint Committee on Cancer	<b>DIA</b> : Digital image analysis
	<b>DVL</b> : Dishevelled
<b>AKT</b> : Protein kinase B	<b>DSS</b> : Dextran sulfate sodium
<b>AOM</b> : Azoxyméthane	
<b>APC</b> : Adenomatous polyposis coli	<b>EAEC</b> : <i>Escherichia coli</i> entéro-agrégatives
<b>ARG</b> : Arginase	<b>EGF</b> : Epidermal growth factor
<b>ARN</b> : Acide ribonucléique	<b>EGFR</b> : Epidermal growth factor receptor
<b>ATP</b> : Adénosine triphosphate	<b>EHEC</b> : <i>Escherichia coli</i> entéro-hémorragiques
	<b>EIEC</b> : <i>Escherichia coli</i> entéro-invasives
<b>BCL-2</b> : B-cell lymphoma 2	<b>ELISA</b> : Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>BFT</b> : <i>Bacteroides fragilis</i> toxin	<b>EPEC</b> : <i>Escherichia coli</i> entéro-pathogènes
	<b>ERCC</b> : Excision Repair Cross-Complementing protein
<b>CAC</b> : colitis-associated cancer	<b>ERK</b> : Extracellular signal-regulated kinases
<b>CagA</b> : Cytotoxin-associated antigen A	<b>ETEC</b> : <i>Escherichia coli</i> entéro-toxicogènes
<b>CCR</b> : Cancer colorectal	<b>ExPEC</b> : <i>Escherichia coli</i> pathogènes extra-intestinaux
<b>CD</b> : Cluster de différenciation	
<b>CDT</b> : Cytolethal distending toxin	<b>FAD A</b> : <i>Fusobacterium</i> adhesin A
<b>CEACAM</b> : Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule	<b>FCA</b> : Foyer de cryptes aberrantes
<b>CFSE</b> : Carboxyfluorescein succinimidyl ester	<b>FDA</b> : Food and drug administration
<b>CIF</b> : Cycle inhibiting factor	<b>FGF</b> : Fibroblast growth factor
<b>CIMP</b> : CpG island methylator phenotype	<b>FISH</b> : Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
<b>CIN</b> : Chromosomal instability	<b>FOXP3</b> : Forkhead box P3
<b>CMH</b> : Complexe majeur d'histocompatibilité	<b>FZ</b> : Frizzled
<b>CMS</b> : Consensus molecular subtype	
<b>CNL</b> : Cognition network language	<b>GALT</b> : Gut-associated lymphoid tissue
<b>CNT</b> : Cognition network technology	<b>GFP</b> : Green fluorescence protein
	<b>G-MDSCs</b> : Granulocytic-myeloid-derived suppressor cells
<b>CNF</b> : Cytotoxic necrotizing factor	<b>GPX</b> : Glutathion peroxydase
<b>COX-2</b> : Cyclo-oxygénase-2	<b>GTP</b> : Guanosine triphosphate
<b>COXIBs</b> : Inhibiteurs de Cyclo-oxygénase	<b>HGF</b> : Hepatocyte growth factor
<b>CRP</b> : Protéine C réactive	<b>HES</b> : Hématoxyline éosine safran
<b>CT</b> : Centre de la tumeur	



**HNPCC** : Hereditary non-polyposis colorectal cancer

**IDO** : Indoleamine 2,3-dioxygénase

**IELs** : lymphocytes intraépithéliaux

**Ig** : Immunoglobuline

**IGF-1** : Insulin growth factor 1

**IHC** : Immunohistochimie

**IL** : Interleukine

**ILC** : Innate lymphoid cell

**IM** : Invasive margin

**IMC** : Indice de masse corporelle

**iNOS** : Inductible NO synthase

**IFN** : Interféron

**IVIS** : *In vivo* imaging spectrum

**KO** : Knock-out

**LB** : Lymphocyte B

**LPS** : Lipopolysaccharide

**LT** : Lymphocyte T

**LT Th** : Lymphocyte T helper

**M1/M2** : Macrophage de type 1/Macrophage de type 2

**MAPK** : Mitogen activated protein kinase

**MC** : Maladie de Crohn

**MCC** : Mutated in colorectal cancer

**MCP** : Monocyte chemoattractant protein

**MDSCs** : Myeloid-derived suppressor cells

**MIBE** : Microbiome-Induced Bystander Effect

**MICI** : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

**MIN** : Multiple intestinal neoplasia

**MLH** : MutL *E. coli* homolog

**MLN** : Mesenteric lymph node

**MMP** : Métalloprotéinase

**MMR** : Mismatch repair

**MPO** : Méyloperoxydase

**MSH** : MutS *E. coli* homolog

**MSI** : Microsatellite instability

**MSS** : Microsatellite stability

**MUC-1** : Mucin 1 cell surface associated

**MYH** : *E. coli* mutY gene homolog

**NE** : Neutrophil elastase

**NF-κB** : Nuclear factor- κ B

**NK** : Natural killer

**NKG2D** : Natural Killer Group 2D

**NKT** : Natural killer T

**NLR** : Neutrophil to lymphocyte ratio

**NLRs** : Nod-like receptor

**NMEC** : Neonatal meningitis *Escherichia coli*

**NOD** : Nucleotide binding oligomerization domain

**NOX** : NAPDH oxydase

**NRPS** : Non-ribosomal peptides megasynthase

**PAI** : îlot de pathogénicité

**PAF** : Polyposis adénomateuse familiale

**PAMP** : Pathogens associated molecular pattern

**PBMCs** : Peripheral blood mononuclear cells

**PCNA** : Proliferating cell nuclear antigen

**PD-1** : Programmed death 1

**PDGF** : Platelet derived growth factor

**PDL-1** : Programmed death ligand 1

**PET/CT** : Tomographie par émission de positrons – tomodensitométrie

**PGE<sub>2</sub>** : Prostaglandine 2

**PI3K** : Phosphoinositol-3-kinase

**PKS** : Polyketide synthase

**PMS** : Post-meiotic segregation protein

**PP** : Plaque de Peyer

**PRR** : Pattern recognition receptor

**QPCR** : Quantitative polymerase chain reaction

**RAG2** : Recombination activating gene 2

**RAS** : Rat sarcoma viral oncogene

**RCH** : Rectocolite ulcéro-hémorragique

**RH** : Recombinaison homologue

**RNS** : Espèces nitrosées réactives

**ROI** : Region of interest

**ROS** : Espèces réactives de l'oxygène

**RPA** : Replication protein A

**SCID** : Severe combined immunodeficiency

**SFB** : Segmented filamentous bacteria

**SIDA** : Syndrome d'immunodéficience acquise

**SMAD** : Small mothers against decapentaplegic protein

**SMO** : Spermine oxydase

**SOD** : Superoxyde dismutase

**SST3** : Système de secretion de typ



**STAT3** : Signal transducer and activator of transcription 3

**TAM** : Tumor associated macrophage

**TAN** : Tumor associated neutrophil

**TCR** : T cell receptor

**TGF** : Tumor growth factor

**TILs** : Infiltrats lymphocytaires tumoraux

**TLR** : Toll-like receptor

**TME** : Tumor microenvironment

**TNM** : (« *Tumor Node Metastasis* »)

**TNF** : Tumor necrosis factor

**TP53**: Tumor protein 53

**TRAIL** : Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

**TSA** : Tyramide signal amplification

**TREG** : LT régulateurs

**UICC** : Union Internationale Contre le Cancer

**UPEC** : Uropathogenic *Escherichia coli*

**VacA** : Toxine vacuolisante A

**VEGF** : Vascular endothelial growth factor

**WNT** : Wingless integration site

**ZAP70** : Zeta-chain-associated protein kinase 70

**3E** : Elimination – équilibre - échappement

**5-FU** : 5-fluoro-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione

**8-OXO-DG** : 8-Oxo-2'-désoxyguanosine



# INDEX DES FIGURES

---

**Figure 1 :** Répartition géographique du cancer colorectal dans le monde

**Figure 2 :** Anatomie générale du côlon

**Figure 3 :** Structure de la paroi intestinale

**Figure 4 :** Particularité de la muqueuse colique et renouvellement cellulaire de l'épithélium

**Figure 5 :** Tissus immunitaires associés à l'intestin

**Figure 6 :** Séquence adénome-cancer des patients atteints de CCR

**Figure 7 :** Voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine

**Figure 8 :** Composition du micro-environnement tumoral colique

**Figure 9 :** Activation et modulation de la réponse lymphocytaire T CD8<sup>+</sup>

**Figure 10 :** Production de ROS par les neutrophiles via la sécrétion de la MPO

**Figure 11 :** Effets antagonistes des neutrophiles dans la carcinogenèse

**Figure 12 :** Interaction des cellules tumorales avec les cellules immunitaires : le principe d'immunoédition ou des 3E « Élimination-Équilibre-Échappement »

**Figure 13 :** La phase d'élimination tumorale par les cellules immunitaire : une immunosurveillance efficace

**Figure 14 :** Modifications du micro-environnement impliquées dans l'échappement tumoral

**Figure 15 :** Principes d'immunosurveillance et d'immunoédition appliqués au CCR le long de la « séquence adénome-cancer »

**Figure 16 :** Implication de l'inflammation chronique dans la carcinogenèse

**Figure 17 :** Effets des espèces réactives de l'oxygène (ROS) liés à la carcinogenèse

**Figure 18 :** Analyse de l'infiltrat immunitaire lymphocytaire T : importance de l'Immunoscore dans le CCR

**Figure 19 :** Importance du microbiote dans la maturation du système immunitaire : effet de certaines espèces bactériennes sur la réponse lymphocytaire T

**Figure 20 :** Dysbioses associées au CCR dans la tumeur et les fèces des patients

**Figure 21 :** Le modèle « driver-passenger » de l'implication bactérienne dans la carcinogenèse colorectale

**Figure 22 :** Mécanismes impliqués dans la modulation de la carcinogenèse colique par le microbiote intestinal

**Figure 23 :** Pouvoir carcinogène des bactéries associé à un stress oxydant

**Figure 24 :** Hypothèse de l'induction d'un micro-environnement immunitaire pro-tumoral par *B. fragilis* dans des modèles murins du CCR

**Figure 25 :** Diversité phylogénétique des *Escherichia coli*

**Figure 26 :** Tropisme des différents pathovars d'*Escherichia coli*

**Figure 27 :** Mécanismes d'action des cyclomodulines produites par *Escherichia coli*

**Figure 28 :** Mécanisme d'action de Cif (« Cycle inhibiting factor »)

**Figure 29 :** Mécanisme d'action de CNF (« Cytotoxic Necrotizing Factor »)

**Figure 30 :** Mécanisme d'action de CDT (« Cytolethal Distending Toxin »)





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

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

**Figure 33** : Principe de l'algorithme d'analyse d'image développé et validé

**Figure 34** : Schéma bilan de la modulation de l'environnement immunitaire et de l'efficacité de l'immunothérapie anti-PD-1 par *Escherichia coli* colibactine-positives

**Figure 35** : Hypothèse quant à l'implication des bactéries *Escherichia coli* colibactine-positives dans la carcinogenèse colique en lien avec le micro-environnement immunitaire pro-tumoral qu'elles induisent

**Figure 36** : Induction de chimiokines par les souches *E. coli* colibactine-positives *in vitro*

**Figure 37** : Augmentation de l'expression du ligand de checkpoint immunologique PDL-1 induite par l'internalisation des bactéries *E. coli* colibactine-positives 11G5

**Figure 38** : L'augmentation de l'expression de PDL-1 induite par les bactéries *E. coli* colibactine-positives, nécessite l'internalisation des bactéries

## INDEX DES TABLEAUX

**Tableau 1** : Classification histopronostique TNM du CCR selon l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC), 8ème édition (2017)

**Tableau 2** : Liste des genres et espèces microbiens à cibler pour l'étude d'une dysbiose associée à l'infection chronique par les souches *E. coli* colibactine-positives

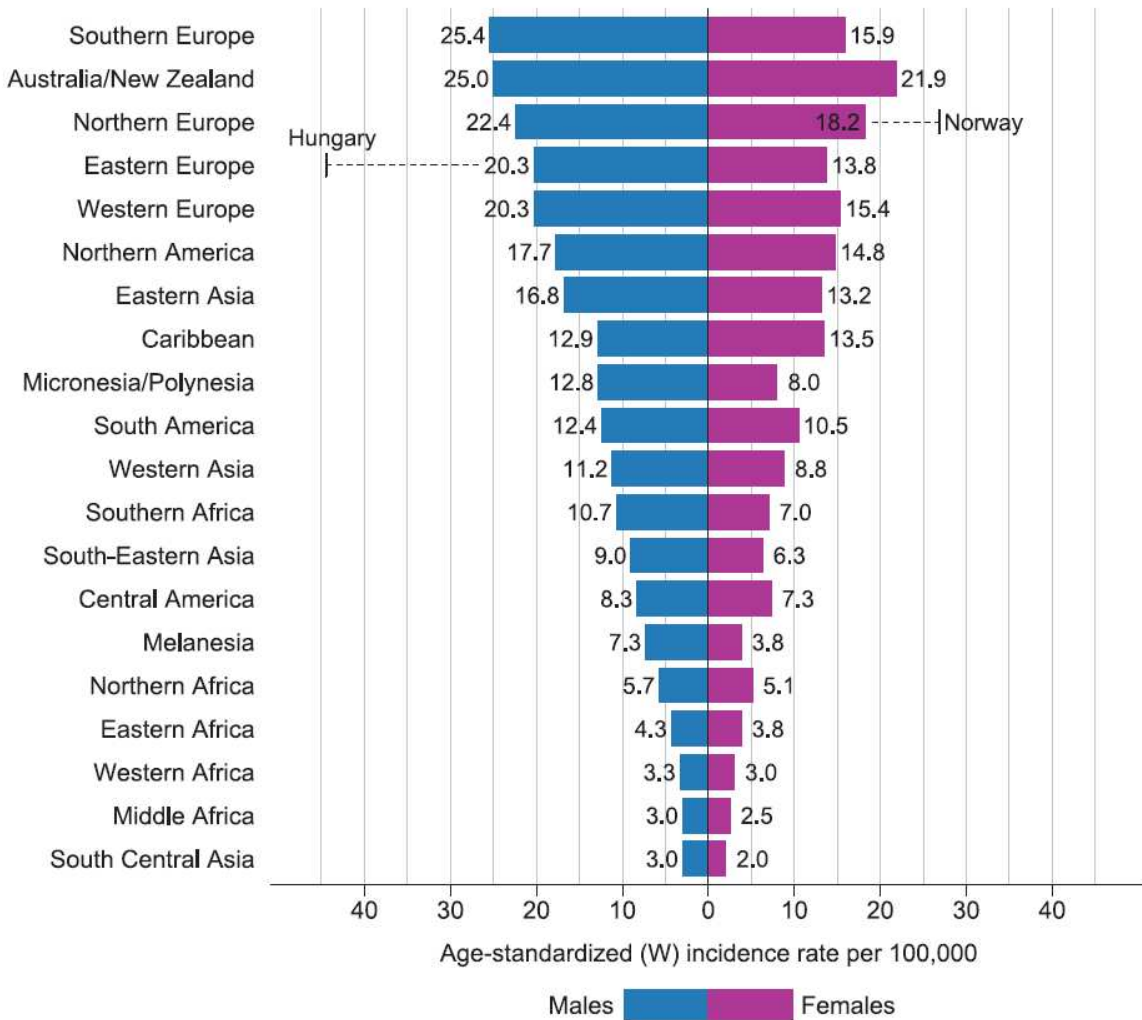
**Tableau 3** : Liste des genres et espèces microbiens à cibler pour l'étude d'une dysbiose associée à l'induction de la résistance à l'immunothérapie anti-PD-1, en contexte d'une infection chronique à *E. coli* colibactine-positives



# SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

## Colon



**Figure 1 : Répartition géographique du cancer colorectal dans le monde.** La répartition géographique du CCR varie notamment en fonction du niveau d'industrialisation. Les incidences les plus élevées sont observées dans les pays les plus industrialisés tels que ceux de l'Europe occidentale, Amérique du Nord et d'Asie. *Source : Bray et al., 2018*

# I- Le cancer colorectal

## I.1- Généralités

### I.1.1) Épidémiologie

Dans le monde, le cancer colorectal (CCR) représente le troisième cancer le plus fréquent chez l'homme, avec une incidence de 575 789 nouveaux cas (10,2 % des cancers diagnostiqués dans le monde) en 2018 ; et le deuxième chez la femme avec 520 812 nouveaux cas (9,5 % des cancers diagnostiqués) (Bray et al., 2018). En 2018, environ 881 000 décès ont été répertoriés dans le monde, faisant du CCR le deuxième cancer le plus mortel. La répartition géographique de ce cancer est corrélée au niveau d'industrialisation, les incidences et le taux de mortalité les plus élevés sont observés dans les pays les plus industrialisés tels que ceux d'Europe occidentale, d'Amérique du Nord et d'Asie (**Figure 1**) (Arnold et al., 2017; Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2015). En France, le taux d'incidence est de 26,3 nouveaux cas pour 100 000 hommes et de 18,4 pour 100 000 femmes (Ferlay et al., 2018). Le taux de survie à 5 ans est de 56 % tous stades confondus, quel que soit le sexe, il passe à moins de 20 % pour les stades les plus agressifs (Ferlay et al., 2015).

### I.1.2) Facteurs de risques

Le CCR est une maladie impliquant une combinaison de facteurs héréditaires et environnementaux. Bien que la majorité des CCR soient sporadiques, 5% de ces cas sont liés à une prédisposition génétique (cas dits héréditaires). Le CCR peut également être associé à une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) dans moins de 1% des cas (Half et al., 2009; Stoffel and Chittenden, 2010).

#### ***1.1.2.a. Les antécédents personnels et familiaux en lien avec le CCR***

Les individus ayant des antécédents de CCR dans leur famille ont un risque plus élevé que la population générale (Kim et al., 2018). Il dépend à la fois du nombre de personnes apparentés touchées et de l'âge du patient zéro lors du diagnostic (Kim et al., 2018). Plus précisément ce risque est augmenté de 2 fois pour un apparenté au premier degré atteint de



CCR, à 6 fois pour au moins deux apparentés au premier degré touchés (Boutron et al., 1995; Carstensen et al., 1996; Fuchs et al., 1994; Kim et al., 2018; St John et al., 1993 ; Haute Autorité de Santé, 2013).

De la même façon, les sujets traités pour un CCR ont un risque deux fois supérieur à celui de la population générale de développer un second CCR dans les 5 premières années suivant le traitement (Haute Autorité de Santé, 2013). Ce risque est multiplié par 3,6 chez les sujets atteints d'adénomes de plus de 1cm et par 6,6 en cas d'adénomes multiples (Atkin et al., 1992).

### ***1.1.2.b. Les syndromes héréditaires : Lynch et polypose adénomateuse familiale***

Lorsque le CCR est diagnostiqué avant 50 ans avec des antécédents personnels et/ou familiaux de cancers, une prédisposition génétique est suspectée. Les deux principaux syndromes de CCR héréditaires actuellement identifiés sont le syndrome de Lynch ou HNPCC (« *Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer* ») et la polypose adénomateuse familiale (PAF) (Jasperson et al., 2010).

La forme la plus fréquente de CCR familiaux survient dans le cadre du syndrome de Lynch et représenterait environ 5% des cancers coliques (Jasperson et al., 2010; Ponz de Leon et al., 1993; Stoffel and Chittenden, 2010). Le risque de développer un CCR pour les individus porteurs de ce syndrome est estimé entre 50 et 80%. Son apparition survient à l'âge médian de 45 ans et touche plus souvent le côlon droit (Steinke et al., 2013). L'absence de caractéristiques phénotypiques de ces formes de tumeurs qui sont très proches de celles des CCR sporadiques, rendent leur diagnostic difficile.

La polypose adénomateuse familiale (PAF) serait responsable de 1% des CCR. Sa prévalence est estimée à 1 pour 10 000 (Jasperson et al., 2010; Palmer et al., 2007). Elle est caractérisée par le développement, après la puberté, de plusieurs centaines de polypes adénomateux colorectaux qui évoluent en cancer colique vers l'âge de 40 ans (Cunningham et al., 2010; Lynch and de la Chapelle, 2003; Weitz et al., 2005). Si ces patients ne sont pas traités ils développeront un CCR dans les 10 à 20 ans.





Deux gènes peuvent être impliqués dans la genèse de la PAF : le gène suppresseur de tumeur *apc* (« *Adenomatous Polyposis Coli* ») et le gène *myh* (« *E. coli mutY gene homolog* ») (Half et al., 2009; Jaspersion et al., 2010).

Le gène *apc* est organisé en 15 exons et est présent chez l'homme au niveau du locus 5q21. Il code pour la protéine APC qui interagit avec d'autres protéines dans de nombreux processus biologiques et intracellulaires tels que l'adhésion et la prolifération cellulaire (Half et al., 2009). Lorsque ce gène est muté, il conduit à une sur-activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (« *Wingless Integration Site* ») qui favorise une prolifération cellulaire anarchique (Half et al., 2009; Weitz et al., 2005). De nombreuses mutations de ce gène peuvent être responsables de la PAF, la majorité induisent l'apparition d'un codon stop qui entraîne la synthèse d'une protéine APC tronquée au niveau de la région C-terminale (Galiatsatos and Foulkes, 2006).

Concernant le gène *myh*, il code pour une adénine glycosylase impliquée dans la réparation de dommages à l'ADN provoqués par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Jaspersion et al., 2010). Une mutation bi-allélique est indispensable et est en général responsable de formes atténuées de la PAF.

Il existe également une forme plus rare de PAF, la polypose juvénile familiale, caractérisée par la présence de nombreux polypes, dont le risque de transformation en carcinome est d'environ 50 % (Howe et al., 1998; Jaspersion et al., 2010). Il a été caractérisé des mutations du gène suppresseur de tumeur *smad4/madh4* chez environ 20 à 50% des familles atteintes. D'autres gènes tels que *pten*, *bmpr1/alk3* pourraient être impliqués mais leur rôle reste controversé (Tenière et al., 2002).

### ***1.1.2.c. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)***

Le cancer colorectal associé à une colite (CAC, « *colitis-associated cancer* ») est un sous type de CCR qui survient après une prédisposition induite par l'agression chronique de l'épithélium intestinal (Long et al., 2017a; Terzić et al., 2010). Bien qu'ils représentent moins de 1% des cas de CCR, les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) telles que la maladie de Crohn ou la rectocolite ulcéro-hémorragique, présentent le risque le plus élevé de développer un CCR, avec une incidence de plus de 60% supérieure à la population générale (Long et al., 2017b; Lopez et al., 2018; Shawki et al., 2018). Plus de 20% des patients déclarent un cancer colique dans les 30 ans après le diagnostic de leur MICI (Terzić et al., 2010).



### ***1.1.2.d. Les facteurs environnementaux***

La répartition hétérogène du CCR dans le monde suggère l'implication de facteurs environnementaux (Arnold et al., 2017; Huxley et al., 2009). Ces facteurs sont à la fois alimentaires et liés au mode de vie, en particulier le mode de vie « occidental » est fortement impliqué.

La consommation d'alcool et/ou de tabac a été identifiée comme un facteur de risque. L'alcool est associé à un doublement du risque de développer un CCR dès 30 g consommés par jour (Aleksandrova et al., 2014; Boutron-Ruault et al., 2001; Moskal et al., 2007). Son implication vient de ses métabolites, comme l'acétaldéhyde, qui induisent des altérations génétiques, épigénétiques, biochimiques et immunologiques en lien avec l'inflammation associée au CCR (Bishehsari et al., 2014; Rossi et al., 2018; Shukla and Lim, 2013; Varela-Rey et al., 2013; Wimberly et al., 2013). La consommation de tabac, au-delà de 20 paquets par an, augmente de 20% le risque de développer un cancer colique (Chao et al., 2000; Raskov, 2014). Depuis 2009, le CCR fait partie des maladies associées au tabagisme par l'IARC (« *International Agency for Research on Cancer* »). Certains dérivés de la nicotine sont mis en cause tels que l'hydroxycotinine dont la détection dans le sang est associé à un risque de développer un CCR (Cross et al., 2014).

La consommation excessive de protéines, en particulier de viande rouge et de charcuterie riche en graisse (> 133 g par jour) augmente également la prédisposition au cancer du côlon (Aykan, 2015; Bernstein et al., 2015; Carr et al., 2016; Domingo and Nadal, 2017; Huxley et al., 2009; Norat et al., 2002; Potter et al., 1993; Raskov, 2014). La cuisson des protéines et des graisses produit des composés tels que les amines hétérolytiques et l'acrylamide pouvant initier la carcinogenèse, tout comme les dérivés des nitrites utilisés pour la conservation de la viande, qui sont mutagènes (Gunter et al., 2005; Norat et al., 2002; Turner and Lloyd, 2017).

Le syndrome métabolique et l'obésité définie par un Indice de Masse Corporelle (IMC) supérieure à 30 kg/m<sup>2</sup>, participent aussi à une élévation du risque de développer un CCR. Plus précisément les personnes souffrant d'obésité présentent un sur-risque de 20% par rapport aux sujets dont l'IMC est inférieur à 25 kg/m<sup>2</sup> (Freisling et al., 2017; Mendonça et al., 2015; Moghaddam et al., 2007). Le risque est augmenté de 2 à 10 fois chez les patients atteints de syndrome métabolique (Mendonça et al., 2015). Le diabète de type 2 est également un facteur de risque (Mendonça et al., 2015). L'hyperinsulinémie serait liée à la cancérogénèse notamment



via son effet promoteur en activant les récepteurs IGF-1 (« *Insulin growth factor 1*») des cellules malignes (Giovannucci, 1995; Mendonça et al., 2015).

Au contraire, une activité physique régulière, une alimentation riche en fruits, légumes et en fibres (10g/j) diminuent significativement le risque de développer un CCR (Huxley et al., 2009; Mendonça et al., 2015; Moore et al., 2016; Morris et al., 2018; Raskov, 2014).

### I.1.3) Facteurs pronostiques

#### ***I.1.3.a. Les facteurs cliniques***

L'âge, le sexe et le niveau socio-économique des patients atteints de CCR ont été identifiés comme facteurs de risque.

Le risque de mortalité ajusté au stade tumoral augmente avec l'âge (Gabriel et al., 2018; Roncucci et al., 1996), il est supérieur à 30% chez les patients âgés de 60 à 74 ans puis double après 74 ans (Roncucci et al., 1996). Il est probablement davantage lié à l'état de santé de l'individu qu'à l'agressivité du CCR.

Le pronostic du CCR est plus mauvais chez les hommes que les femmes, après chirurgie d'exérèse (McArdle et al., 2003; Paulson et al., 2009). Ceci pourrait être expliqué par l'effet protecteur des stéroïdes féminins sur les fonctions immunitaires et par une inflammation systémique chronique associée au CCR plus forte chez l'homme.

Le niveau socio-économique faible est un facteur de mauvais pronostic, comme le montre l'élévation du risque résiduel de décès de 9 à 20% chez les afro-américains après ajustement par rapport au stade du diagnostic et au niveau de revenus, aux États-Unis (Lee et al., 2012; Monnet et al., 1993; Sineshaw et al., 2018). Néanmoins il a été montré que ce risque pouvait être diminué si les patients bénéficiaient d'une sécurité sociale adaptée (Pulte et al., 2017; Sineshaw et al., 2018; Zhang et al., 2015b).

#### ***I.1.3.b. Les facteurs histopronostiques***

La classification TNM (« *Tumor Node Metastasis*») est la classification histopronostique internationale de référence. Elle est utilisée pour définir la prise en charge des patients atteints de CCR et notamment pour les indications de chimiothérapies. Cette

**Tableau 1 : Classification histopronostique TNM du CCR selon l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC), 8<sup>ème</sup> édition (2017).** La classification TNM (« Tumor Node Metastasis ») permet de définir la prise en charge des patients. Cette classification évalue l'envahissement tumoral pariétal (T), la présence de métastases ganglionnaires (N) et/ou viscérales (M). *Source : d'après <http://www.uicc.org>.*

<b>T (Tumor) – Tumeur primitive</b>	
<b>TX</b>	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
<b>T0</b>	Pas de signe de tumeur primitive
<b>Tis<sup>[1]</sup></b>	Carcinome <i>in situ</i> : intra-épithélial ou envahissant la lamina propria (chorion de la muqueuse)
<b>T1</b>	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
<b>T2</b>	Tumeur envahissant la musculature
<b>T3</b>	Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péri-coliques ou péri-rectaux non péritonisés
<b>T4</b>	Tumeur envahissant directement d'autres organes ou d'autres structures et/ou perforant le péritoine viscéral
	<b>T4a</b> : tumeur perforant le péritoine viscéral
	<b>T4b</b> : tumeur envahissant directement d'autres organes ou d'autres structures <sup>[2],[3]</sup>
<b>N (Node) – Extension ganglionnaire</b>	
<b>NX</b>	Renseignements insuffisants pour classer les ganglions lymphatiques régionaux
<b>N0</b>	Pas de métastase ganglionnaire régionale
<b>N1</b>	Métastases dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
	<b>N1a</b> : métastases dans 1 seul ganglion régional
	<b>N1b</b> : métastases dans 2-3 ganglions lymphatiques régionaux
<b>N1c</b> : nodules tumoraux (c'est-à-dire satellites) dans la sous-séreuse ou dans les tissus mous non péritonéalisés péri-coliques ou péri-rectaux sans atteinte ganglionnaire lymphatique	
<b>N2</b>	Métastases dans 4 ou plus ganglions lymphatiques régionaux
	<b>N2a</b> : métastases dans 4 à 6 ganglions lymphatiques régionaux
	<b>N2b</b> : métastases dans 7 ou plus ganglions lymphatiques régionaux.
<b>M (Metastasis) – Extension métastatique</b>	
<b>M0</b>	Pas de métastase à distance
<b>M1</b>	Présence de métastase(s) à distance
	<b>M1a</b> : métastases dans un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s) non régional(aux))
	<b>M1b</b> : métastases dans plus d'un organe ou dans le péritoine.
	<b>M1c</b> : métastases dans le péritoine avec ou sans atteinte d'un autre organe

classification décrit l'extension anatomique des cancers selon trois statuts : extension tumorale ou pariétale (T), ganglionnaire (N) et métastatique (M), par l'intermédiaire d'indices numériques croissants. Ces critères sont définis par l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer) et l'AJCC (« *American Joint Committee on Cancer* ») (**Tableau 1**) (Edge and Compton, 2010).

Ceci permet de distinguer des stades tumoraux auxquels sont associés un risque de récurrence et une survie à 5 ans spécifiques (Adloff et al., 1989). En fonction de l'envahissement local (T), la survie à 5 ans pour les patients atteints de CCR et porteurs de tumeurs Tis est d'environ 100%, et chute progressivement avec l'augmentation de l'index T, jusqu'à atteindre 72% pour les patients porteurs de tumeurs T4 (O'Connell et al., 2004). Le nombre de ganglions envahis (N) est un facteur de mauvais pronostic. En effet, un stade N2 entraîne une diminution de 20% de la survie à 5 ans de façon indépendante du stade T (Adloff et al., 1989; Greene et al., 2002; O'Connell et al., 2004). Dans 80% des cas de métastases viscérales (M) celles-ci sont inaccessibles à une résection chirurgicale, elles altèrent la survie à 5 ans en l'abaissant à 30% (Simmonds et al., 2006).

D'autres critères comme les envahissements lymphatiques et péri-nerveux, qui participent à la formation de micro-métastases disséminant dans l'organisme pour former de nouvelles tumeurs sur des sites secondaires, sont des facteurs de pronostic péjoratifs (Compton, 2003; Compton et al., 2000; Huh et al., 2010). Un faible niveau de différenciation tumorale, défini par le pourcentage de glandes en formation au sein de la tumeur, est lui aussi un critère péjoratif (Cho et al., 2009; Chung et al., 1982; Compton, 2007; Purdie and Piris, 2000). L'aneuploïdie est corrélée au risque de récurrence tumorale et au potentiel métastatique pour les cancers coliques de stade TNM III (Zarbo et al., 1997). Enfin, l'existence d'un bourgeonnement tumoral est associée à une diminution de la survie après une chirurgie (Graham et al., 2015; Koelzer et al., 2016a; Zlobec et al., 2007). Ces bourgeons sont initiés au niveau des structures glandulaires et sont constitués d'une à quatre cellules au niveau de la marge d'invasion du CCR (Prall and Ostwald, 2007; Ueno et al., 2002).

À l'inverse, un infiltrat dense en lymphocytes T intra-tumoraux (TILs) à la fois au centre et à la marge de la tumeur apparaît de plus en plus comme un facteur de bon pronostic dans le CCR (Galon et al., 2014, 2016; Mlecnik et al., 2016; Pagès et al., 2005, 2018, 2018; Tosolini et al., 2011). Le pouvoir pronostique de ce paramètre, qui sera détaillé plus tard dans ce manuscrit, a été confirmé très récemment sur une cohorte de 3 539 patients atteints de CCR, tous stades confondus, répartis dans 13 pays différents (Pagès et al., 2018).





### ***1.1.3.c. Les facteurs sériques et moléculaires***

En pratique courante, le seul marqueur sérique utilisé dans le CCR est l'Antigène Carcino-Embryonnaire (ACE) CEACAM5 (« *Carcinoembryonic Antigen Cell Adhesion Molecule 5* »). Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire appartenant à la famille des CEACAM, impliquée dans les processus biologiques d'adhésion et d'apoptose cellulaire, ainsi que dans l'immunité. En condition normale elle est exprimée à la surface de l'intestin grêle, du côlon, du rectum, du pancréas, du poumon et du sein, et est faiblement détectée dans le sang (Beauchemin and Arabzadeh, 2013). Un taux d'ACE préopératoire élevé (supérieur à 5 ng/mL) est un facteur de mauvais pronostic chez un patient présentant un CCR, en lien avec une élévation du volume tumoral et du risque métastatique qui lui est associé (Dixon et al., 2003; Wang et al., 2007). La persistance d'un taux élevé après résection de la tumeur primitive est un indicateur de récurrence précoce et de moindre survie (Hohenberger and Herfarth, 1994).

D'autres marqueurs sériques sont associés à un mauvais pronostic mais non spécifiques du CCR, tels que la protéine C réactive (CRP) et l'albumine qui sont associées à une inflammation (Ghuman et al., 2017). L'ADN tumoral circulant pourrait être un facteur pronostique (Basnet et al., 2016; El Messaoudi et al., 2016). Sa présence et sa quantité sont mesurées par la détection de mutations génétiques spécifiques ou de modifications de méthylation de l'ADN (Basnet et al., 2016; Garrigou et al., 2016; Malapelle et al., 2017; Nagai et al., 2017; Ng et al., 2017).

Le ratio NLR (densité de neutrophiles/densité de lymphocytes) dans le sang est également de plus en plus étudié, un fort ratio (supérieur à 3 ou 5 en fonction des études) pourrait être associé à une diminution de la survie globale et sans récurrence. Cet indicateur sera plus détaillé dans la deuxième partie de cette introduction bibliographique (Chua et al., 2011; Han et al., 2018; Kim et al., 2014; Li et al., 2018; Pedrazzani et al., 2017; Shibutani et al., 2013; Walsh et al., 2005).

Concernant les facteurs qui se basent sur des altérations présentes au niveau de la tumeur, seule la détermination du phénotype tumoral MSI est utilisée. En effet, ce phénotype est de bon pronostic avec un potentiel métastatique plus faible (Guastadisegni et al., 2010; Ogino et al., 2009a; Phipps et al., 2015). Il pourrait également être lié à une meilleure réponse aux traitements comme aux immunothérapies ciblant des protéines inhibitrices du système



immunitaire (*checkpoints* immunologiques inhibiteurs) (Le et al., 2015; Llosa et al., 2015; Sclafani, 2017).

D'autres indicateurs ont été rapportés comme des facteurs péjoratifs dans le CCR. La perte de matériel génétique sur le bras long du chromosome 18q diminue de près de la moitié la survie à 5 ans chez les patients atteints de CCR de stade II et III (Shibata et al., 1996). Des mutations sur le gène *k-ras* sont associées à un taux de récurrence plus important et à une résistance aux thérapies ciblant l'EGFR (Benhattar et al., 1993; Custodio and Feliu, 2013).

Récemment un consensus international a permis de définir une nouvelle classification moléculaire des cancers colorectaux dont la valeur pronostique est forte, nommée classification CMS (« *Consensus Molecular Subtype* ») (Bibeau et al., 2018; Colangelo et al., 2017; Guinney et al., 2015). Elle a été établie à partir de l'analyse de données provenant de plus de 4 000 échantillons tumoraux de patients différents et est basée sur des facteurs moléculaires, cliniques et biologiques. Cette classification CMS prend en compte le phénotype tumoral et l'activation de voies de signalisation impliquées dans la carcinogénèse colique (cf ci-dessous). L'abondance et la nature des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs est un critère déterminant.

Au total quatre sous-types de tumeurs sont définis, du CMS-1 au CMS-4 permettant de classer 87% des CCR (Colangelo et al., 2017; Guinney et al., 2015; Thésaurus National de Cancérologie Digestive, 2018).

Le sous-type CMS-1 (14 % des CCR), aussi appelé sous-type « Immun », est caractérisé par une instabilité microsatellitaire forte définissant le phénotype MSI, des mutations sur le gène *b-raf* et une forte infiltration en cellules immunitaires et en particulier en lymphocytes T anti-tumoraux.

Le sous-type CMS-2 (37 % des CCR), nommée « Canonique », est défini par un nombre d'altérations moléculaires important au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs tels que ceux codant pour les protéines P53 et APC, ou de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire tels que ceux codant pour les protéines de la voie de signalisation WNT. Ces tumeurs coliques sont faiblement infiltrées par les cellules immunitaires.

Cette faible densité de l'infiltrat immunitaire est également observée dans le sous type CMS-3 (13 % des CCR), dénommé « Métabolique », qui présente des dérégulations épithéliales et métaboliques. En effet, un fort taux de mutations *k-ras* et une surexpression des voies métaboliques sont identifiées dans ce type de tumeurs.



Le sous-type « Mésenchymateux » ou CMS-4 (23 % des CCR) quant à lui, est caractérisé par une sur-activation de la voie TGF- $\beta$  et de l'angiogenèse ainsi que par un stroma inflammatoire et immunosuppresseur.

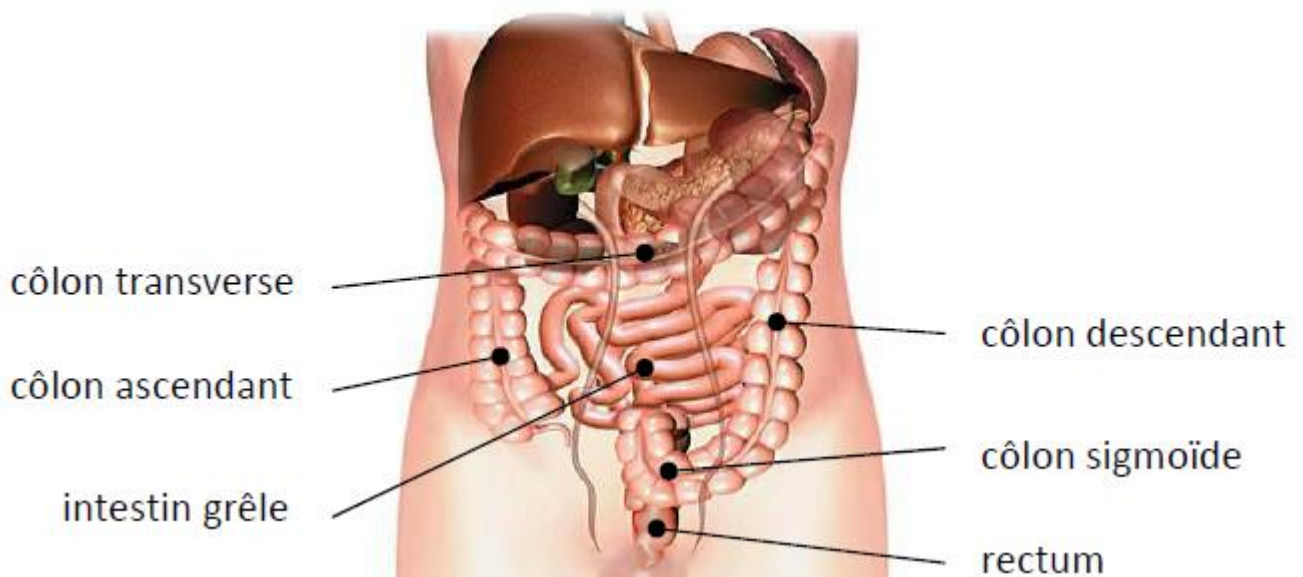
Bien qu'elle ne soit pas encore utilisée en clinique cette classification est de plus en plus diffusée car elle pourrait permettre une meilleure évaluation du pronostic des patients atteints de CCR et d'orienter leurs traitements, notamment par le choix de thérapies ciblées (Colangelo et al., 2017; Okita et al., 2018; Sveen et al., 2018. Thésaurus National de Cancérologie Digestive, 2018). Les patients porteurs du CCR de sous-type CMS-1 présentent la meilleure survie sans récurrence contrairement aux patients porteurs de CCR CMS-4 pour lesquels la survie sans récurrence et la survie globale sont les plus mauvaises. Les patients atteints de CCR de sous-type CMS-2 et CMS-3 présentent quant à eux des survies sans récurrence intermédiaires, néanmoins les meilleures survies globale et après rechute sont observées pour les patients porteurs du sous-type CMS-2 (Colangelo et al., 2017; Guinney et al., 2015).

En plus de ces facteurs pronostiques, il existe de plus en plus d'évidence sur la valeur pronostic du microbiote colique dans le CCR (cf ci-dessous).

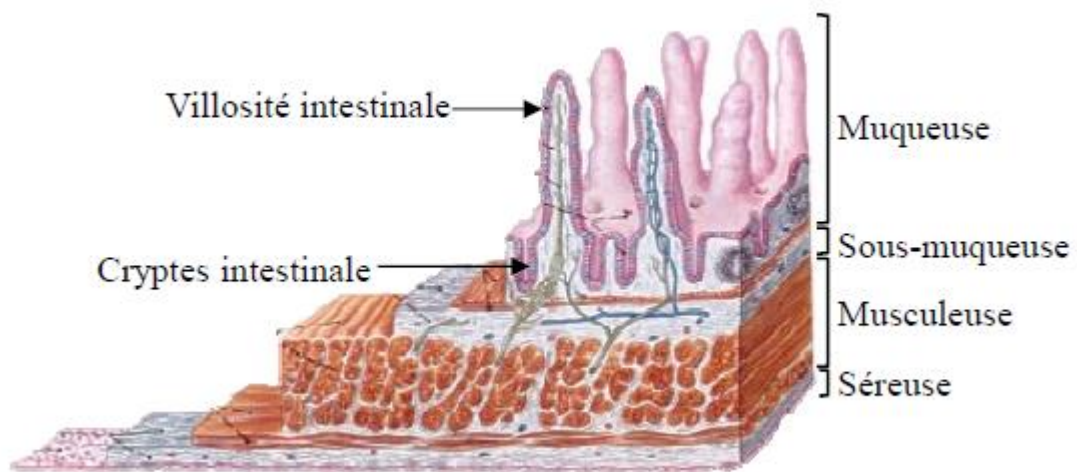
#### I.1.4) Traitements

Le principal traitement du cancer colorectal est la chirurgie. Elle consiste en la résection de la tumeur avec des marges de sécurité suffisantes (marges distales et proximales minimales de 5 cm) et un curage ganglionnaire. Le côlon étant en rapport étroit avec ses organes et tissus adjacents (duodénum, intestin grêle, estomac, rate...), il peut être nécessaire de réaliser l'exérèse totale ou partielle de ces derniers en cas d'envahissement tumoral (Shen et al., 2004; Thésaurus National de Cancérologie Digestive, 2018).

La chimiothérapie est administrée dans trois situations selon le stade de développement tumoral : avant la chirurgie afin de stabiliser ou de faire régresser le développement cancéreux (néo-adjuvant) ; ou après la chirurgie en fonction de facteurs pronostiques histopathologiques, dans le but de diminuer les risques de récurrences en éliminant d'éventuelles cellules tumorales résiduelles (adjuvant) ; ou lorsque la chirurgie n'est pas possible en raison d'un développement tumoral trop avancé et/ou de l'état général trop précaire du patient (Cunningham et al., 2010). L'administration d'une chimiothérapie adjuvante n'est indiquée que pour les tumeurs de stade TNM II associées à des facteurs de mauvais pronostic (T4, perforation, engainements péri-



**Figure 2 : Anatomie générale du côlon.** Le côlon est la portion du tube digestif située entre l'intestin grêle et le rectum. Il comporte deux parties : le côlon droit (côté ascendant et partie droite du côlon transverse), et le côlon gauche (côlon transverse partie gauche, côlon descendant et côlon sigmoïde).  
*Source : Larousse encyclopédie*



**Figure 3 : Structure de la paroi intestinale.** La paroi intestinale est composée de 4 couches qui sont (de la lumière vers l'extérieur) : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculieuse et la séreuse. La muqueuse intestinale est pourvue de nombreux replis : les évaginations telles que les villosités intestinales, et des invaginations telles que les cryptes intestinales. *Source : <http://www.corpshumain.ca>*

nerveux, tumeurs peu différenciées). Elle est composée de 5-FU (5-Fluoro-Uracile), acide folinique et oxaliplatine (FOLFOX) (O'Connor et al., 2011; Thésaurus National de Cancérologie Digestive, 2018). Pour les CCR de stade III l'administration d'une bi ou tri-chimiothérapie adjuvante de type CAPOX (Capecitamine et Oxaliplatine) ou FOLFOX est indiquée (André et al., 2004; Thésaurus National de Cancérologie Digestive, 2018).

Au stade métastatique, le traitement de première intention est la chimiothérapie, la chirurgie n'étant préconisée qu'en cas de tumeur compliquée ou symptomatique (occlusion, hémorragie...). En cas de métastases, la chimiothérapie néo-adjuvante est utilisée pour favoriser la stabilisation de la maladie voir même faire régresser les lésions. Si une stabilisation ou une réponse est observée les métastases seront alors réséquées (Jones et al., 2012). La radiothérapie n'est indiquée que dans le cas de cancer du rectum.

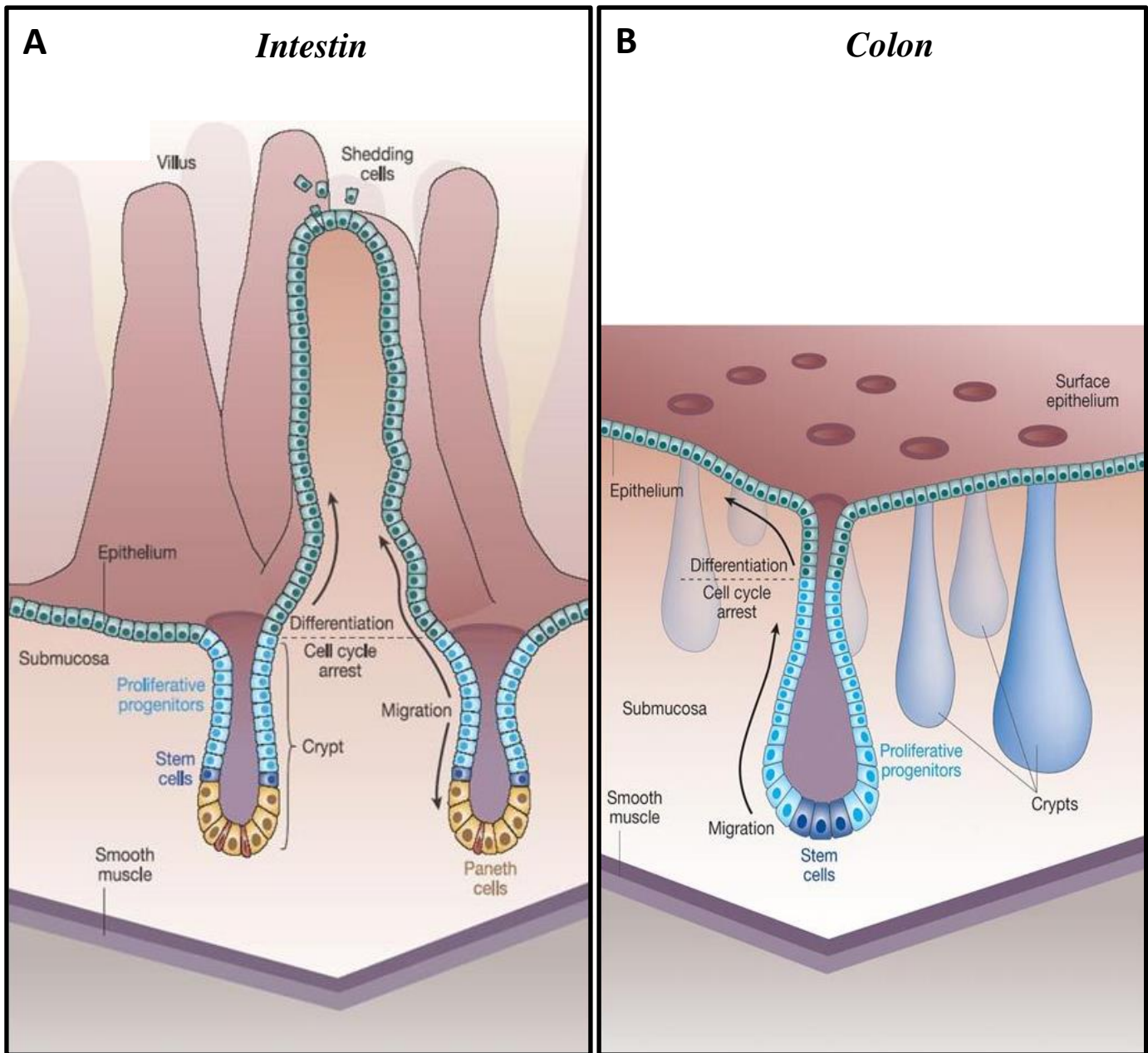
## I.2 - Structure et physiologie du côlon

### I.2.1) Généralités

Le tractus digestif a pour fonction principale la digestion et l'assimilation des aliments. Il participe également à la protection de l'organisme grâce au rôle barrière (physique, chimique et immunitaire) de son épithélium, contre les molécules nocives et/ou les agents pathogènes. L'intestin fait suite à l'estomac et s'étend jusqu'à l'anus. Le côlon est la portion du tube digestif situé entre l'intestin grêle et le rectum (**Figure 2**). Les rôles physiologiques spécifiques du côlon sont la réabsorption hydro-électrolytique, la dégradation des composés non-digestibles, et le stockage des selles avant défécation. Une organisation histologique spécifique permet le bon déroulement de ces fonctions (van der Flier and Clevers, 2009).

La paroi intestinale est constituée de 4 couches (**Figure 3**) : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. La muqueuse est la tunique la plus complexe en contact avec la lumière. Elle est composée d'un épithélium qui repose sur une lame basale, d'un chorion (ou *lamina propria*) riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques, et d'une fine couche musculaire de soutien appelée musculaire muqueuse (Humphries and Wright, 2008).

La muqueuse intestinale est pourvue d'invaginations nommées cryptes ou glandes de Lieberkühn, qui sont essentielles pour l'homéostasie cellulaire et permettent le renouvellement



**Figure 4 : Particularité de la muqueuse colique et renouvellement cellulaire de l'épithélium.** La muqueuse colique est dépourvue de villosité mais elle présente un grand nombre de cryptes, contrairement à celle de l'intestin. Son épithélium est monostratifié et son renouvellement est assuré par les cellules souches pluripotentes localisées au fond des cryptes. Celles-ci se divisent et se différencient en remontant progressivement vers la lumière colique. Source : *Reya and Clevers, 2009.*

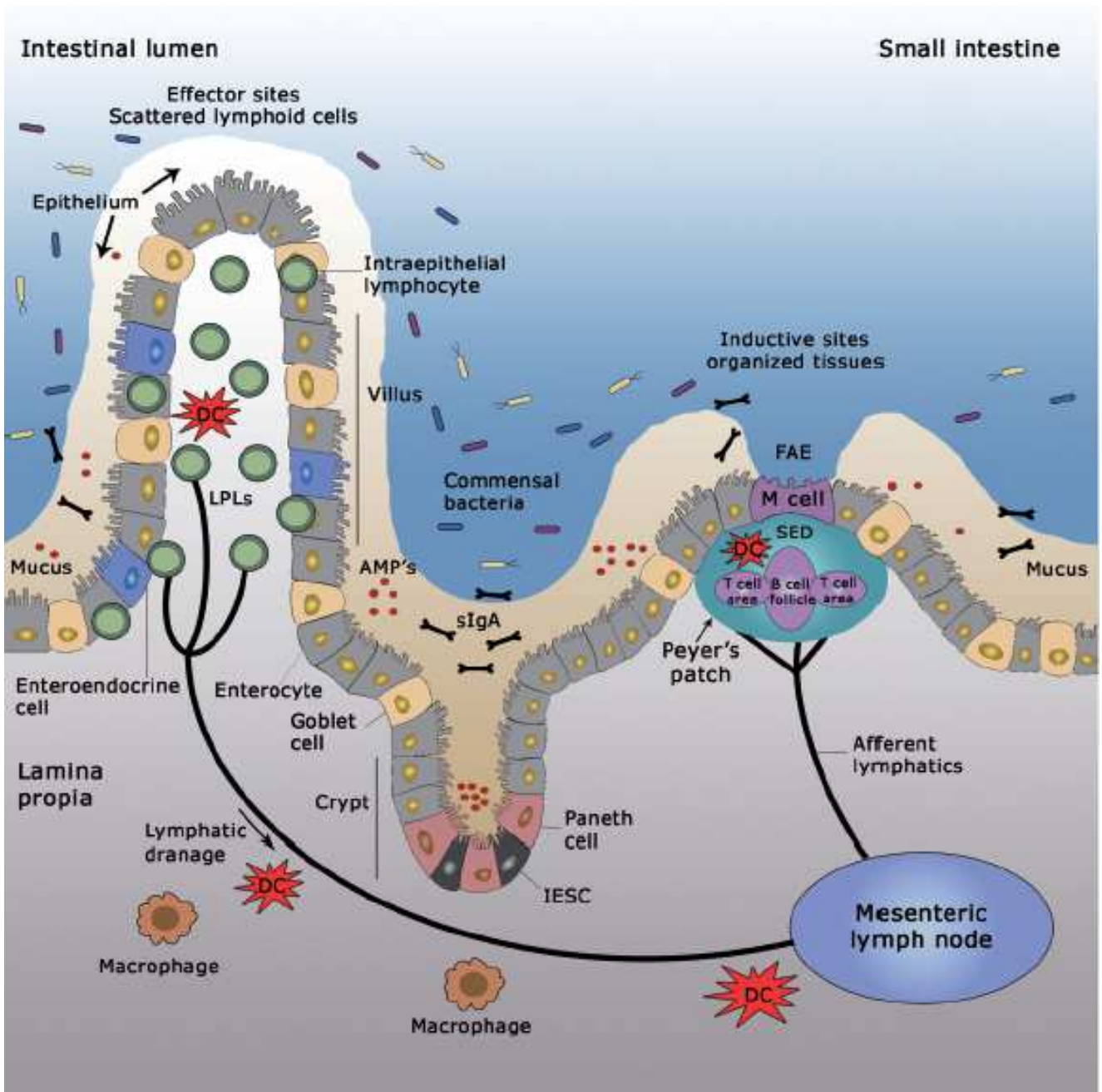


des cellules de l'épithélium muqueux puisqu'elles sont le siège de la prolifération cellulaire (Clevers, 2013; van der Flier and Clevers, 2009). Chez l'homme, l'épithélium intestinal est remplacé tous les 4 à 5 jours ce qui en fait le tissu qui possède le renouvellement le plus actif de tout l'organisme.

### I.2.2) Caractéristiques de l'épithélium colique

Contrairement à la muqueuse de l'intestin, celle du côlon est dépourvue de valvules conniventes et de villosités mais présente un nombre important de cryptes (**Figure 4**) (Allaire et al., 2018; Kim and Ho, 2010; Peterson and Artis, 2014). Comme il vient d'être évoqué, ces structures permettent le renouvellement de l'épithélium colique. Plus précisément, il est assuré par les cellules souches pluripotentes localisées au fond des cryptes et bordées par les cellules mésenchymateuses, appelées myofibroblastes péri-cryptiques (Humphries and Wright, 2008). Les cellules souches se divisent, se différencient en cellules épithéliales et remontent progressivement à la surface des cryptes au cours de leur différenciation (**Figure 4**) (Fevr et al., 2007; van der Flier and Clevers, 2009; Reya and Clevers, 2005). L'activité de la voie de signalisation WNT est essentielle dans ces processus, et un gradient de signalisation WNT existe le long des cryptes. L'absence de cette signalisation bloque la prolifération et conduit à la destruction de l'épithélium dans des modèles murins présentant une altération de la voie WNT (altération de la protéine APC) (Vries et al., 2010).

L'épithélium colique est composé de quatre types cellulaires : (i) les entérocytes, qui réalisent l'absorption intestinale ; (ii) les cellules caliciformes, qui sécrètent le mucus et des glycoprotéines permettant la lubrification des selles et favorisant la fonction de barrière de l'épithélium ; (iii) les cellules endocrines, qui sécrètent des hormones avec une activité paracrine et endocrine (glucagon, gastrine....) ; et (iv) les cellules de Paneth, qui protègent l'hôte par la sécrétion de peptides (défensines) et de lysozyme antimicrobiens (Allaire et al., 2018; van der Flier and Clevers, 2009; Kim and Ho, 2010; Peterson and Artis, 2014). La proportion de chaque type cellulaire au niveau de l'épithélium colique est différente de celle observée au niveau de l'intestin. L'épithélium colique est composé d'un nombre moins important d'entérocytes puisque sa fonction est de réabsorber l'eau et les électrolytes et non pas les nutriments. Il contient une quantité plus faible de cellules de Paneth qui ne sont présentes



**Figure 5 : Tissus immunitaires associés à l'intestin.** La défense immunitaire intestinale est organisée à travers trois structures différentes : la barrière intestinale, la *lamina propria* et les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT : «Gut-Associated Lymphoid Tissue»). La barrière intestinale contient de nombreux lymphocytes T intraépithéliaux (IELs) et constitue la première ligne de défense immunitaire. La *lamina propria* contient la majorité des cellules immunitaires de la muqueuse : lymphocytes T et B (LPLs « Lamina Propria Lymphocytes »), neutrophiles, cellules dendritiques (DC) et macrophages.

Le GALT est composé de trois aires lymphoïdes différentes : les plaques de Peyer (PP), les follicules lymphoïdes isolés (FAE) et les ganglions mésentériques (MLNs). Les MLNs permettent l'activation des LT par les cellules dendritiques provenant de la muqueuse intestinale. IESC : cellules souches épithéliales intestinales. AMP : peptides anti-microbiens. sIgA : Immunoglobuline A. SED : Dôme sous-épithéliale. Source : Ahluwalia et al., 2017.

qu'au fond des cryptes coliques à proximité des cellules souches afin d'assurer leur protection. En revanche les cellules caliciformes sont plus nombreuses (Ganz, 2000).

### I.2.3) Tissus intestinaux impliqués dans la réponse immunitaire

Les trois territoires intestinaux impliqués dans la défense immunitaire mucoale de l'hôte sont l'épithélium, la *lamina propria* et les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT : « Gut-Associated Lymphoid Tissue ») (**Figure 5**) (Abreu, 2010; Ahluwalia et al., 2017).

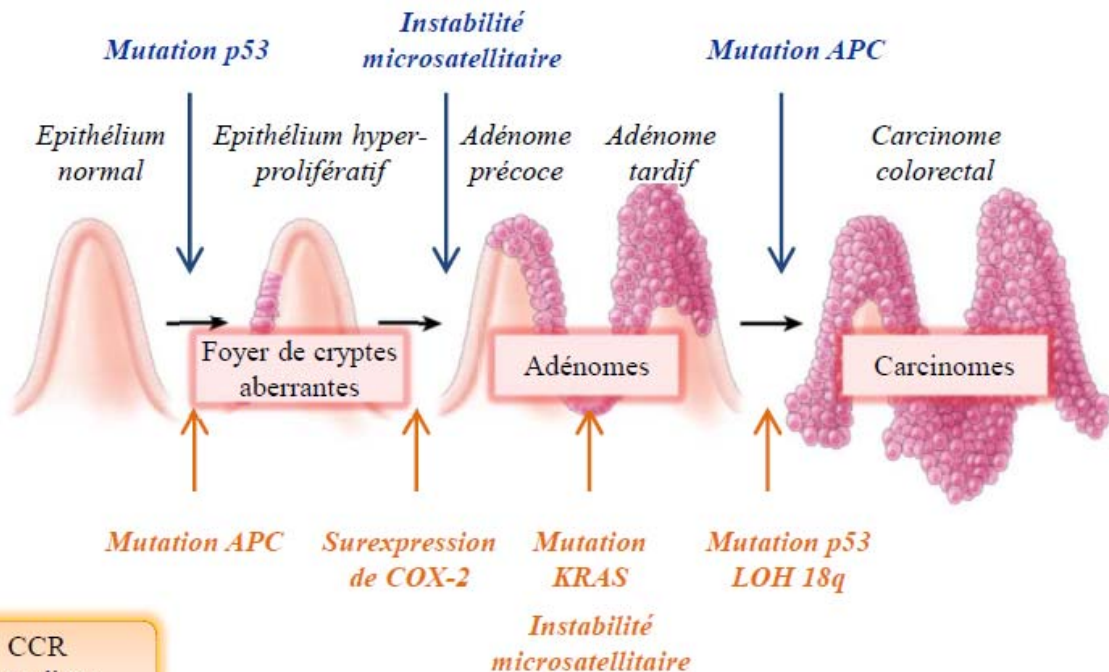
En plus de sa fonction barrière *via* la sécrétion de composés anti-microbiens (Peterson and Artis, 2014), l'épithélium colique contient de nombreuses cellules immunitaires appelées lymphocytes intraépithéliaux (IELs). Ils constituent la première ligne de défense immunitaire contre l'entrée de pathogènes dans la muqueuse, en raison de leur proximité avec la lumière intestinale (Cheroutre et al., 2011; Wershil and Furuta, 2008). Ces lymphocytes sont exclusivement des lymphocytes T (LT) capables de reconnaître les antigènes *via* l'interaction entre leur récepteur T (TCR) et le CMH des cellules présentatrices. Chez l'homme la majorité de ces LT (90%) sont porteurs du récepteur TCR $\alpha\beta$  et seulement 10% ont un TCR $\gamma\delta$  (Cheroutre, 2004; Poussier et al., 2002; Wershil and Furuta, 2008). Le maintien de ces cellules dans l'épithélium est régulé par leur interaction avec les cellules épithéliales intestinales, engageant leurs protéines de surface respectives  $\alpha E\beta 7$  (aussi appelée CD103) et E-cadhérine (Cepek et al., 1994).

La *lamina propria* est un site effecteur important de la réponse immunitaire intestinale puisqu'elle contient la majorité des cellules immunitaires associées à l'immunité intestinale telles que les lymphocytes, les cellules dendritiques, les neutrophiles, les macrophages et d'autres cellules myéloïdes ainsi que les cellules lymphoïdes innées (ILCs) (Mowat and Agace, 2014). Elle permet de prévenir et de répondre à une invasion de la muqueuse par des pathogènes (Tlaskalová-Hogenová et al., 2004; Wershil and Furuta, 2008). La *lamina propria* intestinale est considérée comme la plus grande aire lymphocytaire de l'organisme, elle est composée de LT et de LB sécréteurs majoritairement d'IgA. La sous-population de LT la plus représentée est la population T CD4<sup>+</sup> auxiliaire mais les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, ainsi que des LT régulateurs, notamment les LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>, sont également présents (Acheson and Luccioli, 2004; Carol et al., 1998; Coombes and Maloy, 2007; Mowat and Agace, 2014; Wershil and Furuta, 2008). La plupart de ces cellules immunitaires sont déjà activées.

Mutations génétiques  
Modifications épigénétiques

Séquence adénome-cancer

CCR associé à  
une colite



CCR  
sporadique

**Figure 6 : Séquence adénome-cancer des patients atteints de CCR.** La « séquence adénome-cancer » décrit le processus du développement du cancer colique. La transformation d'un épithélium normal en carcinome est initiée par la formation de cryptes aberrantes, après l'accumulation de mutations génétiques et de modification épigénétiques. L'étape suivante est la formation d'un adénome précoce puis tardif. Le carcinome est la dernière étape de cette séquence. L'apparition et la succession des différents événements moléculaires est différente entre les CCR associés à une colite et les CCR sporadiques. Source : D'après Terzic et al, 2010 ; Thèse de Jennifer Raisch, 2014.

Le GALT est composé de trois aires lymphoïdes différentes (**Figure 5**) : les plaques de Peyer (PP), les follicules lymphoïdes isolés (ILF) et les ganglions mésentériques (MLNs) (Mason et al., 2008; Mowat, 2003). Les plaques de Peyer sont localisées dans la partie distale de l'iléon. Ces structures sont composées majoritairement par une aire folliculaire riche en LB nommée « zone B » et une plus petite surface composée de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, la « zone T ». Elles contiennent également des cellules dendritiques et des macrophages (MacDonald, 2003). Les follicules lymphoïdes isolés associés à la muqueuse ont une composition et une structure similaire aux plaques de Peyer, mais ils sont de plus petite surface et sont répartis sur tout le long du tube digestif y compris le côlon (Newberry and Lorenz, 2005). Contrairement à ces deux tissus lymphoïdes, les ganglions mésentériques présentent une capsule et sont alimentés par des vaisseaux lymphatiques (Newberry and Lorenz, 2005). Ils sont composés de trois zones distinctes : le paracortex, le cortex et la médulla qui permettent l'initiation de la réponse immunitaire après présentation des antigènes aux lymphocytes par les cellules dendritiques activées provenant de la lamina propria. Les MLNs contiennent également des macrophages (Buettner and Bode, 2012; Willard-Mack, 2006).

La maturation du GALT et des cellules qui le composent est étroitement liée au microbiote intestinal (cf ci-dessous) (Falk et al., 1998; Lee and Kim, 2017; Macpherson and Harris, 2004).

### I.3 - Étapes de la carcinogenèse colique

Les adénocarcinomes (tumeurs malignes qui se développent à partir d'un épithélium glandulaire) représentent 98% des cas de CCR, il existe également des formes plus rares de tumeurs du côlon de type sarcomes (2%).

Les étapes de développement du CCR ont été décrites par Fearon et Vogelstein par la « séquence adénome-cancer » (Fearon and Vogelstein, 1990), comportant plusieurs étapes successives qui évoluent sur environ 10 à 15 ans (**Figure 6**). Chacune de ces étapes est relativement bien caractérisée au niveau cellulaire et moléculaire (Fearon and Vogelstein, 1990).





### I.3.1) Modifications histologiques lors de la carcinogénèse colique

#### ***I.3.1.a. Les foyers de cryptes aberrantes***

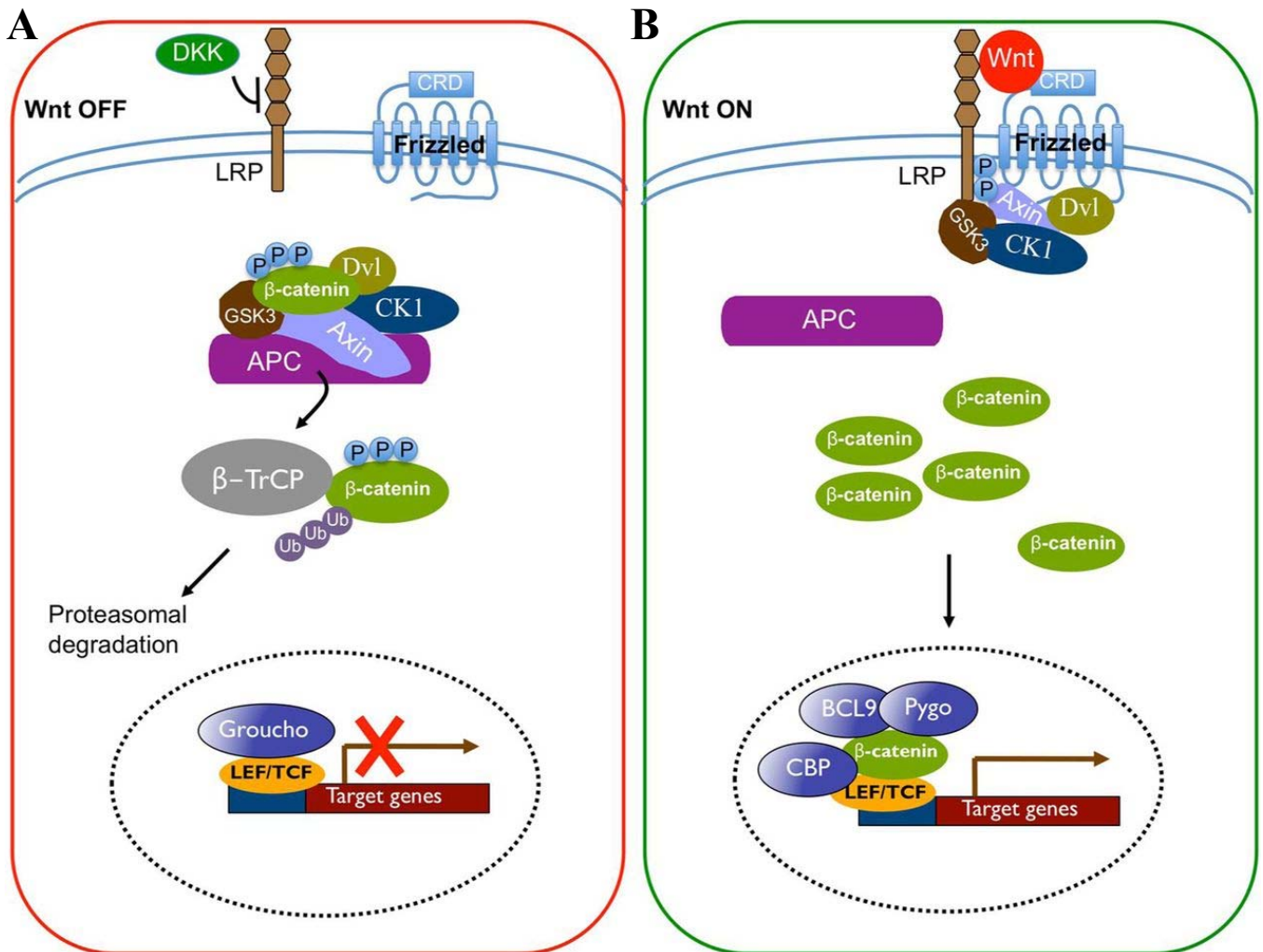
La carcinogénèse colorectale serait initiée par la formation de foyers de cryptes aberrantes (FCA) induite par la prolifération anarchique des cellules épithéliales pluripotentes des cryptes intestinales (Drew et al., 2014). Dans la majorité des cas ces lésions sont des hyperplasies bénignes mais dans 5% des cas des atypies cellulaires peuvent être observées rendant ainsi le FCA dysplasique. Il s'agit de la première étape de la séquence « adénome-cancer » qui est définie par l'apparition de ce micro-adénome et aboutit à la formation d'un polype dysplasique (présentant des altérations épithéliales structurales et cytologiques), détectable macroscopiquement, nommé adénome précoce (Lopez-Ceron and Pellise, 2012). Les FCA hyperplasiques pourraient être également à l'origine de la carcinogénèse colique des tumeurs présentant une architecture festonnée (dentelée) (Haque et al., 2014; Lopez-Ceron and Pellise, 2012).

#### ***I.3.1.b. L'adénome***

Les adénomes coliques sont des proliférations intra-épithéliales dysplasiques qui sont sous forme de polypes dans 90 % des cas. Plusieurs types de lésions sont distinguables histologiquement par leur organisation architecturale : les polypes tubuleux (65 à 87 % des cas), villosités (8 à 25 % des cas) et tubulo-villosités (5 à 10 %) (Tanaka, 2009). Il a également été découvert l'adénome festonné (« *serrated adenoma* »), qui diffère des trois autres formes par la nature des voies moléculaires altérées (Haque et al., 2014). En fonction de leur degré de dysplasie ces adénomes sont qualifiés de bas grade à haut grade, ils peuvent ensuite évoluer en adénocarcinomes (Tanaka, 2009).

#### ***I.3.1.c. L'adénocarcinome (ADK) et les métastases***

L'adénocarcinome *in situ* s'étend petit à petit en profondeur. Il franchit tout d'abord la lame basale, on parle alors d'ADK intra-muqueux *in situ* puis il devient invasif lorsqu'il atteint la *lamina propria* et la musculaire de la muqueuse colique (Jass, 2007). D'un point de vue histologique ils sont dénommés ADK de « Lieberkühn » et ont un degré de différenciation



**Figure 7 : Voie de signalisation Wnt/β-caténine.** La voie WNT/β-caténine (« *Wingless Int* ») contrôle notamment la prolifération cellulaire. Une activation anormale de cette voie est observée dans la majorité des CCR. **A.** Quand la voie n'est pas activée (« *OFF* ») la protéine β-caténine est phosphorylée par un complexe multiprotéique constitué par la protéine APC (*adenomateous polyposis coli*), GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*), CK1 (*casein kinase 1*), DVL (*Dishevelled*) et AXIN. Cette phosphorylation va entraîner la dégradation de la β-caténine par le protéasome, elle n'effectue donc pas son rôle de facteur de transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. **B.** A l'inverse quand la voie est activée (« *ON* ») après fixation de WNT sur son récepteur *Frizzled*, la β-caténine n'est plus phosphorylée par le complexe protéique et donc reste libre dans le cytosol cellulaire puis transloque dans le noyau et induit la transcription de gènes cibles tels que *c-myc* et *cycline D1* activant la prolifération cellulaire. Source : D'après *Yu et al, 2014*.



tumorale variable. La majorité (70 à 75%) présentent une structure glandulaire similaire au tissu sain et sont donc bien différenciés (Tanaka, 2009).

Une fois que l'ADK franchit la *lamina propria*, les cellules tumorales sont en contact avec les vaisseaux sanguins et lymphatiques ce qui leur permet de métastaser au niveau ganglionnaire et viscéral. La plupart des métastases du côlon sont hépatiques (75 %) mais des métastases pulmonaires (15% des cas), osseuses (5% des cas) et cérébrales (5% des cas) peuvent également être observées (Scheele et al., 1990).

Les cellules épithéliales altérées sont en interaction permanente avec leur micro-environnement associé (TME : « *Tumor MicroEnvironment* »). Il est composé de types cellulaires variés (cellules stromales, cellules immunitaires, fibroblastes, cellules endothéliales) mais aussi de composants de la matrice extracellulaire (collagène). L'importance d'acteurs microbiens est également remarquable dans le CCR (Burns et al., 2018; Colangelo et al., 2017; Peddareddigari et al., 2010). Ce micro-environnement évolue tout le long de la « séquence adénome-cancer ». Un nombre croissant d'études montre notamment l'importance du micro-environnement microbien et immunitaire qui sera décrit plus tard (Boleij et al., 2015; Bonnet et al., 2014; Colangelo et al., 2017; Fletcher et al., 2018; Llosa et al., 2015; Mima et al., 2015, 2016a; Pagès et al., 2018; Tilg et al., 2018a; Viljoen et al., 2015; Villéger et al., 2018; Wei et al., 2016a).

### I.3.2) La séquence adénome-cancer

Il est estimé qu'il faut au minimum environ 6 à 10 altérations génomiques au cours de l'évolution de la cellule normale jusqu'à l'adénocarcinome (Fearon and Vogelstein, 1990). Ces altérations sont responsables de la dérégulation de plusieurs voies de signalisation qui régulent la prolifération, la survie, la migration et l'invasion cellulaire (Del Vecchio et al., 2017; Han et al., 2013).

#### ***I.3.2.a. La voie WNT/ $\beta$ -Caténine***

La voie de signalisation WNT/ $\beta$ -Caténine (**Figure 7**) est activée dans la majorité des CCR. Cette voie joue un rôle important au cours du développement embryonnaire et de la carcinogenèse en modulant l'expression de signaux intercellulaires qui contrôlent notamment



la prolifération cellulaire (Gregorieff et al., 2005; Reya and Clevers, 2005). Quand la voie WNT n'est pas stimulée (position « OFF ») (**Figure 7.A**), la  $\beta$ -caténine cytosolique libre est phosphorylée par un complexe multiprotéique constitué par la protéine APC codée par le gène suppresseur de tumeur *apc* (« *adenomatous polyposis coli* »), l'axine, et la GSK3 $\beta$  (glycogène synthase kinase 3 $\beta$ ). Elle est alors adressée au protéasome pour dégradation par le système d'ubiquitination du protéasome. À l'inverse lorsque le ligand WNT se fixe sur ses récepteurs Fz (« *Frizzled* ») (position « ON ») (**Figure 7.B**), il entraîne la phosphorylation de la protéine Dvl (« *Dishevelled* ») et induit le recrutement à la membrane de l'axine et de GSK3 $\beta$  qui ne phosphorylera plus la  $\beta$ -caténine. Celle-ci ne sera alors plus dégradée et va transloquer dans le noyau et activer la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire (Reya and Clevers, 2005; Yu and Virshup, 2014).

Dans la carcinogénèse colique, la voie WNT est activée sans fixation du ligand aux récepteurs Fz. Ce mécanisme est induit le plus souvent par la synthèse d'une protéine APC tronquée suite à une mutation du gène *apc*. Ainsi, le complexe multiprotéique nécessaire à la dégradation de la  $\beta$ -caténine n'est pas formé et celle-ci s'accumule dans le cytoplasme puis transloque dans le noyau, activant une prolifération cellulaire non-contrôlée (Goss and Groden, 2000; Gregorieff et al., 2005; Reya and Clevers, 2005). De plus cette translocation nucléaire entraîne un déséquilibre entre la  $\beta$ -caténine cytoplasmique et celle se fixant à l'E-cadhérine en faveur de celle présente dans le cytoplasme. Il en résulte une perte de l'adhésion intercellulaire qui favorise la migration des cellules tumorales (Goss and Groden, 2000; Gregorieff et al., 2005; Reya and Clevers, 2005).

L'altération de cette voie intervient à un stade précoce de la « séquence adénome-cancer ». En effet, les mutations du gène *apc* sont le premier évènement moléculaire de la séquence adénome-cancer. On dénombre actuellement 700 mutations du gène *apc* (Bérout and Soussi, 1996; Laurent-Puig et al., 1998; Powell et al., 1992). Dans la PAF, c'est une mutation germinale héréditaire d'un des allèles du gène *apc* qui est transmise (Half et al., 2009). S'il se produit une altération de l'autre allèle alors la voie WNT est activée de façon constitutive. Dans les CCR sporadiques avec une protéine APC fonctionnelle (15%), d'autres mutations géniques touchant les autres acteurs de la voie WNT sont responsables de sa sur-activation (Akisik et al., 2011).

Le modèle murin APC<sup>Min/+</sup> (*Min, multiple intestinal neoplasia*), qui est un modèle de référence pour étudier le CCR possède une mutation du gène *apc* sur son codon 850 induisant



la formation d'un codon stop (Moser et al., 1990). Ces souris développent ainsi plusieurs centaines d'adénomes préférentiellement au niveau de l'intestin grêle. Les animaux plus âgés présentent des adénocarcinomes au niveau du côlon (Moser et al., 1990).

### ***1.3.2.b. Autres voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse colique***

En plus de la voie WNT/ $\beta$ -Caténine, d'autres voies de signalisation peuvent être mise en cause dans le CCR, telles que les voies Ras/MAPK, Phosphatidyl Inositol 3 kinase (PI3K)/AKT, p53 et du TGF- $\beta$  (« *Transforming Growth Factor  $\beta$*  »).

Lors de la carcinogenèse colique, des altérations géniques au niveau des protéines de la voie Ras/MAPK entraînent une sur-activation de celle-ci sans fixation du ligand sur l'EGFR. Par exemple, la mutation K-RAS qui intervient à un stade précoce, serait présente dans 50% des cas de ce cancer (Clarke and Kopetz, 2015; Custodio and Feliu, 2013). Des mutations du gène *B-raf* sont également observées dans 10 % des CCR (Barault et al., 2008; Clarke and Kopetz, 2015). Une activation anormale de la voie Ras/MAPK peut également être expliquée par une surexpression du récepteur EGFR (30 à 70 % des CCR) (Custodio and Feliu, 2013).

La voie phosphatidyl-inositol PI3K/AKT est, comme la voie MAPK, activée par la protéine RAS. Des mutations sur les gènes codant les protéines de la voie PI3K (*pten*, *akt2*, *p85*) sont observées dans environ 40 % des CCR sporadiques (Samuels and Ericson, 2006).

Dans le CCR sporadique, des mutations du gène *p53* alors nommé *tp53* entraînent des altérations de la protéine P53. Ces altérations surviennent tardivement dans la « séquence adénome-cancer », mais elles peuvent également apparaître à des temps précoces lors des CCR associés aux MICI (Rhodes and Campbell, 2002).

Dans le CCR, la voie TGF- $\beta$  est considérée comme une voie « suppresseur de tumeur » et des mutations du gène codant le récepteur au TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ RII) ou de ceux codant pour les protéines SMAD4 ou SMAD2 impliquées dans cette voie sont observées (Castets et al., 2011; Eppert et al., 1996; Grady and Pritchard, 2014; Parsons et al., 1995; Tanaka et al., 2008).



### I.3.3) Les différents phénotypes de tumeurs CCR

L'analyse moléculaire des CCR a permis de définir différents phénotypes de tumeur : le phénotype CIN (« *Chromosomal INstability* »), le phénotype MSI (« *Microsatellite Instability* »), le phénotype CIMP (« *CpG Island Méthylator Phenotype* ») (Bond et al., 2012a, 2012b; Jass, 2007; Pritchard and Grady, 2011).

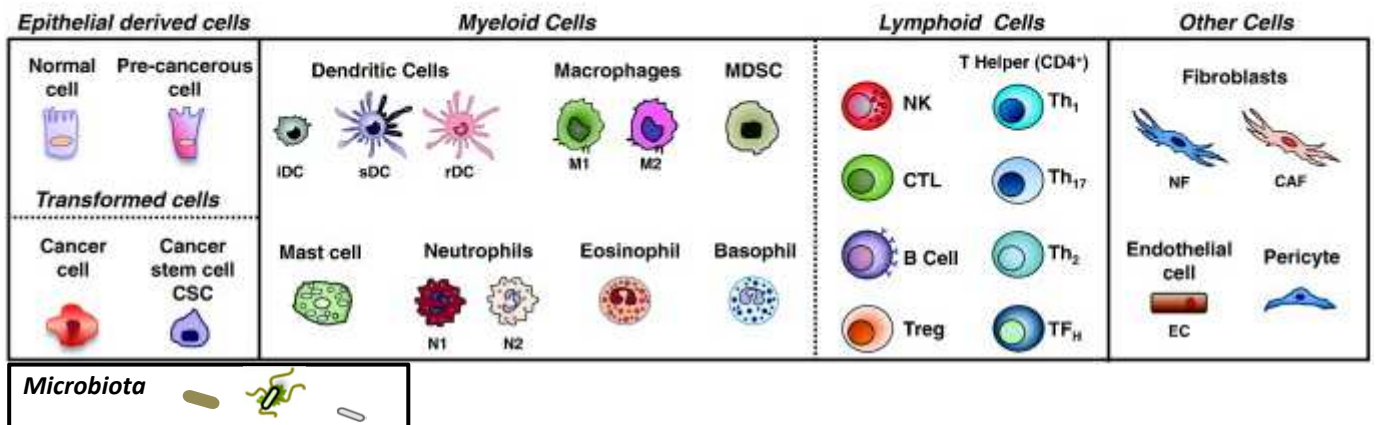
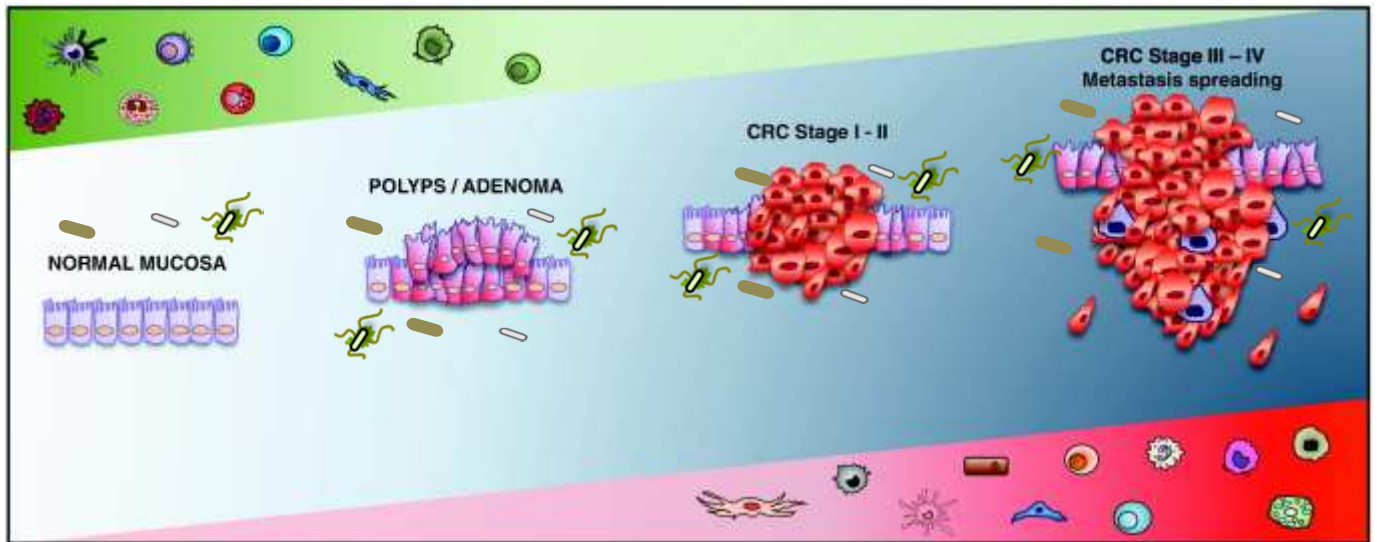
#### ***I.3.3.a. L'instabilité chromosomique (CIN)***

Le phénotype de tumeurs CCR le plus fréquent est l'instabilité chromosomique (CIN) qui représente plus de 70% des cancers coliques. Il s'agit de la voie classique de la carcinogenèse colorectale caractérisée par l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que *apc* (60 à 80 % des CCR sporadiques CIN), *k-ras* et *p53* (60 à 80 % des CCR sporadiques CIN également), résultant de la perte de matériel chromosomique (Bond et al., 2012a; Fearon and Vogelstein, 1990; Grady and Pritchard, 2014; Jass, 2007; Laurent-Puig et al., 1998; Naccarati et al., 2012; Powell et al., 1992; Raskov, 2014). Les CCR héréditaires associés à la PAF présentent aussi ce phénotype CIN.

De façon chronologique et d'après le modèle classique du développement du cancer colique sporadique (**Figure 6**), l'altération du gène *apc* semble apparaître de manière précoce dès le développement de cryptes aberrantes ou d'adénomes de bas grade (Powell et al., 1992). La mutation du gène *k-ras* interviendrait à des temps intermédiaires de la carcinogenèse (Custodio and Feliu, 2013) et serait suivie par la perte du chromosome 18 porteur de gènes suppresseurs de tumeurs, en particulier celui codant SMAD4, ou par des mutations de ces gènes (Park et al., 2008). Ces processus entraînent la progression du développement tumoral jusqu'à la formation d'un adénome tardif. Des altérations sur la protéine *p53* apparaissent lors de la dernière étape de la « séquence adénome-cancer », induisant le passage de l'adénome tardif à l'adénocarcinome (Terzić et al., 2010).

#### ***I.3.3.b. L'instabilité microsatellitaire (MSI)***

L'instabilité microsatellitaire ou phénotype MSI est observée dans 15% des CCR. Elle est caractérisée par la présence d'une instabilité dans les zones microsatellites induite par des altérations épigénétiques ou des mutations génétiques altérant les systèmes de réparation des mésappariements de l'ADN MMR (« *MisMatch DNA Repair* »). Au moins une altération sur



**Figure 8 : Composition du micro-environnement tumoral colique.** Le micro-environnement tumoral colique est composé de diverses populations cellulaires. Des cellules épithéliales normales, tumorales, endothéliales (EC), péricytes, et fibroblastes normaux (NF) ou cancéreux (CAF) coexistent dans ce micro-environnement, le long de la « séquence adénome-cancer ». Il est également composé de cellules immunitaires : des cellules dendritiques (DC : iDC « *immature Dendritic Cells* » ; sDC « *stimulatory DC* » et rDC (« *regulatory DC* »), des lymphocytes (NK : cellules natural killer ; CTL : LT cytotoxiques ; LB ; Treg : LT régulateurs et des LT helper : Th<sub>1</sub>, Th<sub>17</sub>, Th<sub>2</sub>, TF<sub>H</sub>) ainsi que des cellules myéloïdes telles que les neutrophiles, macrophages et myéloïdes suppressives (MDCSs). Cet environnement immunitaire évolue également au cours de la séquence-adénome cancer. Enfin le microbiote colique est également un composant important de ce micro-environnement. Source : D'après Colangelo et al, 2017 et Fletcher et al, 2018



un des gènes impliqués dans ce système (*msh2*, *msh3*, *msh6*, *mlh1*, *pms1* et *pms2*) entraîne une défaillance du système MMR (Jass, 2007; Pritchard and Grady, 2011). Les CCR associés au Syndrome de Lynch sont classés dans cette catégorie (Coppedè, 2014). L'inactivation du gène TGF- $\beta$ RII est observée dans 80% des cancers MSI (Grady and Pritchard, 2014; Parsons et al., 1995).

### ***I.3.3.c. L'hyperméthylation des îlots CpG (CIMP)***

L'hyperméthylation des îlots CpG touche les promoteurs de certains gènes suppresseurs de tumeur, induisant leur inactivation. Elle définit le phénotype CIMP. Bien que les gènes définissant ce phénotype ne soient pas clairement identifiés, il est à noter que ce type de tumeurs est fréquemment associé à des mutations des gènes *b-raf* et *k-ras* (Leggett and Whitehall, 2010).

En plus des altérations moléculaires décrites ci-dessus, l'importance du microenvironnement dans la séquence adénome-cancer est largement décrite.

## **II - Rôle du système immunitaire dans la carcinogénèse colique**

### **II.1- Cellules immunitaires impliquées dans le CCR**

Le micro-environnement tumoral est composé de diverses cellules dont différentes populations de cellules immunitaires (**Figure 8**). Plus particulièrement les cellules myéloïdes comme les cellules myéloïdes suppressives, les macrophages et les neutrophiles, ainsi que les lymphocytes tels que les cellules *Natural killer* (NK), lymphocytes T (LT) et B (LB), sont importants dans le CCR. Ces effecteurs du système immunitaire sont retrouvés dans les trois territoires immunitaires intestinaux présentés plus haut avec une prédominance des lymphocytes dans le GALT et la muqueuse. Les cellules myéloïdes sont présentes également dans la muqueuse et le GALT mais sont plus abondantes dans la lamina propria. Des rôles antagonistes peuvent être observés pour ces populations qui peuvent être à la fois pro- et/ou anti-tumorales. Leur pouvoir anti-tumoral s'exerce à la fois avant le développement du cancer par l'élimination de cellules aberrantes et après son apparition par leur activité cytotoxique contre les cellules tumorales. Certaines cellules immunitaires peuvent également être des indicateurs clés dans le pronostic des patients CCR (Colangelo et al., 2017; Norton et al., 2015;

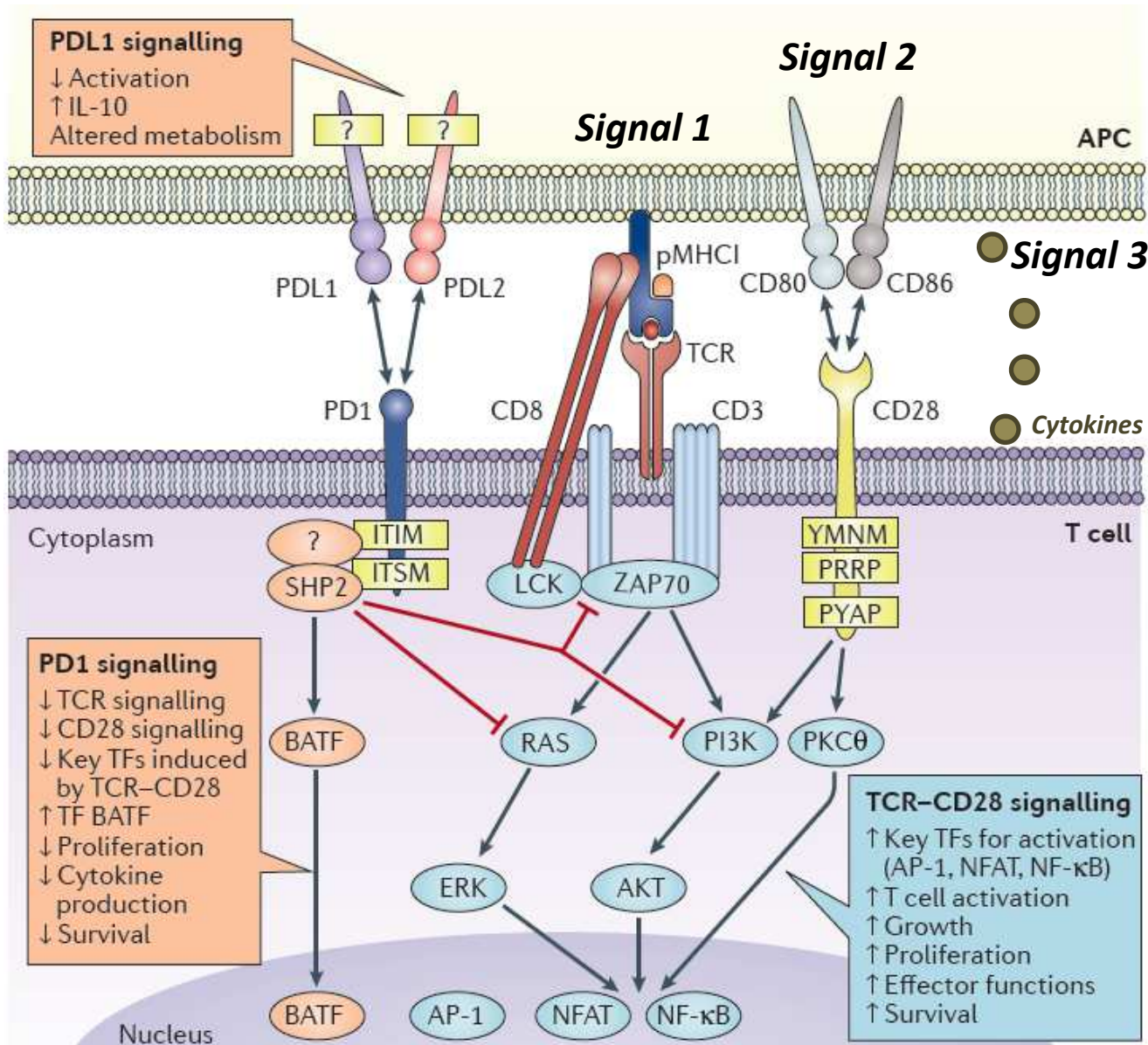


Powell and Huttenlocher, 2016). Chez l'homme la majorité des études rapportent l'implication de cellules immunitaires infiltrant la muqueuse et/ou les tumeurs mais également de cellules circulantes (sang), dans le CCR.

### II.1.1) Rôles des lymphocytes dans le CCR

#### II.1.1.a. Les NK et NKT

Les NK ou « cellules tueuses naturelles » (« *Natural Killer* ») sont des lymphocytes granuleux faisant partie de l'immunité innée car leur activité cytotoxique est spontanée et ne nécessite pas d'induction par une cellule présentatrice d'antigène. À l'inverse les NKT (« *Natural Killer T* ») reconnaissent les antigènes *via* leur TCR, leur activation et leur cytotoxicité dépendent donc d'une présentation antigénique par les cellules présentatrices ou anormales *via* le complexe CMH-peptide (Martín-Antonio et al., 2017; Vivier et al., 2012). En particulier les NKT sont connus pour reconnaître et réagir au glycosphingolipide  $\alpha$ -galactosylcéramide présenté par la protéine CD1d du CMH I (complexe CD1d- $\alpha$ GalCer). Ces deux types cellulaires participent à la reconnaissance et à la destruction des cellules infectées par deux types de mécanismes : l'induction de l'apoptose par l'interaction de récepteurs membranaires entre la cellule cible et la cellule immunitaire (TRAIL « *TNF-related-apoptosis-inducing ligand* », FasLigand), et une cytotoxicité par la dégranulation de granzymes cytotoxiques (granzymes A, B, H et K) et la production d'IFN- $\gamma$ . Ils participent également à la reconnaissance et à la destruction de cellules aberrantes et tumorales, notamment coliques, par des mécanismes similaires (Colangelo et al., 2017; Martín-Antonio et al., 2017; Vivier et al., 2012). Les NKT sont activés après la reconnaissance d'un antigène tumoral par leur TCR, et les NK après reconnaissance d'une expression altérée des protéines de surface des cellules aberrantes et tumorales, comme par exemple une diminution des protéines du CMH de classe I, *via* leurs NCRs (Natural Cytotoxicity Receptors) ou le récepteur NKG2D (« *Natural Killer Group 2D* ») (Gras Navarro et al., 2015; Vitale et al., 2014). Bien que les NK et NKT participent à la destruction des cellules aberrantes et tumorales, leur rôle est surtout important à un stade précoce de la carcinogenèse car ces cellules ont une capacité moindre d'infiltrer les tumeurs par rapport à la muqueuse (Sconocchia et al., 2014).



**Figure 9 : Activation et modulation de la réponse lymphocytaire T CD8<sup>+</sup>.** L'activation de la réponse lymphocytaire T nécessite trois signaux : (1) la fixation du CMHI-peptide (porté par une cellule présentatrice d'antigène APC) au TCR du LT, (2) la liaison des facteurs de co-stimulations CD80/CD86 au récepteur CD28, et (3) la sécrétion de cytokines activatrices telles que l'IL-2. Ces trois signaux entraînent des cascades de phosphorylation intracellulaire impliquant les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT qui activent la transcription de gènes nécessaires à l'activation des LT. Cette activité est modulée par des récepteurs membranaires des LT nommés « checkpoints immunologiques ». Par exemple la stimulation du récepteur inhibiteur PD-1 du lymphocyte T par la fixation de son ligand PDL-1 va inhiber la réponse du LT CD8<sup>+</sup> *via* l'implication de cascade de phosphorylation, La phosphorylations de la protéine SHP2 va notamment inhiber les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT. *Source : D'après Sharpe and Pauken 2018*

Il a également été mis en évidence chez les patients atteints de CCR des NK aux fonctions et structures altérées pouvant être associés à une accélération de la progression tumorale (Gharagozloo et al., 2015; Rocca et al., 2013). Plus précisément, les NK infiltrant les tumeurs de ces patients sous-expriment les récepteurs essentiels à leur activité cytotoxique tels que NKG2D, comparativement aux NK circulant dans le sang de ces patients (Rocca et al., 2013). De plus, les NK sanguins des patients atteints de CCR présentent également une expression moindre de ces récepteurs et une capacité plus faible à sécréter des granzymes et l'IFN- $\gamma$  par rapport aux NK provenant de sang d'individus sains (Gharagozloo et al., 2015; Rocca et al., 2013).

### ***II.1.1.b. Les LT CD8<sup>+</sup>***

Tout comme les NK et NKT, les LT CD8<sup>+</sup> sont impliqués dans la défense contre les cellules infectées par des pathogènes, les cellules aberrantes et les cellules tumorales. L'activation de cette population lymphocytaire s'effectue dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions mésentériques. Elle nécessite trois signaux indispensables (**Figure 9**) : (i) la reconnaissance de l'antigène tumoral grâce à la liaison du TCR du LT CD8<sup>+</sup> et du CMH I-peptide exposé par la cellule présentatrice grâce au processus de présentation croisée, (ii) la liaison des facteurs de co-stimulation membranaires (CD28/CD80, CD86) ainsi que (iii) la sécrétion de cytokines activatrices (IL-2...) (Masopust and Schenkel, 2013; Mittrücker et al., 2014a; Sharpe and Pauken, 2018; Zhang and Bevan, 2011). Cette activation se fait par des cascades de phosphorylation intracellulaires faisant intervenir la protéine ZAP70 et les voies de signalisation Ras/MAPK et PI3K/Akt des LT (**Figure 9**). Elle est régulée notamment par les *checkpoints* immunologiques. La liaison de ces récepteurs à leurs ligands spécifiques (ligand de *checkpoints* immunologiques) exprimés sur d'autres cellules du micro-environnement (cellules présentatrices d'antigènes, autres cellules immunitaires, cellules saines et tumorales) entraîne une cascade de phosphorylation qui module la réponse du LT. Par exemple, la liaison du checkpoint immunologique inhibiteur PD-1 avec son ligand PDL-1 induit une inhibition de l'activité du LT CD8<sup>+</sup> (**Figure 9**) (Pardoll, 2012; Sharpe and Pauken, 2018). Ces LT activés migrent ensuite sur le site d'infection, sur le site pré-tumoral ou tumoral et exercent leur fonction cytotoxique par la sécrétion de TNF- $\alpha$ , d'IFN- $\gamma$  et par la voie de lyse perforine/granzyme B (Mittrücker et al., 2014a; Zhang and Bevan, 2011).



Des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques d'antigènes tumoraux sont détectés chez 30 à 40% des patients de CCR (Koch et al., 2006). Dans cette étude il est montré que ces lymphocytes T activés sont présents à la fois dans la muqueuse et dans les tumeurs de ces patients, témoignant de l'implication de ces cellules à des temps précoces (reconnaissance de cellules aberrantes) et plus tardifs du développement tumoral (reconnaissance des cellules tumorales). De plus, le nombre de LT CD8<sup>+</sup> infiltrant la tumeur (TILs) est élevé par rapport à la muqueuse saine (Koch et al., 2006).

Le rôle anti-tumoral de ces cellules est confirmé par une analyse génomique sur une cohorte de patients CCR qui a mis en évidence qu'un fort infiltrat de LT CD8<sup>+</sup> et de LT mémoires CD45RO<sup>+</sup> dans la tumeur colique, est associé à une forte expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse anti-tumorale (IFN- $\gamma$ , granzyme B...), comparativement à des patients avec un faible infiltrat en LT CD8<sup>+</sup> et LT CD45RO<sup>+</sup> (Pagès et al., 2009). De plus, l'expression de ces gènes de la réponse anti-tumorale et notamment du granzyme B, dans les tumeurs, est corrélée à une meilleure survie des patients, témoignant donc d'une meilleure efficacité de la réponse anti-tumorale (Salama et al., 2011). Récemment la présence de LT CD8<sup>+</sup> hautement activés (notamment surexpression d'IFN- $\gamma$ , de granzyme B et sous expression de checkpoints immunologiques) dans les ganglions drainant les tumeurs coliques de patients a été associée à un bon pronostic pour ces patients, montrant que l'importance de cette réponse peut également être observée à distance des tumeurs (E et al., 2018). Ces études confirment donc le rôle des LT CD8<sup>+</sup> dans la destruction des cellules tumorales coliques. Un outil pour déterminer le pronostic des patients atteints de CCR, l'Immunoscore, développé sur la base de la quantification de ces cellules dans la tumeur, sera détaillé plus loin.

### ***II.1.1.c. Les LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires: Th1, Th2 et Th17***

Dans les organes lymphoïdes secondaires, les LT auxiliaires (LT CD4<sup>+</sup>) interagissent par leur TCR avec le complexe CMH II/peptide porté par les cellules présentatrices d'antigènes. Cette interaction induit la différenciation de ces LT en différentes sous-populations notamment les Th1, Th2, Th17 et LT régulateurs décrits plus loin. Elles produisent différentes cytokines en fonctions de leur phénotype qui participent à la régulation d'autres cellules immunitaires telles que les autres sous-populations de LT, LB et macrophages de façon localisée dans les tissus (Pennock et al., 2013; Zhu et al., 2010). Leur effet est à la fois observé dans la réponse anti-infectieuse et anti-tumorale (Borst et al., 2018).





Les LT Th1 se différencient en réponse à une infection bactérienne intracellulaire ou virale et sont producteurs d'IFN- $\gamma$ , d'IL-2 et de TNF- $\beta$  qui vont activer les LT CD8<sup>+</sup> et macrophages (Romagnani, 1999). Ils ont un rôle dans la réponse contre les cellules aberrantes et tumorales coliques en amplifiant la réponse CD8<sup>+</sup> et en activant les macrophages anti-tumoraux (Tosolini et al., 2011). Ceci est confirmé par le fait que l'expression de gènes de la réponse Th1 (*t-bet*, *irf1*, *il12rb2* et *stat4*) dans les tissus tumoraux est associée à une meilleure survie des patients atteints de CCR (Tosolini et al., 2011; Zhu et al., 2010).

Les LT Th2 sont impliqués dans la réponse aux pathogènes extracellulaires et sont producteurs d'IL-4, IL-5, IL-13 et IL-10. Ils activent des polynucléaires granulocytes éosinophiles jouant un rôle dans l'allergie (Colangelo et al., 2017; Ellyard et al., 2007; Romagnani, 1999). Ils seraient plutôt pro-tumoraux car ils limitent l'activité des LT cytotoxiques et favorisent l'angiogenèse, cependant leur présence dans le micro-environnement tumoral des patients CCR ne semble pas avoir d'impact sur le pronostic des patients (Ellyard et al., 2007; Grizzi, 2013; Housseau et al., 2016; Tosolini et al., 2011).

Le rôle des LT Th17 dans le CCR est de plus en plus étudié. Cette population est impliquée dans la réponse anti-infectieuse contre les pathogènes extracellulaires mais également dans l'inflammation chronique. En effet après leur différenciation à partir de LT naïfs en présence d'IL-6, d'IL-1 $\beta$ , de TGF- $\beta$  et d'IL-23, ils produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17, l'IL-21, l'IL-22, l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et le GM-CSF (« *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* ») (Blaschitz and Raffatellu, 2010; Corvaisier-Chiron and Beauvillain, 2010).

L'implication de cette population dans le CCR a notamment été suggérée par l'augmentation du nombre de LT Th17 activés (producteurs d'IL-17) dans les tumeurs de patients atteints de ce cancer comparativement à leur muqueuse saine (Doulabi et al., 2018; Liu et al., 2011; Su et al., 2010). Bien que ces études ont observé l'importance de ces LT auxiliaires dans l'infiltrat tumoral, donc à un stade tardif de la carcinogenèse, l'augmentation du nombre de ces cellules dans la *lamina propria* des patients atteints de MICI, maladie qui est un facteur de risque du CCR, peut suggérer une implication de cette population également à des temps plus précoces du développement tumoral colique (Kobayashi et al., 2008; Ogino et al., 2013).

Même si le rôle exact des Th17 dans la promotion du CCR est encore mal connu, la cytokine pro-inflammatoire qu'ils produisent serait impliquée dans l'inflammation exacerbée



associée au CCR. En effet, la production d'IL-17 au niveau du site tumoral entraîne le recrutement d'autres cellules pro-inflammatoires telles que les monocytes et les neutrophiles, qui vont à leur tour produire les cytokines impliquées dans la différenciation des LT en LT Th17, créant ainsi une boucle d'amplification (Reynolds et al., 2010).

De plus, l'IL-17 induit la sécrétion de VEGF par les cellules tumorales et par les fibroblastes du stroma tumoral, ce qui favoriserait l'angiogenèse (Chang et al., 2013; De Simone et al., 2015; Liu et al., 2011; Numasaki et al., 2003). Il a été montré que l'expression de l'IL-17 dans les tumeurs de patients atteints de CCR est positivement corrélée à celle du VEGF (Liu et al., 2011). Dans le même sens, des études *in vitro* et *ex vivo* sur des cellules tumorales coliques purifiées de patients, ont montré que la stimulation de ces cellules par l'IL-17 induit la production de ce facteur de croissance, ainsi que l'activation du métabolisme du glucose dans ces cellules tumorales, accélérant ainsi la prolifération cellulaire (Chang et al., 2013; De Simone et al., 2015; Numasaki et al., 2003; Straus, 2013). Cette association entre IL-17 et VEGF a récemment été confirmée chez les patients atteints de CCR, où l'augmentation de lymphocytes Th17 producteurs d'IL-17 dans le sang est accompagnée d'une augmentation de VEGF sérique. De plus dans cette étude ces deux paramètres sont corrélés à l'agressivité des tumeurs (Minamikawa et al., 2017). La croissance des cellules tumorales est également induite par l'IL-17 via l'activation de la voie de signalisation STAT-3 (De Simone et al., 2015).

Enfin, l'IL-17 pourrait également être responsable de l'immunosuppression de la réponse LT anti-tumorale par l'induction du recrutement des MDSCs sur le site tumoral, observée à la fois chez l'homme et dans des modèles murins (Chang et al., 2013; Minamikawa et al., 2017; Ohki et al., 2012; Suzuki et al., 2013; Thiele Orberg et al., 2017a; Yazawa et al., 2013).

#### ***II.1.1.d. Les LT régulateurs***

Les LT régulateurs (Tregs ; CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> et/ou CD25<sup>+</sup>) coliques, ont la fonction première de réguler la réponse immunitaire au sein de la muqueuse colique et de permettre ainsi son homéostasie en empêchant les phénomènes pro-inflammatoires. Ils ont aussi la capacité d'inhiber l'activation et la prolifération des LT. Les LT naïfs se différencient en LT régulateurs en présence notamment de la cytokine immunosuppressive TGF- $\beta$ . Cette différenciation peut avoir lieu aussi bien dans le thymus que dans les tissus périphériques ou des zones plus localisées (par exemple muqueuse et tumeurs), générant plusieurs sous-types de Tregs qui seront décrits plus bas. Ces cellules produisent ensuite à leur tour des cytokines



immunosuppressives et en particulier l'IL-10 et le TFG- $\beta$  (Shevach and Thornton, 2014). Les LT régulateurs peuvent avoir des rôles antagonistes dans le CCR (Fletcher et al., 2018; Fridman et al., 2012). En effet, ils peuvent inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale et donc être pro-tumoraux ; ceci est confirmé par des études sur les patients atteints de CCR qui montrent qu'un infiltrat riche en LT régulateurs est associé à une diminution de la survie des patients (Yaqub et al., 2008; Zhuo et al., 2014). L'une de ces études montre notamment que les LT régulateurs isolés de patients atteints de CCR ont sur les LT CD8<sup>+</sup> anti-tumoraux un effet inhibiteur dépendant de l'activation de l'enzyme COX-2, décrite précédemment (Yaqub et al., 2008). À l'inverse d'autres études montrent qu'un fort infiltrat en LT régulateurs est associé à une augmentation de la survie des patients, suggérant un effet bénéfique de ces populations (Ling et al., 2014; Salama et al., 2009). Cette observation serait en partie expliquée par une diminution de l'inflammation induite par les LT régulateurs, notamment par leur rôle suppresseur sur les LT Th17. En effet, des études *ex vivo* ont permis de montrer que les Tregs isolés du sang des patients atteints de CCR inhibent la prolifération des LT Th17 (Crome et al., 2010). De plus, un effet anti-tumoral de ces cellules a été observé dans des modèles murins de CCR (Erdman et al., 2005; Geis et al., 2015). Notamment le transfert adoptif de LT régulateurs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) de souris WT (C57BL/6) à des souris APC<sup>Min/+</sup> induit une régression des tumeurs coliques et intestinales de ce modèle. Cet effet est dépendant de la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Erdman et al., 2005).

Il est à noter que parmi les Tregs il existe des sous-populations qui sont difficilement distinguables d'un point de vue phénotypique mais aux rôles bien distincts. En particulier concernant le micro-environnement colique on peut distinguer les LT régulateurs naturels (nTregs ou tTregs : « *thymic derived Tregs* ») et les LT régulateurs inductibles (iTregs ou pTregs : « *peripheric inducible Tregs* ») (Zhang et al., 2015a). Les nTregs sont différenciés au niveau du thymus et migrent ensuite dans les tissus de l'organisme, ils sont responsables de l'homéostasie des tissus et favorisent la tolérance immunitaire en inhibant les LT auto-réactifs (Sakaguchi et al., 1995). Les iTregs se différencient localement dans les tissus et au contact d'un environnement fortement inflammatoire (Singer et al., 2014; Whiteside, 2012; Zou, 2006). Cette sous-population de Tregs est particulièrement présente dans le micro-environnement tumoral du CCR et est responsable de l'inhibition de la réponse anti-tumorale T (Syed Khaja et al., 2017; Zhang et al., 2015a). Bien qu'une étude récente décrive l'augmentation des iTregs dans les tumeurs de patients atteints de CCR par rapport à leur muqueuse saine et leur association avec un micro-environnement immunosuppresseur pro-tumoral (expression de



checkpoints immunologiques notamment) (Syed Khaja et al., 2017), des études complémentaires sont nécessaires pour savoir si la distinction des iTregs et nTregs permet d'expliquer le rôle antagoniste de la population des LT régulateurs dans le CCR.

Néanmoins, il est fortement suggéré que le rôle de ces cellules régulatrices serait étroitement lié à la nature de l'infiltrat des tumeurs CCR. En effet si cet infiltrat est composé en majorité de cellules pro-inflammatoires (neutrophiles, macrophages, LT Th17...) les LT régulateurs permettraient de diminuer l'inflammation associée au cancer et seraient donc de bon pronostic pour les patients. À l'inverse si l'infiltrat intra-tumoral est composé en majorité de LT anti-tumoraux, dans ce cas les Tregs seraient de mauvais pronostic pour les patients (Betts et al., 2012).

Enfin, il a été décrit dans les tumeurs de patients atteints de CCR une population de LT régulateurs particuliers, caractérisés par leur capacité à produire de l'IL-17. Ces Tregs IL-17<sup>+</sup> seraient fortement pro-tumoraux car ils participeraient à l'amplification d'un microenvironnement pro-inflammatoire, mais aussi à l'inhibition des LT anti-tumoraux (Kryczek et al., 2011).

Ainsi les LT régulateurs peuvent avoir un effet pro-ou anti-tumoral ; bien que leur implication dans le CCR restent mal connue, il semblerait que leur état d'activation, leur profil cytokinique, leur localisation, mais également la nature de l'infiltrat immunitaire auquel ils appartiennent (pro-inflammatoire ou riche en LT anti-tumoraux) soient importants pour déterminer leur rôle dans la carcinogenèse colique (Erdman et al., 2005; Fletcher et al., 2018; Norton et al., 2015).

### ***II.1.1.e. Les LB***

Les LB sont les effecteurs de la réponse humorale notamment contre les pathogènes extracellulaires. Ils se différencient dans la moelle osseuse et sont activés dans les organes lymphoïdes secondaires tels que le GALT, de manière dépendante de la reconnaissance d'antigène par leur BCR (« *B cell receptor* »). Les LB activés peuvent présenter des peptides antigéniques via leur CMH de classe II (Moens and Tangye, 2014). Une interaction des LB avec les LT auxiliaires, notamment les LT Th2 dans la voie d'activation dite T-dépendante permet la différenciation des LB en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (Hoffman et al., 2016). Le rôle de ces cellules dans la carcinogenèse colique n'est pas encore bien élucidé, cependant chez les patients atteints de CCR à des temps tardifs de la tumorigenèse elles s'accumulent dans





l'infiltrat tumoral et dans le sang par rapport à des individus sains (Shimabukuro-Vornhagen et al., 2014). Cette accumulation de LB serait associée à un bon pronostic pour les patients, suggérant un rôle plutôt anti-tumoral (Berntsson et al., 2016). Mais il a également été mis en évidence la présence de LB régulateurs capables de diminuer la réponse anti-tumorale chez les patients atteints de CCR à des stades avancés et métastatiques (Berntsson et al., 2016).

## II.1.2) Rôles des cellules myéloïdes dans le CCR

### *II.1.2.a. Les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs)*

Les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) sont une population très hétérogène provenant des précurseurs des cellules myéloïdes et définies comme des cellules immatures ayant une potentielle activité immunosuppressive (Schmid and Varner, 2010). Dans les conditions physiologiques les cellules myéloïdes immatures se différencient dans la moelle osseuse en granulocytes (comprenant notamment les neutrophiles), en macrophages et cellules dendritiques matures, et représentent environ 0,5 % des cellules mononuclées du sang (Colangelo et al., 2017; Schmid and Varner, 2010). Dans des conditions pathologiques telles qu'une infection chronique ou la carcinogenèse, cette différenciation est altérée et entraîne l'expansion de MDSCs (granulocytes, macrophages et cellules dendritiques immatures) (Dorhoi and Du Plessis, 2018; Schmid and Varner, 2010).

Dans un contexte tumoral, cette expansion peut être induite de deux manières : (i) soit l'activation des voies JAK2 (« Janus Kinase 2 ») et STAT3 au sein des cellules précurseurs de la population myéloïde suite à la sécrétion d'IL-6, de GM-CSF et de VEGF ainsi que l'expression de COX-2 par les cellules endommagées (infectées, aberrantes et tumorales) ; (ii) soit par l'activation des voies de signalisation STAT6, STAT1 et NF- $\kappa$ B après la sécrétion de ligands des TLRs, d'IFN- $\gamma$ , d'IL-4, d'IL-13 et de TGF- $\beta$  par les LT activés (en particulier les LT Th17) et les cellules tumorales (Foell et al., 2007; Gabilovich and Nagaraj, 2009; OuYang et al., 2015; Pan et al., 2010). Une fois activées, ces MDSCs produisent de l'arginase, de l'acide nitrique et des ROS qui vont inhiber la réponse lymphocytaire T anti-tumorale. Elles peuvent également produire de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  et induire des LT régulateurs ce qui va affecter la réponse anti-tumorale des LT et NK (Pan et al., 2010).

Un taux élevé de MDSCs activées a été mis en évidence dans le sang, les lésions préneoplasiques et les tumeurs des patients atteints de CCR comparativement aux individus

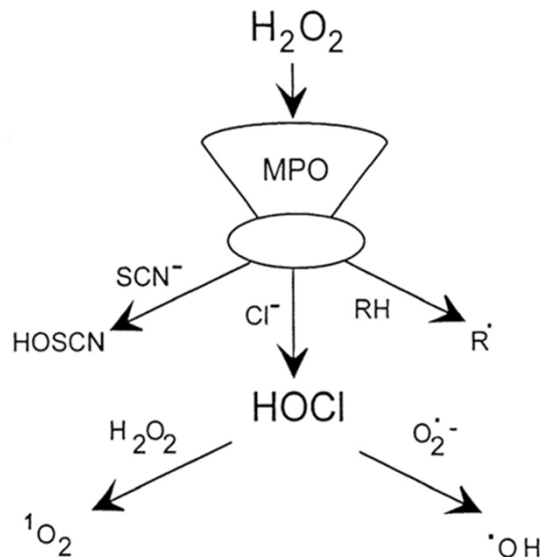


sains (OuYang et al., 2015; Wu et al., 2014; Zhang et al., 2013). De plus, seules les MDSCs prélevées du sang ou extraites de lésions (tumoraux et préneoplasiques) de patients atteints de CCR possèdent une activité immunosuppressive. La quantité de MDSCs dans le sang des patients est corrélée à l'agressivité tumorale (stades avancés dans la classification TNM, métastases) (OuYang et al., 2015; Zhang et al., 2013). Tout comme pour les LT Th17, le nombre de ces cellules est également augmenté dans les muqueuses de patients souffrant de MICI, suggérant là encore que ces MDSCs peuvent jouer un rôle à des stades plus précoces du CCR (Ogino et al., 2013).

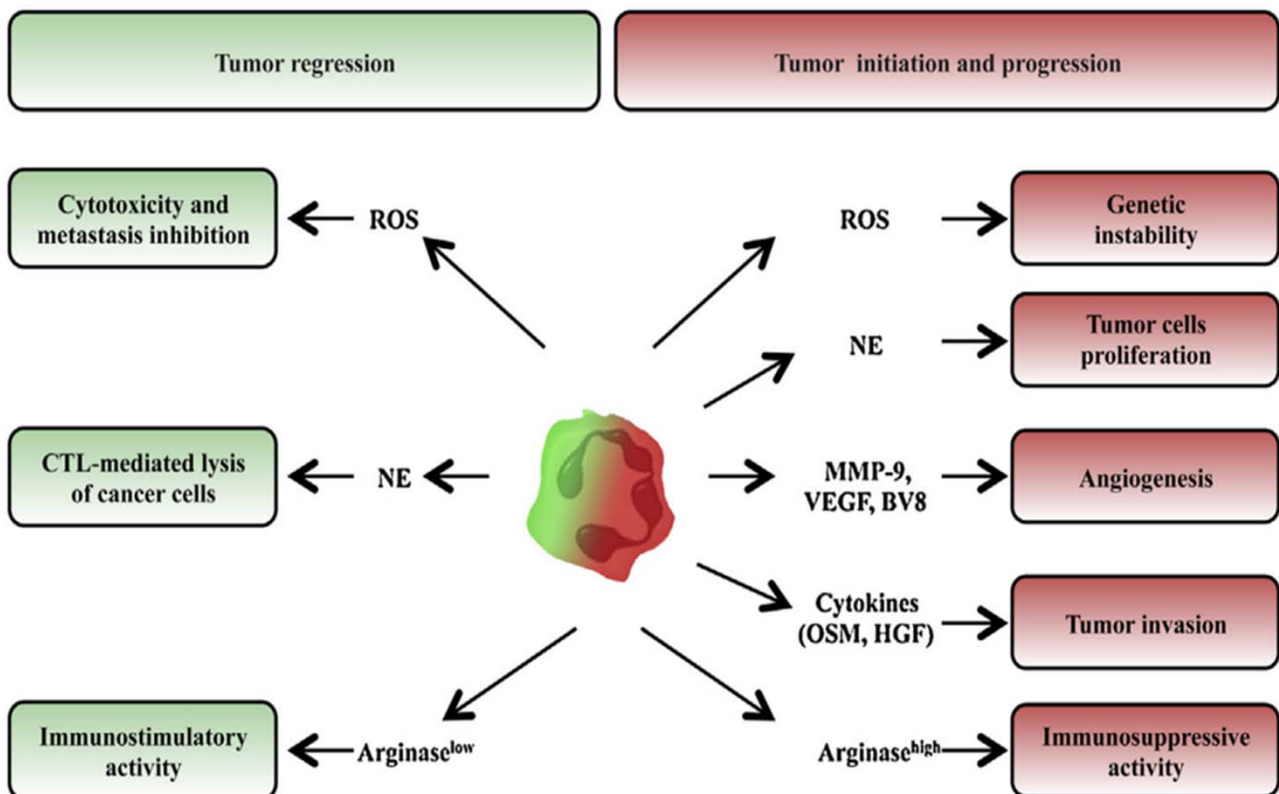
En plus de leur rôle immunosuppresseur sur la réponse T anti-tumorale dans le CCR, il a également été souligné que ces MDSCs sécrètent les protéines S100A8 et S100A9 qui vont amplifier leur recrutement sur le site tumoral et activer les voies de signalisation MAPK et NF- $\kappa$ B dans les cellules tumorales coliques (Foell et al., 2007; Gabrilovich and Nagaraj, 2009).

### ***II.1.2.b. Les neutrophiles***

Bien que peu de travaux décrivent l'impact des neutrophiles dans le développement du CCR, les rôles antagonistes de ces cellules dans le CCR sont de plus en plus étudiés. En effet, ils peuvent avoir un rôle à la fois pro-tumoral et anti-tumoral (Galdiero et al., 2018a; Powell and Huttenlocher, 2016). Dans des conditions physiologiques et pathologiques (infection et/ou dommages cellulaires), les neutrophiles sont les premières cellules sur les sites d'infection et/ou de dommages cellulaires pour permettre une première défense de l'hôte. Leur recrutement est induit notamment par la production de chimiokines inflammatoires, telles que par exemple CXCL-1 et CXCL-2, par les cellules du tissu lésé ou par les cellules infectées (Anzai et al., 2015; Keeley et al., 2010; Lazennec and Richmond, 2010; Mantovani et al., 2011; McDonald et al., 2010). Une fois sur le site, les neutrophiles participent aux processus de l'inflammation aiguë, par la phagocytose ou par leur activité cytotoxique *via* la libération de molécules réactives telles que les ROS, après contact avec des agents infectieux ou des cellules anormales. Ils facilitent le recrutement d'autres cellules immunitaires par la production de chimiokines (Brancato and Albina, 2011; Christoffersson et al., 2012). De plus, ils produisent massivement des ROS par leur sécrétion accrue de MPO lors de leur dégranulation suite à leur activation (processus de « *burst oxydatif* » ou « *burst respiratoire* »). En effet la MPO est responsable de la formation de l'acide hypochloreux (HOCl) à partir du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), cet



**Figure 10 : Production de ROS par les neutrophiles via la sécrétion de la MPO.** Les neutrophiles ont la capacité de produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) grâce à la libération de la MPO contenue dans leur granules, vers le milieu extracellulaire. Cette enzyme dégrade le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) du milieu extracellulaire en acide hypochloreux (HOCl). HOCl ainsi formé réagit alors avec d'autres molécules telles que le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) pour former respectivement l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) et le radical hydroxyl ( $\bullet\text{OH}$ ). *Source : D'après Hampton et al., 1998*



**Figure 11 : Effets antagonistes des neutrophiles dans la carcinogénèse.** Les neutrophiles intra-tumoraux (TANs) peuvent exercer une action anti-tumorale en détruisant les cellules tumorales, ou pro-tumorale en favorisant l'instabilité génétique et l'angiogénèse par la production de ROS et de facteurs solubles (MMP-9, VEGF, BV8). Ils peuvent également moduler la réponse lymphocytaire T anti-tumorale soit en l'activant par la production d'élastase (NE) soit en l'inhibant par la production excessive d'Arginase. *Source : Galdiero et al., 2013*

HOCl réagit ensuite avec d'autres molécules pour former d'autres ROS telles que le radical hydroxyle et l'oxygène singulet (**Figure 10**) (Hampton et al., 1998; Pase et al., 2012).

Dans un contexte de carcinogenèse, les cellules tumorales et/ou les cellules de l'inflammation associées au cancer comme les macrophages ou les fibroblastes endothéliaux peuvent également produire des chimioattractants de motifs CXC- tels que CXCL-1 et CXCL-2, et ainsi attirer les neutrophiles (Anzai et al., 2015; Keeley et al., 2010; Lazennec and Richmond, 2010; Mantovani et al., 2011; McDonald et al., 2010). Une fois sur le site tumoral les neutrophiles peuvent participer à la défense anti-tumorale, ils sont alors appelés TAN N1 pour « neutrophiles associés aux tumeurs de type 1 ». Ils participent à cette défense par la sécrétion de ROS en faible quantité pour détruire les cellules tumorales, par la sécrétion de la protéine de granule élastase (NE) qui active la réponse des LT et par une faible sécrétion d'arginase qui permet d'amplifier l'activation des cellules cytotoxiques (Cassatella, 2006; Galdiero et al., 2013; Granot et al., 2011; Mittendorf et al., 2012; Tecchio et al., 2004) (**Figure 11**).

Ces mêmes composés sécrétés par d'autres types de neutrophiles, nommés neutrophiles « N2 » peuvent avoir un rôle pro-tumoral. En effet une forte production de ROS par les neutrophiles peut être impliquée dans la carcinogenèse comme détaillé plus haut dans le cas du CCR (Güngör et al., 2010; Hanahan and Weinberg, 2011; Sandhu et al., 2000). De plus la sécrétion de facteurs tels que les métalloprotéinases (MMP-9, MMP-8), de facteurs de croissance, ou d'élastase, peut favoriser la prolifération et l'invasion cellulaire, ainsi que l'angiogenèse en lien avec le développement tumoral (Grosse-Steffen et al., 2012; Imai et al., 2005; Larco et al., 2004; Queen et al., 2005; Wislez et al., 2003). Des neutrophiles peuvent également exercer une immunosuppression sur la réponse anti-tumorale (Fridlender et al., 2009). Ces neutrophiles particuliers font partie de la grande population des MDSCs et plus spécifiquement des MDSCs granulocytiques (G-MDSCs), ils sont caractérisés par une sécrétion accrue d'arginase-1 et de iNOS, et apparaissent à des temps tardifs de la carcinogenèse (Liu et al., 2010).

Concernant plus particulièrement le cancer colique, actuellement peu d'informations sont publiées, néanmoins certaines associations entre la quantité de neutrophiles dans les tissus (muqueuse ou tumeur) et la vitesse de développement du CCR ont été mises en évidence (Rao et al., 2012; Roncucci et al., 2008). En effet il a été montré une augmentation des neutrophiles dans les muqueuses des patients atteints de CCR comparativement aux sujets contrôles (Roncucci et al., 2008). De la même manière, l'infiltration accrue des tumeurs par les neutrophiles est corrélée à l'agressivité tumorale chez ces patients (Rao et al., 2012). Plus



particulièrement l'existence de neutrophiles suppresseurs de la réponse T anti-tumorale et producteurs de ROS a été mise en évidence dans les tumeurs coliques (Wu et al., 2014). Néanmoins la présence de ces neutrophiles au sein de la tumeur peut avoir des effets bénéfiques ou péjoratifs sur le pronostic des patients (Galdiero et al., 2018b; Powell and Huttenlocher, 2016).

### ***II.1.2.c. Les macrophages***

Les macrophages représentent une population très hétérogène, ces cellules dérivent toutes des monocytes circulants et acquièrent des spécificités en fonction du tissu dans lequel ils se trouvent. Classiquement deux types de macrophages sont décrits, les macrophages M1 qui sont impliqués dans la réponse contre les pathogènes intracellulaires et produisent des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-18, CCL15, CCL20, CXCL8-11 et CXCL13), des ROS et RNS; et les macrophages M2 impliqués dans la réponse contre les parasites et producteurs de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) et anti-inflammatoires (TGF- $\beta$  et IL-10) (Chanmee et al., 2014; Martinez and Gordon, 2014; Zhang and Wang, 2014).

Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) sont les leucocytes prédominants de l'infiltrat tumoral et sont recrutés dans le micro-environnement à un stade précoce de la carcinogenèse colique par un cocktail de chimiokines (CCL2, CCL22...), cytokines (CSF1 : « *Colony Stimulating Factor 1* »), facteurs de croissance ou facteurs impliqués dans l'angiogénèse (VEGF-A, PDGF), produits par les cellules immunitaires et tumorales (Chanmee et al., 2014; Martinez and Gordon, 2014). Une fois dans la tumeur ils se différencient et se polarisent en macrophages M1 et/ou M2 en fonction du micro-environnement, par exemple le type M1 est induit par le LPS, l'INF- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  alors que le type M2 requiert la présence notamment d'IL-6, de PGE<sub>2</sub>, de TGF- $\beta$  ou d'IL-10 (Erreni et al., 2011).

Les macrophages M1 sont décrits comme anti-tumoraux car ils participent à la destruction des cellules tumorales soit directement par leur activité cytotoxique ou en favorisant la réponse Th1 (Gordon and Taylor, 2005; Mantovani et al., 2005). De ce fait, l'infiltration de macrophages M1 dans la tumeur est associée à un bon pronostic chez les patients atteints de CCR (Edin et al., 2012). À l'inverse, les macrophages M2 sont décrits comme pro-tumoraux car ils favorisent la réponse Th2, la stimulation de LT régulateurs immunosuppresseurs de la réponse LT anti-tumorale et l'angiogénèse (Erreni et al., 2011; Martinez and Gordon, 2014).





La quantité de macrophages de type M2 est augmentée dans les tissus tumoraux des patients atteints de CCR par rapport à leur muqueuse saine (Bailey et al., 2007; Siveen and Kuttan, 2009; Zhang et al., 2013). Par ailleurs, la localisation des TAMs dans la tumeur est également un indicateur de leur rôle dans la carcinogenèse colique puisqu'il a été remarqué qu'une accumulation de macrophages au bord de la tumeur induit l'apoptose des cellules tumorales et est corrélée à un bon pronostic pour les patients atteints de CCR (Algars et al., 2012; Forssell et al., 2007; Funada et al., 2003) alors que le recrutement de ces cellules immunitaires au centre de la tumeur est lié à une immunosuppression de la réponse anti-tumorale et à un mauvais pronostic pour les patients (Bailey et al., 2007; Koelzer et al., 2016b; Norton et al., 2016).

## II.2- Interactions entre système immunitaire et cellules tumorales, généralités : le concept d'immunoédition ou des 3E

### II.2.1) Mise en évidence du concept d'immunosurveillance et d'immunoédition

#### ***II.2.1.a. Immunosurveillance dans des modèles murins***

L'hypothèse d'une interaction entre les cellules immunitaires et tumorales a été émise pour la première fois en 1909 par Paul Ehrlich, qui a suggéré que la prévalence des cancers pouvait augmenter en l'absence d'un système immunitaire efficace. Ce postulat fut ensuite soutenu par des expériences *in vivo* utilisant des allogreffes sous-cutanées de cellules tumorales sur des modèles murins. Plus précisément il a été montré que des souris préalablement immunisées par des cellules tumorales irradiées provenant de sarcomes murins, étaient capables de rejeter ensuite ces mêmes cellules tumorales, après xénogreffe. De plus, le transfert des LT de souris immunisées, à d'autres souris « naïves », leur permet de développer une résistance spécifique à la greffe de ces cellules de sarcome. Cette expérience suggéra que les lymphocytes T seraient capables de reconnaître spécifiquement les antigènes associés aux cellules tumorales et ainsi de les éliminer, comme ils le feraient pour un pathogène (Burnet, 1957). Ces résultats furent la première démonstration du principe d'immunosurveillance, selon lequel le système immunitaire et en particulier les lymphocytes T préviendraient le développement de tumeurs en reconnaissant et en éliminant les cellules préneoplasiques au sein des tissus de l'hôte (Burnet, 1970, 1957; Thomas, 1959).



L'utilisation de modèles murins présentant des dysfonctionnements immunitaires a confirmé par la suite ce principe en démontrant que ces souris développent un nombre plus important de tumeurs que des souris immunocompétentes (Dunn et al., 2002; Finn, 2018; Fletcher et al., 2018). Plus précisément, il a été mis en évidence que certaines cellules cytotoxiques du système immunitaires, les LT et les cellules Natural killer T (NKT), sont importantes pour cette réponse anti-tumorale. En effet des modèles murins déficients pour ces cellules immunitaires (RAG2<sup>-/-</sup> ; BALB/C SCID ; T cell<sup>-/-</sup>) ont montré une susceptibilité plus forte à développer des sarcomes chimio-induits par le carcinogène méthylcholanthrène (MCA) que les souris contrôles immunocompétentes.

De plus, il a également été observé un développement spontané de tumeurs épithéliales (poumon, intestin en particulier) plus fréquent et présentant un stade plus avancé chez les souris déficientes pour ces cellules immunitaires, comparativement aux souris immunocompétentes, suggérant le rôle des LT et NKT à la fois sur le contrôle de l'initiation mais aussi de la promotion tumorale (Girardi et al., 2001; Shankaran et al., 2001; Smyth et al., 2000a).

L'importance de la cytokine IFN- $\gamma$  et des perforines pouvant être produites par ce type de cellules immunitaires a été montrée avec une augmentation de la fréquence et de la croissance des tumeurs chez les souris ne pouvant pas produire ces facteurs (van den Broek et al., 1996; Kaplan et al., 1998; Smyth et al., 2000b; Street et al., 2001, 2002). D'autres expériences *in vivo* ont montré que la déplétion spécifique des cellules immunitaires (Natural Killer (NK) et NKT ou LT) ou la neutralisation de l'IFN- $\gamma$  par l'utilisation d'anticorps induisent là encore une augmentation du nombre de tumeurs chimio-induites et de leur croissance, confirmant ainsi le rôle des LT, NK et NKT dans la réponse anti-tumorale, *via* la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  (Dighe et al., 1994; Smyth et al., 2000a, 2000b).

### ***II.2.1 .b. Immunoédition dans les modèles murins***

Outre cette mise en évidence de l'immunosurveillance dans différents modèles murins de cancers, il a été montré que les cellules immunitaires contribuent à des modifications des cellules tumorales (Dunn et al., 2002; Fridman, 2018). En effet, les souris immunocompétentes sont capables de rejeter des greffes de cellules tumorales provenant de souris immunodéprimées (RAG2<sup>-/-</sup> ; nude ; SCID) alors qu'elles ne parviennent pas à rejeter des cellules tumorales issues de souris immunocompétentes (Engel et al., 1997; Shankaran et al., 2001; Svane et al., 1996). De plus, il a également été mis en évidence que plus le modèle murin donneur duquel on extrait



les cellules tumorales est immunodéprimé, moins la tumeur issue de ces cellules transplantées est agressive chez la souris receveuse (O'Sullivan et al., 2012). Ces études suggèrent donc que les cellules tumorales ayant évolué au contact d'un système immunitaire efficace sont moins reconnues par les défenses de l'hôte, que des cellules tumorales ayant évolué au contact d'un système immunitaire immunodéprimé. Ainsi, en luttant contre les tumeurs, le système immunitaire exerce une pression de sélection sur les cellules tumorales entraînant l'émergence de clones résistants aux défenses de l'hôte. Ces observations ont permis de décrire le principe d'immunoédition aussi nommé « 3E » pour les trois phases d'interaction entre système immunitaire et tumeur : Élimination-Équilibre-Échappement, qui sera plus détaillé ci-dessous.

### ***II.2.1.c. Immunosurveillance anti-tumorale et immunoédition chez l'homme***

Comme évoqué précédemment, la compréhension des mécanismes qui régissent les interactions entre la tumeur et le système immunitaire lors des 3E, découle d'expériences réalisées sur des modèles murins. En ce qui concerne l'existence de ces interactions chez l'homme, elle est suggérée par des études épidémiologiques et cliniques qui reflètent une influence de l'état du système immunitaire des patients sur la carcinogenèse. La phase d'échappement étant la seule phase visible cliniquement, ces données portent surtout sur cette étape.

Tout d'abord, le risque de développer un cancer augmente avec l'âge de l'individu, ce qui peut être mis en relation avec le processus d'immunosénescence qui montre une diminution de l'efficacité du système immunitaire et donc de l'immunosurveillance avec l'âge (Ribatti, 2016).

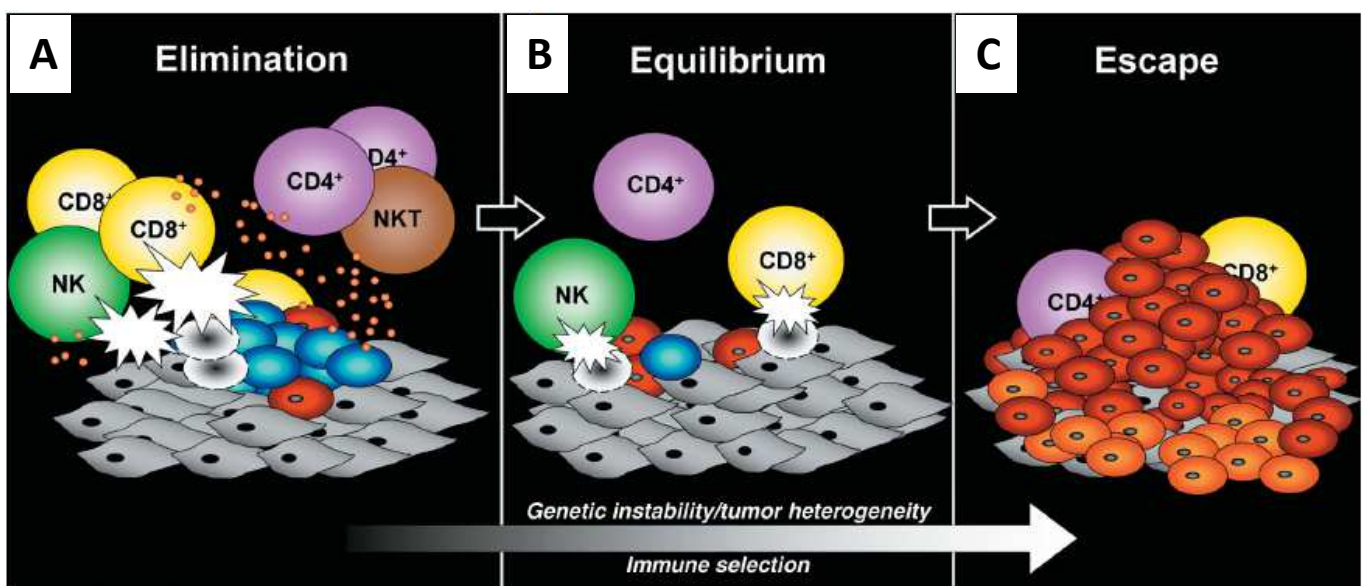
Le concept d'immunosurveillance a été décrit pour la première fois à partir du constat que les individus immunosupprimés ou immunodéficients présentent un risque plus élevé de développer un cancer (Finn, 2018; Fletcher et al., 2018). Par exemple, une incidence plus forte de lymphomes, sarcomes et cancers urogénitaux est observée chez les individus atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Toutefois, ces cancers étant associés à des virus, la rupture de l'immunité anti-virale est ici mise en cause (Boshoff and Weiss, 2002; Gatti and Good, 1971). D'autres études suggèrent que les traitements immunosuppresseurs suite aux transplantations d'organes altèreraient la réponse anti-tumorale spécifique, et ainsi augmenteraient le risque de développer des tumeurs chez les patients transplantés (Birkeland et



al., 1995; Engels et al., 2011; Hanahan and Weinberg, 2011; List et al., 1987; Opelz and Döhler, 2004; Penn, 1996; Sheil, 1986; Shiels et al., 2011). Des observations similaires sont rapportées pour les patients dont l'immunodéficience est liée à une maladie génétique, telle que l'agammaglobulinémie liée à l'X (défaut de maturation des LB et donc de la production d'anticorps) ou des maladies touchant la maturation des LT (Kinlen et al., 1985; Salavoura et al., 2008; Spinner et al., 2014).

Enfin, la mise en évidence chez l'homme d'effecteurs immunitaires contre les tumeurs renforce l'hypothèse de l'immunosurveillance (Finn, 2018; Fletcher et al., 2018). En effet, il a été identifié des anticorps spécifiques d'antigènes tumoraux dans le sérum de patients atteints de cancer, suggérant l'immunogénicité des tumeurs. La diversité très importante de ces anticorps en fonction du type tumoral, mettent en évidence que la réponse anti-tumorale engagée est spécifique à chaque tumeur (Broussard et al., 2013; Reuschenbach et al., 2009; Sahin and Pfreundschuh, 1997). De la même manière, la présence de cellules immunitaires a été démontrée dans l'infiltrat de nombreux types tumoraux et la composition de cet infiltrat évolue en fonction du stade tumoral, suggérant une interaction dynamique entre la tumeur et ces cellules immunitaires (Jang, 2013; Maglietta et al., 2016; Yuan et al., 2008). Il a également été isolé du sang des patients atteints de cancer des LT spécifiquement dirigés contre les tumeurs (Caux et al., 1996; Kao et al., 2001; Mackensen et al., 1993; Zorn and Hercend, 1999). L'expansion clonale de ces LT a été corrélée à des régressions spontanées de mélanomes (Mackensen et al., 1993; Zorn and Hercend, 1999). Certains acteurs immunitaires tels que les LT peuvent aussi être associés à une meilleure survie des patients atteints de cancers épithéliaux, montrant leur importance dans le contrôle du développement tumoral (Clemente et al., 1996; Mihm et al., 1996; Naito et al., 1998; Pagès et al., 2005; Taube et al., 2017).

Enfin l'efficacité des diverses immunothérapies anti-tumorales chez l'homme, confirme l'importance des phénomènes d'immunosurveillance et d'immunoédition (Rusch et al., 2018; Yang, 2015). En effet, la plupart de ces thérapies permettent de rétablir la réponse anti-tumorale en réactivant les effecteurs immunitaires impliqués, *via* par exemple l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant les checkpoints immunologiques PD-1 et CTLA-4 ou par le transfert d'effecteurs immunitaires tels que les LT. Ces données démontrent qu'une réactivation ou une augmentation de la réponse immunitaire anti-tumorale peut permettre de lutter contre ce développement cancéreux et renverser l'étape d'échappement de l'immunoédition pour revenir à une étape d'élimination (Rusch et al., 2018; Yang, 2015).



**Figure 12 : Interaction des cellules tumorales avec les cellules immunitaires : le principe d'immunoédition ou des 3E « Élimination-Équilibre-Échappement ».** Les cellules tumorales et immunitaires interagissent selon trois phases lors de la carcinogénèse. **A.** Lors de la première phase d'élimination, les cellules immunitaires reconnaissent les cellules tumorales et ont la capacité de les éliminer, prévenant ainsi le développement tumoral. **B.** Dans des cas moins favorables, cette phase est suivie par l'étape d'équilibre dans laquelle le système immunitaire parvient à contenir le développement des cellules tumorales mais n'empêche pas l'apparition de clones tumoraux résistants au SI (cellules rouges). La pression de sélection établie par les cellules immunitaire ainsi que l'instabilité génétique des tumeurs favorisent l'émergence de ces clones tumoraux résistants. **C.** Ces clones tumoraux ont la capacité d'échapper aux défenses immunitaires, il s'agit de la phase clinique où le cancer est déclaré. Cette dernière étape est appelée échappement tumoral. *Source : Dunn et al, 2002*



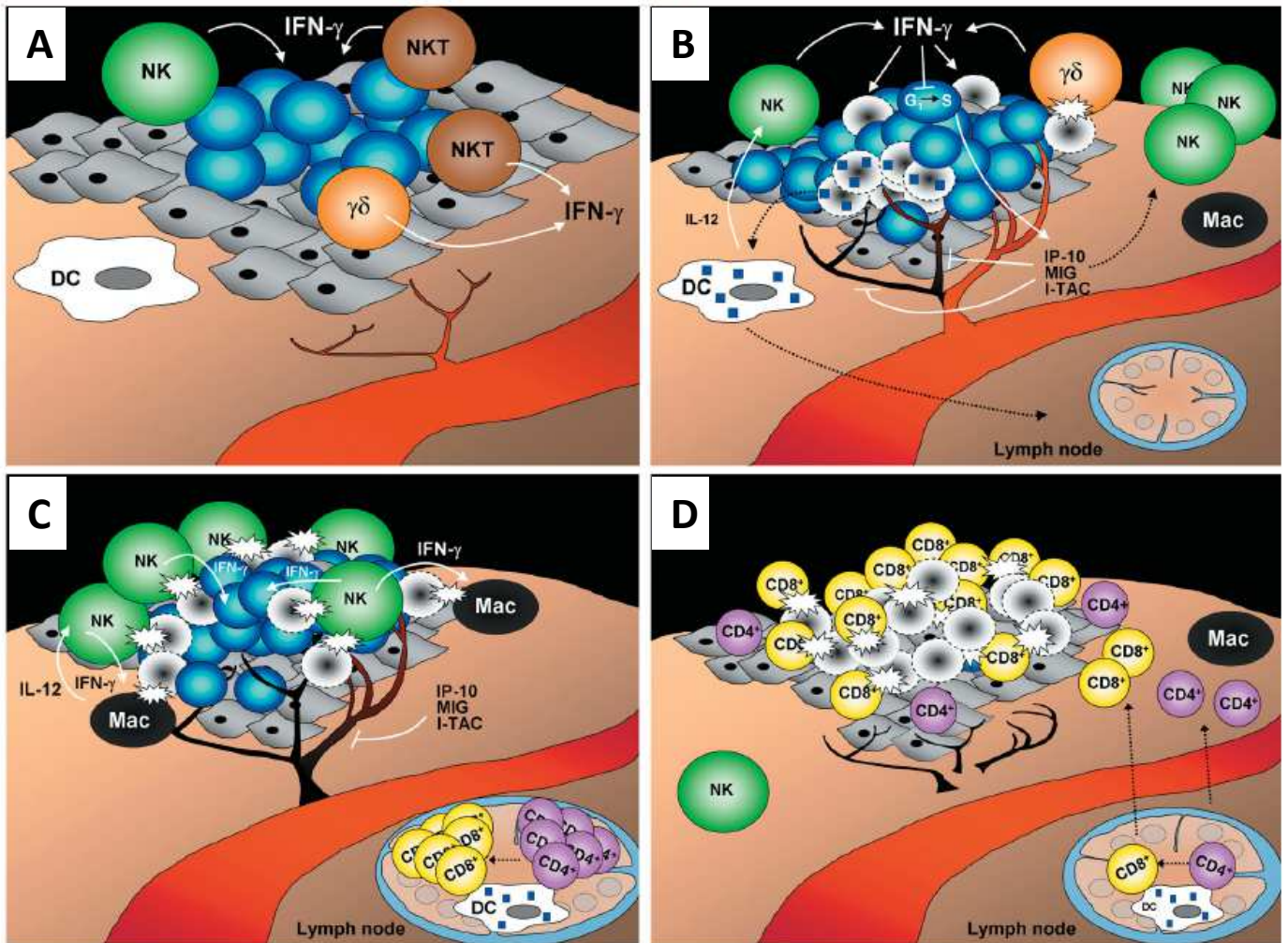
## II.2.2) Les étapes de l'immunoédition (3E)

L'interaction entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires (**Figure 12**) est décrite par la théorie de l'immunoédition dite aussi des 3E (Élimination – Équilibre – Échappement) (Dunn et al., 2002). D'après cette hypothèse, l'interaction s'effectuerait selon trois phases : la phase d'élimination dans laquelle le système immunitaire parvient à détruire les cellules épithéliales aberrantes, la phase d'équilibre où le système immunitaire contient le développement tumoral mais n'empêche pas la génération de nouveaux clones tumoraux parmi lesquels des clones résistants à l'immunité anti-tumorale, et la phase d'échappement dans laquelle ces cellules tumorales résistances échappent au système immunitaire. Cette dernière phase participe à l'apparition de tumeurs. Ce principe d'immunoédition a été confirmé dans de nombreux types de cancer différents.

### II.2.2.a. La phase d'élimination

La phase d'élimination est le stade où l'immunosurveillance est efficace (**Figure 13**). Le système immunitaire reconnaît et détruit les cellules tumorales, empêchant le développement de tumeurs. Cette phase est composée d'une première étape où les cellules épithéliales altérées qui apparaissent, induisent des modifications du micro-environnement (métabolites, cytokines, dommages cellulaires) qui sont reconnues par les cellules du système immunitaire inné (Girardi et al., 2001; Matzinger, 1994; Smyth et al., 2001) (**Figure 13.A**). Une fois sur le site pré-néoplasique, les effecteurs de la réponse innée, NK, NKT, LT  $\gamma\delta$ , éliminent les cellules altérées *via* la production d'IFN- $\gamma$  (Cerwenka et al., 2000; Diefenbach et al., 2001; Yokoyama, 2000). Les cellules altérées peuvent également exprimer des antigènes non retrouvés sur les cellules normales, appelés « antigènes tumoraux spécifiques » ou alors exprimer de façon anormale des antigènes communs aux cellules tumorales et normales (surexpression, modification post-traductionnelle de l'antigène...) nommés alors « antigènes associés aux tumeurs ». La reconnaissance de ces deux types d'antigènes permet la réponse anti-tumorale (Fletcher et al., 2018; Schumacher and Schreiber, 2015).

Lors de la seconde étape, la mort des cellules va favoriser la libération d'antigènes tumoraux qui pourront être captés par les cellules présentatrices d'antigènes du système immunitaire telles que les cellules dendritiques (DC) présentes sur le site (Finn, 2008) (**Figure 13.B**). De plus, des chimiokines sont produites par les cellules altérées, mais également par les



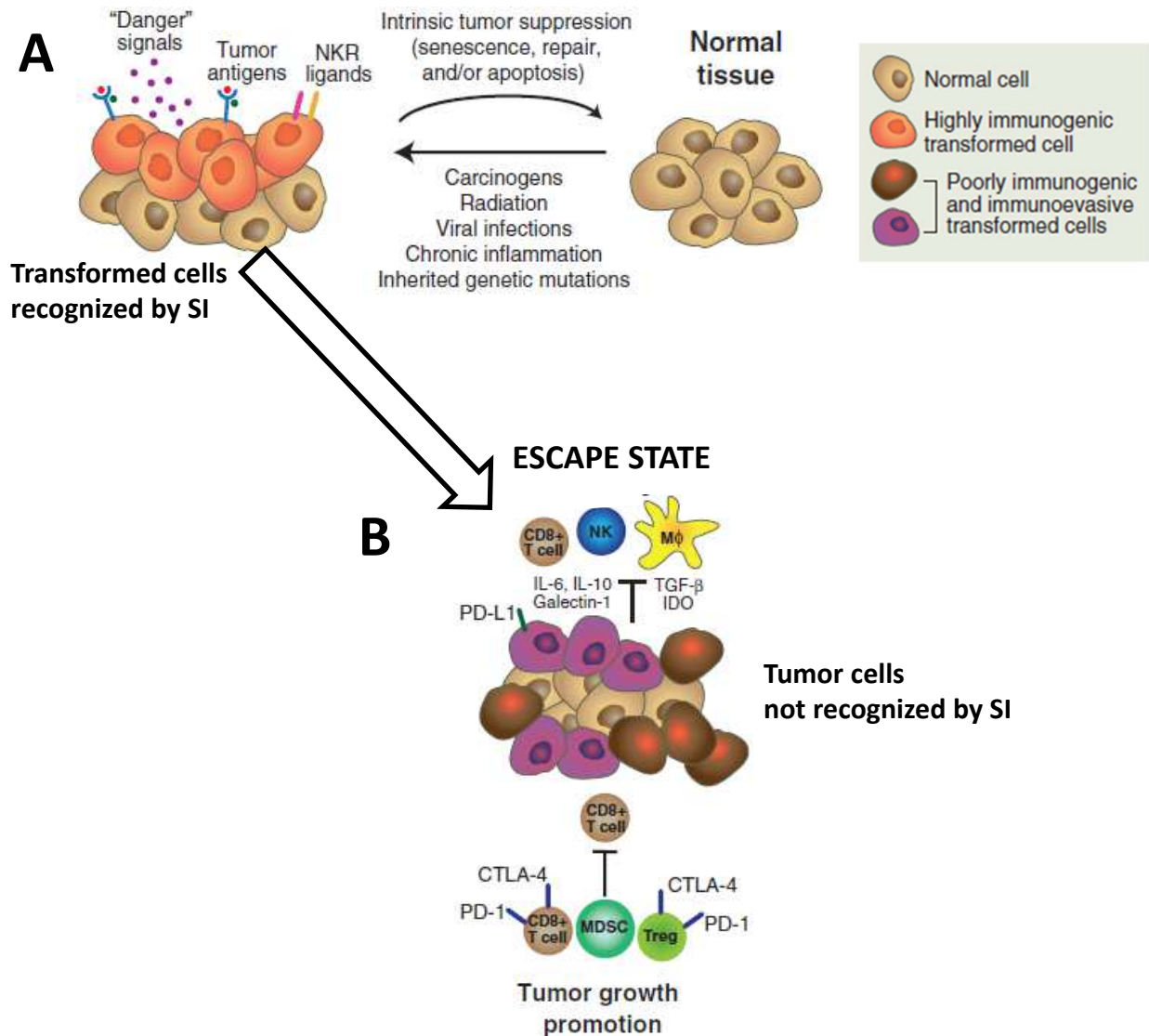
**Figure 13 : La phase d'élimination tumorale par les cellules immunitaires : une immunosurveillance efficace.** La phase d'élimination est la première phase des 3E qui décrit l'interaction entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires. Lors de cette phase l'immunosurveillance est efficace et permet la destruction des cellules tumorales. **A.** Les modifications du micro-environnement par les cellules tumorales (cytokines, dommages cellulaires...) activent le système immunitaire inné (NK, NKT, LT  $\gamma\delta$ ) qui produit notamment de l'IFN- $\gamma$  et détruit les cellules tumorales. **B.** Cette réaction entraîne la libération de facteurs solubles telles que des chimiokines qui favorisent le recrutement de nouvelles cellules immunitaires sur le site inflammatoire (NK et Macrophages (Mac)). Elle conduit également à la libération d'antigènes tumoraux dans le micro-environnement qui sont alors captés par les cellules dendritiques (DC). **C.** Les cellules dendritiques ainsi activées migrent au niveau des ganglions afférents et présentent les antigènes aux LT CD4<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup>, permettant l'activation de cette réponse immunitaire spécialisée. **D.** Ces LT spécifiques gagnent ensuite le site inflammatoire et renforcent la réponse anti-tumorale, détruisant ainsi les cellules tumorales et empêchant le développement d'un cancer. *Source : Dunn et al, 2002*

cellules saines qui les entourent, modifiant les processus d'angiogenèse et amplifiant l'inflammation par le recrutement d'autres cellules immunitaires, en particulier les NK et les macrophages (Cole et al., 1998; Liao et al., 1995; Luster and Ravetch, 1987; Vesely et al., 2011).

La troisième étape d'élimination des cellules altérées est orchestrée par ces deux types de cellules et par la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , d'IL-12, de ROS et de perforines, mais également *via* des signaux d'apoptose induits par des interactions cellules tumorales/cellules immunitaires (**Figure 13.C**) (Bancroft et al., 1991; Cerwenka et al., 2000; Smyth et al., 2000b; Takeda et al., 2002; Vesely et al., 2011). En parallèle, les cellules dendritiques chargées en antigènes migrent dans les ganglions afférents et induisent la différenciation de LT CD4<sup>+</sup> (en particulier Th1 producteur d'IFN- $\gamma$ ) et de LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques dirigés contre les cellules tumorales via la présentation de peptides en contexte CMH II ou I respectivement. Ces LT migrent ensuite et détruisent les cellules tumorales suite à la liaison spécifique de leur TCR avec les CMH des tumeurs (**Figure 13.D**) (Ferlazzo et al., 2002; Gerosa et al., 2002; Pardoll, 2002; Umar, 2014). Cette phase peut aboutir à la destruction du foyer tumoral, dans d'autres cas moins avantageux elle peut aboutir à la phase d'équilibre (**Figure 12.B**).

### ***II.2.2.b. Les phases d'équilibre et d'échappement***

Lors de la phase d'équilibre, la réponse anti-tumorale des LT soutenue par la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-12 parvient à contenir le développement tumoral mais ne parvient pas à détruire totalement le foyer tumoral (**Figure 12.B**). Cette réponse immunitaire persistante peut potentiellement induire une pression de sélection sur les cellules génétiquement très instables, favorisant l'émergence de clones tumoraux résistants aux défenses de l'hôte (Engel et al., 1997; O'Sullivan et al., 2012; Shankaran et al., 2001; Svane et al., 1996). Il s'agit de la phase la plus longue, elle peut durer plusieurs dizaines d'années.



**Figure 14 : Modifications du micro-environnement impliquées dans l'échappement tumoral.** L'échappement tumoral est induit par des modifications du micro-environnement et notamment par des transformations des cellules tumorales et un environnement immunitaire pro-tumoral. En effet, si lors de la phase d'élimination les cellules tumorales étaient reconnaissables et sensibles au système immunitaire (SI), (A) les clones tumoraux persistants lors de la phase d'échappement présentent des caractéristiques membranaires et fonctionnelles qui leur permettent de résister au SI (B). Ces clones résistent au SI notamment en empêchant leur reconnaissance par les défenses de l'hôte, puisqu'ils n'expriment plus d'antigènes tumoraux et/ou de CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) essentiels à cette reconnaissance. De plus, ils peuvent exprimer des protéines membranaires qui inhibent le système immunitaire (ligands de checkpoints immunologiques inhibiteurs) telle que PDL-1 (« *Programmed cell death ligand 1* »), qui se lie au *checkpoint* immunologique inhibiteur PD-1, présent sur les membranes des cellules immunitaires anti-tumorales, notamment des LT. Les clones qui échappent au SI peuvent également produire des cytokines et molécules immunosuppressives telles que TGF-β, IL-10 et IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase) et des chimiokines qui vont respectivement inhiber les cellules de l'immunité anti-tumorale et/ou recruter des cellules immunitaires suppressives renforçant le déclin de la réponse anti-tumorale. *Source : D'après Schreiber et al., 2011*

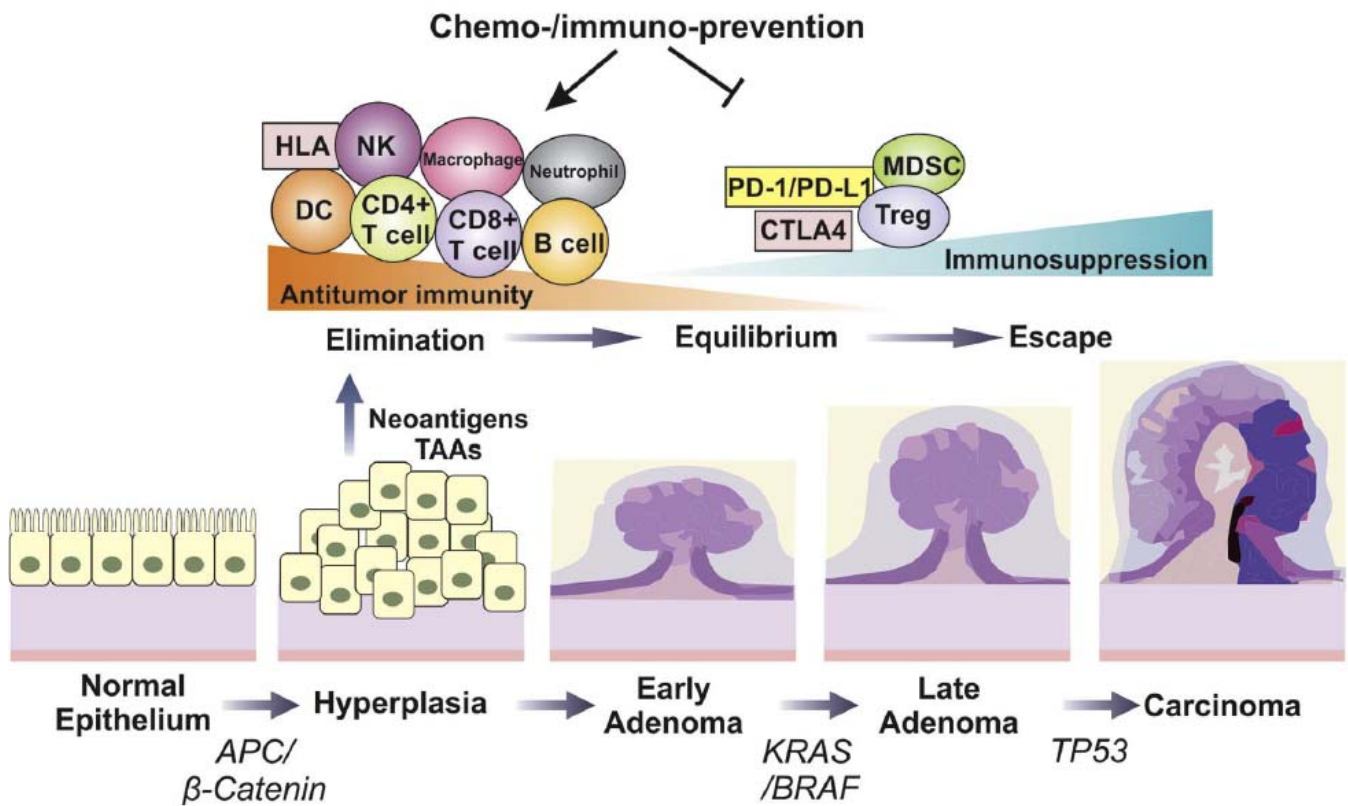
La phase d'échappement correspond à la phase clinique du développement tumoral, où l'apparition d'une tumeur maligne est détectable. Lors de cette étape, les cellules tumorales ayant acquis des mécanismes de résistance au système immunitaire échappent alors à cette défense et sont hors de contrôle. Divers mécanismes sont impliqués dans ce processus (**Figure 14**).

Les cellules tumorales peuvent ne plus être reconnues par certaines cellules du système immunitaire (LT, NKT) en diminuant l'expression ou n'exprimant plus les antigènes tumoraux ou le CMH I (Fletcher et al., 2018; Gutting et al., 2018; Khong and Restifo, 2002; Schreiber et al., 2011).

Elles peuvent également être résistantes à la cytotoxicité des effecteurs immunitaires, par l'induction de processus intracellulaires anti-apoptotiques, tels qu'une sur-activation de la voie de signalisation STAT3 ou la surexpression du gène Bcl-2 (« *B-cell lymphoma 2* ») (Gutting et al., 2018; Khong and Restifo, 2002; Schreiber et al., 2011).

Enfin, elles peuvent établir un micro-environnement immunosuppresseur qui va inhiber la réponse anti-tumorale *via* la sécrétion de cytokines ou molécules immunosuppressives (VEGF, TGF- $\beta$ , IL-10, IDO), *via* le recrutement de cellules immunitaires suppressives (MDSCs : cellules myéloïdes suppressives, et LTregs : LT régulateurs) et/ou *via* l'expression de ligands spécifiques à des récepteurs membranaires inhibiteurs des effecteurs de la réponse anti-tumorale (Fletcher et al., 2018; Gutting et al., 2018; Pardoll, 2012; Radoja et al., 2000; Schreiber et al., 2011; Vesely et al., 2011; Zhai et al., 2018). Plus précisément ces récepteurs des cellules immunitaires sont appelés *checkpoints* immunologiques inhibiteurs, ou plus couramment « *checkpoints* immunologiques ». Les récepteurs les plus décrits sont PD-1 et CTLA-4, retrouvés majoritairement à la surface des LT anti-tumoraux. Leurs ligands respectifs (PDL-1 et CD80 ou CD86) sont surexprimés sur les cellules tumorales et/ou les cellules présentatrices d'antigènes (DCs) et également par d'autres effecteurs immunitaires. Le type d'effecteurs impliqués ainsi que les mécanismes mis en jeu sont dépendants du *checkpoint* immunologique considéré, du type de cancer, ainsi que de son micro-environnement. Mais la liaison de ces récepteurs à leurs ligands aboutit toujours à une inhibition de la réponse anti-tumorale, dont les LT sont les principaux effecteurs (Marin-Acevedo et al., 2018; Pardoll, 2012; Sharpe and Pauken, 2018; Shi et al., 2018).





**Figure 15 : Principes d’immunosurveillance et d’immunoédition appliqués au CCR le long de la « séquence adénome-cancer ».** L’accumulation de mutations génétiques aboutit au développement d’un carcinome colique, décrit par la « séquence adénome-cancer ». L’émergence de cellules tumorales lors des stades précoces du CCR (hyperplasies-adénomes précoces) est accompagnée par la génération de néo-antigènes aussi appelés antigènes associés aux tumeurs (TAAs), qui vont permettre l’activation de la réponse anti-tumorale. Lors de la phase d’équilibre, la réponse immunitaire ne parvient pas à empêcher l’émergence de nouveaux clones tumoraux coliques. L’instabilité génétique et la pression sélective exercée par la réponse immunitaire sur le site tumoral favorisent l’apparition de clones tumoraux coliques résistants aux cellules immunitaires. Ces clones échappent alors aux défenses de l’hôte, le développement d’un adénome tardif puis d’un carcinome colique est alors observé. Un micro-environnement immunosuppresseur de la réponse anti-tumorale caractérise cette phase avec l’apparition de cellules suppressives (MDSCs) et l’expression de *checkpoints* immunologiques et de leurs ligands (PDL-1, PD-1, CTLA-4). Ce micro-environnement est dépendant du stade et du phénotype du CCR. *Source : Fletcher et al., 2018*

### II.2.3) Immunosurveillance anti-tumorale et immunoédition dans le cancer colorectal

Les théories de l'immunosurveillance et de l'immunoédition sont valables pour le cancer colorectal et se déroulent comme décrit précédemment (**Figure 15**).

L'immunosurveillance dans le cancer colorectal a été mise en évidence sur le modèle murin APC<sup>Min/+</sup>RAG2<sup>-/-</sup> qui montre un nombre de tumeurs augmenté dans le petit intestin comparativement au modèle sauvage APC<sup>Min/+</sup> immunocompétent (Nagamine et al., 2008). De la même façon des altérations de la composition du système immunitaire et du profil cytokinique dans les tumeurs du modèle APC<sup>Min/+</sup> par rapport à la muqueuse ont été mises en évidence, avec notamment l'augmentation de la population de LT régulateurs (LT CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) dans les adénomes, suggérant la mise en place d'un micro-environnement tumoral suppresseur caractéristique de l'échappement tumoral (Akeus et al., 2014). Récemment il a été montré dans ce même modèle murin que l'inhibition des processus d'autophagie induit une régression tumorale nécessitant la réponse anti-tumorale LT CD8<sup>+</sup> (Lévy et al., 2015). Ces études suggèrent donc l'existence d'une immunosurveillance dans les modèles murins de CCR.

Chez l'homme, les connaissances restent limitées, néanmoins il a été montré des associations en faveur des principes d'immunosurveillance et immunoédition (Fletcher et al., 2018). Tout d'abord, l'accumulation des altérations génétiques tout au long de la séquence adénome-cancer est source d'antigènes tumoraux potentiellement impliqués dans l'immunosurveillance. Cela est renforcé par la surexpression des antigènes associés aux tumeurs MUC-1 et CEA au niveau des polypes adénomateux (Finn, 2008; Fletcher et al., 2018). De même il a été identifié un panel de 160 gènes et de 23 protéines surexprimés dans les adénomes de patients atteints de CCR comparativement à la muqueuse saine (Broussard et al., 2013). De la même manière il a été retrouvé une élévation importante des anticorps dirigés contre MUC-1 et CEA dans le sérum des patients atteints de CCR à des stades précoces par rapport à des individus sains, témoignant de l'immunogénicité de ces protéines dans un contexte de cancer colique (Broussard et al., 2013). D'autres études montrent des surexpressions protéiques ou l'expression de protéines altérées dans le CCR lors des stades précoces, pouvant potentiellement activer l'immunosurveillance, telles que CEA, KRAS, APC et TP53 (Quesada-Calvo et al., 2017; Wiśniewski et al., 2015).

Bien que des études supplémentaires soient nécessaires pour connaître l'influence de ces protéines sur l'activation du système immunitaire, il a notamment été montré que la cycline D





surexprimée sur les cellules tumorales chez les patients CCR (Mermelshtein et al., 2005; Ogino et al., 2009b) peut induire la stimulation des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> *in vitro* (Dao et al., 2009).

Concernant l'étape d'échappement tumoral dans le CCR, de nombreuses observations sur les patients atteints de ce cancer suggèrent une perte de l'immunogénicité des cellules tumorales et l'instauration d'une immunosuppression dans les tumeurs. Il a été montré une perte ou une sous-expression de la protéine CMH I par les cellules tumorales des patients atteints de CCR, suggérant une perte de reconnaissance de ces cellules par le système immunitaire (Campoli and Ferrone, 2008). La présence de cellules suppressives telles que les cellules myéloïdes suppressives pouvant produire des ROS, ou les LT régulateurs, a également été montrée dans ces tumeurs, suggérant la mise en place d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur (Nagaraj and Gabrilovich, 2007; Zhao et al., 2014). La surexpression du *checkpoint* immunologique inhibiteur PD-1 par les LT infiltrant les tumeurs CCR pourrait être impliquée dans la phase d'échappement de ce cancer. Bien que son ligand PDL-1 soit peu exprimé dans les adénomes, une forte expression de PDL-1 a été observée dans le front invasif des tumeurs de phénotype MSI, en particulier sur les cellules myéloïdes (Llosa et al., 2015; Mostafa et al., 2016; Zhu et al., 2015).

L'expression du ligand NKG2D, impliqué dans la reconnaissance et l'activation des LT et NK anti-tumoraux, ou d'autres protéines impliquées dans la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules immunitaires, est également diminuée sur les tumeurs CCR (Ferrone and Dranoff, 2010; Kloor et al., 2005; McGilvray et al., 2009).

Enfin, l'implication de la réponse anti-tumorale dans le CCR est démontrée par l'efficacité d'une immunothérapie anti-PD-1 dans le traitement des cancers de phénotypes MSI (Le et al., 2015, 2017). En effet ce *checkpoint* immunologique étant un frein de la réponse immunitaire et notamment de la réponse des LT (Pardoll, 2012; Sharpe and Pauken, 2018), le fait que cette réponse puisse être réactivée après blocage par un anticorps et induire la régression de ce phénotype de CCR particulier, montre l'importance de cette réponse immunitaire.

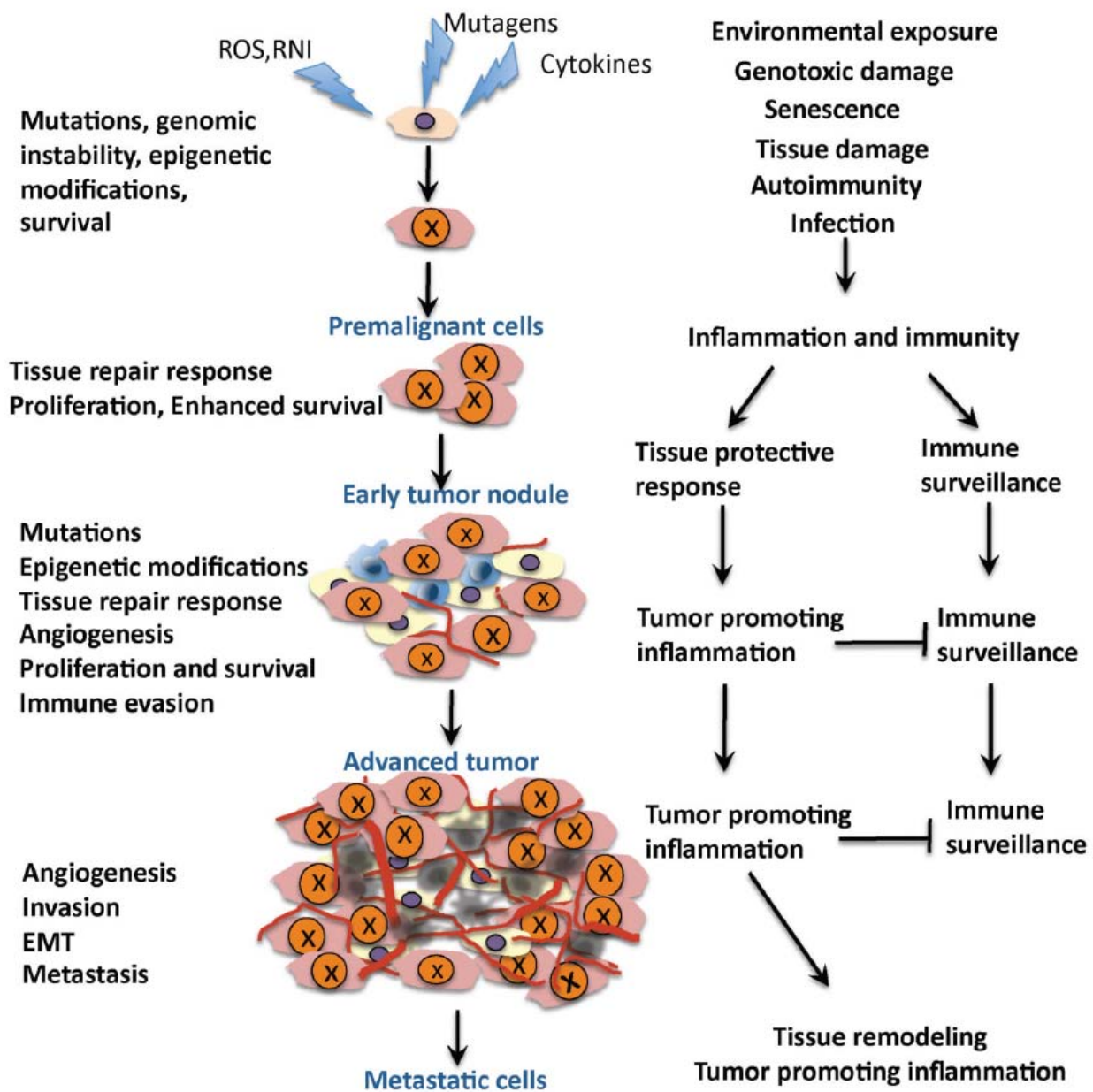


## II. 3 – Importance de l'inflammation dans la carcinogenèse du côlon

### II.3.1) Mise en évidence

Le premier lien entre l'inflammation et le développement tumoral a été établi en 1863, par le professeur Virchow. Il émit l'hypothèse que l'inflammation chronique pouvait être responsable de la formation de cancers, après avoir observé des cellules immunitaires dans les lésions néoplasiques (Balkwill and Mantovani, 2001; Leonardi et al., 2018). La susceptibilité des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) à développer un CCR étaye cette association (Eaden et al., 2001; Farraye et al., 2010; Jess et al., 2012; Lopez et al., 2018; Shawki et al., 2018; Ullman and Itzkowitz, 2011). Un argument fort en faveur de l'implication de l'inflammation chronique dans le développement du CCR est la diminution de 40 à 50 % du risque de développer un CCR observée chez les patients qui utilisent à long terme (10-15 ans) des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et plus particulièrement l'aspirine (Flossmann and Rothwell, 2007a, 2007b; Grancher et al., 2018; Nan et al., 2015; Qiao et al., 2018). L'utilisation de ce type de traitement est également associée à une augmentation de la survie chez les patients atteints de CCR (Huang et al., 2017; Walker et al., 2012). Ce postulat a été depuis confirmé chez la souris. En effet, l'utilisation d'agents chimiques induisant des colites tels que le dextran sulfate sodium (DSS) et l'azoxyméthane (AOM) entraîne une augmentation du nombre et de la taille des tumeurs dans les modèles murins (Cooper et al., 2001; Neufert et al., 2007; Robertis et al., 2011; Seril et al., 2002; Talero et al., 2011; Thaker et al., 2012; Zitvogel et al., 2016). L'utilisation de différents modèles murins de CCR survenant chez des souris génétiquement modifiées chez qui l'inflammation est moins forte suite à l'inactivation de voies et/ou à la perte de protéines impliquées dans les réactions inflammatoires, a également montré que ces modèles ont un développement tumoral ralenti, ce qui renforce l'importance des processus inflammatoires dans la carcinogenèse colique (Long et al., 2017a).

Selon le type de CCR considéré, l'origine de l'inflammation chronique observée chez les patients peut être différente. En effet, en plus de l'implication de l'alimentation, d'autres facteurs environnementaux peuvent jouer un rôle (exposition aux détergents, émulsifiants, aluminium... par voie alimentaire surtout), tout comme la colonisation anormale de la muqueuse intestinale par des agents infectieux colitogéniques et/ou l'apparition d'altérations génétiques (Arthur and Jobin, 2013; Boleij and Tjalsma, 2012; Mandal, 2018; Park et al., 2018).



**Figure 16 : Implication de l'inflammation chronique dans la carcinogenèse.** L'inflammation chronique caractérisée par une sur-activation persistante et pathologique du système immunitaire, s'oppose à la réponse immunitaire protectrice. Elle peut également être médiée par les cellules épithéliales. Elle contribue à la promotion du développement tumoral *via* l'induction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et *via* des dommages cellulaires et moléculaires (« X ») qui vont conduire *in fine* à une prolifération cellulaire anarchique. Cette inflammation anormale favorise également la migration cellulaire et l'angiogenèse par l'activation de voies de signalisation oncogènes. Enfin cette inflammation associée au développement tumoral participe à l'inhibition de l'immunosurveillance et de la réponse anti-tumorale. *Source : Grivennikov et al., 2018*

### II.3.2) Rôle de l'inflammation chronique dans la carcinogenèse colique

Les principales cellules impliquées dans l'inflammation chronique sont les cellules épithéliales et immunitaires. Concernant les populations du système immunitaire il s'agit en particulier des macrophages, des neutrophiles, des cellules dendritiques, des éosinophiles, des mastocytes et des lymphocytes. Elles infiltrent aussi bien la muqueuse que les tumeurs, et sont présentes dès le stade adénome du CCR (Jayakumar and Bothwell, 2017; Kong et al., 2014; Kumar et al., 2018a; Leonardi et al., 2018; Mariani et al., 2014; Yuan et al., 2008).

Les cellules impliquées dans l'inflammation chronique promotrice du développement du CCR, produisent des espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $HO^\bullet$ ), l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) et le monoxyde d'azote ( $NO^\bullet$ ). Elles produisent aussi des facteurs de croissance comme l'EGF (Epidermal Growth factor), le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), et le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) ainsi que des médiateurs de l'inflammation tels que l'IL-6, l'IL-8, le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et la PGE<sub>2</sub>. Leur production est liée à l'activation de voies de signalisation importantes dans l'inflammation : NF- $\kappa$ B, STAT3, AKT, et COX-2/PGE<sub>2</sub> (Grivennikov, 2013; Lin et al., 2018a; Long et al., 2017a; Terzić et al., 2010; Ullman and Itzkowitz, 2011). L'activation de ces voies et la sécrétion de ces médiateurs favorisent la carcinogenèse colique en induisant des mutations oncogènes, une instabilité génomique, des modifications épigénétiques au niveau des cellules épithéliales, ainsi qu'en stimulant leur prolifération cellulaire. Ces voies de signalisation et médiateurs participent également à l'angiogenèse (**Figure 16**).

Ces processus inflammatoires inhibent également l'immunosurveillance et la réponse anti-tumorale, par l'induction d'une immunosuppression locale de ces réponses (**Figure 16**) (Grivennikov, 2013; Grivennikov et al., 2010; Lin et al., 2018a; Long et al., 2017a).

### II.3.3) Les médiateurs de l'inflammation chronique dans le CCR

#### ***II.3.3.a. La cyclo-oxygénase-2 (COX-2) et les prostaglandines 2 (PGE2)***

L'enzyme COX-2 fait partie de la famille des cyclo-oxygénases (COXs) intervenant dans la synthèse des prostaglandines. En conditions physiologiques, elle n'est exprimée que dans le système nerveux central, les reins et les vésicules séminales (Adegboyega and Ololade, 2004; Kirschenbaum et al., 2000; Svensson and Yaksh, 2002), alors qu'elle est surexprimée



dans de nombreux cancers et notamment le CCR (Allaj et al., 2013; Liu et al., 2017b; Roelofs et al., 2014; Szyberg et al., 2016). En effet, chez l'homme son expression est observée dans 50 % des adénomes et 85 % des adénocarcinomes colorectaux (Eberhart et al., 1994; Luo and Zhang, 2017; Roelofs et al., 2014; Szyberg et al., 2016). Elle augmente avec l'agressivité des tumeurs et est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de CCR (Cianchi et al., 2010; Elzagheid et al., 2013; Ogino et al., 2008; Szyberg et al., 2016). Au sein des tumeurs coliques, COX-2 est préférentiellement localisée au niveau du front invasif (bord de la tumeur), et exprimée par les cellules épithéliales, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les macrophages et les lymphocytes T régulateurs (Gupta and Dubois, 2001; Tuncer and Banerjee, 2015; Yaqub et al., 2008). Son expression est inductible par des cytokines pro-inflammatoires (IL-1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6), par le LPS bactérien, par des facteurs de croissance (EGF, PDGF, FGF : Fibroblast Growth Factor) et par des hormones (Ramsay et al., 2003; Tanabe and Tohnai, 2002).

L'utilisation d'inhibiteurs de cyclo-oxygénases (COXIBs) pendant une longue durée (10 à 15 ans) permet de réduire de moitié le risque de développer un CCR chez les patients ayant déjà développé des adénomes. De plus, elle permet de diminuer le nombre de polypes développés par les patients atteints de PAF, renforçant l'importance de cette enzyme dans le CCR (Chan et al., 2007; Flossmann and Rothwell, 2007a; Rostom et al., 2007; Sandler et al., 2003; Steinbach et al., 2000). De la même manière l'utilisation prolongée (plus de 5 ans) ou quotidienne d'acide salicylique (aspirine), qui inhibe notamment COX-2, est associée à un risque plus faible de développer un CCR (Chan et al., 2012; Rothwell et al., 2010a, 2010b; Sostres et al., 2014). Une étude prospective récente a également montré que la prise d'aspirine ou d'inhibiteurs de COX-2 par des patients atteints de CCR, pendant ou après leur chimiothérapie, diminue le risque de rechute et prolonge la survie (Ng et al., 2015).

Le rôle de COX-2 dans la tumorigénèse colique est attribué à son produit de synthèse majoritaire, la PGE<sub>2</sub>, dont la synthèse est augmentée dans les adénomes et carcinomes des patients atteints de CCR comparativement à leur muqueuse saine (Pugh and Thomas, 1994; Rigas et al., 1993; Yang et al., 1998). L'implication de la PGE<sub>2</sub> est appuyée par de nombreuses études dans des modèles murins de CCR (APC<sup>Min/+</sup>, AOM) qui montrent que l'administration de cette prostaglandine accélère le développement tumoral chez ces souris par rapport à des souris non traitées (Kawamori, 2003; Wang et al., 2004, 2005).

Les travaux sur ces modèles murins ainsi que sur des lignées cellulaires ont permis de mettre en évidence les mécanismes mis en jeu, à la fois dans les cellules épithéliales et les cellules immunitaires (Luo and Zhang, 2017; Tuncer and Banerjee, 2015). La PGE<sub>2</sub> est capable





notamment de moduler la prolifération cellulaire des cellules épithéliales intestinales par l'activation de la voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine (Castellone et al., 2005; Wu et al., 2010a) et d'induire une résistance cellulaire à l'apoptose par une surexpression de la protéine anti-apoptotique B-cell lymphoma 2 (BCL-2) (Hawcroft et al., 2007; Sheng et al., 1998). Elle est également capable de stimuler l'angiogenèse et la migration cellulaire *via* la surexpression des facteurs angiogéniques VEGF et FGF et de la chimiokine CXCL-1 par les cellules épithéliales (Amano et al., 2003; Seno et al., 2002; Tsujii et al., 1998; Wang et al., 2006). La PGE<sub>2</sub> influence également le micro-environnement immunitaire colique, en induisant le recrutement de neutrophiles et de macrophages pro-tumoraux M2 dans l'infiltrat tumoral, ce qui génère une inflammation à bas bruit du fait de la production de ROS (Janakiram et al., 2011; Nakanishi et al., 2011; Wang et al., 2014). Un recrutement de neutrophiles et LT pro-tumoraux Th17 par la PGE<sub>2</sub> a été observé aussi dans les tissus coliques en contexte d'inflammation chronique (Sheibanie et al., 2007).

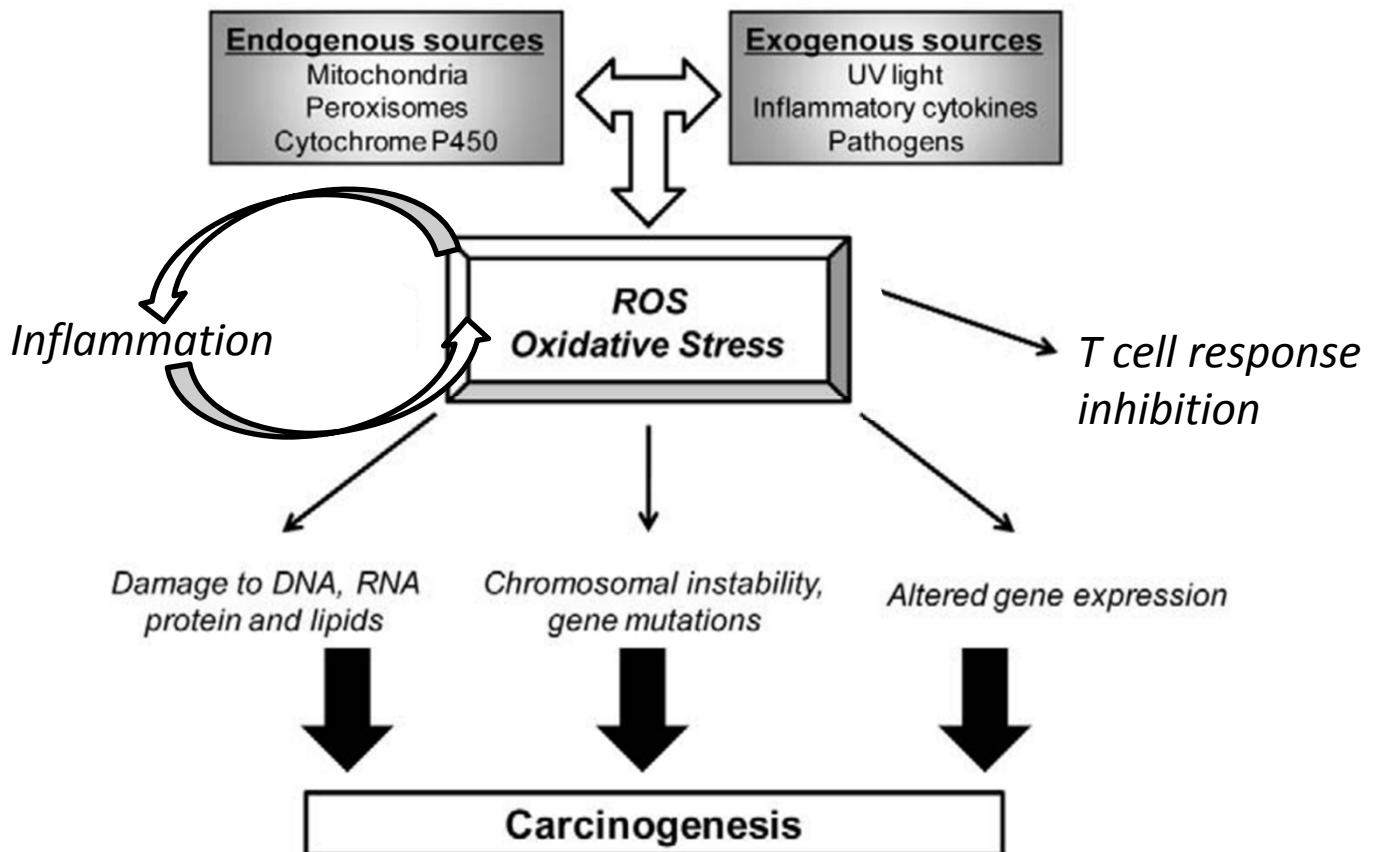
En parallèle, la PGE<sub>2</sub> a une action immunosuppressive sur la réponse lymphocytaire T anti-tumorale. En effet, il a été montré qu'une surexpression de la PGE<sub>2</sub> par les LT régulateurs présents dans les ganglions mésentériques et les tumeurs diminue le nombre de LT effecteurs anti-tumoraux activés (producteurs de TNF- $\alpha$  ou d'IFN- $\gamma$ ) (Yaqub et al., 2008). Cet effet négatif sur la réponse anti-tumorale peut également être provoqué par les cellules tumorales coliques productrices de COX-2, qui expriment les ligands FasL et TRAIL qui leur permettent d'induire l'apoptose des LT (Wang et al., 2009).

### ***II.3.3.b. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS)***

#### *Description générale*

Les espèces réactive de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) impliquées dans l'inflammation colique peuvent être synthétisées à la fois par les cellules du système immunitaires et par les cellules épithéliales coliques (Janakiram and Rao, 2014; Lin et al., 2018a; Liu et al., 2017a).

Il existe quatre principaux types de ROS : le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le radical hydroxyle HO $\cdot$ , l'anion superoxyde O<sub>2</sub> $\cdot^-$  et l'oxygène singulet <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Liu et al., 2017a). Leur production est dépendante de différents systèmes enzymatiques et non-enzymatiques comme par exemple la chaîne respiratoire mitochondriale, les cyclo-oxygénases parmi lesquelles COX-2, et la myéloperoxydase MPO (Kim et al., 2008; Liu et al., 2017a, 2017b). Les RNS quant à



**Figure 17 : Effets des espèces réactives de l'oxygène (ROS) liés à la carcinogénèse.** Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent participer à la carcinogénèse par différents effets moléculaires, cellulaires et sur le micro-environnement. Les principales sources endogènes de ROS sont représentées par le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, le peroxyosome et le cytochrome p450. Ces espèces induisent des dommages sur l'ensemble des composants cellulaires (acides nucléiques, protéines, lipides) qui entraînent des mutations et une instabilité génétique qui participent au développement tumoral. De plus, les ROS participent à l'amplification de l'inflammation chronique pro-tumorale et à l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale. *Source : Klaunig et al., 2010*

elles sont produites lors du métabolisme de l'azote par l'intervention des oxydes nitriques synthases (NO-synthases : « *nitric oxide synthase* ») (mitochondriale, endothéliale, inductible-iNOS). Les principales RNS sont l'oxyde nitrique (NO<sup>•</sup>), l'anhydride nitreux (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) et l'ion peroxydant (ONOO<sup>-</sup>) (Klaunig et al., 2010).

La production de ROS et de RNS dans des conditions physiologiques permet le maintien de l'homéostasie des tissus en assistant les processus cellulaires tels que la prolifération, la migration, la différenciation, ainsi que la lutte contre les pathogènes (Janakiram and Rao, 2014; Liu et al., 2017a). Cependant un déséquilibre dû à la production excessive de ROS par les cellules de l'hôte et/ou à la diminution des défenses anti-oxydantes de l'hôte génère un stress oxydant associé à diverses pathologies et notamment au CCR (Liu et al., 2017a).

Il a notamment été montré une augmentation de la quantité de MPO dans le sérum de patients atteints de CCR (Crespo-Sanjuán et al., 2015), ainsi qu'un recrutement accru de cellules productrices de MPO (neutrophiles et macrophages) dans la muqueuse de ces patients comparativement à des individus sains. De plus, des taux élevés de MPO sérique sont corrélés à des stades avancés du CCR (Mariani et al., 2017; Roncucci et al., 2008). Le rôle du stress oxydant est confirmé par le fait que certains facteurs de risque du CCR, comme la consommation de tabac et/ou d'alcool, favoriseraient la production de ROS (Bartsch and Nair, 2006; Mariani et al., 2017; Roncucci et al., 2008; Ziech et al., 2011).

Concernant les RNS, il a été montré une expression d'iNOS associée à une altération de la survie chez les patients atteints de CCR (Zafirellis et al., 2010). L'augmentation de ces espèces favorise la carcinogénèse par l'amplification de l'inflammation et par les dommages cellulaires et nucléaires qu'elles causent. Un effet sur la réponse LT anti-tumorale est également suggéré (**Figure 17**) (Chen et al., 2016; Lin et al., 2018a; Liu et al., 2017a).

### *Effets sur l'inflammation*

La génération de ROS entraîne une boucle d'amplification inflammatoire puisque la réaction inflammatoire elle-même augmente la formation de ROS par la chaîne respiratoire (Yang et al., 2013) et qu'en parallèle ces espèces activent la transcription de gènes pro-inflammatoires des cellules voisines (Lin et al., 2018a). Plus précisément, cette activation stimule la sécrétion de cytokines (IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18) et de chimiokines (MCP-1, CXCL-12) associées au développement du CCR (Grassl et al., 1999; Lappas, 2013; Wongchana and Palaga, 2012). Ces cytokines activent ensuite des voies pro-inflammatoires comme NF- $\kappa$ B et oncogènes telles que MAPK au sein des cellules épithéliales. Des réactions en cascade



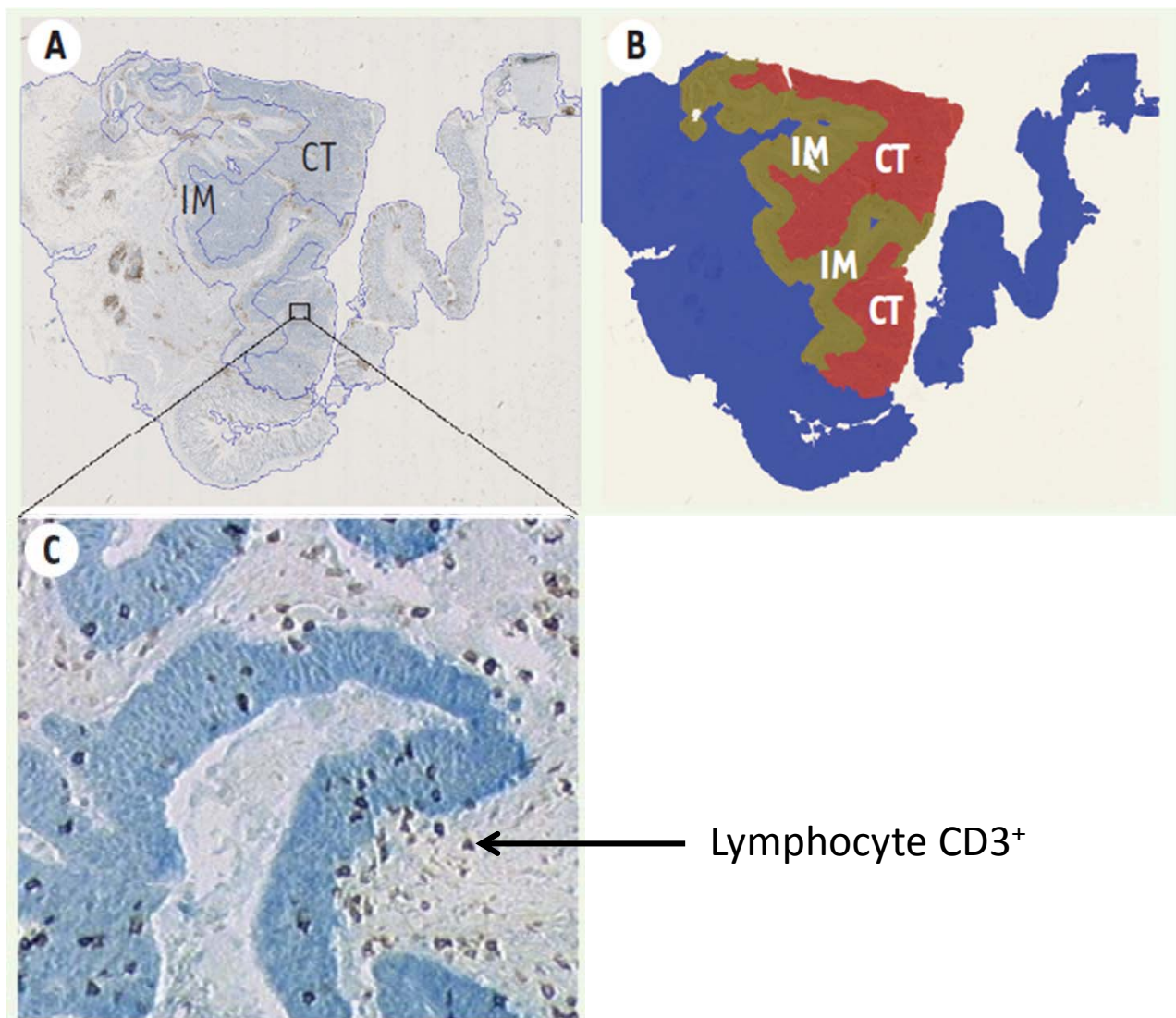
impliquent ensuite d'autres cytokines telles que l'IFN- $\gamma$  et l'IL-17, amplifiant les processus oncogènes venant d'être cités (Lin et al., 2018b). *In fine* il en résulte une modulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la migration cellulaire en faveur d'un développement tumoral colique.

### *Dommages nucléaires et cellulaires*

Les ROS et RNS participent à la carcinogenèse colorectale également par leur forte réactivité avec l'ADN, les lipides et les protéines, qui induit des dommages sur ces molécules, entraînant des mutations génétiques et des modifications cellulaires (Forsberg et al., 2001; Kirkali et al., 2011; Klaunig et al., 2010; Liu et al., 2017a; Ziech et al., 2011).

Concernant les dommages à l'ADN, ils résultent de l'interaction des ROS avec les bases puriques et pyrimidiques, le désoxyribose ou les liaisons phosphodiester. Ils sont essentiellement causés par le radical hydroxyle HO $\cdot$  et les produits de la peroxydation lipidique (Chatgililoglu and O'Neill, 2001). Ceci entraîne des cassures double brins de l'ADN et des mutations avec perte/gain de fonction favorisant la carcinogenèse colique. La peroxydation lipidique et notamment celle des acides gras polyinsaturés, très sensibles à l'hydroxyle et à l'oxygène singulet, induit la production de composés hydroxyles instables. De nouveaux radicaux libres capables d'induire des dommages sur d'autres composants cellulaires sont alors formés, mais aussi des composés potentiellement carcinogènes comme les adéhydes réactifs responsables de dommages à l'ADN (Cadet et al., 2010). Ces processus sont aussi impliqués dans la perte de fonctionnalité des membranes lipidiques et inhibent l'apoptose cellulaire, favorisant la carcinogenèse colique (Cai et al., 2012; Stark, 2005).

Des dommages peuvent également être observés sur les protéines. Ils sont causés par l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène. Ils peuvent toucher les acides aminés, ce qui génère des protéines carbonylés parfois inactives (Hensley and Floyd, 2002). De la même manière, la génération de ponts disulfure ou le clivage d'acides aminés induisent des modifications structurales et des pertes de fonctions des protéines oxydées, qui se répercutent ensuite sur les fonctions cellulaires (Hoshi and Heinemann, 2001; Liu et al., 2017a; Schieber and Chandel, 2014; Stark, 2005).



**Figure 18: Analyse de l'infiltrat immunitaire lymphocytaire T : importance de l'Immunoscore dans le CCR.** La quantification des LT CD3+ et CD45RO+ mémoires ou des LT CD3+ et LT CD8+ ou des LT CD8+ et CD45RO+ dans les tumeurs coliques a une valeur pronostique pour les patients CCR. Elle s'effectue sur des coupes histologiques de tumeurs de patients traitées par marquages immunohistochimiques des protéines de surface spécifiques de ces cellules (**A ; C : grossissement**). Les LT sont ensuite quantifiés par analyse d'image numérique (**B**) en distinguant le centre de la tumeur (CT) de la marge tumorale (IM). Ces quantifications permettent de déterminer un Immunoscore de 0 à 4, plus ce score est fort plus l'infiltrat en LT est riche et meilleur est le pronostic du patient. *Source : D'après Galon et al., 2014*

Les ROS peuvent également avoir un impact sur la réponse des LT cytotoxiques. Elles peuvent lorsqu'elles sont produites en faible quantité, participer à la prolifération de ces cellules et à l'activation de la réponse lymphocytaire T (Chen et al., 2016). Cependant, il a été montré *in vitro* et dans des modèles murins d'inflammation que la production excessive de ROS dans le milieu extracellulaire par les cellules tumorales et/ou immunitaires (macrophages, neutrophiles, cellules myéloïdes suppressives (MDSCs)...) induit une immunosuppression de la réponse immunitaire des LT (Holmdahl et al., 2016; Kraaij et al., 2010, 2013; Liu et al., 2015; Qu et al., 2012; Sheng et al., 2010; Srivastava et al., 2010; Wei et al., 2015). En particulier, la production de ROS par les MDSCs inhibe la reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T et est associée à une diminution des cystéines et cystines extracellulaires, qui entraîne une inactivation de ce type cellulaire (Liu et al., 2015; Srivastava et al., 2010). Un traitement des MDSCs par la N-acétylcystéine qui stimule la production du glutathion, un antioxydant, élimine cet effet immunosuppresseur (Wei et al., 2015). Ceci suggère donc que les ROS pourraient également participer à une diminution de l'immunosurveillance et/ou de la réponse anti-tumorale.

#### II.4) Valeur pronostique des cellules immunitaires dans le CCR

Indépendamment de leur rôle dans la carcinogénèse colique, les cellules immunitaires pourraient être utilisées comme des facteurs pronostiques chez les patients atteints de CCR. Concernant plus particulièrement les LT, il est montré qu'une forte densité des LT CD3<sup>+</sup>, LT CD8<sup>+</sup> et LT CD45RO<sup>+</sup> dans l'infiltrat tumoral (TILs), est un facteur de bon pronostic (Galon et al., 2006, 2014; Mlecnik et al., 2016; Pagès et al., 2005, 2009, 2018; Tosolini et al., 2011). La répartition de ces cellules se fait dans toute l'aire tumorale avec une concentration plus forte au niveau du front d'invasion (IM) par rapport au centre de la tumeur (CT) (**Figure 18**), et peut évoluer au cours de la carcinogénèse colique (Bindea et al., 2013).

Le marqueur pronostique Immunoscore a ainsi été développé, permettant d'utiliser couramment en clinique la qualité et la densité de l'infiltrat immunitaire dans ces deux régions (Galon et al., 2006, 2014; Pagès et al., 2009). Il se base sur la détection par immunohistochimie de deux populations de LT, les CD3<sup>+</sup> et CD45RO<sup>+</sup> ou les CD3<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ou les CD8<sup>+</sup> et CD45RO<sup>+</sup> sur les coupes de tumeurs de patients atteints de CCR, suivie d'une quantification cellulaire (densité ; cellules/mm<sup>2</sup>) par analyse numérique d'image, à la fois dans la zone marginale et dans





le centre de la tumeur. Ces paramètres permettent de définir l'Immunoscore allant de 0 (I0) à 4 (I4). Un Immunoscore de 0 représente une faible densité de ces populations dans les deux régions de la tumeur et un mauvais pronostic, alors qu'un Immunoscore de 4 représente une forte densité de ces cellules dans les deux régions tumorales et un bon pronostic (Galon et al., 2014; Pagès et al., 2009). En effet, cinq ans après diagnostic, seulement 4,8% des tumeurs présentant un Immunoscore élevé ont récidivé contre 75% parmi celles qui avaient un Immunoscore faible. De plus, un taux de 86,2 % de survie est observé dans le cas d'un Immunoscore élevé contre 27,5 % pour un score plus bas (Pagès et al., 2009). Ce nouveau facteur permettrait d'augmenter la précision du pronostic, car il met en valeur des groupes de patients distincts au sein des individus atteints d'un CCR avancé, avec des espérances de survie différentes. De plus il aurait une valeur pronostique plus forte que le stade TNM (Mlecnik et al., 2011). Récemment une étude sur une cohorte de 3 539 patients atteints de CCR de stade TNM I à III, répartis dans 13 pays différents a confirmé la valeur pronostique de l'Immunoscore en validant ce facteur (Pagès et al., 2018).

En plus de l'Immunoscore, le ratio de la quantité de neutrophiles par rapport aux LT (NLR), en particulier dans le sang des patients CCR, pourrait être un bon marqueur. De nombreuses études indépendantes ont effectivement mis en évidence qu'un fort ratio NLR (supérieur ou égal à 3 ou à 5 en fonction des études) était corrélé à une diminution de la survie globale et de la survie sans récurrence (Chua et al., 2011; Han et al., 2018; Kim et al., 2014; Li et al., 2018; Pedrazzani et al., 2017; Shibutani et al., 2013; Walsh et al., 2005). Une étude récente a notamment montré une augmentation de cinq mois et demi, en moyenne, de la survie globale chez les patients ayant un ratio NLR faible comparativement à des patients avec un ratio NLR fort. De la même manière, la survie sans récurrence est augmentée de 6 mois (Han et al., 2018).



## III - *E. coli* et cancer colorectal

### III.1. Implication du microbiote intestinal dans la carcinogénèse

#### III.1.1) Présentation et fonctions du microbiote intestinal

##### III.1.1.a. Généralités

Le microbiote intestinal représente l'ensemble des micro-organismes vivant en symbiose dans le tube digestif. Il est composé en majorité par des bactéries mais il existe également des cellules eucaryotes, des virus et des archées (Eckburg et al., 2005). À l'heure actuelle le terme de « microbiote » est souvent utilisé pour définir seulement les bactéries.

Dès la naissance, le tube digestif est colonisé par de nombreux micro-organismes, acquis *via* le microbiote de la peau, du vagin et du rectum de la mère. La composition de ce microbiote varie durant les deux premières années de la vie, suite aux interactions avec les processus physiologiques de l'hôte et son environnement. (Claesson et al., 2011; Dominguez-Bello et al., 2011; Gagnière et al., 2017; Mulder et al., 2011; Rodríguez et al., 2015; Savage, 1977). Sa densité et sa diversité augmentent jusqu'à atteindre une certaine stabilité à l'âge adulte. Selon les périodes de la vie, sa composition varie par l'action des pathologies ou de facteurs environnementaux rencontrés, tels que l'alimentation ou la prise d'antibiotiques (Dethlefsen et al., 2008; Kayama and Takeda, 2012; Rodríguez et al., 2015). Chez les individus de plus de 65 ans, la composition du microbiote change progressivement avec une altération de sa diversité (Biagi et al., 2010; Claesson et al., 2011; Rodríguez et al., 2015; Thursby and Juge, 2017).

Le microbiote intestinal est propre à chaque individu et est composé d'environ  $10^{20}$  micro-organismes (à l'âge adulte). Sa quantité et sa composition change tout le long du tube digestif (Sartor, 2008). Le côlon est la partie du tube digestif le plus peuplé et diversifié (Hakansson and Molin, 2011). La majorité est non cultivable, mais les techniques de métagénomiques (séquençage complet ou de l'ARN16S) et métatranscriptomiques (séquençage d'ARN) ont permis de caractériser le microbiote intestinal. La composition est différente si on s'intéresse au contenu luminal qui désigne les micro-organismes présent dans la lumière, au microbiote fécal ; ou au « microbiote associé aux muqueuses » constitué par les micro-organismes ayant atteint la muqueuse (Boleij and Tjalsma, 2012; Chen et al., 2012).



Actuellement, on dénombre environ 500 à 10<sup>3</sup> espèces bactériennes différentes dans le microbiote colique humain (Cho and Blaser, 2012; Claesson et al., 2011; Dethlefsen et al., 2008; Eckburg et al., 2005; Kim and Jazwinski, 2018). Parmi l'ensemble de ces phyla, 3 sont majoritairement représentés : les *Firmicutes* (30-50 %), dans lequel on retrouve notamment l'espèce anti-inflammatoire *Fusobacterium nucleatum* ; les *Bacteroides*, auquel appartient l'espèce *Bacteroides fragilis* (20-40%) et les *Actinobacteries* (1-10%) (Eckburg et al., 2005; Kim and Jazwinski, 2018). Le phylum *Proteobacteria* auquel est associé *Escherichia coli* est quant à lui moins représenté (moins de 2%). (Eckburg et al., 2005; Gagnière et al., 2016; Li et al., 2014). Il est important de noter que le microbiome de chaque individu est constitué à la fois par un « core commun » aussi appelé « microbiome fonctionnel central » regroupant les gènes bactériens partagés par l'ensemble des individus, mais aussi par un « microbiome fonctionnel variable » propre à chacun (Jandhyala et al., 2015; Turnbaugh et al., 2006; Yatsunencko et al., 2012).

Le rôle principal de cet ensemble microbien est le maintien de l'homéostasie colique par sa participation à de nombreux processus physiologiques essentiels à son hôte (Hooper et al., 2001). Chacun de ces rôles a pu être mis en évidence chez des animaux axéniques, dépourvus de microbiote, présentant des anomalies au niveau de la muqueuse.

Il constitue une barrière biologique qui protège la muqueuse des agents infectieux. Il empêche la colonisation par des pathogènes en masquant leur accès aux récepteurs d'adhésion, et aux nutriments, mais aussi par la stimulation de la synthèse de peptides antimicrobiens par les cellules de la muqueuse colique (Boleij and Tjalsma, 2012; Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010; Jandhyala et al., 2015). Ce phénomène est nommé « résistance à la colonisation » et peut-être affecté notamment par l'inflammation et la prise d'antibiotiques (Stecher and Hardt, 2008).

Il a également un rôle métabolique en permettant la digestion de nutriments qui ne peuvent pas être dégradés par les enzymes de son hôte. Il est responsable de la formation d'acides gras à chaîne courte (AGCCs) tels que le butyrate qui est l'une des sources d'énergie importante pour l'épithélium colique. Le processus de fermentation anaérobie utilisé pour cette réaction, produit également du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), du dihydrogène (H<sub>2</sub>) et du méthane (CH<sub>4</sub>). La fermentation protéolytique bactérienne quant à elle, permet de produire de l'ammoniac, des indoles, ainsi que des composés phénoliques, nitrosylés et aminés. Ces métabolites peuvent ensuite agir sur la production de vitamines et de mucus, mais également sur la prolifération et la différenciation des cellules de l'épithélium intestinal (Boleij and



Tjalsma, 2012; Mohajeri et al., 2018; Rowland et al., 2018; Sung et al., 2017; Turnbaugh et al., 2006). Ces activités métaboliques peuvent également participer à la dégradation de xénobiotiques comme par exemple les médicaments (Clayton et al., 2009; Kim et al., 2016; Rowland et al., 2018; Wallace et al., 2010; Walsh et al., 2005)

Enfin, un autre rôle important du microbiote est sa fonction structurelle et fonctionnelle sur la muqueuse intestinale. Il permet en effet le maintien de l'épithélium *via* notamment ses actions sur les différentes jonctions cellulaires et le pH. De plus, en facilitant les stades du développement cellulaire et l'angiogenèse, il contribue au renouvellement de l'épithélium (Cario et al., 2007; Jandhyala et al., 2015; Natividad and Verdu, 2013; Neish, 2009; Stappenbeck et al., 2002). En effet, l'absence de microbiote chez les souris axéniques se traduit par une motricité et une absorption altérées (Alam et al., 1994; Banasaz et al., 2002; Neish, 2009; Williams et al., 1971). Ainsi, une modification du microbiote colique pourrait avoir des répercussions sur l'homéostasie de l'épithélium intestinal et sur son bon fonctionnement.

### ***III.1.1.b. Rôle du microbiote dans l'homéostasie immunitaire***

Le microbiote intestinal contribue à la maturation du système immunitaire colique et systémique. Les interactions entre ces deux acteurs du côlon commencent dès la naissance et évoluent tout au long de la vie. Ainsi le microbiote va être déterminant dans la mise en place du système immunitaire associé aux muqueuses mais les cellules immunitaires vont également moduler la composition du microbiote colique (Lee and Kim, 2017; Nicholson and Wilson, 2003). L'importance du microbiote dans la formation d'un système immunitaire mucosal fonctionnel a été démontrée sur des souris axéniques. En effet, comparativement à des souris porteuses d'un microbiote conventionnel, les souris axéniques montrent un défaut dans le développement des tissus lymphoïdes associés à la muqueuse intestinale (GALT) (Falk et al., 1998; Macpherson and Harris, 2004). Plus précisément ces souris ont des plaques de Peyer atrophiées par rapport aux souris porteuses d'un microbiote conventionnel (McDermott and Huffnagle, 2014). Une altération du développement et de la maturation des follicules lymphoïdes associés à la muqueuse est également observée chez ces souris (Bouskra et al., 2008). De plus, elles présentent des déficits cellulaires avec une diminution des lymphocytes intraépithéliaux, des LT présents dans les plaques de Peyer ainsi que des LB sécréteurs d'IgA de la *lamina propria*. Un défaut dans la production de cytokines est également observé (Bauer and Levenson; Crabbé et al., 1968; Hamada et al., 2002; Macpherson et al., 2001; Mazmanian

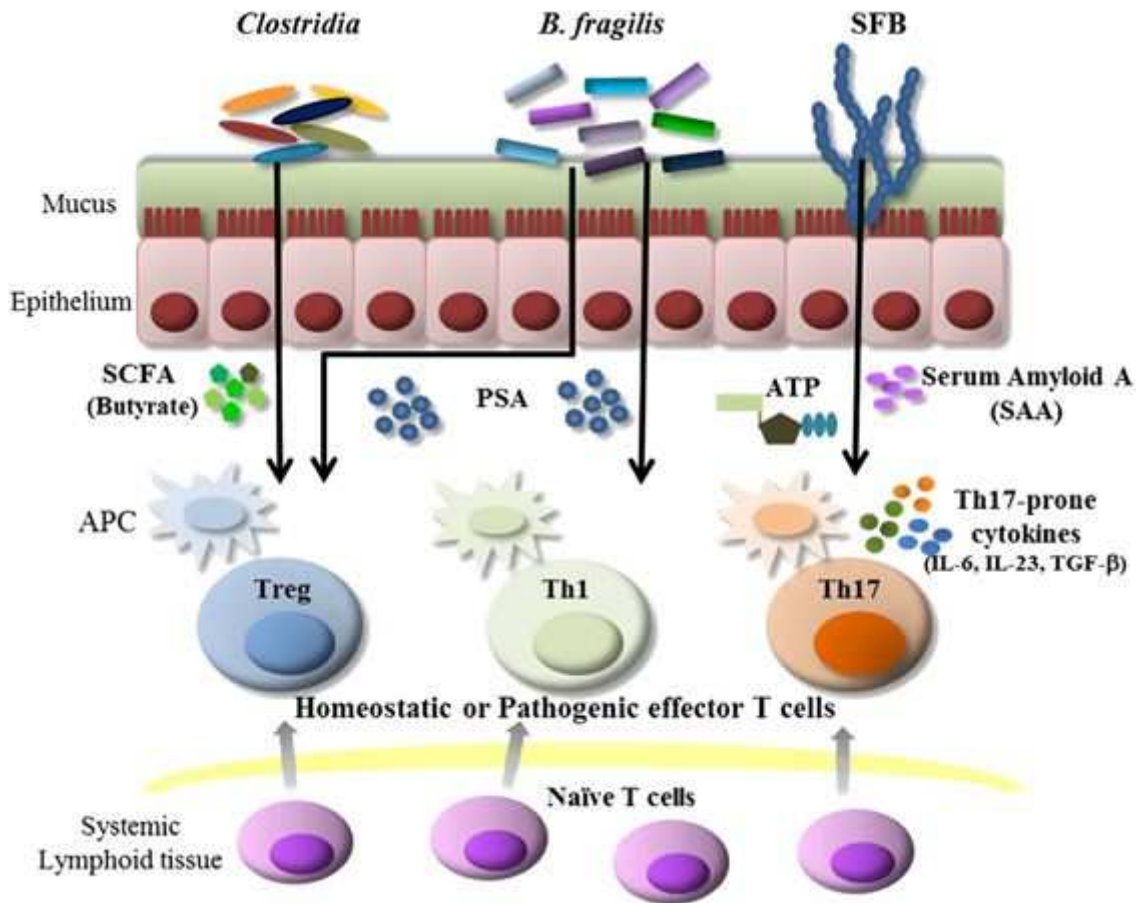




et al., 2005; Ostman et al., 2006; Yamanaka et al., 2003). Il a été rapporté une diminution de la taille des ganglions mésentériques chez les souris axéniques par rapport à des souris conventionnelles.

Ces effets s'étendent jusqu'à d'autres organes lymphoïdes, puisque ces souris présentent des atrophies au niveau des zones spécifiques à la réponse lymphocytaire dans les ganglions lymphatiques et la rate (Falk et al., 1998; Macpherson and Harris, 2004). Des dysfonctions des cellules immunitaires (par exemple des défauts d'activation, de différenciation) dans ces organes périphériques ont aussi été observées, entraînant une susceptibilité accrue de ces souris à tous types d'infections (Abt et al., 2012; Ganal et al., 2012; Mittrücker et al., 2014b). L'ensemble de ces anomalies disparaissent lorsque le microbiote des souris conventionnelles est administré aux souris axéniques, confirmant l'importance du microbiote dans le développement et la maturation du système immunitaire (Atarashi et al., 2011; Bouskra et al., 2008; Feng et al., 2010; Macpherson and Harris, 2004; Mazmanian et al., 2005; Ohnmacht et al., 2011).

Cette action du microbiote est exercée à la fois sur les cellules immunitaires innées (polynucléaires, macrophages et cellules dendritiques) et sur les cellules immunitaires adaptatives (LT et LB) mais aussi sur les cellules épithéliales, celles de la *lamina propria* et hématopoïétiques. Plus précisément les bactéries commensales en colonisant le tractus digestif après la naissance libèrent dans le milieu intestinal des composés bactériens spécifiques (MAMPs : « MicrobeAssociated Molecular Patterns ») provenant à la fois de leur métabolisme mais aussi de leur structure (protéines, lipides, acides nucléiques...). Ces motifs bactériens sont ensuite reconnus par les récepteurs de l'immunité innée, les PRRs (« Pattern Recognition Receptor ») et plus particulièrement les TLRs (« Toll-like receptor ») et les NLRs (« Nucleotide Oligomerization Domain-Like Receptors ») exprimés par les cellules épithéliales, et activent des cellules immunitaires innées (macrophages, ILC3 : cellules lymphoïdes innées de type 3) (Chu and Mazmanian, 2013; Zhang et al., 2011). La fixation des PAMPs sur les NLRs et TLRs induit notamment le recrutement de protéines cytoplasmiques impliquées dans la cascade de phosphorylations permettant des processus pro-inflammatoires, telles que le facteur de différenciation MyD88 (« *Myeloid Differentiation factor 88* ») et la protéine RICK (« *RIP-like interacting CLARP Kinase* »). Cette cascade de phosphorylation active la transcription de gènes codant pour des peptides antimicrobiens, des protéines et cytokines pro-inflammatoires (respectivement COX-2 et IL-6, TNF- $\alpha$ ...).



**Figure 19 : Importance du microbiote dans la maturation du système immunitaire : effet de certaines espèces bactériennes sur la réponse lymphocytaire T.** Certains composant du microbiote sont capables d'induire la différenciation de LT naïfs en sous population de LT CD4+. En particulier, l'espèce *Clostridium* favoriserait l'apparition de LT régulateurs par la production d'Acides Gras à Chaines Courtes (AGCCs). *B. fragilis* influencerait la balance des LT Th1/Th2 en faveur des LT Th1 par la fixation de son polysaccharide A capsulaire sur les récepteurs TLR2 des cellules de l'immunité innée qui induiraient ensuite la différenciation de LT Th1. Cette espèce bactérienne induirait également la différenciation des LT régulateurs par un mécanisme similaire. Les bactéries filamenteuses quant à elle, sont responsables de la différenciation des LT Th17 pro-inflammatoires par l'intermédiaire d'une activation des cellules dendritiques (APC) suite à la production d'ATP et/ ou à la sécrétion de la protéine pro-inflammatoire sérum amyloïde A (SAA).  
 Source : D'après Lee et al., 2017

Les cellules dendritiques présentes dans le côlon vont également capter ces MAMPs et entraîner l'activation de la réponse immunitaire adaptative (Belkaid and Hand, 2014; Dzutsev et al., 2015).

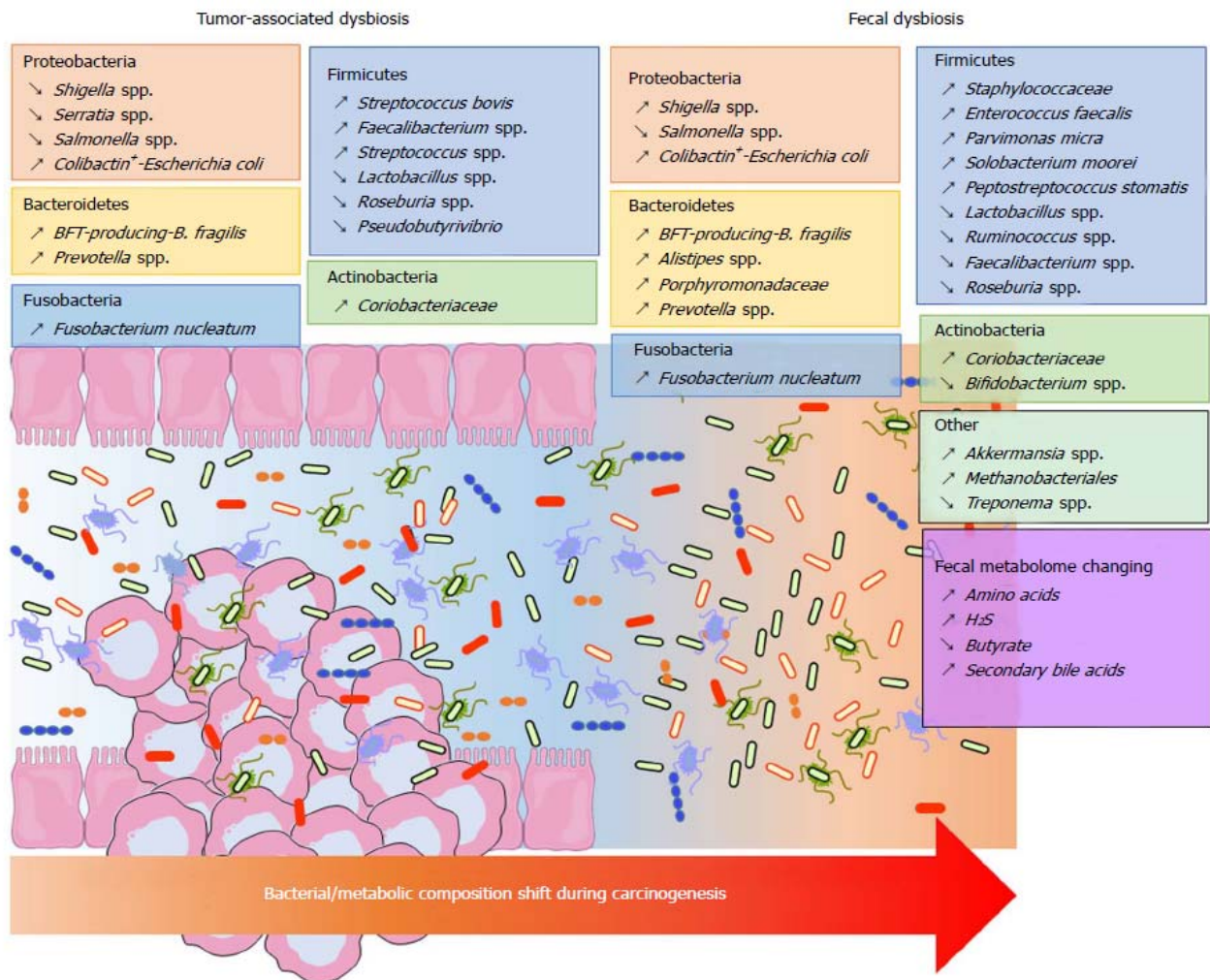
Il a été montré une régulation fine des sous-populations de LT coliques par le microbiote, certaines espèces bactériennes étant capables de moduler une sous-population spécifique (**Figure 19**) (Duan and Kasper, 2011; Lee and Kim, 2017). Le rôle des bactéries filamenteuses segmentées (SFB) dans l'induction des LT pro-inflammatoires Th17 est largement décrit (Atarashi et al., 2008; Gaboriau-Routhiau et al., 2009; Garland et al., 1982; Hall et al., 2008; Ivanov et al., 2009; Lee et al., 2011; Venkatesh et al., 2014; Wu et al., 2010b). Les mécanismes impliqués seraient la production d'ATP par ces bactéries qui induiraient l'activation de cellules dendritiques spécifiques (CD11c<sup>low</sup> CD70<sup>high</sup>) (Atarashi et al., 2008; Gaboriau-Routhiau et al., 2009; Ivanov et al., 2009), l'induction de la production de la protéine pro-inflammatoire sérum amyloïde A (SAA) par les cellules de l'immunité innée (Ivanov et al., 2009) et la liaison d'ADN bactérien au TLR9 des cellules dendritiques de la *lamina propria* (Hall et al., 2008). Cette action des SFBs sur ce récepteur, entraînerait également une augmentation de la réponse Th1 et une diminution des LT régulateurs (Hall et al., 2008).

Cette interaction entre le microbiote intestinal et l'immunité muqueuse est essentielle à l'homéostasie intestinale car elle permet une régulation fine au sein de la muqueuse entre les processus inflammatoires et anti-inflammatoires, comme l'illustre la modulation des différentes sous-populations lymphocytaires T (Atarashi et al., 2011; Belkaid and Hand, 2014; Chu and Mazmanian, 2013; Kim et al., 2017; Mazmanian et al., 2005; Rook et al., 2014).

### III.1.2 Composition du microbiote intestinal et CCR

#### ***III.1.2.a Analyse globale de la composition du microbiote***

Au vu des fonctions essentielles du microbiote sur la maturation de la muqueuse, et sachant qu'il est estimé que les micro-organismes sont associés à environ 15 à 20% des cancers (Collins et al., 2011; Zur Hausen, 2009; Plummer et al., 2016), la piste infectieuse a été envisagée dans la carcinogenèse colique. Aujourd'hui de nombreux travaux montrent un lien entre une modification de la composition du microbiote (dysbiose) et le CCR. En effet, il a tout



**Figure 20 : Dysbioses associées au CCR dans la tumeur et les fèces des patients.** Des modifications du microbiote sont observées chez les patients atteints de CCR. Bien qu'il n'y ait pas de consensus concernant la composition du microbiote dans la dysbiose associée à ce cancer, de nombreuses espèces bactériennes ont une prévalence augmentée ou diminuée chez les patients atteints d'un cancer colique. Cette composition en micro-organismes dépend du prélèvement (fèces, muqueuse, tumeur) et évolue au fil de la carcinogénèse. *Source : D'après Villéger et al., 2018*

d'abord été montré que des animaux (souris et rats) susceptibles de développer un CCR et porteurs d'un microbiote conventionnel développaient plus de tumeurs que des animaux axéniques (Dove et al., 1997; Uronis et al., 2009; Vannucci et al., 2008) (Li et al., 2012). De plus, il a été rapporté des dysbioses sur des modèles de CCR induit chimiquement des modèles spontanés de CCR tels que APC<sup>Min/+</sup> (Arthur et al., 2014; Son et al., 2015; Tomkovich et al., 2017; Zackular et al., 2013).

Chez l'homme, des dysbioses sont également décrites (**Figure 20**) (Ahn et al., 2013; Chen et al., 2012; Dai et al., 2018; Dejea et al., 2018; Feng et al., 2015; Guo et al., 2018; Kostic et al., 2012; Marchesi et al., 2011; McCoy et al., 2013; Nakatsu et al., 2015; Sobhani et al., 2011; Viljoen et al., 2015; Wu et al., 2013; Zeller et al., 2014). Il reste cependant difficile d'établir un consensus concernant sa composition chez les patients CCR. En effet, elle varie notamment en fonction de la technique utilisée et des prélèvements observés (fèces, muqueuse, tumeur), de la localisation de ces prélèvements (par exemple côlon ascendant ou descendant), de l'âge et du stade tumoral du patient (Villéger et al., 2018). Cependant il est accepté, que comme décrit chez la souris, les phyla *Bacteroidetes* et *Proteobacteria* sont sur-représentés chez les patients CCR, tout comme le phylum *Fusobacteria*, tandis que le phylum *Firmicutes* est lui sous-représenté (Gagnière et al., 2016; Lucas et al., 2017).

Une perturbation au niveau des espèces est également remarquée. Plus précisément il est retrouvé un enrichissement en *Parvimonas micra*, *Solobacterium moorei*, *Peptostreptococcus stomatis* dans les fèces des patients CCR (Yu et al., 2017a; Zeller et al., 2014). Une augmentation de *Fusobacterium nucleatum* a été observée dans les fèces, les tissus mais aussi les tumeurs de ces patients (Ahn et al., 2013; Kostic et al., 2012; Liang et al., 2017a; Viljoen et al., 2015; Vogtmann et al., 2016; Yu et al., 2017a; Zeller et al., 2014). D'autres espèces sont retrouvées augmentées dans les fèces et tumeurs telles que *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus gallolyticus* et *Escherichia coli* au détriment des espèces *Bacteroides vulgatus*, *Lactobacillus* and *Faecalibacterium prausnitzii* (Arthur et al., 2012; Chen et al., 2012; Feng et al., 2015; Villéger et al., 2018; Zeller et al., 2014). Certaines de ces espèces ont également été détectées dans des métastases hépatiques de patients CCR (Bullman et al., 2017).

Une étude métagénomique récente de Dai *et al.*, effectuée sur 526 échantillons fécaux provenant de cohortes de patients chinois, australiens, américains, allemands et français a montré également que 7 espèces étaient détectées chez tous ces individus : *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Parvimonas micra*, *Prevotella*



*intermedia*, *Alistipes finegoldii*, et *Thermanaerovibrio acidaminovorans* (Dai et al., 2018). Mais d'autres prélèvements venant d'autres groupes ethniques (Afrique, Asie du Sud-Est) doivent être testés pour confirmer que ces 7 espèces sont réellement « universelles » chez les patients CCR.

Durant les stades précoces de la carcinogenèse colique, plusieurs études suggèrent que la composition évolue en fonction des stades tumoraux (**Figure 20**). Il a ainsi été montré qu'aux stades précoces du CCR les phyla *Fusobacterium*, *Parvimonas*, *Gemella* et *Leptotrichia* étaient les plus représentés alors que les phyla *Bacteroides*, *Blautia*, *Sutterella*, et les espèces *Faecalibacterium prausnitzii*, *Collinsella aerofaciens* et *Alistipes putredinis* étaient les moins abondants (Nakatsu et al., 2015). Par ailleurs, il a été montré une augmentation de *Fusobacterium nucleatum* dans les adénomes par rapport aux muqueuses saines (Rezasoltani et al., 2018) et dans les carcinomes par rapport aux adénomes (Nakatsu et al., 2015). A l'inverse les espèces *Escherichia coli*, *Pseudomonas veronii* et *Lactococcus* sont détectées dans les adénomes (Nakatsu et al., 2015). D'autres études montrent une association entre évolution du microbiote et stade tumoral (Dejea et al., 2018; Eklöf et al., 2017; Lu et al., 2016; Mira-Pascual et al., 2015), avec notamment une augmentation progressive de *Bacteroides fragilis*, *Granulicatella*, et de souches *E. coli* particulières productrices de colibactine, tout au long de la séquence adénome-cancer (Eklöf et al., 2017). Les dysbioses associées au CCR peuvent également dépendre du phénotype des tumeurs (Gagnière et al., 2017; Mima et al., 2016b, 2016b; Rezasoltani et al., 2018; Richard et al., 2018a; Viljoen et al., 2015). Notamment il a été mis en évidence une abondance plus forte de *F. nucleatum* et *E. coli* respectivement dans les tumeurs et les muqueuses de patients atteints de CCR de phénotype MSI (Gagnière et al., 2017; Mima et al., 2016b). De plus, les patients atteints de CCR sporadiques sont porteurs d'un microbiote mucosal colique dont la composition est différente de celle des patients atteints de CCR associé à une colite, CAC. Cette composition est caractérisée par une augmentation de la famille des *Enterobacteriaceae* et du genre *Sphingomonas* ainsi qu'une diminution des genres *Fusobacterium* et *Ruminococcus* chez les patients souffrant de CAC par rapport à ceux souffrant de CCR sporadiques (Richard et al., 2018a). Comme il vient d'être évoqué la composition du microbiote diffère entre adénomes et carcinomes (Eklöf et al., 2017; Lu et al., 2016; Mira-Pascual et al., 2015; Nakatsu et al., 2015).

Parmi ces composants du microbiote, certaines espèces ont été décrites comme étant impliqués dans la carcinogenèse colique par différents mécanismes.





### ***III.1.2.b Etude de la prévalence de certaines espèces bactériennes***

#### *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* est un bacille Gram négatif, spiralé qui en infectant la muqueuse gastrique provoque une inflammation associée à des gastrites chroniques et pouvant aboutir au cancer de l'estomac. Il a été reconnu comme une espèce bactérienne carcinogène par l'Organisation Mondiale de la Santé (Handa et al., 2010). Si son rôle dans le cancer gastrique est bien documenté, son implication dans le CCR est en revanche assez discutée. Une méta-analyse menée à partir de 11 études par Zumkeller *et al.*, a montré que les patients porteurs de *H. pylori* présentent 1,4 fois plus de risque de développer un cancer colique (Zumkeller et al., 2006). Deux autres études indépendantes, sur des personnes d'origine asiatique ont démontré une corrélation significative entre la présence d'adénomes colorectaux et la présence d'*H. pylori* (Guo and Li, 2014; Qing et al., 2016) suggérant un rôle de ce pathogène lors des stades précoces du CCR. Par contre, une étude portant sur une population américaine d'origine hispanique n'a pas confirmé cette association (Patel et al., 2014). Plus récemment, une augmentation de la colonisation par ces bactéries a été mise en évidence dans les adénomes et adénocarcinomes des patients par rapport aux tissus non néoplasiques (Grahm et al., 2005; Jones et al., 2007). Très récemment, il a été montré par une étude rétrospective que *H. pylori* était significativement associé à un risque plus élevé de développer des adénomes festonnés sessiles, connus pour être des précurseurs du CCR (Kumar et al., 2018a).

#### *Streptococcus bovis/gallolyticus*

*Streptococcus gallolyticus*, nommée précédemment *Streptococcus bovis*, est une espèce bactérienne anaérobie à Gram positif. Elle est également une espèce bactérienne commensale du tube digestif et le premier micro-organisme à avoir été lié au CCR, bien que son implication reste à ce jour controversée. Son rôle dans la carcinogenèse colique est suspecté depuis les années 1950, après une première étude associant les endocardites streptococcales à l'apparition de ce cancer chez 25 à 80 % des patients présentant une bactériémie à *S. gallolyticus* (McCOY and Mason, 1951). Il a été montré une corrélation entre immunoglobulines (IgG) dirigées contre *S. gallolyticus* et présence d'adénomes et de carcinomes (Abdulmir et al., 2009; Tjalsma et al., 2006). En effet, 78% des patients ayant développé des adénomes et 98% ayant développé des carcinomes étaient séropositifs pour ces anticorps spécifiques comparativement à 17% des



individus contrôles (Abdulmir et al., 2009). Cette association a été largement confirmée par la suite (Abdulmir et al., 2011; Boleij and Tjalsma, 2013; Corredoira et al., 2017; Gold et al., 2004; Hoppes and Lerner, 1974; Klein et al., 1979).

Certaines études montrent une augmentation de *S. gallolyticus* dans les fèces de patients CCR comparativement aux fèces d'individus sains (Klein et al., 1979). D'autres études ne montrent aucune différence significative (Boltin et al., 2015; Dubrow et al., 1991; Potter et al., 1998). En revanche, la plupart des études menées sur tissu de patients montrent une augmentation de la colonisation de la muqueuse colique par ce type de bactéries (Abdulmir et al., 2010; Boleij et al., 2011; Krishnan and Eslick, 2014; Paritsky et al., 2015).

### *Enterococcus faecalis*

*Enterococcus faecalis* est une espèce bactérienne à Gram positif, anaérobie facultative, commensale du microbiote intestinal humain. La quantité de cette bactérie dans le tractus digestif est fortement dépendante du régime alimentaire, ainsi elle est davantage représentée chez des populations dont l'alimentation est basée sur des produits végétaux par rapport à des individus avec un régime alimentaire occidental (« Western Diet ») (Hill et al., 1971). Plusieurs études ont permis de mettre en évidence que la colonisation par *E. faecalis* était multipliée d'au moins trois fois chez des patients CCR par rapport à des individus contrôles (Balamurugan et al., 2008; Wang et al., 2012a). Plus récemment il a été montré que cette bactérie colonise préférentiellement un sous-type de CCR particulier à instabilité microsatellitaire (Lennard et al., 2016). Un lien entre endocardite à *E. faecalis* et CCR est également suggéré (Khan et al., 2018). De plus, il a été montré que l'administration de cette bactérie chez des souris IL-10<sup>-/-</sup> favorise une colite et une hyperplasie des cryptes intestinales ainsi que des adénocarcinomes (Balish and Warner, 2002).

### *Clostridium septicum*

*Clostridium septicum* est un bacille à Gram positif, anaérobie strict, capable de former des spores et normalement présent dans le tractus digestif. Il est responsable de rares cas de bactériémies (moins de 1%). Ces translocations bactériennes dans le sang peuvent être associées à des risques de développer un CCR (Hermsen et al., 2008; Kwong et al., 2018; Mirza et al., 2009). Aucune association entre la colonisation colique par ces micro-organismes et le CCR



n'a été observé jusqu'à maintenant, mais environ 40% des individus infectés par *C. septicum* sont atteints d'une maladie digestive ou d'un CCR (Chew and Lubowski, 2001; Hermesen et al., 2008). L'implication de ces bactéries dans la carcinogenèse colique reste pour le moment indirecte.

### *Fusobacterium nucleatum*

*Fusobacterium nucleatum* est une espèce bactérienne opportuniste à Gram négatif, anaérobie. Elle fait partie des bactéries commensales les plus abondantes de la cavité buccale. Une prévalence plus importante du genre *Fusobacterium*, dont l'espèce *F. nucleatum* est majoritaire, a été soulignée dans les fèces et muqueuses de patients comparativement aux individus contrôle (Ahn et al., 2013; Dai et al., 2018; Kostic et al., 2012, 2013; Liang et al., 2017a; McCoy et al., 2013; Rezasoltani et al., 2018; Viljoen et al., 2015; Vogtmann et al., 2016; Yu et al., 2017a; Zeller et al., 2014). La forte colonisation est observée dans les tumeurs coliques (Kostic et al., 2013; Marchesi et al., 2011; Mima et al., 2016b; Nakatsu et al., 2015; Rezasoltani et al., 2018; Viljoen et al., 2015) et récemment dans les métastases de ce cancer (Bullman et al., 2017). Ces bactéries sont retrouvées de façon plus importante dans les tissus tumoraux que la muqueuse saine adjacente (Kostic et al., 2012; Marchesi et al., 2011; Rezasoltani et al., 2018) et préférentiellement au sein des cancers du côlon droits (Mima et al., 2016b). Viljoen et al., ont également montré que de fort niveau de colonisation de *F. nucleatum* sont associés aux formes de mauvais pronostics déterminés par les facteurs TNM (Viljoen et al., 2015). D'autres études montrent une corrélation entre l'augmentation de la colonisation bactérienne dans les tumeurs et le stade tumoral (Mima et al., 2015; Viljoen et al., 2015; Wei et al., 2016b; Yang et al., 2017) ainsi qu'avec la survie (Yang et al., 2017). Enfin, une forte colonisation des tumeurs coliques par *F. nucleatum* est associée à une diminution de la survie à 3 ans des patients atteints de CCR (Wei et al., 2016b).

### *Bacteroides fragilis*

*B. fragilis* est une espèce bactérienne commensale anaérobie stricte à Gram négatif. Elle est présente chez 80% de la population et ne représente qu'environ 0.1% du microbiote intestinal (Huang et al., 2011; Macfarlane et al., 2005; Wu et al., 2006). Néanmoins l'augmentation de la colonisation chez les patients CCR comparativement aux individus sains,



est démontrée (Boleij et al., 2015; Bullman et al., 2017; Chen et al., 2012; Dai et al., 2018; Rezasoltani et al., 2018; Sobhani et al., 2011; Viljoen et al., 2015; Wang et al., 2012a; Wei et al., 2016b; Zeller et al., 2014) et notamment dans les stades avancées du CCR (Boleij et al., 2015). Il a été décrit comme un potentiel indicateur prédictif de la survie à 3 ans (Wei et al., 2016b).

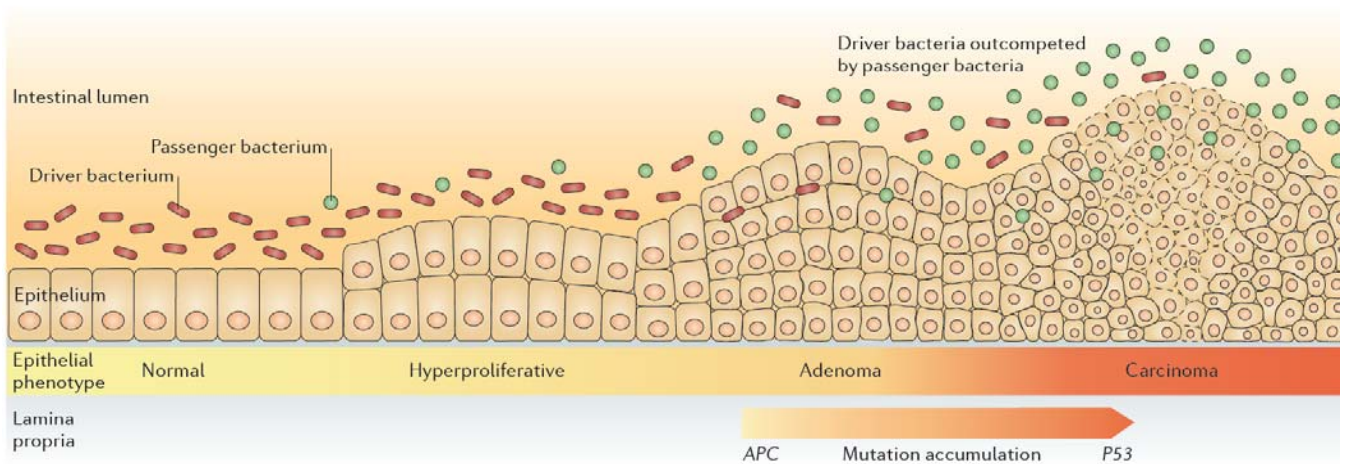
La plus grande partie des souches retrouvées chez les patients CCR sont porteuses du gène *bft* codant pour la toxine BFT (*Bacteroides Fragilis* toxin). Une étude a montré que ses souches spécifiques, nommées *B. fragilis* entérotoxigènes (ETBF), sont détectées chez 38% des patients CCR comparativement à 12% des individus contrôles (Ulger Toprak et al., 2006). Cette toxine acquise lors de processus évolutifs, possède des motifs spécifiques de métalloprotéase dépendante du zinc, conférant ainsi une activité protéolytique aux EBFT (Pierce and Bernstein, 2016; Wu et al., 1998).

### III.1.3) Mécanismes impliqués dans la carcinogenèse colique

#### III.1.3.a. Modèles Dysbiotique et « Driver-passenger »

Le rôle des bactéries dans la carcinogenèse semble être complexe impliquant des espèces différentes, contrairement à la carcinogenèse gastrique qui serait lié à un seul pathogène, *Helicobacter pylori* (Handa et al., 2010). Deux hypothèses concernant le rôle du microbiote intestinal dans la carcinogenèse colique sont décrites : la théorie de la dysbiose et le modèle « *driver-passenger* » (Chen et al., 2017; Sears and Garrett, 2014). Ces deux hypothèses ne s'excluent pas l'une et l'autre.

L'hypothèse dysbiotique décrit un changement du microbiote qui résulterait en la formation d'une communauté microbienne pro-carcinogène via des perturbations de l'hôte. Ces perturbations des fonctions de l'hôte seraient notamment une induction d'altérations cellulaires et une réponse immunitaire dérégulée avec une augmentation des réactions pro-inflammatoires (Ahn et al., 2013; Chen et al., 2008, 2017; Feng et al., 2015; Kostic et al., 2012; Marchesi et al., 2011; McCoy et al., 2013; Sanapareddy et al., 2012; Sobhani et al., 2011; Viljoen et al., 2015; Wu et al., 2013). Une modification des voies métaboliques pourrait également jouer un rôle (Dai et al., 2018; Johnson et al., 2015; Nugent et al., 2014; Villéger et al., 2018). Il a été



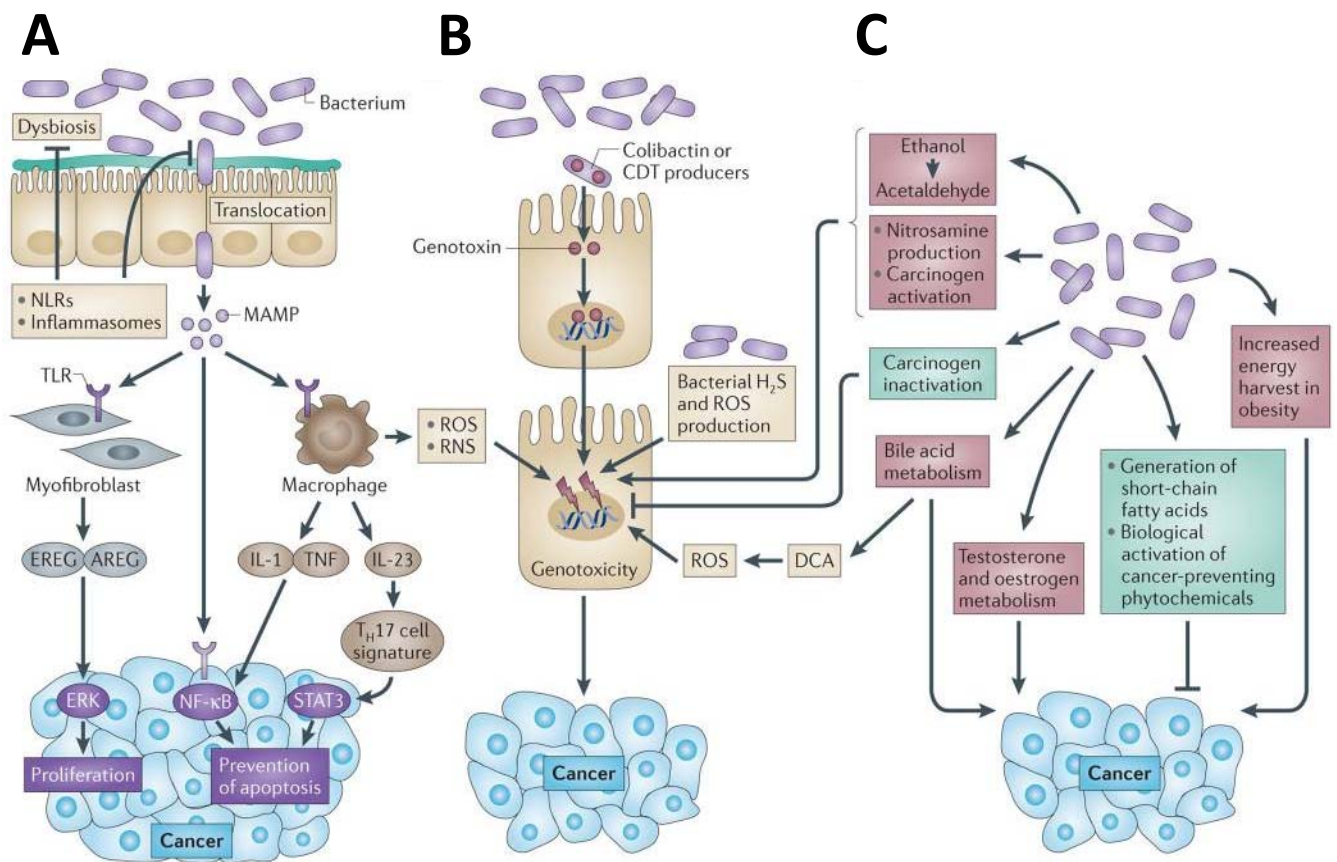
**Figure 21 : Le modèle « driver-passenger » de l'implication bactérienne dans la carcinogénèse colorectale.** La muqueuse colique des patients atteints de cancer colorectal est particulièrement colonisée par des bactéries pathogènes du genre *Bacteroides* et de la famille des Entérobactéries, et par d'autres bactéries « *driver* » de la carcinogénèse colorectale. Ces bactéries « *driver* » peuvent être impliquées dans l'inflammation, la prolifération cellulaire, et la production de composés génotoxiques qui peuvent contribuer à l'accumulation de mutations impliquées dans la séquence adénome-cancer. Ces anomalies peuvent être responsables de modifications du microenvironnement tumoral et de la sélection d'un microbiote local. Ces changements pourraient favoriser le remplacement progressif des bactéries « *driver* » par d'autres bactéries « *passenger* » opportunistes pouvant exercer un rôle promoteur de la carcinogénèse. *Source: Tjalsma et al., 2012*



mis en évidence que les dysbioses sont associées à des profils métaboliques différents aussi bien dans les tissus des patients CCR que dans les tumeurs (Dai et al., 2018; Nugent et al., 2014). Elles favoriseraient ainsi la formation de composés toxiques et pro-carcinogènes.

L'identification d'une exposition fréquente aux antibiotiques comme un facteur de risque du cancer colique (Boursi et al., 2015; Dik et al., 2016) renforce cette hypothèse par les perturbations du microbiote qu'elle peut entraîner (Becattini et al., 2016; Iizumi et al., 2017; Korpela et al., 2016). Les résultats les plus probants qui appuient l'hypothèse dysbiotique sont ceux obtenus avec le transfert de microbiote associées au CCR (Wong et al., 2017; Zackular et al., 2013). Une première expérience menée par Zackular et al., démontre que le transfert du microbiote de souris ayant développé des tumeurs (modèle d'induction par AOM/DSS), chez des souris axéniques traitées avec de l'AOM/DSS favorise la tumorigenèse colique. De plus, l'incidence, la sévérité et la taille des tumeurs de ses souris sont réduits après un traitement par un cocktail d'antibiotiques, ciblant les bactéries à Gram négatif et positif (Zackular et al., 2013). De la même façon, une seconde étude plus récente de Wong et al., montre que l'administration par gavage d'un microbiote dysbiotique issue de patients atteints de CCR à des souris, axéniques ou conventionnelles traitées par de l'AOM/DSS, favorise là encore, la carcinogenèse du côlon chez les souris receveuses (Wong et al., 2017).

Selon le deuxième modèle dit « *driver-passenger* » proposé par Tjalsma et al, (**Figure 21**), la muqueuse colique pourrait être colonisée par des bactéries dites « *driver* » ce qui favoriserait l'implantation de bactéries « *passenger* » (Boleij and Tjalsma, 2012) . Plus précisément, les bactéries « *driver* » participeraient à l'initiation et à la promotion du développement tumoral par leurs propriétés génotoxiques, et par leur capacité à induire une prolifération des entérocytes et/ou une inflammation chronique, qui vont contribuer à l'accumulation d'altérations génétiques. Les modifications du micro-environnement où se développe la tumeur (rupture de l'épithélium, micro-inflammation...) vont entraîner une pression de sélection et favoriser l'implantation de bactéries appelées donc « *passenger* » qui pourraient favoriser et amplifier la progression tumorale. Dans ce modèle les bactéries « *passenger* » vont progressivement remplacer les bactéries « *driver* » au sein du micro-environnement tumoral. Les espèces *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides fragilis* et *Escherichia coli* sont considérées comme des bactéries « *driver* », alors que les espèces *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus bovis/galloyticus*, *Clostridium septicum* sont considérés comme « *passenger* ».



**Figure 22 : Mécanismes impliqués dans la modulation de la carcinogénèse colique par le microbiote intestinal.**

Le microbiote intestinal est impliqué dans la carcinogénèse colorectale par différents mécanismes. **A.** La dysbiose et la modulation des défenses de l'hôte pourraient favoriser des translocations bactériennes et induire des phénomènes inflammatoires, qui favorisent la prolifération cellulaire et régulent l'apoptose. Cette inflammation est activée par la reconnaissance de motifs antigéniques particuliers de ces micro-organismes, les MAMPs (« *Microbe Associated Molecular Patterns* »), par les TLRs (« *Toll-like receptors* ») exprimés par de nombreux types cellulaires tels que les macrophages, les myofibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules tumorales. **B.** Des génotoxines produites par les bactéries, comme la colibactine ou la CDT (« *cytolethal distending toxin* ») sont internalisées dans les cellules et pourraient créer des dommages à l'ADN et moduler le cycle cellulaire. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), par les cellules immunitaires et/ou épithéliales en réponse à l'infection bactérienne, ou par les bactéries elles-mêmes pourrait également être impliquée dans cet effet génotoxique. **C.** Le métabolisme microbien participerait à la production, à la conversion et à l'activation de composés pro-carcinogènes tels que l'acétaldéhyde, les nitrosamines, et les acides biliaires secondaires. *Source : Schwabe et al., 2013*

Concernant les mécanismes mis en jeu par les bactéries lors de la carcinogenèse colique, que ce soit dans le modèle dysbiotique ou « *driver-passenger* », différentes hypothèses sont décrites dans la littérature (**Figure 22**). Ces mécanismes regroupent : l'action de facteurs de virulence et de toxines, la transformation de nutriments en composés pro-carcinogènes, l'induction d'un stress oxydant, et la modulation des défenses de l'hôte par des processus pro-inflammatoires ou impactant les réponses immunitaires anti- et pro-tumorales. Ces effets plus ou moins directs pourraient probablement résulter de l'action de plusieurs espèces associées au CCR à la fois. Il reste 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 inflammation chronique, production de toxines et composés carcinogènes, immunosurveillance anti-tumorale et réponses cellulaires de l'hôte aboutirait à la création d'un micro-environnement pro-carcinogène (Arthur et al., 2012; Boleij et al.; Dejea et al., 2018; Kostic et al., 2013; Mima et al., 2015; Schwabe and Jobin, 2013; Thiele Orberg et al., 2017a; Wu et al., 2003) .

### ***III.1.3.b. Facteurs de virulence et toxines***

Certaines bactéries possèdent un arsenal de facteurs de virulence acquis lors de leur évolution. En particulier elles possèdent des outils d'adhésion et d'invasion, tels que les flagelles, les pili et les adhésines, qui leur permettent d'entrer en contact avec les entérocytes mais également d'adhérer et de pénétrer les cellules intestinales afin d'envahir l'épithélium (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Escobar-Páramo et al., 2004; Le Gall et al., 2007; Schwabe and Jobin, 2013). C'est par exemple le cas de *S. gallolyticus*, dont la faculté à coloniser l'épithélium normal et tumoral serait liée à l'utilisation de pili adaptés (Martins et al., 2015, 2016). *F. nucleatum* quant à lui, adhère et envahit les cellules épithéliales et endothéliales de l'intestin grâce à l'adhésine FadA, exprimée à la surface de ces bactéries (Han et al., 2005; Rubinstein et al., 2013; Shang and Liu, 2018).

De nombreuses toxines bactériennes pourraient également être impliquées dans la carcinogenèse colique en interagissant avec les cellules hôtes et en modulant leurs voies de signalisation (Lax, 2005). On distingue deux types de toxines, les exotoxines classiques, sécrétées, et celles qui sont délivrées par les bactéries directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes *via* des systèmes de sécrétion. Ces molécules peuvent cibler la membrane de la cellule hôte, ou des composants intracellulaires. Ces toxines vont perturber le



fonctionnement physiologique de la cellule hôte, en agissant sur des processus liés à la carcinogenèse, tels que la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Ainsi, en plus de faciliter la dissémination de *F. nucleatum*, l'adhésine FadA va également se fixer sur l'E-cadhérine et activer la voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine. Il en résulte une accélération de la croissance tumorale dépendante de FadA chez un modèle murin de xénogreffe de cellules tumorales coliques (Rubinstein et al., 2013).

D'autres bactéries associées au CCR possèdent ce type de toxines tels que *H. pylori* qui produit l'exotoxine VacA (toxine vacuolisante A) et CagA (« *cytotoxin-associated antigen* »). Ces onco-protéines sont codées par l'îlot de pathogénicité (PAI) qui n'est présent que chez certaines souches d'*H. pylori*. Il a été décrit que ces deux toxines induisent des processus pro-inflammatoires et la prolifération cellulaire dans le cancer de l'estomac (Higashi et al., 2002). La toxine CagA est considérée comme la première oncoprotéine découverte chez une bactérie (Lax, 2005). Suite à son injection dans la membrane plasmique, elle peut être phosphorylée et se lier à des protéines contenant un domaine SH2, ce qui mime les effets des tyrosines phosphorylées des protéines endogènes de la cellule hôte, et ainsi induit des réarrangement du cytosquelette et une augmentation de la mobilité cellulaire (Hagymási and Tulassay, 2014). La forme non phosphorylée de CagA peut également avoir des effets sur la cellule infectée en déstabilisant les jonctions cellulaires ou en interférant dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et/ou l'inflammation *via* l'activation de voies de signalisation et de facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B, c-fos, c-jun (Franco et al., 2005; Hagymási and Tulassay, 2014; Lax, 2005). La protéine VacA elle, est une cytotoxine vacuolisante active dont les mécanismes ont été étudiés *in vitro* et nécessitent d'être confirmés *in vivo*. Elle forme des vacuoles cellulaires et des canaux membranaires perturbant les fonctions endosomales/lysosomales ainsi que l'apoptose. Elle a également un rôle immunosuppresseur (Isomoto et al., 2010).

Une toxine pro-carcinogène mieux décrite est la toxine BFT produite par *B. fragilis*. Il s'agit d'une toxine de 20 kDa à activité métalloprotéase zinc-dépendante, qui active les voies de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et NF- $\kappa$ B en se liant à un récepteur spécifique non identifié au niveau de l'épithélium colique. Ainsi, elle favorise la prolifération cellulaire, par un relargage de la  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme qui transloque ensuite dans le noyau, et la résistance à l'apoptose par l'induction de COX-2 et de l'hème oxygénase 1 (Wu et al., 2003). Mais elle va également jouer un rôle dans la carcinogenèse colique en augmentant la libération de médiateurs pro-inflammatoires et en favorisant l'apparition de dommage à l'ADN par la production de ROS. (Chung et al., 2018; Goodwin et al., 2011; Housseau and Sears, 2010;



Irrazabal and Martin, 2015; Ko et al., 2016; Moncrief et al., 1995; Rhee et al., 2009; Sears, 2009; Thiele Orberg et al., 2017a; Ulger Toprak et al., 2006; Wu et al., 1998, 2006, 2009).

D'autres toxines bactériennes ciblant le cycle cellulaire des cellules eucaryote peuvent aussi être impliquées dans la carcinogenèse colique, elles seront décrites plus loin.

### ***III.1.3.c. Métabolites bactériens***

Les nutriments non digérés se retrouvent dans le côlon comme d'autres composés exogènes (xénobiotiques, cellulose...) et endogènes tels que le mucus et les sels biliaires. Tous ces composants vont être alors métabolisés par le microbiote colique en divers métabolites utilisables par les cellules coliques (Louis et al., 2014a; Rowland et al., 2018). Les principales fonctions métaboliques assurées par le microbiote sont la digestion des polysaccharides et carbohydrates non digérables par son hôte, la protéolyse et fermentation des acides aminées, la dégradation des acides biliaires, le métabolisme des gaz (CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>) et des stérols, ainsi que des xénobiotiques. Les dysbioses identifiées dans le CCR peuvent donc être à l'origine de modifications de ces fonctions métaboliques (Villéger et al., 2018).

La fermentation des carbohydrates produit des acides gras à chaînes courtes (AGCC) dont les trois majoritaires sont le butyrate, l'acétate et le propionate qui sont considérés comme des composants bénéfiques pour la muqueuse colique la plupart du temps (Miller and Wolin; Ouwehand et al., 2005). Il a été montré qu'une moindre quantité de ces AGCC et en particulier de butyrate était observée dans les fèces de patients atteints de CCR comparativement aux sujets contrôles (Chen et al., 2012; Weaver et al., 1988; Weir et al., 2013). De même, les études de microbiote chez les patients CCR montrent une baisse d'abondance des bactéries capables de métaboliser ces composés telles que *Ruminococcus spp* et *Pseudobutyvribrio ruminis* (Chen et al., 2012; Weaver et al., 1988; Weir et al., 2013). Le rôle du butyrate reste complexe car il a également été montré dans le modèle murin APC<sup>Min/+</sup> MSH2<sup>-/-</sup> que le butyrate peut favoriser le développement de polypes dans le côlon. L'effet du butyrate dépendrait de la concentration de ce composé dans le milieu colique et de sa voie d'administration, par exemple de fortes concentrations en butyrate induisent une prolifération anarchique des cellules de l'épithélium colique (Belcheva et al., 2014).

Il a été montré que les patients atteints de CCR présentent de plus grande quantité d'acides aminés dans leur fèces que les individus sains (Weir et al., 2013). Leur dégradation

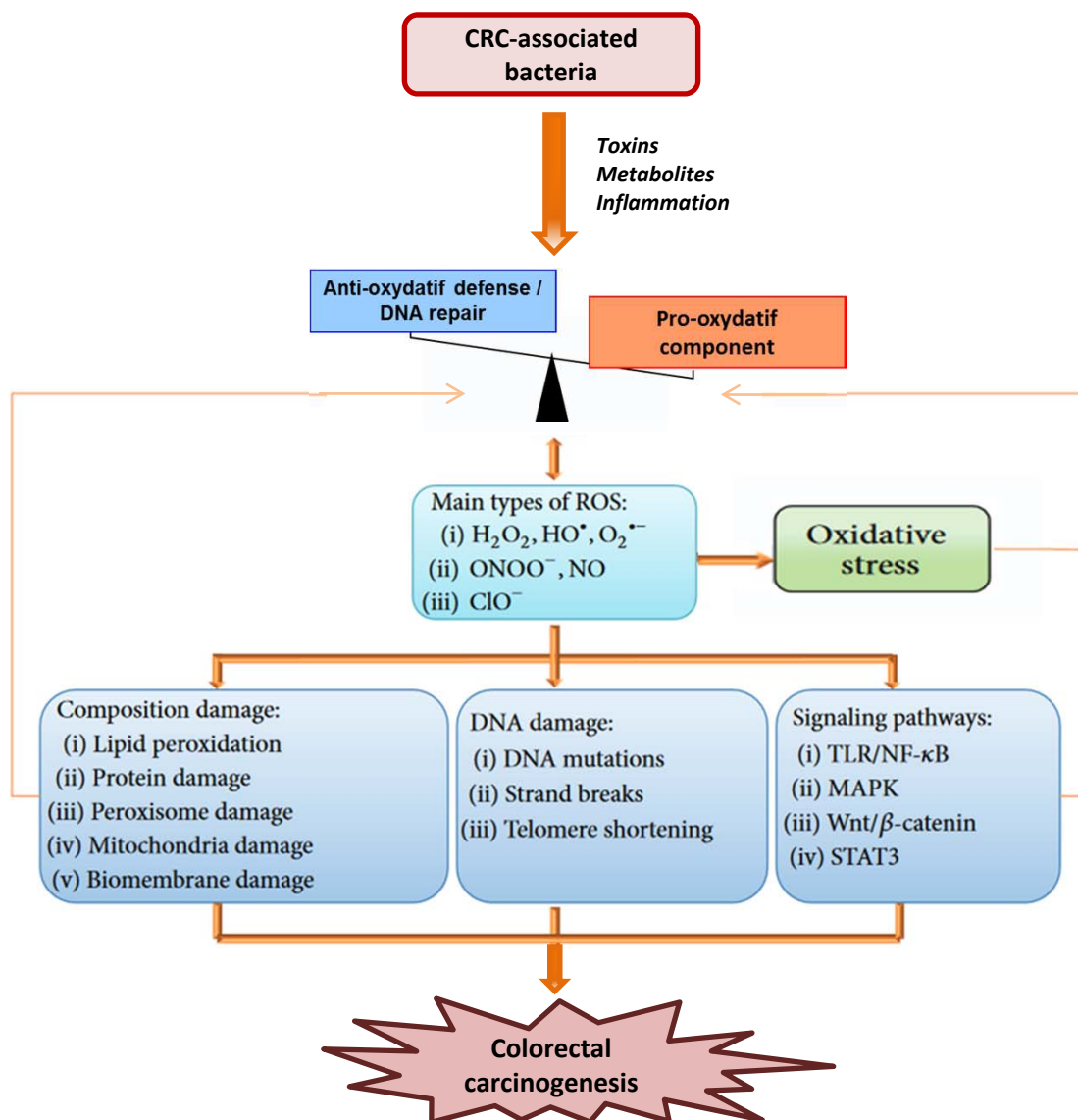




entraîne la formation de métabolites pouvant être particulièrement pro-carcinogènes tels que les phénols, les sulfures, l'ammoniaque et des composés azotés (Louis et al., 2014a; Schwabe and Jobin, 2013). La production de composés azotés à partir d'acides aminés a notamment été décrite pour les *Bacteroidetes* et *Firmicutes*. Ces composés favorisent la carcinogenèse *via* des phénomènes d'alkylation de l'ADN (Loh et al., 2011). De plus, il a été montré qu'un régime riche en protéines et pauvre en carbohydrates induit la production de métabolites toxiques et la diminution de composés protecteurs par les bactéries dont les espèces *Bacteroidetes* et *Firmicutes* (Russell et al., 2013).

Le métabolisme des acides biliaires par les bactéries coliques, peut lui aussi être relié à la carcinogenèse colique. En effet, une forte concentration fécale en acides biliaires serait associée à un risque élevé de développer un CCR (Louis et al., 2014b). Ce lien entre acides biliaires et CCR est renforcé par le fait que la consommation d'aliments à forte teneur en graisses lié à une haute sécrétion de ces acides, est corrélé à un risque élevé de développer un cancer colique (Bernstein et al., 2005). De plus, il a été montré que certaines espèces du microbiote colique telles que *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* et *Listeria* possédaient l'enzyme bactérienne 7 $\alpha$ -dehydroxylase, qui permet la décomposition des sels biliaires en acides biliaires secondaires (acides deoxycholique et lithocholique) (Jones et al., 2007; Ocvirk and O'Keefe, 2017; Ridlon et al., 2006). Ces composés sont connus pour leur rôle dans le CCR (Bernstein et al., 2005; Louis et al., 2014b; Ocvirk and O'Keefe, 2017). Cependant les mécanismes impliqués sont encore mal connus mais l'implication des ROS, RNS et l'accumulation de dommages de l'ADN sont suggérées (Bernstein et al., 2005; Louis et al., 2014b). De plus, l'activité de la  $\beta$ -glucuronidase fécale chez les patients atteints de CCR est multipliée par 1,7 par rapport à celle des sujets sains (Kim and Jin, 2001). Cette enzyme bactérienne est capable de réactiver certains composants carcinogènes rendus inactifs dans le foie et excrétés par la bile dans le tractus digestif et ainsi serait liée à la carcinogenèse colique (Kim and Jin, 2001). Des études sur un modèle de rat prédisposé au CCR ont montré que l'inhibition de cette enzyme par l'utilisation du régime C-GAL, entraînait une diminution du développement tumoral (Takada et al., 1982).

De forts taux de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) ont été détectés chez les patients atteints de CCR, par rapport à des individus contrôles (Rowland, 2000). Les bactéries sulfogéniques présentes dans le côlon peuvent utiliser le sulfate et le transformer en sulfure produisant des réactions entérotoxiques. Ces sulfures sont associés au cancer colique car ils ont un effet génotoxique *via* l'induction d'un stress oxydant démontré *in vitro* (Attene-Ramos et al., 2010).



**Figure 23 : Pouvoir carcinogène des bactéries associé à un stress oxydant.** Certaines bactéries associées au CCR peuvent promouvoir le développement de ce cancer en favorisant le stress oxydant. Elles peuvent notamment augmenter la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et/ou en parallèle diminuer les défenses anti-oxydantes. Ce stress oxydant va ainsi entraîner des dommages cellulaires et nucléaires ainsi que l'activation de voies de signalisation oncogènes, favorisant *in fine* le développement tumoral. *Source : D'après Maddocks et al., 2009 ; Maddocks et al., 2013; Irrabazal et al., 2014; Gagnière et al., 2017 et Wang et al., 2016*

Enfin, le métabolisme microbien augmente la toxicité de l'alcool en transformant l'éthanol en acétaldéhyde qui est connu pour son effet génotoxique avec l'induction de dommages à l'ADN, mais aussi l'altération des systèmes de réparations de l'ADN (Homann, 2001).

En plus de ces effets pro-carcinogènes directement induits sur les cellules épithéliales coliques, ces voies métaboliques bactériennes peuvent également jouer un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire (Routy et al., 2018a).

#### ***III.1.3.d. Stress oxydant***

Comme illustré sur la **figure 22**, l'induction d'un stress oxydant semble centrale dans les mécanismes d'action du microbiote intestinal dans la carcinogenèse colique. Les bactéries associées au CCR seraient capables d'induire la production de ROS et de RNS par les cellules épithéliales, les cellules immunitaires, et/ou les bactéries elles-mêmes. Le stress oxydant pourrait être induit par l'activation de voies pro-inflammatoires, la production de toxines bactériennes et la transformation de métabolites en molécules pro-carcinogènes. L'instabilité génomique mais également les dommages cellulaires qui peuvent en résulter peuvent participer à la carcinogenèse colique (**Figure 23**) (Arthur et al., 2012; Cooke et al., 2003; Evans et al., 2004; Irrazábal et al., 2014; Maddocks et al., 2009, 2013; Schwabe and Jobin, 2013; Wang et al., 1998, 2016b). Cette hypothèse est renforcée par le fait que les facteurs de risque du CCR comme la consommation de tabac, d'alcool et de viandes rouges ainsi que l'inflammation sont liés à l'augmentation du stress oxydant (production de ROS/RNS, oxydation des lipides notamment). (Grivennikov et al., 2010; Huxley et al., 2009; Raskov, 2014; Terzić et al., 2010).

Les ROS et RNS, peuvent être produites par les bactéries elles-mêmes. Ceci a notamment été montré pour certaines souches d'*H. pylori* (Handa et al., 2010), mais également pour *E. faecalis* lors d'études *in vitro* et *in vivo*, qui est responsable de la production de radicaux libres (Wang et al., 2008, 2015). Lors des études sur *E. faecalis* il a été démontré que ces ROS étaient associées à des aneuploïdies dans les cellules épithéliales coliques et que ces dernières n'étaient plus observables après utilisation d'inhibiteurs des ROS et RNS (Wang et al., 2008, 2015)



Concernant la génération de ROS par les cellules eucaryotes après infection bactérienne, *Enterococcus faecalis* est impliqué *in vitro* et dans des modèles animaux dans la production de radicaux hydroxyles (HO<sup>\*</sup>) et la création d'un stress oxydant (Huycke and R Moore, 2002; Huycke et al., 2001; Szemes et al., 2010). De la même façon il a été observé que certaines infections bactériennes induisent une activation des enzymes cellulaires pro-oxydantes dans l'intestin. *F. nucleatum* induit une augmentation de l'activation de iNOS accompagnée de l'augmentation d'oxyde nitrique (NO) dans les tumeurs de souris APC<sup>Min/+</sup> (Kostic et al., 2013). Cette augmentation d'enzymes pro-oxydantes accompagnée de la production de ROS et de dommages à l'ADN, est également induite par *B. fragilis* entérotoxigènes par l'induction de l'expression de l'enzyme spermine oxydase (SMO) des cellules épithéliales (Goodwin et al., 2011; Housseau and Sears, 2010; Ko et al., 2016; Ulger Toprak et al., 2006).

Le rôle du microbiote intestinal dans la carcinogenèse colique *via* son interaction avec les systèmes de réparations MMR de l'ADN a été mis en évidence dans un modèle APC<sup>Min/+</sup> déficient pour le gène MSH2. En effet, dans ce modèle, une altération du microbiote par l'utilisation d'antibiotique, entraîne une diminution du développement tumoral. De plus, dans cette étude, il est montré que l'absence de MSH2, permettant la réparation de l'ADN, entraîne une activation de la voie  $\beta$ -caténine induisant une prolifération cellulaire anarchique de l'épithélium colique, cet effet étant dépendant du microbiote colique (Mangerich et al., 2012) (Belcheva et al., 2014). La prévalence *F. nucleatum* chez les patients atteints de CCR de phénotype MSI suggère une association entre cette espèce bactérienne et les défenses anti-oxydantes (Koi et al., 2018; Viljoen et al., 2015; Wei et al., 2016b). De plus, il a été montré qu'*H. hepaticus* diminuait l'expression de certains gènes impliqués dans les défenses anti-oxydantes et/ou la réparation de l'ADN dans un modèle murin de CCR consécutif à une colite induite (Mangerich et al., 2012). Une interférence avec les systèmes de réparation de l'ADN est également suspectée (Koi et al., 2018; Viljoen et al., 2015; Wei et al., 2016b).

L'ensemble de ces travaux montrent donc l'implication du stress oxydant dans la carcinogenèse colique. Cependant, les ROS et RNS étant des composés instables leur demi-vie est relativement courte, de l'ordre de quelques secondes, ainsi l'effet sur les cellules épithéliales de leur production par les cellules immunitaires reste complexe à démontrer *in vivo* (Grivennikov et al., 2010; Terzić et al., 2010).



### ***III.1.3.e. Inflammation chronique***

Le microbiote colique participe à la maturation du système immunitaire. De la même façon le système immunitaire peut également moduler le microbiote (Belkaid and Hand, 2014). Une réponse inflammatoire aberrante, d'origine infectieuse ou autre, dans le tractus intestinal pourrait conduire à une perturbation du microbiote en faveur de l'émergence de pathobiontes. Ces derniers peuvent alors avoir des effets pro-inflammatoires créant ainsi une boucle d'inflammation chronique qui s'auto-entretient. Les dysbioses observées chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques (MICI), chez lesquels le risque de développer un CCR est augmenté, suggèrent le rôle important du microbiote dans l'induction d'une inflammation chronique liée à ce cancer (Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2011; Cunningham et al., 2010; Manichanh et al., 2012). Les principaux mécanismes décrits pour expliquer cet effet mettent en jeu la modulation des récepteurs NLRs et TLRs, décrits précédemment (Arthur et al., 2012; Chen et al., 2008; Couturier-Maillard et al., 2013; Uronis et al., 2009). Plus précisément l'activation de ces récepteurs NLRs auraient plutôt un rôle protecteur alors que l'activation des récepteurs TLRs par les pathogènes induiraient une inflammation pro-tumorale. Des polymorphismes sur les gènes codant pour les récepteurs de l'immunité TLRs et NODs ont été reliés à un risque plus important de développer un CCR chez l'homme (Branquinho et al., 2016; Messaritakis et al., 2018; Pimentel-Nunes et al., 2013). En particulier le TLR4 semble impliqué dans le CCR puisqu'une forte expression de ce récepteur est associée à des stades agressifs de ce cancer (présence de métastases) (D'Alterio et al., 2016; Wang et al., 2010). De plus, il a été mis en évidence que les patients atteints de CCR porteurs d'un variant du récepteur TLR4 (TLR4-D299G), développent plus fréquemment des cancers agressifs avec métastases (Eyking et al., 2011).

L'implication de cette association entre microbiote et inflammation dans le CCR a été mis en évidence dans des modèles murins d'inflammation chronique intestinale (souris IL10<sup>-/-</sup>, Nod2<sup>-/-</sup> traitées à l'AOM et/ou DSS). Une modification du microbiote des souris IL10<sup>-/-</sup> a été observée après le traitement AOM/DSS comparativement à celui des souris non traitées. Il a été montré que l'induction de dysbiose dans des modèles murins IL10<sup>-/-</sup> ou Nod2<sup>-/-</sup> favorise l'augmentation des colites associées au CCR (Arthur et al., 2012; Chen et al., 2008; Couturier-Maillard et al., 2013; Uronis et al., 2009). De plus, cette inflammation est accompagnée d'un développement tumoral plus rapide chez les souris porteuses d'un microbiote conventionnel et traitées à l'AOM, comparativement à des souris axéniques ayant subi le même traitement. Plus





précisément une augmentation du nombre et de la taille des tumeurs a été observée (Couturier-Maillard et al., 2013; Uronis et al., 2009). Ces résultats suggèrent donc que le microbiote peut induire le développement d'un CCR *via* l'augmentation de l'inflammation colique.

L'induction d'un micro-environnement inflammatoire par les bactéries associées au CCR a également été décrite dans des modèles murins et *in vitro*. Par exemple, *B. fragilis* induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-8, MIP-2, CCL2, MCP-1 et CXCL-1 par les cellules épithéliales par l'activation des voies NFκB, p38, COX-2 et β-caténine. Ces cytokines participent au recrutement des macrophages et des polynucléaires favorisant à leur tour l'inflammation au site d'infection (Kim et al., 2002, 2005a, 2008; Ko et al., 2016; Sears, 2009; Wu et al., 2003, 2004). Une augmentation de la réponse LT Th17 par ce pathogène, a également été mise en évidence par l'activation de la voie STAT3 (Wu et al., 2003). Il a été mis en évidence dans le modèle APC<sup>Min/+</sup> que cet effet était impliqué dans les processus de colites, d'hyperplasie intestinale et de tumorigenèse colique (Chung et al., 2018; Housseau and Sears, 2010; Wu et al., 2009). Ces mécanismes pro-inflammatoires induits par *B. fragilis* sont dépendants de la toxine BFT. Une augmentation des cytokines IL-1β, IL-8 accompagnée d'une activation des voies NFκB et COX-2 a été décrite dans des tissus de patient atteint de CCR séropositifs pour *S. gallolyticus* par rapport à des individus séronégatifs pour cette bactérie (Abdulmir et al., 2011). Ces effets ont également été observé et associé à la carcinogène colique dans des modèles animaux (traités à l'AOM) (Ellmerich et al., 2000; Kumar et al., 2018b). D'autres études montrent également le pouvoir pro-inflammatoire de *F. nucleatum* dont l'infection entraîne une augmentation des cytokines IL-1β, IL-8, IL-6 et TNF-α dépendante là encore de l'activation de la voie COX-2 et liée aux recrutement de macrophages (Kostic et al., 2013). L'augmentation de l'IL-8 et de l'IL-6 semblent liée à l'activation de la voie Wnt/β-caténine (Rubinstein et al., 2013). Plus récemment, l'action de *F. nucleatum* sur la prolifération cellulaire a également été mis en évidence sur un même modèle de xénogreffe, où cette fois-ci les voies de signalisation impliquant NFκB et le TLR4 étaient activées, favorisant la prolifération et le potentiel invasif des cellules tumorales (Yang et al., 2017).

Un recrutement massif de macrophages dans la muqueuse colique est également observé après infection par *E. faecalis* (Balish and Warner, 2002; Wang et al., 2012b, 2013; Yang et al., 2012). Les macrophages infectés produisent des mutagènes tels que le 4-Hydroxy-2-Nonenal (4-HNE) favorisant la dysplasie et la carcinogénèse (Wang et al., 2008, 2015). Ils favorisent



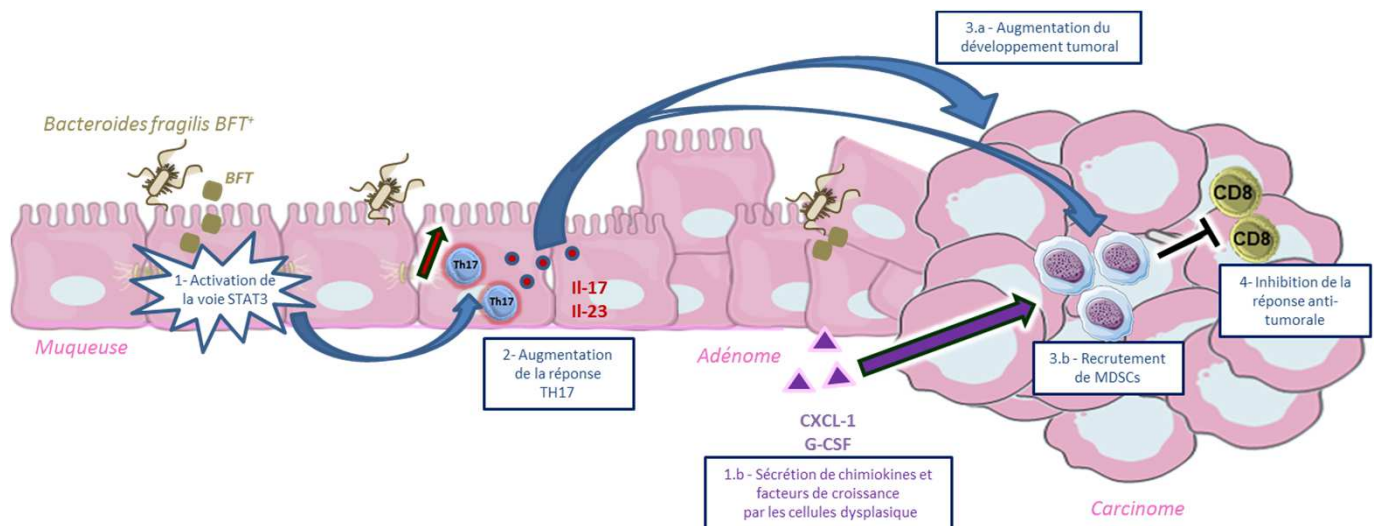
aussi l'apparition de cellules souches cancéreuses par une sur-activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Wang et al., 2017b).

### ***III.1.3.f. Immunité anti-tumorale***

Le microbiote semble pouvoir jouer un rôle également sur les réponses immunitaires pro et anti-tumorales comme le suggèrent de nombreuses études récentes (Cremonesi et al., 2018; Dejea et al., 2018; Kostic et al., 2013; Mima et al., 2015; Thiele Orberg et al., 2017a; Wong et al., 2017; Wu et al., 2009).

Le transfert du microbiote de patients atteints de CCR chez des souris C57BL/6 traitées à l'AOM entraîne une augmentation des LT Th17, connu pour être pro-tumoraux, comparativement aux souris ayant reçu un microbiote d'individus témoins (Bedoui et al., 2018; Grivennikov et al., 2012; Tosolini et al., 2011; Wong et al., 2017). Cette augmentation des Th17 était accompagnée de l'augmentation des cytokines qu'ils produisent : IL-17 $\alpha$ , IL-22 et IL-23 $\alpha$  qui sont elles aussi largement décrites comme des cytokines pro-tumorales dans le CCR (Bedoui et al., 2018; Chae et al., 2010; Flemer et al., 2018; Grivennikov et al., 2012; Huber et al., 2012; Tosolini et al., 2011). De plus, il a été observé que l'expression des gènes codant pour les cytokines CXCL-1 et CXCL-2 attractives des neutrophiles étaient multipliée par quinze chez les souris porteuses du microbiote provenant de patients atteints de CCR par rapport aux souris contrôles (Wong et al., 2017). Ceci suggère que ce microbiote dysbiotique pourrait également agir sur la chimiotaxie de ces cellules que leur rôle pro-inflammatoire rend potentiellement pro-tumorales dans le CCR (Colangelo et al., 2017; Formica, 2014; Powell and Huttenlocher, 2016; Sionov et al., 2014).

Une seconde étude a montré que des cellules tumorales isolées de patients CCR, stimulées par des bactéries commensales, produisent des chimiokines responsables de l'attraction de sous-populations de LT spécifiques (Th1, Th17, Tregs, Th2). De plus *in vivo* dans un modèle de xénogreffe, il a été montré que les cellules tumorales injectées ayant au préalable été stimulées par le microbiote intestinal fécal de patient atteints de CCR, favorisaient un recrutement massif de LT dans les tumeurs comparativement aux cellules n'ayant pas été stimulées par ce microbiote (Cremonesi et al., 2018). Il a été montré dans cette étude que les bactéries associées au CCR, *E. coli*, *B. fragilis* et *Fusobacterium spp* sont capables d'induire l'expression de chimio-attractants des LT *in vitro*. Cependant, aucune conclusion ne peut être



**Figure 24 : Hypothèse de l'induction d'un micro-environnement immunitaire pro-tumoral par *B. fragilis* dans des modèles murins du CCR.** (1) *B. fragilis* serait capable d'activer la voie de signalisation STAT3 dans les cellules épithéliales coliques, ce qui induirait (2) le recrutement de lymphocytes T Th17 et la production massive de cytokines pro-inflammatoires IL-17 et IL-23. (3.a) Cette augmentation de la réponse TH17 aurait alors un effet pro-tumoral sur le côlon de modèles murins prédisposés au CCR. (3.b) De plus, l'IL-17 produite permettrait également le recrutement et la différenciation de cellules myéloïdes immatures (IMC) en cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) dans le micro-environnement tumoral colique. (1.b) Ce recrutement pourrait également être favorisé par la sécrétion de facteurs de croissance (G-CSF) et/ou de chimiokines telles que CXCL-1, par les cellules dysplasiques de la muqueuse après infection par EBFT. (4) Ces MDSCs inhiberaient ensuite la réponse anti-tumorale LT CD8<sup>+</sup>. Source : D'après Wu et al., 2009 et Thiele Orberg et al., 2017

émise concernant l'influence de ces bactéries sur la réponse lymphocytaire T lors de cette étude, car les espèces associées à un fort recrutement de ces cellules immunitaires n'ont pas été identifiées et la fonctionnalité de ces cellules immunitaires n'a pas été étudiée.

D'autres études réalisées sur des modèles de souris mono-colonisées ont également démontré une modulation de ces réponses immunitaires dans la carcinogenèse colique, en ciblant plus particulièrement les bactéries associés au CCR (Kostic et al., 2013; Mima et al., 2015; Thiele Orberg et al., 2017; Wu et al., 2009). Notamment, il a été montré que *B. fragilis* induit la réponse pro-tumorale Lymphocytaire Th17 dans le modèle murins APC<sup>Min/+</sup> et dans des souris C57BL/6 sauvages, par une augmentation de ces cellules immunitaires et de leurs cytokines associées IL-17 et IL-23 dans la muqueuse colique de ces souris. Cet effet est dépendant de la toxine BFT et est initié par l'activation de la voie STAT3. L'importance de cette réponse immunitaire dans la carcinogenèse colique est renforcée par le fait que le nombre de tumeurs diminue chez les souris infectées par EBFT lorsque la fixation des cytokines IL-17 et/ou IL-23 sur leur récepteur est inhibée par un anticorps. Le volume tumoral n'est lui pas affecté par ce blocage, suggérant un rôle plutôt initiateur de ces cytokines (Wu et al., 2009).

Il est également montré que ces cellules produisant l'IL-17 induisent le recrutement de cellules myéloïdes hautement suppressives de la réponse LT anti-tumoral. De même il a été montré une expression forte du checkpoint immunologique inhibiteur PDL-1 sur ces cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) (Thiele Orberg et al., 2017a). Ces effets sont spécifiques des bactéries EBFT et restreints aux tumeurs coliques, ces cellules n'étant pas retrouvées dans la rate et la circulation sanguine des souris infectées par EBFT. Le pouvoir supprimeur de ces cellules sur les LT et notamment les LT CD8<sup>+</sup> a été confirmé *in vitro*. Ainsi, ces résultats montrent que *B. fragilis* en exprimant la toxine BFT, induit un micro-environnement immunitaire pro-carcinogène *via* l'induction d'une réponse pro-tumorale Th17 dans la muqueuse et les tumeurs coliques, qui permet ensuite le recrutement de cellules myéloïdes hautement suppressives (iNOS<sup>high</sup> MDSCs) dans ces tumeurs, ces MDSCs vont ensuite freiner la réponse anti-tumorale en inhibant la réponse Lymphocytaire T (**Figure 24**) (Thiele Orberg et al., 2017a).

Cette augmentation des MDSCs intra-tumorales et particulièrement des iNOS<sup>high</sup> MDSCs a également été rapporté pour l'espèce *F. nucleatum* dans les tumeurs de l'intestin de souris APC<sup>Min/+</sup> (Kostic et al., 2013). En parallèle, il a été montré l'augmentation d'autres cellules myéloïdes pro-tumorales dans ces tumeurs telles que les macrophages associées aux tumeurs (TAMs), les macrophages M2 et les neutrophiles associés aux tumeurs (TAMs). Une



augmentation des cellules dendritiques CD103<sup>+</sup> spécifiquement impliquées dans la différenciation des LT régulateurs, est remarquée. Ces LT régulateurs ont un rôle pro-tumoral lorsqu'ils se retrouvent dans l'infiltrat tumoral car ils inhibent la réponse Lymphocytaire T anti-tumorale (Kostic et al., 2013). Ce lien entre *F. nucleatum* et la réponse anti-tumorale a également été confirmée chez l'homme, où la quantité de ce type bactérien dans les tumeurs et inversement corrélée avec la densité de LT CD3<sup>+</sup> dans l'infiltrat tumoral (Mima et al., 2015).

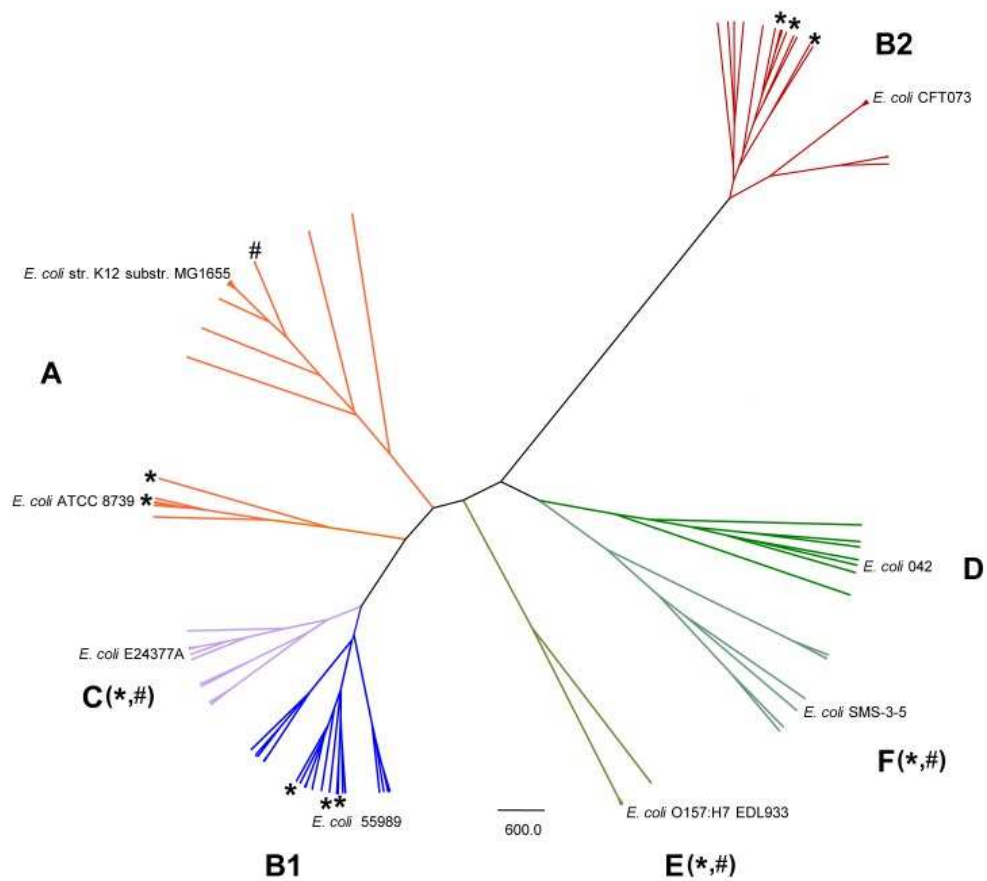
## III.2 -*Escherichia coli* et cancer colorectal

### III.2.1) Présentation générale des *Escherichia coli*

#### III.2.1.a. Généralités

Les bactéries *Escherichia coli* sont des bacilles à Gram négatif, anaérobie facultatif et non-sporulant qui représente environ 0,1% du microbiote humain à l'âge adulte (Eckburg et al., 2005). Elles ont été isolées par Théodore Escherich en 1885 dans des selles de nourrissons. Elles colonisent le tractus digestif dès les premières heures qui suivent la naissance de façon asymptomatique, et persistent ensuite en symbiose dans le côlon et la muqueuse (Freter et al., 1983; Matthews et al., 2013). Ces bactéries possèdent une variabilité génétique importante (Hendrickson, 2009). Plus précisément l'ensemble de leurs gènes est divisé en deux sous-ensembles : un « core-génome » ou « fond commun », composé d'environ 2000 gènes et présent chez toutes les souches de *E. coli* ; et un « fond dérivé », fortement variable entre les souches (Hendrickson, 2009). Cette grande plasticité de son génome, a permis à *E. coli* d'acquérir des facteurs de virulence et/ou adaptatifs lui permettant de coloniser de nouvelles niches écologiques (Hacker and Kaper, 2000; Hendrickson, 2009). Ces facteurs associés ou non à une susceptibilité de l'hôte favorisent l'émergence de souches d'*E. coli* pathogènes (Clements et al., 2012; Croxen and Finlay, 2010).

Les gènes de virulence sont regroupés sur des îlots génomiques et/ou de pathogénicité de 10 à 200kb, différenciables du reste du génome par leurs séquences répétées aux extrémités, par une insertion chromosomique au niveau des gènes codant les ARN de transfert et par une proportion de guanine et cytosine différente du reste du génome (Hacker and Kaper, 2000). Ces facteurs patho-adaptatifs définissent huit groupes phylogénétiques différents dans lesquels sont



**Figure 25 : Diversité phylogénétique des *Escherichia coli*.** Plus de 95% des *E. coli* sont classés selon huit groupes phylogénétiques différents : A, B1, B2, C, D, E ; F et Clade I (non représenté ici). Ces huit phylogroupes sont déterminés par la détection de 13 gènes, exprimés selon des combinaisons différentes pour chaque groupe bactérien. Parmi ces huit phylogroupes, 4 sont majoritaires : le groupe A qui représente 28,7 % des *E. coli*, le groupe B1 (12,3 %) , le groupe B2 (34,5 %) et le groupe D (9,2 %). *Source : Turrientes et al., 2014*

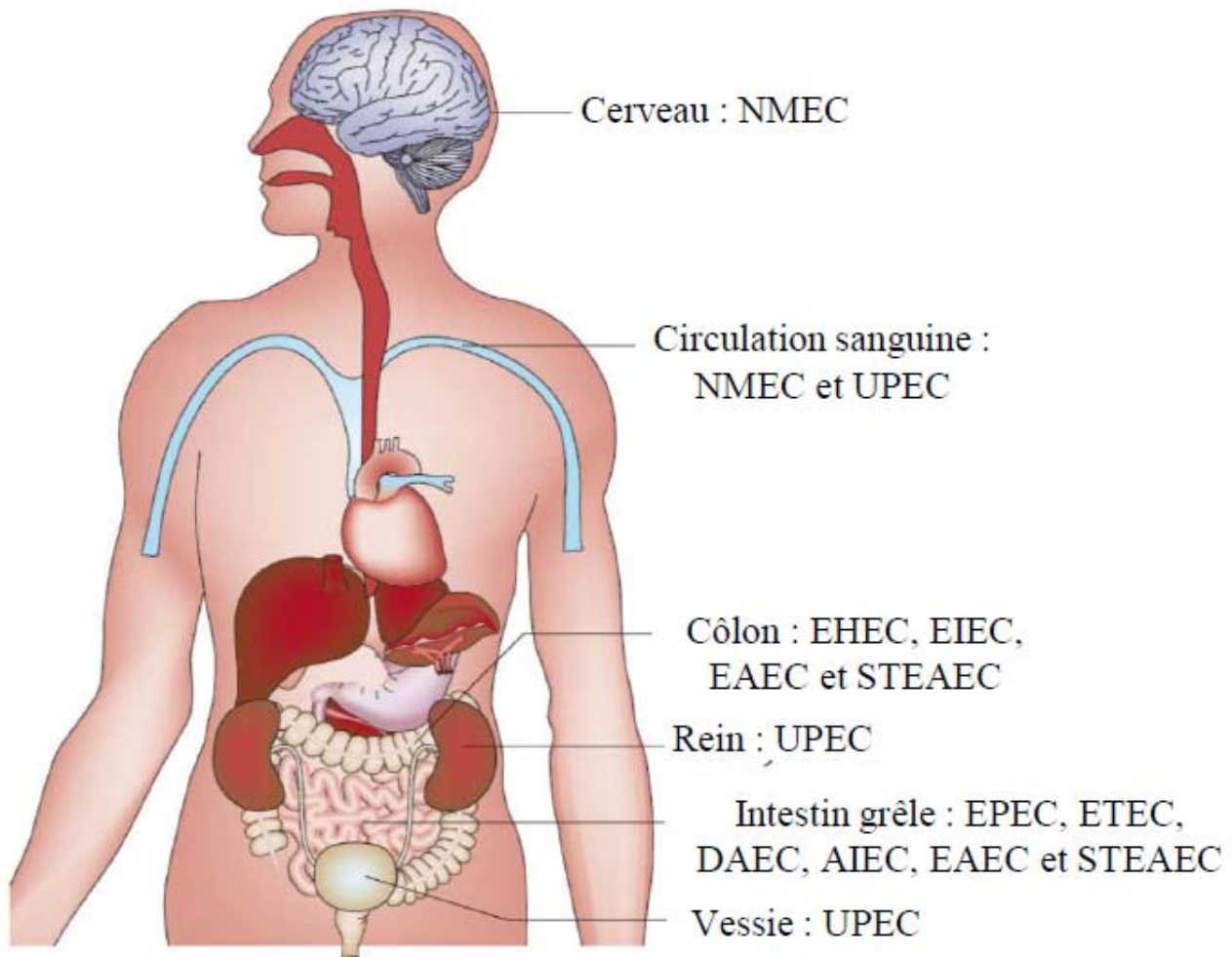


classés plus de 95% des *E. coli* (**Figure 25**). Ces huit phylogroupes sont déterminés par la détection de 13 gènes, présents selon des combinaisons différentes pour chaque phylogroupe (Clermont et al., 2013; Turrientes et al., 2014). Parmi ces huit phylogroupes, 4 sont majoritaires : le groupe A qui représente 28,7 % des *E. coli*, le groupe B1 (12,3 %) , le groupe B2 (34,5 %) et le groupe D (9,2 %) (Clermont et al., 2013). La plus grande partie des souches pathogènes appartient aux groupes B2 et D et entraînent des pathologies intestinales et extra-intestinales. Leur prévalence dans le microbiote intestinal de la population humaine est de plus en plus forte dans les pays industrialisés (Jaureguy et al., 2008)

### ***III.2.1.b. Les souches d'Escherichia coli pathogènes***

En fonction des facteurs de virulence acquis, des environnements colonisés, des caractéristiques d'invasion cellulaire et de la pathologie engendrée, les souches d'*E. coli* pathogènes sont réparties en plusieurs pathovars différents (**Figure 26**). Ces pathovars peuvent être distingués en deux grands groupes en fonction du type d'infection qu'ils causent : Les *E. coli* pathogènes intestinaux et les Extra-intestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC). Les *E. coli* pathogènes intestinaux sont responsables de pathologies intestinales associées à des syndromes diarrhéiques (Croxen and Finlay, 2010). Huit groupes pathogènes principaux existent : les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC, Enterotoxigenic *E. coli*), les *Escherichia coli* entéro-pathogènes (EPEC, Enteropathogenic *E. coli*), les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC, Enterohemorrhagic *E. coli*) dont la souche O157:H7 est impliquée dans les syndromes hémolytiques et urémiques, les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC, Enteroinvasive *E. coli*), les *E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC, Enteroaggregative *E. coli*), les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC, Diffusely-Adhering *E. coli*) (Nataro and Kaper, 1998). Suite à l'épidémie à *E. coli* en Allemagne en 2011, le pathovar des *E. coli* entéroaggrégatifs (STEAEC, Shiga Toxin Enteroaggregative-producing *E. coli*) productrices de Shiga-toxine a été mis en évidence (Clements et al., 2012). Il y a quinze ans, le pathovar des *E. coli* adhérentes et invasives (AIEC, Adherent and Invasive *E. coli*) a été décrit. Il est associé à la forme iléale de la maladie de Crohn (Darfeuille-Michaud et al., 1998, 2004).

Le groupe des ExPEC inclut les pathovars *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*) responsable de méningites et septicémies.



**Figure 26 : Tropisme des différents pathovars d'*Escherichia coli*.** Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), entérotoxigènes (ETEC), à adhésion diffuse (DAEC) et adhérents-invasifs (AIEC) sont présents préférentiellement dans l'intestin grêle, alors que les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et entéroinvasifs (EIEC) colonisent plutôt le côlon. Les *E. coli* entéro-aggrégatifs producteurs ou non de Shiga-toxines (EAEC et STEAEC) peuvent coloniser l'intestin grêle et le côlon. Les *E. coli* uropathogènes (UPEC) sont présents dans la vessie. En fonction des facteurs de virulence portés par les souches, les UPEC peuvent coloniser les voies urinaires. De plus, les UPEC et les neonatal meningitis *E. coli* (NMEC) peuvent être responsables de septicémies.  
Source : D'après Croxen and Finlay, 2010

### III.2.2) Implication des *Escherichia coli* dans le CCR

Plusieurs études indépendantes ont montré que les tumeurs et la muqueuse coliques des patients atteints de CCR sont anormalement colonisées par *E. coli* (Arthur et al., 2012; Buc et al., 2013; Dejea et al., 2018; Maddocks et al., 2013; Martin et al., 2004; Prorok-Hamon et al., 2014; Raisch et al., 2014; Swidsinski et al., 1998). En effet, la première étude de Swidsinski et al., démontrant une association entre *E. coli* associée la muqueuse et CCR, rapporte que celle-ci est détectée chez 70 % des patients atteints par ce cancer, alors qu'elle n'est détectée que chez 3 % des individus sains (Swidsinski et al., 1998). Plus précisément 62 % des patients ayant développé un adénome et 77 % ayant développé un carcinome sont porteurs de ces bactéries au niveau de leur muqueuse (Swidsinski et al., 1998). Cette association a été largement confirmée par la suite. Récemment une étude a montré que *E. coli* était l'une des deux espèces dominantes au sein des biofilms associés à la muqueuse de patients atteints de polyposes adénomateuses familiales (Dejea et al., 2018b).

Les *E. coli* particulièrement impliqués semblent appartenir aux phylogroupes pathogènes B2 et D (Bonnet et al., 2014; Buc et al., 2013; Raisch et al., 2014)

Il a été montré que certaines souches d'*Escherichia coli* isolées chez les patients atteints de CCR portaient des facteurs de virulence identiques à ceux d'*E. coli* uropathogènes (UPEC), qui contribuent notamment à l'activation de la prolifération cellulaire dans le tractus digestif par la production de toxines bactériennes appelées cyclomodulines (Nougayrede et al., 2006). Les données obtenues au sein de notre unité et par le groupe du Professeur Christian Jobin au sein du département de Médecine, Pharmacologie et Immunologie-Microbiologie de l'Université de Caroline du Nord montrent que les *E. coli* producteurs de ces cyclomodulines sont plus fréquemment trouvés dans les biopsies de tumeurs de patients atteints de CCR (66,7%) que dans les biopsies de patients atteints de la MC (40%) par rapport aux patients témoins (20,8%) (Arthur et al., 2012; Buc et al., 2013). Ces toxines ont la particularité de moduler la réponse de l'hôte aux infections bactériennes en interférant directement avec le cycle cellulaire eucaryote, l'apoptose et/ou en altérant l'ADN (Nougayrède et al., 2006). Des études récentes confirment ces données (Bossuet-Greif et al., 2018; Cuevas-Ramos et al., 2010; Dejea et al., 2018; Eklöf et al., 2017; Prorok-Hamon et al., 2014).

D'autres facteurs de virulence ont également été identifiés dans des souches *E. coli* isolées de patients atteints de CCR. La présence d'*E. coli* induisant des lésions d'attachement et d'effacement (AEEC, Attaching and Effacing *E. coli*), dont les pathovars EHEC et EPEC, a été



observée dans 25% des adénocarcinomes de patients atteints de CCR alors qu'elles ne sont pas retrouvées dans la muqueuse saine adjacente (Maddocks et al., 2009). De plus ces souches d'*E. coli* isolées de patients CCR apparentés au pathovar EPEC, ont la capacité d'augmenter la fréquence des mutations au niveau de sites d'instabilité microsatellitaire par la diminution de l'expression de protéines de réparation de dommages à l'ADN, MLH1 et MSH2. Cet effet dépend de l'effecteur bactérien *EspF* qui est injecté dans la cellule hôte par le système de sécrétion de type 3 (SST3) et de la production de ROS par la cellule hôte (Maddocks et al., 2009, 2013).

Enfin, il a été montré que des gènes codant des facteurs de virulence tels que *afaC* (afimbrial adhesin family) dont la détection définit le phénotype DAEC, *lpfA* (long polar fimbriae) et la cyclomoduline nommée colibactine étaient plus fréquemment détectés dans les souches *E. coli* des patients CCR par rapport à des souches de patients contrôles (Prorok-Hamon et al., 2014). Ces facteurs procurent aux bactéries des capacités patho-adaptatives, leur permettant plus précisément d'adhérer aux cellules épithéliales, de transloquer à travers les cellules M, de moduler l'angiogenèse, et d'avoir un effet génotoxique. Cependant ces facteurs ne sont pas détectés dans d'autres études (Eklöf et al., 2017; Raisch et al., 2014).

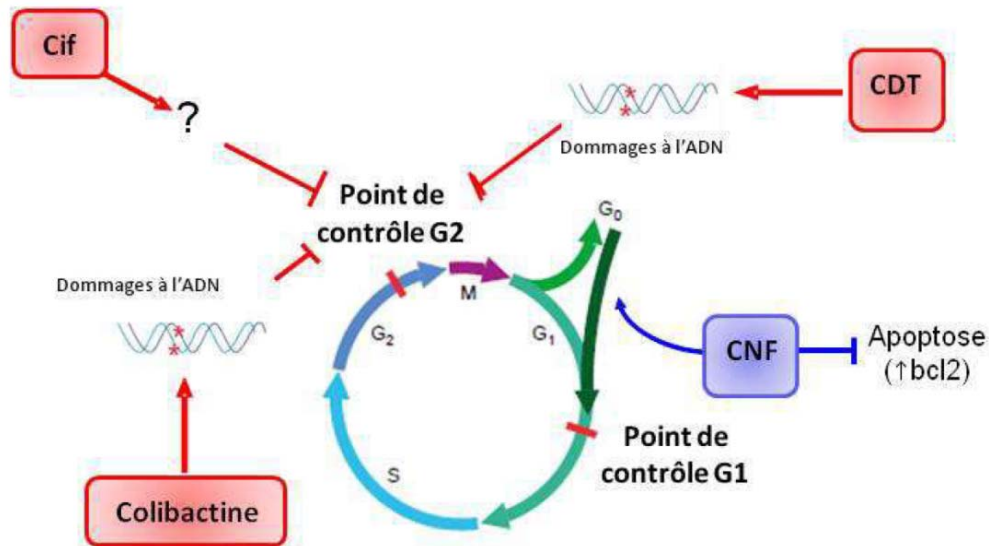
A l'heure actuelle, les souches d'*E. coli* semblent impliquées dans la carcinogenèse colique et notamment les souches porteuses de gènes codant les cyclomodulines mais les études des caractéristiques moléculaires de ces souches (facteurs de virulence prépondérants, type de pathovar) doivent être poursuivies afin de déterminer si ces souches appartiennent à un nouveau ou à certains pathovars déjà décrits.

### III.2.3) Pouvoir pro-carcinogène d'*Escherichia coli* : mécanismes impliqués

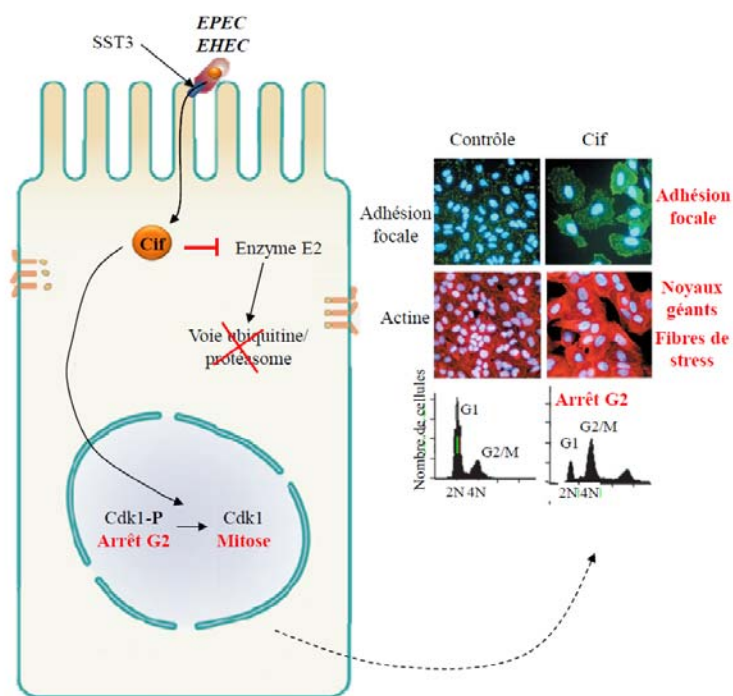
#### **III.3.1.a. *E. coli* et cyclomodulines : focus sur la colibactine**

##### *Généralités : présentation des cyclomodulines*

L'expression de toxines joue un rôle majeur dans le pouvoir carcinogène des *E. coli* pathogènes. La majorité de ces toxines, font partie de la famille des cyclomodulines, qui comme évoqué précédemment interfèrent avec le cycle cellulaire de la cellule hôte soit de façon directe en ciblant des étapes clés du développement cellulaire, soit en induisant des dommages à l'ADN



**Figure 27 : Mécanismes d'action des cyclomodulines produites par *Escherichia coli*.** CDT (« *Cytolethal Distending Toxin* ») induit des dommages sur l'ADN des cellules hôtes, en agissant comme une DNase. La colibactine induit également des dommages à l'ADN et provoque un arrêt du cycle cellulaire à la transition G<sub>2</sub>/M. La génotoxine CNF (« *Cytotoxic Necrotizing Factor* ») force la progression du cycle cellulaire en déclenchant la transition G<sub>1</sub>/S et la réplication de l'ADN. Elle favorise l'apparition d'aberrations nucléaires et bloque l'apoptose. La génotoxine Cif (« *Cycle Inhibiting Factor* ») induit des duplications de l'ADN, et un arrêt irréversible du cycle cellulaire à la transition G<sub>2</sub>/M ou G<sub>1</sub>/S. Sources : Lax et al., 2007; Oswald et al., 2005 et Thèse de Johan Gagnière 2017



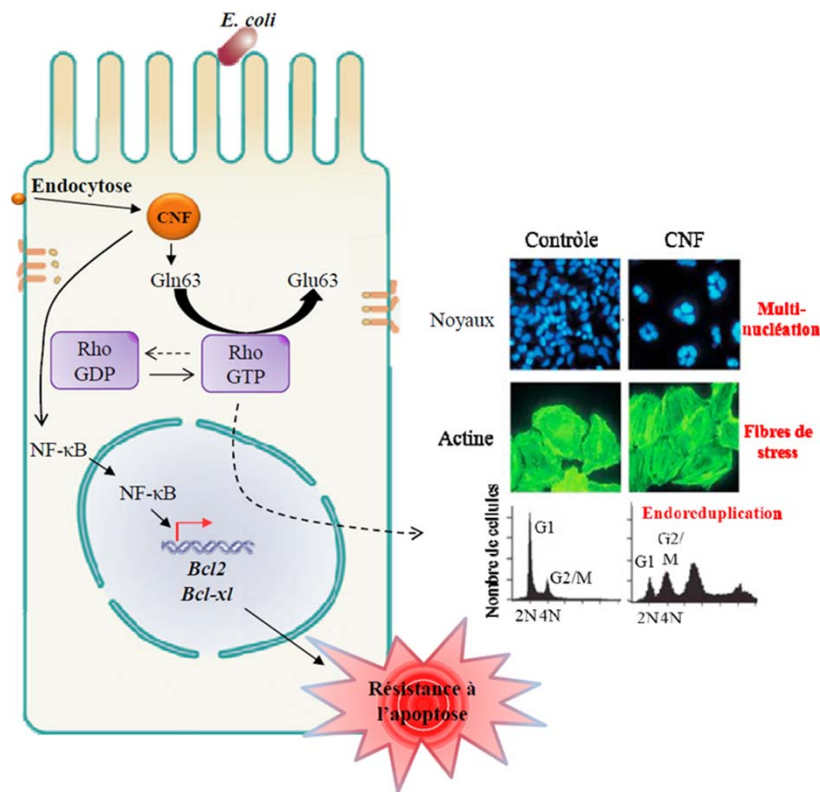
**Figure 28 : Mécanisme d'action de Cif (« *Cycle inhibiting factor* »).** La cyclomoduline Cif (*Cycle inhibiting factor*) est produite par les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC). Elles possèdent un système de sécrétion de type III (SST3) qui va leur permettre d'injecter la génotoxine Cif dans la cellule hôte. Ceci va induire un arrêt du cycle cellulaire en G<sub>2</sub>/M par inhibition de la kinase Cdk1. Cif peut également inhiber l'enzyme E2 de la voie ubiquitine/protéasome et favoriser des dommages cellulaires et nucléaires (par exemple : marquage à la rhodamine-phalloïdine en rouge : fibres de stress d'actine ; marquage de la taline en vert : plaques d'adhésion focale ; marquage au DAPI en bleu : noyaux géant). Sources : D'après Nougayrède et al., 2005 et Thèse de Jennifer Raisch 2014

(Nougayrède et al., 2005; Oswald et al., 2005) (**Figure 27**). Cette famille de toxines particulières a été décrite par les travaux d'Éric Oswald, ils les ont identifiées dans les souches d'*E. coli* (Nougayrède et al., 2005). D'après leurs effets sur la cellule hôte on peut classer ces toxines en deux groupes qui sont : les toxines perturbant les voies de signalisation cellulaires telles que le *cycle inhibiting factor* (Cif) et le *cytotoxic necrotizing factor* (CNF) ; et les génotoxines induisant des lésions directes de l'ADN : la *cytolethal distending toxin* (CDT) et la colibactine (Lax, 2007; Oswald et al., 2005).

Cif est exprimé par moins de 2% des souches d'*Escherichia coli* et notamment par les pathovars EHEC et les EPEC. Elle est également détectée chez *B. pseudomallei*, *P. luminescens*, *P. asymbiotica*, *Y. pseudotuberculosis*. Ces *E. coli* possèdent un locus important dans leur virulence, le LEE (« *Locus of Enterocyte Effacement* »), impliqués dans l'attachement et d'effacement des entérocytes (LEE). Elles portent également un système de sécrétion de type 3 (SST3) qui leur permettent d'injecter Cif dans la cellule eucaryote. Une fois dans la cellule, la toxine va bloquer l'activation de kinases et l'action de protéines inhibitrices de l'ubiquitination, résultant respectivement à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et à une inhibition de la voie ubiquitine/protéasome (**Figure 28**) (Nougayrède et al., 2005; Samba-Louaka et al., 2009). Bien que l'implication de Cif dans la carcinogenèse colique n'a pas été encore mis en évidence, son activité de modulation du cycle cellulaire et de l'ubiquitination pourraient favoriser le développement de ce cancer, en particulier si ces modulations touchent à la protéine suppressive de tumeur p53.

CNF est particulièrement exprimées par des souches d'*E. coli* appartenant aux pathovars UPEC et EPEC. Cette toxine a été décrite pour la première fois en 1983, par les travaux de Caprioli, qui a caractérisé chez les souches d'*E. coli* 3 formes nommées CNF1, CNF2 et CNF3, qui partagent 65 à 90 % d'homologies (Caprioli, 1983). Ce sont des protéines d'environ 115 kDa comportant trois domaines fonctionnels : une extrémité N-terminale qui porte un domaine de liaison de haute affinité au récepteur cellulaire laminine, un domaine centrale qui permet la translocation dans le cytoplasme de la partie C-terminale, qui contient elle-même un domaine enzymatique responsable de la toxicité de ces molécules (Kim et al., 2005b; Lax, 2007; Nougayrède et al., 2005). Il a été mis en évidence une prévalence augmentée d'*E. coli* productrices de CNF chez les patients atteints de CCR (Bronowski et al., 2008; Buc et al., 2013; Raisch et al., 2014).





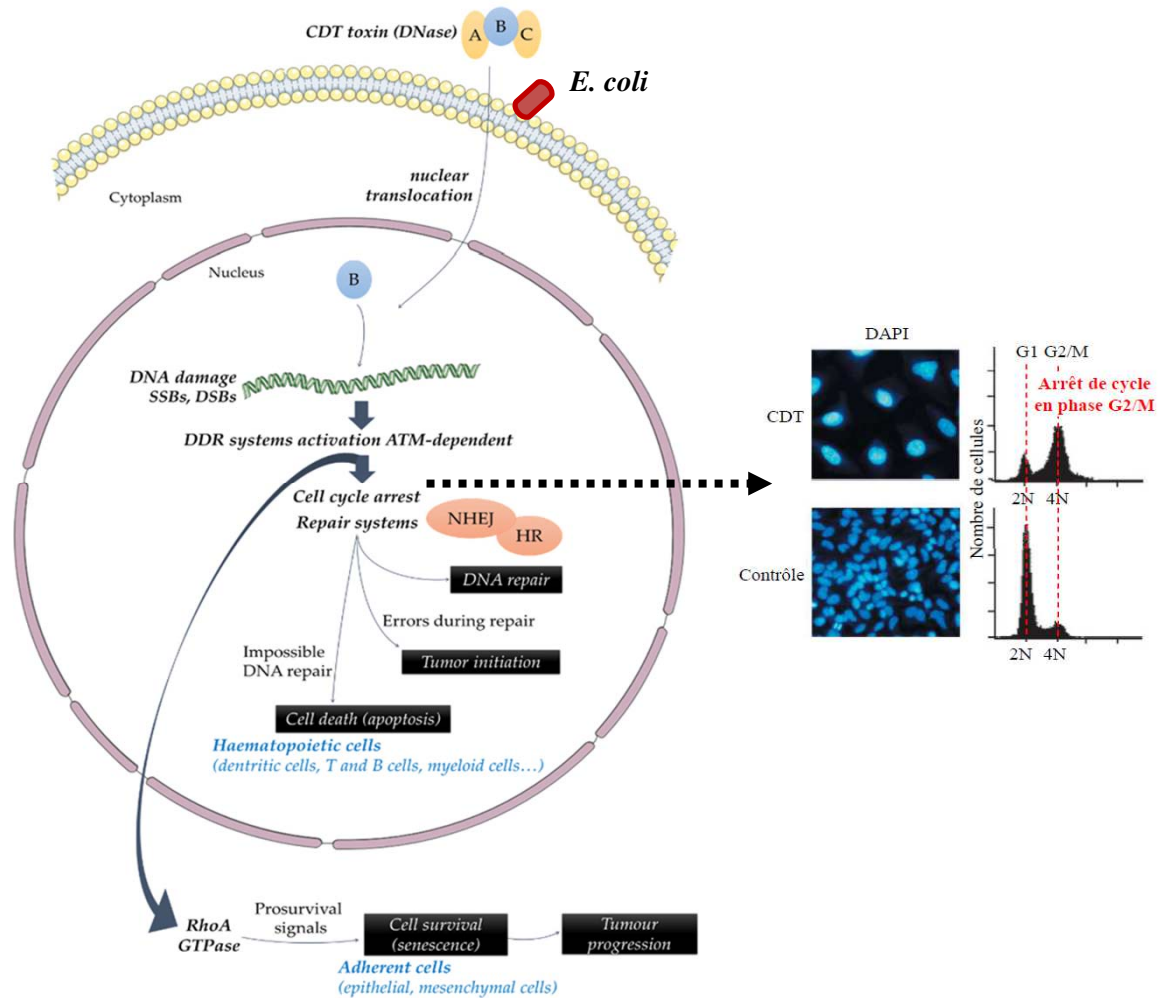
**Figure 29 : Mécanisme d'action de CNF (« Cytotoxic Necrotizing Factor »).** La génotoxine CNF se fixe aux jonctions serrées des cellules hôtes qui l'internalisent par endocytose. Dans le cytoplasme, CNF induit la désamination du résidu glutamine des RhoGTPases, alors converti en glutamate. Le glutamate produit active les RhoGTPases, conduisant à l'apparition de dommages cellulaires et nucléaires (par exemple : marquage à la fluorescéine-phalloïdine en vert : fibres de stress d'actine ; marquage des noyaux au DAPI en bleu : multi-nucléation). Cette génotoxine induit également une endoreduplication (réplication de l'ADN d'un noyau d'une cellule sans division cellulaire) et une résistance à l'apoptose des cellules infectées. *D'après Nougayrède et al., 2005 et Thèse de Jennifer Raisch 2014*



Plus particulièrement l'implication de CNF1 dans le CCR a été décrite chez l'homme (**Figure 29**), elle a une activité transglutaminase qui lui permet de réaliser la désamination ou la polyamination des protéines Rho GTPases (Rho, Rac, Cdc42) (Martin et al., 2004; Nougayrède et al., 2005). Cette activation transitoire des GTPases induit la progression du cycle cellulaire en favorisant la transition G1/S dans le cycle cellulaire, en impactant la production de la cycline D1 et des inhibiteurs de cyclines impliqués dans des points de contrôle du cycle cellulaire. Elle perturbe également la réplication, entraînant la production d'aberrations nucléaires (aneuploïdies, endoréplifications). Ces processus sont médiés par l'inflammation induite par le stress oxydant et les voies NFκB et COX-2 (Nougayrède et al., 2005; Oswald et al., 2005; Travaglione et al., 2008).

CDT peut également être impliquée dans le pouvoir carcinogène des bactéries *E. coli*. Elle est produite par de nombreuses autres espèces bactérienne dont *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, et *Helicobacter hepaticus*. Une étude a montré que les *E. coli* producteurs de cette toxine ne sont pas présents chez des individus contrôles, mais sont détectés chez 12,5 % de patients atteints de CCR, suggérant ainsi leur implication dans le CCR (Buc et al., 2013; Raisch et al., 2014). Cette toxine est composée de trois sous-unités de masse moléculaire variable en fonction des espèces bactériennes : CdtA de 23-30 kDa, CdtB de 28-29 kDa et CdtC de 19-24 kDa. Il existe cinq variants (CDT-I à CDT-V). L'activité toxique est portée par la sous-unité B, qui est délivrée dans la cellule hôte grâce à la fixation des sous-unités A et C à la membrane plasmique de la cellule (Haghjoo and Galan, 2004; Jinadasa et al., 2011). Ses effets ont été étudiés sur des modèles cellulaires *in vitro*. Elle agit comme des DNases en induisant des dommages à l'ADN de la cellule infectée, qui provoquent l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Comayras et al., 1997; Fedor et al., 2013; Frisan et al., 2003; Nougayrède et al., 2006) (**Figure 30**). Ces dommages vont activer le système de réparation de l'ADN qui en faisant des erreurs vont entraîner un état de sénescence si la cellule infectée est une cellule épithéliale ou mésenchymateuse (Blazkova et al., 2010; Cortes-Bratti et al., 1999, 2001), ou une mort par apoptose si la cellule infectée fait partie de la lignée hématopoïétique, telles que les cellules immunitaires (Cortes-Bratti et al., 2001; Hickey et al., 2005; Shenker et al., 2001). Une exposition chronique des cellules épithéliales intestinales à cette toxine, entraîne également des aberrations chromosomiques accompagnée d'une augmentation de la fréquence des mutations, renforçant ainsi son pouvoir génotoxique (Guidi et al., 2013; Taylor et al., 2003).

En plus de ce pouvoir cellule-dépendant, il a été récemment montré que l'effet de cette toxine dépendait également du génotype tumoral des modèles cellulaires étudiés (Grillot et al., 2016).



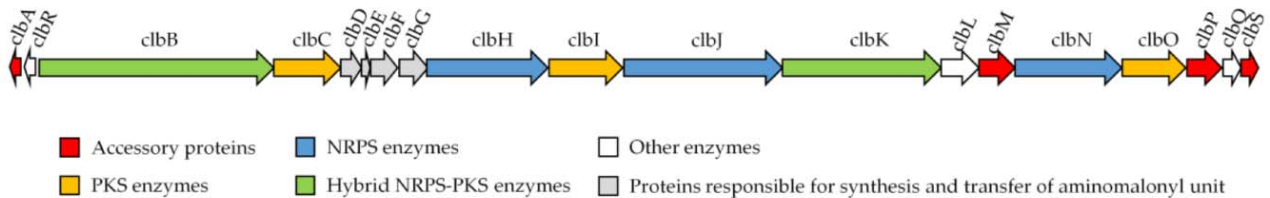
**Figure 30 : Mécanisme d'action de CDT (« *Cytolethal Distending Toxin* »).** La toxine CDT est composée de 3 sous-unités (A, B et C). Les sous-unités A et C se fixent à la membrane plasmique de la cellule hôte et permettent l'internalisation de la sous-unité B qui possède une activité génotoxique. Une fois dans la cellule elle induit des cassures double brin de l'ADN, ce qui a pour conséquence d'activer une cascade de phosphorylations initiée par la protéine ATM. Ceci conduit à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M pouvant aboutir à une mégaloctose. Si les cellules infectées sont des cellules épithéliales ou mésenchymateuses, une sénescence cellulaire sera induite ; s'il s'agit de cellules de la lignée hématopoïétique, telles que les cellules immunitaires, ces mécanisme induiront une mort par apoptose. *Sources : D'après Nougayrède et al., 2005 et Faïs et al., 2016*

### *Focus sur la colibactine*

La cyclomoduline, la plus détectée dans les souches *E.coli* isolées de patients CCR est l'îlot *pks* codant les enzymes de synthèse de la colibactine. Une prévalence plus forte des *E. coli* producteurs de colibactine chez les patients atteints de CCR (55 à 67%) comparativement aux individus sains (20 %) a été détectée (Arthur et al., 2012; Bonnet et al., 2014; Buc et al., 2013; Eklöf et al., 2017; Nakatsu et al., 2015; Prorok-Hamon et al., 2014). Récemment, une étude a également montré une forte prévalence de ces souches chez des patients atteints de polyposes adénomateuses juvéniles (68 %) par rapport aux sujets contrôles (22 %) (Dejea et al., 2018). De plus, ces souches ont été détectées dans des lésions adénomateuses (Eklöf et Nakatsu). Dans les adénocarcinomes, la prévalence augmente avec le stade TNM suggérant une association avec l'agressivité de la maladie (Bonnet et al., 2014). Une étude récente a également démontré une plus forte présence de ces *E. coli* colibactine-positives chez des patients atteints de CCR de phénotype MSS, qui reste de mauvais pronostic (Gagnière et al., 2017).

La colibactine a été identifiée pour la fois en 2006 par Nougayrède et al., chez la souche d'*E. coli* IHE3034 isolée d'une méningite bactérienne néonatale (Nougayrède et al., 2006). Sa structure précise reste inconnue à ce jour. Il s'agit d'un composé hybride « *Polyketide-Non Ribosomal Peptide* » (PK-NRP) dont la synthèse est assurée par une machinerie d'enzymes codées par l'îlot génomique de pathogénicité nommé « *pks* » (polyketide-synthase). Cet îlot de 54 kpb est composé de 19 gènes (*clbA* à *clbS*) codant pour trois NRPS (non-ribosomal peptides megasynthase : ClbH, ClbJ, ClbN), trois PKS (polyketide megasynthases : ClbC, ClbI, ClbO), deux hybrides NRPS/PKS mégasynthases (ClbB, ClbK) et neuf enzymes accessoires (**Figure 31**). Des techniques de mutagenèse ont pu montrer que toutes les NRPS, PKS et enzymes accessoires sont essentielles à la production de la colibactine active, (Nougayrède et al., 2006). En plus d'être présent chez certaines souches d'*E. coli*, cet îlot *pks* est également détecté chez les espèces *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* et *Citrobacter koseri* (Faïs et al., 2018; Taieb et al., 2016). De manière intéressante l'expression de l'îlot *pks* dans les souches est souvent associée à l'expression d'autres facteurs de virulence, comme les gènes codant la cyclomoduline CNF, les adhésines des fimbriae P (PapC) et de type 1 (FimH) ou/et de l'hémolysine HlyA suggérant que l'îlot *pks* est associé à des souches particulièrement virulente du phylogroupe B2 (Buc et al., 2013; Dubois et al., 2010; Johnson et al., 2008; Nowrouzian and Oswald, 2012; Prorok-Hamon et al., 2014; Putze et al., 2009; Raisch et al., 2014).

Protein	Function and Role in Colibactin Production	Protein	Function and Role in Colibactin Production
ClbA	Accessory protein: phosphopantetheinyl transferase Activates other enzymes (favors placement of cofactor)	ClbI	Synthesis enzyme: PKS
ClbR	Putative regulatory protein	ClbJ	Synthesis enzyme: NRPS
ClbB	Synthesis enzyme: hybrid NRPS-PKS	ClbK	Synthesis enzyme: hybrid PKS-NRPS
ClbC	Synthesis enzyme: PKS	ClbL	Synthesis enzyme: amidase
ClbD	Synthesis enzyme: hydroxyl acyl coA dehydrogenase	ClbM	Accessory protein: MATE transporter Transports precolibactin across the cytoplasmic membrane
ClbE	Synthesis protein: acyl carrier protein	ClbN	Synthesis enzyme: NRPS
ClbF	Synthesis enzyme: $\alpha\beta$ dehydrogenase	ClbO	Synthesis enzyme: PKS
ClbG	Synthesis enzyme: acyl transferase	ClbP	Accessory protein: <i>fmtA</i> peptidase Transports precolibactin from the cytoplasm to the periplasm and clives precolibactin into genotoxic colibactin
ClbH	Synthesis enzyme: NRPS	ClbQ	Synthesis enzyme: thioesterase
ClbI	Synthesis enzyme: PKS	ClbS	Accessory protein Inactivates colibactin in order to protect bacterial cell

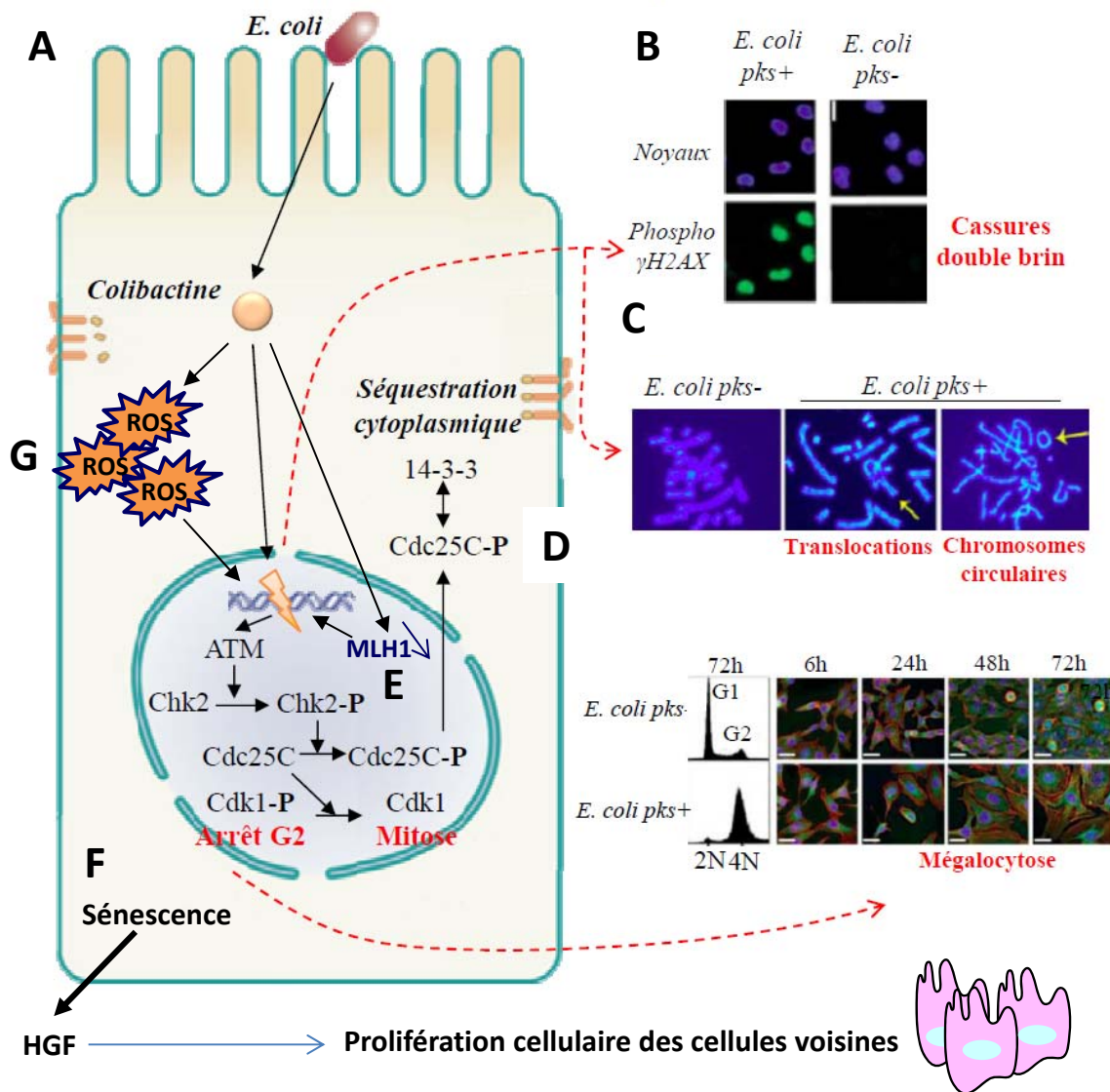


**Figure 31 : Organisation de l'îlot génomique *pks*.** L'îlot génomique *pks* (54 kb) est composé de 19 gènes (*clbA* à *clbS*) codant pour trois NRPS (non-ribosomal peptides megasynthase : ClbH, ClbJ, ClbN), trois PKS (polyketide megasynthases : ClbC, ClbI, ClbO), deux hybrides NRPS/PKS mégasynthases (ClbB, ClbK) et neuf enzymes accessoires. Chacun de ces composants permet la synthèse de la colibactine active. *Source : Faïs et al., 2018*

La mise en évidence du pouvoir carcinogène des souches *E. coli* porteuses de l'îlot *pks* a été réalisée *in vitro* et *in vivo* dans différents modèles murins de prédispositions au CCR (Arthur et al., 2014, 2014; Bonnet et al., 2014; Bossuet-Greif et al., 2018; Cougnoux et al., 2014; Cuevas-Ramos et al., 2010; Dalmaso et al., 2014; Dejea et al., 2018; Healy et al., 2016; Nougayrède et al., 2006; Raisch et al., 2015; Tomkovich et al., 2017; Vizcaino and Crawford, 2015). Ainsi, il a été démontré que l'infection de souris prédisposées au CCR ou de modèles de xenogreffes, induit une augmentation du développement tumoral dépendante de la production de la colibactine (Arthur et al., 2012, 2014; Bonnet et al., 2014; Cougnoux et al., 2014; Dalmaso et al., 2014; Dejea et al., 2018; Raisch et al., 2015; Tomkovich et al., 2017) Arthur et al., 2012, 2014; Cougnoux et al., 2014; Dejea et al., 2018). Ces souches *E. coli* colibactine-positives sont capables de persister dans le tube digestif des souris infectées et d'induire l'augmentation du nombre de tumeurs et du volume tumoral suggérant un rôle pro-carcinogène dans ces modèles (Arthur et al., 2012, 2014; Bonnet et al., 2014; Cougnoux et al., 2014; Dalmaso et al., 2014; Tomkovich et al., 2017). De façon intéressante, il a été mis en évidence dans un modèle murin (rat), que la transmission de souches d'*E. coli* colibactine-positives par la mère entraînait l'apparition de dommages à l'ADN chez les rats nouveau-nés qui se traduisait notamment par une altération de la barrière intestinale chez l'adulte, suggérant que ces phénomènes peuvent être précoces (Payros et al., 2014).

Des expériences *in vivo* et *in vitro* ont permis de préciser les mécanismes d'action de la colibactine en lien avec ce pouvoir carcinogène (**Figure 32**). Notamment il a été montré que les souches *E. coli* colibactine-positives induisent des cassures double brins (Cuevas-Ramos et al., 2010; Gagnière et al., 2017; Nougayrède et al., 2006). Il a été montré que la colibactine induisait un stress oxydant *via* la production de ROS mais aussi la diminution des systèmes de réparation de l'ADN qui entraînent des dommages à l'ADN dans les cellules infectées (Gagnière et al., 2017). Cet effet sera détaillé ci-dessous.

Lorsque ces dommages ne sont pas réparés correctement, notamment lors d'infection avec un faible nombre de bactéries *E. coli* colibactine-positives, il a été observé une augmentation des aberrations chromosomiques et de la fréquence de mutations génétiques (Cuevas-Ramos et al., 2010). *In vitro*, il a également été montré que les cellules ayant été au contact de ces bactéries colibactine-positives développaient de manière colibactine dépendante des mégaloctes (Cuevas-Ramos et al., 2010; Nougayrède et al., 2006; Vizcaino and Crawford, 2015).



**Figure 32 : Mécanismes d'action de la colibactine.** La colibactine est un composé hybride PK/NRP génotoxique. **A.** Le contact des bactéries *E. coli* colibactine-positives avec les cellules infectées induit de nombreux mécanismes pouvant être impliqués dans la carcinogénèse. **B.** Cette génotoxine peut induire des cassures double brin de l'ADN (vert : immunomarquage de l'histone  $\gamma$ H2AX ; bleu : marquage du noyau par le DAPI). **C.** Les dommages de l'ADN induits peuvent générer d'importants remaniements chromosomiques (bleu : translocations et formation de chromosomes circulaires). **D.** Toutes ces lésions activent la cascade ATM/Chk2 qui conduit à la phosphorylation de la protéine Cdc25c qui est alors séquestrée dans le cytoplasme. La protéine Cdc25c ne peut plus phosphoryler la protéine Cdk1, ce qui conduit à un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M pouvant aboutir à une mélagocytose (bleu : noyau ; rouge : cytosquelette d'actine ; vert :  $\alpha$ -tubuline). **E.** La colibactine induit une diminution de la protéine MLH1 appartenant aux systèmes de réparation de l'ADN ce qui amplifie les dommages à l'ADN. **F.** Un profil de sénescence cellulaire des cellules infectées par *E. coli* colibactine-positives favoriserait la prolifération anarchique des cellules environnantes. **G.** La colibactine active la production de ROS par les cellules infectées. Sources : D'après Nougayrède et al., 2005 ; Nougayrède et al. 2006 ; Cuevas-Ramos et al., 2010 ; Thèse de Jennifer Raisch 2014 ; Cougnoux et al., 2014 ; Gagnière et al., 2017

De façon intéressante, il a été montré que l'inhibition de la synthèse de la colibactine, par l'utilisation d'inhibiteurs des protéines Clbs, entraîne une diminution des dommages à l'ADN et de la prolifération cellulaire normalement induite par *E. coli* colibactine-positives, dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. *In vivo*, il en résulte une diminution de la croissance tumorale, confirmant l'importance de la colibactine dans le pouvoir carcinogène de la souche (Cougnoux et al., 2016).

D'autres mécanismes de la colibactine, impliquant des effets en lien avec le micro-environnement de ces bactéries, ont également été mis en évidence. Elle est notamment responsable de l'induction de phénomènes de sénescence cellulaire et de la sécrétion de facteurs de croissance (HGF) par les cellules infectées qui stimulent la prolifération cellulaire des cellules voisines (Cougnoux et al., 2014, 2016; Dalmasso et al., 2014).

De plus, des études sur des modèles murins de colites associées au CCR (souris IL10<sup>-/-</sup> ou Rag2<sup>-/-</sup> IL-10<sup>-/-</sup>) ont démontré qu'un micro-environnement inflammatoire est essentiel au pouvoir carcinogène des souches *E. coli* colibactine-positives, car il permet l'expression de gènes nécessaires pour la synthèse de la colibactine (Arthur and Jobin, 2013; Arthur et al., 2014; Tomkovich et al., 2017).

Récemment, il a été rapporté que la co-colonisation d'un modèle murin de CCR (APC<sup>Min/+</sup> et APC<sup>Min/+</sup> IL10<sup>-/-</sup>) par *E. coli* colibactine-positives et *B. fragilis* BFT-positives induisait une accélération du développement tumoral accompagnée d'une réponse inflammatoire LT Th17 par rapport aux modèles mono-colonisés correspondant, suggérant une synergie possible des effets carcinogènes de ces deux bactéries associées au CCR (Dejea et al., 2018).

Tous ces mécanismes participeraient à modifier le micro-environnement et entraîneraient la mise en place d'un territoire pro-carcinogène et/ou pro-inflammatoire qui favoriserait la croissance des cellules tumorales et une modulation du cycle cellulaire.

### **III.3.1.b. *E. coli* et stress oxydant**

De nombreuses études, essentiellement *in vitro*, ont montré les capacités des souches *E. coli* à induire un stress oxydant soit par la production de ROS, soit par une diminution des systèmes de réparation de l'ADN.

Certaines souches d'EPEC sont capables de diminuer *in vitro* les protéines MLH1 et MSH2 impliquées dans ces mécanismes de réparation, comme le décrit les études de Maddocks et al., (Maddocks et al., 2013; Maddocks et al., 2009).





Comme il vient d'être évoqué, ce stress oxydant peut être dépendant de l'activité de toxines, telle que la colibactine. En effet, les *E. coli* colibactine-positives induisent la production d'espèces oxydantes conduisant à des dommages à l'ADN (Cuevas-Ramos et al., 2010; Gagnière et al., 2017; Nougayrède et al., 2005). De plus une étude récente montre que ces souches sont capables d'inhiber l'expression de la protéine MLH1. Cette altération du système MMR favorise la colonisation par ces *E. coli* spécifiques et induit une instabilité génomique chez les cellules de l'hôte (Gagnière et al., 2017). L'implication du stress oxydant induit par la colibactine, est confirmée par l'utilisation d'antioxydant qui permet de limiter les effets des *E. coli* colibactine-positives, en diminuant (i) la production de ROS, (ii) la baisse des protéines de réparation de l'ADN, et (iii) l'induction de dommages à l'ADN liées à l'infection par ces bactéries (Gagnière et al., 2017).

L'induction de ROS par ces souches spécifiques a également été observée sur un modèle murin de xénogreffe de cellules tumorales de CCR, lors d'une récente étude (Veziat et al., 2016).

Ces résultats montrent donc l'importance de la modulation du stress oxydant mais également du système de réparation de l'ADN dans le pouvoir de colonisation des cellules coliques de ces souches mais également dans leur pouvoir carcinogène.

### ***III.3.1.c. E. coli, inflammation et immunosurveillance***

Concernant l'effet des souches *E. coli* colibactine-positives sur le système immunitaire, bien que peu de travaux aient étudiés l'effet potentiellement modulateur de ces souches sur des cellules immunitaires, il a été montré un lien intéressant entre ces souches et l'inflammation associée au CCR. Tout d'abord, il a été montré *in vitro* que les *E. coli* isolés de patients CCR peuvent induire l'expression du gène codant pour l'enzyme pro-inflammatoire COX-2 dans les macrophages, indépendamment de la présence de l'îlot *pks* (Raisch et al., 2015). Bien qu'il a déjà été observé une augmentation de cette enzyme par la souche *E. coli* uropathogène J96 via l'activation de voies de signalisation dépendantes du récepteur TLR4 (Chen et al., 2011), ce type de mécanisme n'est pas impliqué dans l'induction de COX-2 par les souches *E. coli* associées au CCR (Raisch et al., 2015).

D'autres études ont également montré une induction de mécanismes pro-inflammatoires non dépendant de l'îlot *pks* mais uniquement dans des modèles de CCR associés aux colites (Arthur et al., 2014; Raisch et al., 2014; Tomkovich et al., 2017). En particulier, des travaux récents étudiant le profil cytokinique pro-inflammatoire intestinal, montrent une augmentation



des cytokines IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-22 et IL-17 après infection par les souches d'*E. coli* colibactine-positives et *E. coli* colibactine-négatives dans un modèle APC<sup>Min/+</sup> IL10<sup>-/-</sup> (Tomkovich et al., 2017). Ainsi, les *E. coli* colibactine-positives pourraient agir lors des stades précoces de la tumorigenèse colique et favoriser un micro-environnement qui permet la colonisation d'autres *E. coli* capable d'induire une inflammation.

Concernant plus particulièrement l'effet de ces bactéries sur l'immunosurveillance, peu d'études sont publiées concernant leur influence sur l'équilibre entre la réponse pro- et anti-tumorale. De manière intéressante, ce type de bactéries est détecté avec une prévalence plus forte dans les tumeurs de patients atteints de CCR de phénotype MSS (Gagnière et al., 2017), pour lesquels il a été également observé que l'infiltrat tumoral était moins dense en cellule immunitaires, et notamment en LT, par rapport au phénotype MSS de ce cancer (Llosa et al., 2015) suggérant qu'un lien peut être envisagé entre ces deux observations. Une étude sur des souris C57BL/6 sauvages n'a pas montré d'effet de la souche *E. coli* productrice de colibactine sur les populations myéloïdes et certaines populations de LT (Th1, Th17, CD8<sup>+</sup>) mais il est important de noter que ces travaux étaient effectués sur des souris sauvages chez lesquelles le pouvoir carcinogène de ce type de bactéries n'a pas été observée (Bonnet et al., 2014). De la même façon, cette étude n'a pas montré les effets de *F. nucleatum* sur les cellules immunitaires, observés chez les souris APC<sup>Min/+</sup> (Thiele Orberg et al., 2017b).

Comme évoqué précédemment, une étude plus récente montre que la co-infection de souris C57BL/6 axéniques traitées avec de l'AOM, par *E. coli* colibactine-positives et *B. fragilis* BFT-positives induit une augmentation de l'IL-17 alors que celle-ci n'est pas observée chez les souris mono-colonisées par *E. coli* colibactine-positives ou EBFT (Dejea et al., 2018). Cet effet suggère donc que *E. coli* colibactine-positives pourrait comme les autres bactéries associées au CCR participer à la modulation du micro-environnement immunitaire colique.



### III.3- Microbiote intestinal: un nouveau facteur pronostique

#### III.3.1) Implication des dysbioses dans la réponse aux traitements

##### ***III.3.1.a. Cicatrisation et complication après chirurgie***

L'influence du microbiote dans la régénération et la réparation de la muqueuse intestinale est liée à son rôle dans l'homéostasie intestinale décrit précédemment. (Hooper et al., 2001). De la même façon le microbiote peut avoir un effet bénéfique ou délétère sur la cicatrisation mucosale après un épisode inflammatoire (Meneghin and Hogaboam, 2007; Souza et al., 2004). Il est décrit que les espèces *Akkermansia muciniphila* et *Lactobacillus spp* auraient un effet positif en stimulant la prolifération et la migration cellulaire (Alam et al., 2016; Collier-Hyams et al., 2005; Kumar et al., 2009; Wentworth et al., 2010). Les mécanismes mis en jeu impliqueraient la reconnaissance des bactéries par les récepteurs TLRs de l'immunité innée (Rakoff-Nahoum et al., 2004) et/ou la production de ROS et RNS par les cellules épithéliales (Chan et al., 2009; Cordeiro and Jacinto, 2013) dont les liens avec les mécanismes cellulaires a été précédemment décrits dans ce manuscrit. L'utilisation d'une antibiothérapie avant opération chirurgicale afin de diminuer le risque d'infection post-chirurgie, est également liée à la perte de la fonction protectrice du microbiote sur le système immunitaire et les fonctions de régénération de la muqueuse (Bachmann et al., 2017; Guyton and Alverdy, 2017). Certaines espèces sont plus spécifiquement associées à la fistule anastomotique, une des complications les plus fréquentes observées après une exérèse du côlon. Notamment, il a été rapporté une augmentation de la prévalence de *E. faecalis* au niveau des tissus présentant ces anomalies (Kaffarnik et al., 2012; Komen et al., 2014). De la même manière, une augmentation de l'abondance de *Bacteroides spp* et *Clostridium spp* dans les tissus coliques de personnes âgées par rapport aux jeunes adultes est liée à l'augmentation du risque de fistule anastomotiques associé à l'âge (Claesson et al., 2011). A l'inverse, la diminution des bactéries appartenant à la famille des *Lactobacillaceae* est observée dans les tissus anastomotiques (Mack et al., 2003; Mennigen et al., 2009; Okada et al., 1999).



### ***III.3.1.b.Réponse aux chimiothérapies***

L'efficacité de certaines chimiothérapies peut être régulée directement par les bactéries présentes dans l'infiltrat tumoral mais aussi *via* la modulation de la réponse immunitaire (Bronckaers et al., 2008; Geller et al., 2017; Lehouritis et al., 2015; Vande Voorde et al., 2014; Yu et al., 2017b) (Daillère et al., 2016; Iida et al., 2013; Kuczma et al., 2017; Viaud et al., 2013; Xu and Zhang, 2015).

Tout d'abord, par son rôle dans la dégradation de composant non digestibles par l'homme, le microbiote peut être impliqué dans le métabolisme des molécules chimiothérapeutiques, influençant ainsi l'efficacité de ces traitements (Bronckaers et al., 2008; Espín et al., 2017; Guthrie et al., 2017; Takasuna et al., 1996; Vande Voorde et al., 2014; Wallace et al., 2010). Il a été décrit que les espèces *Bacteroides eggerthii* et *Bacteroides vulgatus* augmentent la toxicité du 5-fluorouracil (5-FU) lorsqu'il est combiné à la sorivudine (un composé anti-viral), ceci réduisant donc son efficacité (Nakayama et al., 1997). Plus récemment, le rôle des bactéries porteuses de l'enzyme cytidine deaminase, telles que les gammaprotéobactéries, dans la résistance aux chimiothérapies, la gemcitabine et l'oxaliplatine, a également été montré (Geller et al., 2017). De la même façon, l'efficacité et les effets secondaires de l'irinotecan, sont influencés par les bactéries porteuses de la  $\beta$ -glucuronidase telles que *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium spp.*, et *Bacteroides spp.* (Guthrie et al., 2017; Wallace et al., 2010).

En plus de ces effets directs de certaines bactéries par leur pouvoir métabolique, sur la réponse aux chimiothérapies, il a été mis en évidence d'autres effets impliquant la modulation du système immunitaire ou de l'activité des cellules épithéliales coliques. Notamment, dans un modèle de greffes syngéniques sous-cutanée du CCR (cellules MC-38), il a été observé que les souris axéniques ou traitées par antibiotiques ne répondaient pas au traitement utilisant l'oxaliplatine comparativement à des souris porteuses d'un microbiote conventionnel. Bien que les espèces bactériennes permettant la réponse à ce traitement n'aient pas encore identifiées, l'efficacité de l'oxaliplatine est renforcée par la présence de cellules myéloïdes productrices de ROS (Iida et al., 2013). De plus, l'implication de *F. nucleatum* dans l'induction d'une résistance à l'oxaliplatine et au 5-FU via une activation de l'autophagie a été décrite *in vitro* sur les lignées cellulaires du CCR HT29 et HCT116, mais également sur des modèles murins de xénogreffes et chez des patients atteints de CCR (Yu et al., 2017b).





Le microbiote intestinal peut également moduler la réponse des chimiothérapies utilisées pour d'autres tumeurs solides comme le mélanome, le cancer du poumon et le sarcome, grâce à un dialogue complexe avec le système immunitaire (Daillère et al., 2016; Iida et al., 2013; Kuczma et al., 2017; Viaud et al., 2013; Xu and Zhang, 2015). La plupart des études ciblent le cyclophosphamide, pour lequel il a été montré que l'efficacité est diminuée par les dysbioses induites par l'utilisation d'antibiotiques (Daillère et al., 2016; Kuczma et al., 2017; Viaud et al., 2013; Xu and Zhang, 2015). Il a été démontré que les bactéries *Enterococcus hirae* et *Barnesiella intestinihominis* peuvent améliorer la réponse au cyclophosphamide via une activation de la réponse anti-tumorale lymphocytaire T (LT CD8<sup>+</sup> cytotoxique, LT Th1 et LT Tc1). La première de ces espèces a la capacité de transloquer dans les organes lymphoïdes secondaires où elle initie cette activation des effecteurs immunitaires alors que la deuxième exerce son effet depuis le côlon (Daillère et al., 2016; Viaud et al., 2013).

### ***III.3.1.c. Réponse aux immunothérapies***

Le microbiote peut également moduler la réponse aux immunothérapies ciblant les checkpoints immunologiques, CTLA-4 (Chaput et al., 2017; Vetizou et al., 2015a), PD-1 (Gopalakrishnan et al., 2018; Matson et al., 2018; Routy et al., 2018b), et PDL-1 (Sivan et al., 2015). Trois études indépendantes ont montré récemment que le microbiote intestinal peut être utilisé pour discriminer les patients répondeurs des non répondeurs, aux traitements ciblant par anticorps l'axe PD-1/PDL-1 dans différents types de tumeurs (Gopalakrishnan et al., 2018; Matson et al., 2018; Routy et al., 2018a). Lors d'une étude sur la réponse à un anti-PD-1 chez l'homme, il a été remarqué une plus forte abondance de l'espèce *E. coli* chez les patients non-répondeurs que chez les patients répondeurs (Gopalakrishnan et al., 2018).

De plus, des travaux sur des modèles murins de greffes sous-cutanées de CCR, ont mis en évidence que l'espèce *Bacteroides* favorise l'efficacité d'un anticorps anti-CTLA-4 (Vetizou et al., 2015a) en stimulant la réponse anti-tumorale lymphocytaire T. Une autre étude a montré une augmentation de la réponse à un anti-PDL-1 par deux espèces de *Bifidobacterium* via le même mécanisme (Sivan et al., 2015). Les bactéries associées au CCR sont capables de moduler les réponses des cellules impliquées dans la réponse aux immunothérapies : les cellules myéloïdes (Kostic et al., 2013; Park et al., 2017; Thiele Orberg et al., 2017a) et les LT (Bhattacharya et al., 2016; Cremonesi et al., 2018; Dejea et al., 2018; Mima et al., 2015; Wu et



al., 2010b), suggérant une potentielle implication de ces bactéries sur la réponse à ce type de traitement.

Une autre type d'immunothérapie basé sur le transfert adoptif de LT peut également être modulé par le microbiote, comme il a été montré dans de nombreux modèles (Kuczma et al., 2017; Paulos et al., 2007; Uribe-Herranz et al., 2018) incluant un modèle murin de CCR (Kuczma et al., 2017). Ceci suggère que le microbiote colique devra être pris en compte pour les futures études cliniques concernant ce type de thérapies.

Enfin, la réponse aux immunothérapies pourrait être améliorée par l'utilisation de probiotiques ou de prébiotiques ciblant les dysbioses impliquées dans la résistance. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la résistance aux immunothérapies observée chez les souris axéniques, ou traitées par antibiotiques, ou ayant reçu le microbiote colique de patients non répondeurs à ce type de traitement, peuvent être contrecarrés en inoculant le microbiote de patients répondeurs à ces souris (Gopalakrishnan et al., 2018; Matson et al., 2018; Routy et al., 2018b; Vetizou et al., 2015a). Des espèces spécifiques ont été mises en évidence chez la souris et chez l'homme, à travers ces différentes études pour leur effet bénéfiques sur la réponse à ce type de traitement, telles que *Lactobacillus johnsonii* (Viaud et al., 2013), *Enterococcus hirae* (Daillère et al., 2016; Viaud et al., 2013), *Barnesiella intestinihominis* (Daillère et al., 2016), *Akkermansia muciniphila* (Routy et al., 2018b), *Bacteroides* (Vetizou et al., 2015b) et *Bifidobacterium* (Matson et al., 2018; Sivan et al., 2015), ouvrant la voie au développement de nouveaux outils thérapeutiques, les « onco-biotiques ».

### III.3.2) Le microbiote : un nouveau facteur pronostique

De plus en plus d'études cliniques suggèrent que le microbiote intestinal pourrait être un facteur de pronostic du CCR. En effet, il a été montré que des patients atteints de CCR avec un mauvais pronostic présentent une dysbiose particulière. Certains pathogènes impliqués dans le CCR ont été montrés comme associés aux stades tumoraux TNM les plus agressifs (Boleij et al., 2015; Bonnet et al., 2014; Mima et al., 2016b; Viljoen et al., 2015). Il a été observé une abondance plus forte de *F. nucleatum* et *B. fragilis* chez les patients atteints d'un CCR de mauvais pronostic (Wei et al., 2016b). Il a été rapporté que ces deux espèces sont associées à une diminution de la survie des patients atteints de CCR (Boleij et al., 2015; Mima et al., 2016b; Viljoen et al., 2015). L'association d'une forte colonisation des tumeurs par *F. nucleatum* avec



une faible densité des lymphocytes infiltrant ces tumeurs, suggère également que ce pathogène peut être un facteur de mauvais pronostic (Mima et al., 2015).

Concernant, plus particulièrement *E. coli*, il a été montré que cette espèce était plus abondante dans les fèces de patients atteints de CCR par rapport aux individus sains et que la quantité de cette bactérie augmente chez les patients atteints de CCR de stades III-IV comparativement à des stades plus précoces (Bonnet et al., 2014; Eklöf et al., 2017). De plus une corrélation a été décrite entre la colonisation des tissus par cette souche et des facteurs de mauvais pronostic du CCR, tels que l'invasion pariétale, l'envahissement ganglionnaire et l'index de prolifération (Bonnet et al., 2014). De plus la prévalence de l'îlot *pks* est significativement plus élevée dans les tissus de patients présentant des tumeurs plus agressives (stade TNM) (Bonnet et al. 2014). Récemment, il a également été mis en évidence que les *E. coli* porteurs de l'îlot *pks* sont présents préférentiellement dans les tumeurs de phénotype MSS chez les patients atteints de CCR, qui est un cancer de mauvais pronostic (Gagnière et al., 2017). A l'inverse *Faecalibacterium prausnitzii* est associé aux patients atteints de CCR de meilleur pronostic (Wei et al., 2016b).

En plus de cette valeur pronostique le microbiote pourrait également être un nouvel outil d'aide au diagnostic du CCR. En effet, certaines espèces associées au cancer colique, peuvent être détectables dans les fèces des patients atteints de CCR dès le stade précoce de la carcinogenèse colique (adénome), telles que *F. nucleatum*, *E. coli* et *S. gallolyticus* (Boleij and Tjalsma, 2013; Butt et al., 2016; Eklöf et al., 2017; Liang et al., 2017b; Mira-Pascual et al., 2015; Nakatsu et al., 2015; Wang et al., 2016a). Il a notamment été montré dans une étude récente que la détection de *F. nucleatum* ou du gène *clbA* de l'îlot *pks* des souches *E. coli* colibactine-positives pouvaient être un indicateur de la présence de tumeurs coliques avec une spécificité respective de 81,5% et 76,9 % (Eklöf et al., 2017). Ainsi la détection de ces espèces permettrait de cibler les populations pour lesquelles une coloscopie est essentielle.



# PRÉSENTATION DU TRAVAIL

---





L'implication du microbiote intestinal dans la carcinogenèse colique et la réponse aux traitements anti-cancéreux est de plus en plus évidente. En effet, de nombreuses études décrivent différentes dysbioses chez les patients atteints de cancers colorectaux comparativement au microbiote intestinal de sujets sains (Amitay et al., 2018; Villéger et al., 2018; Zou et al., 2018). L'exposition fréquente aux antibiotiques, susceptible d'entraîner des dysbioses (Becattini et al., 2016; Iizumi et al., 2017; Korpela et al., 2016), a été identifiée comme un facteur de risque de développer un cancer colique (Boursi et al., 2015; Cao et al., 2018; Dik et al., 2016), ce qui renforce cette hypothèse. De plus, le transfert du microbiote dysbiotique des patients atteints de CCR chez des modèles murins prédisposés à ce cancer, induit une augmentation du développement tumoral chez ces souris par rapport aux souris porteuses d'un microbiote conventionnel (Wong et al., 2017). Plus précisément, il a été montré que certaines espèces bactériennes augmentées chez les patients atteints de CCR, telles que *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis* et *Escherichia coli*, favorisent l'apparition et/ou le développement de tumeurs coliques dans des modèles murins de prédisposition au CCR (Amitay et al., 2018; Villéger et al., 2018; Zou et al., 2018).

Concernant plus particulièrement *E. coli*, plusieurs études indépendantes ont montré que la muqueuse intestinale de patients atteints de CCR est anormalement colonisée par des souches pouvant présenter des propriétés d'invasion et ayant acquis des facteurs de virulence tels que des cyclomodulines (Arthur et al., 2012; Bonnet et al., 2014; Buc et al., 2013; Eklöf et al., 2017; Maddocks et al., 2013; Prorok-Hamon et al., 2014; Swidsinski et al., 1998). La moitié de ces souches sont porteuses de l'îlot *pks* responsable de la synthèse d'une cyclomoduline appelée colibactine (Arthur et al., 2012; Bonnet et al., 2014; Buc et al., 2013; Dejea et al., 2018; Healy et al., 2016; Nakatsu et al., 2015; Prorok-Hamon et al., 2014; Vizcaino and Crawford, 2015; Eklof et al. Int J Cancer). Cette genotoxine peut induire des dommages à l'ADN ou interférer directement avec le cycle cellulaire des cellules de l'hôte, et ainsi générer des mutations (Bossuet-Greif et al., 2018; Cuevas-Ramos et al., 2010; Nougayrède et al., 2006). Des études indépendantes ont décrit *in vivo* et *in vitro* d'autres mécanismes d'action liés au pouvoir carcinogène de ces souches, notamment l'induction de la sénescence cellulaire ainsi qu'une perturbation de la réponse immunitaire dans des modèles de CCR associés à des colites (Arthur et al., 2012, 2014; Cougnoux et al., 2014; Dalmasso et al., 2014; Dejea et al., 2018; Raisch et al., 2015; Tomkovich et al., 2017). Ainsi, les travaux publiés jusqu'à maintenant montrent une implication des *E. coli* colibactine-positives dans le CCR, cependant ce sont des études indépendantes et fragmentaires, il est donc essentiel de préciser les mécanismes mis en jeu.



Ainsi, l'objectif de cette thèse était de préciser l'effet d'une infection chronique par des bactéries *E. coli* colibactine-positives, notamment sur le micro-environnement immunitaire colique et son implication sur la carcinogenèse du côlon. Nous avons utilisé le modèle murin de prédisposition génétique au CCR APC<sup>Min/+</sup>, infecté chroniquement par la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5, isolée d'un patient CCR (Bonnet et al., 2014). Le modèle murin APC<sup>Min/+</sup> est un modèle de référence pour étudier ce cancer puisqu'il est représentatif du type de tumeurs CIN (Chromosomal INstability), phénotype majoritaire du CCR. Bien que ce modèle présente une réponse lymphocytaire T légèrement affaiblie dans l'intestin par rapport à des souris sauvages, il ne présente pas d'altérations majeures de la réponse immunitaire dans le côlon et est considéré comme immunocompétent (Coletta et al., 2003; Kettunen et al., 2003). Les modèles murins de CCR utilisés dans la plupart des études citées dans la partie bibliographique (AOM/DSS ; IL10<sup>-/-</sup>) sont des modèles de CCR associés aux colites, qui ne représentent qu'une très faible proportion de CCR chez l'homme et pour lesquels le microbiote intestinal serait différent de celui décrit dans le CCR sporadique (Richard et al., 2018b). Ainsi, le modèle APC<sup>Min/+</sup>, semble mieux adapté à une étude prédictive des interactions entre les trois acteurs : cellules épithéliales, système immunitaire et microbiote. Nous avons dans un premier temps développé et validé une nouvelle méthode de quantification de certaines populations cellulaires, marquées par immunofluorescence, au niveau de trois compartiments d'intérêt d'une section colique entière : la muqueuse, les follicules lymphoïdes et les tumeurs. Ce travail est présenté dans un article publié le 12 Novembre 2018 dans **Scientific Reports (Article 1)**.

L'analyse précise du micro-environnement colique immunitaire dans le modèle de souris APC<sup>Min/+</sup> chroniquement infectées par la souche *E. coli*-colibactine-positif 11G5 a ensuite été réalisée par cette méthode d'analyse d'image numérique. Nous avons choisi plus particulièrement d'étudier la modulation des neutrophiles et des populations lymphocytaires T. En effet, des interactions entre microbiote, micro-environnement immunitaire et entérocytes ont déjà été publiées pour d'autres espèces bactériennes associées au CCR. Il a notamment été montré que le transfert du microbiote de patients atteints de CCR chez des souris axéniques prédisposées à ce cancer, induisait une augmentation de l'inflammation et le recrutement de cellules immunitaires pro-tumorales telles que les LT Th17, associées à l'augmentation du développement tumoral (Wong et al., 2017). De plus, les espèces *Fusobacterium nucleatum* et *Bacteroides fragilis* sont capables de diminuer spécifiquement la réponse anti-tumorale des LT et d'induire le recrutement et/ou la différenciation de cellules immunitaires pro-tumorales, ainsi que l'inflammation dans des modèles murins de CCR (Kostic et al., 2013; Thiele Orberg et al., 2017a; Wu et al., 2009). L'association entre *F. nucleatum* et la diminution de l'infiltrat LT dans



la tumeur a également été montrée chez l'homme (Mima et al., 2015). L'importance de ces cellules immunitaires dans la carcinogenèse colique *in vivo* ainsi que leur valeur pronostique en clinique (Formica, 2014; Galon et al., 2016; Kim et al., 2017; Markman and Shiao, 2015; Pagès et al., 2018; Pancione et al., 2014; Park et al., 2018; Taube et al., 2017; Tosolini et al., 2011), nous ont conduits à étudier ces cellules. En plus de l'étude sur souris, nous avons confirmé nos résultats sur la collection de prélèvements de tumeurs de patients opérés dans le service de chirurgie digestive du CHU de Clermont-Ferrand. Enfin, au vu des modulations du micro-environnement immunitaire induites par la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5, nous avons étudié l'effet de l'infection chronique du tube digestif par ces bactéries sur la réponse à une immunothérapie ciblant le *checkpoint* immunologique PD-1. Les résultats de ces travaux sont présentés dans un article en préparation (**Article 2**) et font également l'objet d'un brevet confidentiel en cours de rédaction.

# TRAVAIL EXPERIMENTAL



# **I - Article 1 : Analyse du micro-environnement immunitaire par traitement d'image numérique d'une coupe entière de tissu : application sur côlon de souris**

*(Publié dans Scientific Reports le 12 Novembre 2018)*

## **I.1- Contexte de l'étude**

Le système immunitaire joue un rôle central dans les pathologies digestives, aussi bien dans leur développement que pour leur prise en charge thérapeutique. De nombreux travaux ont montré l'importance de la sur-activation du système immunitaire dans la genèse des maladies inflammatoires chroniques intestinales (Hall et al., 2011; Kaser et al., 2010; Kim et al., 2017; Lissner et al., 2015; Yan et al., 2009), telles que la maladie de Crohn. En parallèle, dans le développement du cancer colorectal (CCR), d'autres études montrent l'importance de l'inflammation chronique du côlon et d'un défaut de la réponse immunitaire anti-tumorale. L'infiltrat immunitaire des tumeurs coliques est un indicateur clé concernant son pronostic (Galon et al., 2014; Jakubowska et al., 2017; Mlecnik et al., 2016; Pagès et al., 2018; Tosolini et al., 2011). L'influence du microbiote sur ces dysfonctionnements du système immunitaire lors des maladies inflammatoires chroniques intestinales est largement étudiée *in vivo* (Cremonesi et al., 2018; Kaser et al., 2010; Kostic et al., 2013; Lapaquette et al., 2012; Nguyen et al., 2013; Thiele Orberg et al., 2017a; Wu et al., 2009; Yan et al., 2009). Néanmoins les mécanismes impliqués restent encore à préciser, qu'il s'agisse du rôle de la réponse immunitaire dans les pathologies digestives, ou des interactions entre bactéries et cellules de l'immunité. Ceci souligne la nécessité de pouvoir analyser finement les réactions immunitaires au sein des muqueuses intestinales lors de ces pathologies. Plus précisément, la caractérisation du phénotype des cellules, de leur état d'activation mais également de leur localisation au sein des tissus et de leur cinétique de recrutement apparaît essentielle pour mieux comprendre les processus mis en cause (Galon et al., 2014; Mlecnik et al., 2016; Yan et al., 2009).

Il existe actuellement différentes techniques pour explorer la réponse immunitaire dans les tissus intestinaux murins. La plus courante est la cytométrie de flux qui permet une quantification ainsi qu'une étude fonctionnelle précise des différents types cellulaires grâce à un large nombre d'anticorps disponibles. Cependant, de par son principe, elle ne permet qu'une étude de cellules isolées de leur tissu. Il en résulte une limite technique et expérimentale : les





protocoles d'extraction des cellules restent longs et complexes, notamment à partir de la muqueuse colique, et entraînent des difficultés à obtenir une viabilité cellulaire satisfaisante pour les analyses cytométriques, en particulier lors du traitement d'un grand nombre d'échantillons. De plus, cette technique nécessite une quantité de tissus importante pour obtenir un nombre suffisant de cellules. Ainsi l'analyse de cellules immunitaires contenues dans un tissu de petite taille, comme c'est le cas des lésions pré-néoplasiques ou des tumeurs coliques observées dans le modèle APC<sup>Min/+</sup> (5 à 30 mg), reste compliquée. Enfin la localisation des cellules et les interactions intercellulaires ne peuvent pas être étudiées par cette technique. D'autres méthodes, telles que l'immunohistochimie classique (IHC) avec analyse manuelle ou plus récemment l'imagerie par spectrométrie de masse, permettent ce type d'analyses. Toutefois, ces approches restent chronophages. De plus, la première est subjective car elle est dépendante du manipulateur, et la deuxième requiert une expertise importante en bio-informatique et programmation ainsi qu'un appareillage spécifique coûteux. L'automatisation de l'analyse de sections de tissus traitées par IHC, grâce au développement de l'analyse numérique d'image (DIA : « *Digital Image Analysis* »), a permis une avancée considérable pour étudier le micro-environnement immunitaire. Cependant, à ce jour, aucune méthode ne permet à la fois de phénotyper, quantifier, et localiser précisément l'ensemble des cellules immunitaires le long de côlons de souris.


Dans l'optique d'étudier le système immunitaire dans le contexte du CCR et de ses interactions avec le microbiote, nous avons développé une nouvelle méthode pour discriminer, localiser et quantifier automatiquement et précisément des cellules immunitaires au sein des muqueuses intestinales, et ce, dans différentes régions d'une section entière de côlon de souris. Ce travail a été mené en collaboration avec l'équipe « Histopathology & Bio-Imaging » de Sanofi Recherche et Développement. Dans un premier temps, des protocoles d'immunofluorescence ont été optimisés pour l'étude des cellules immunitaires d'intérêt, en ciblant des protéines membranaires spécifiques de chaque population cellulaire, permettant le traitement d'une section de côlon entière par analyse numérique d'image. Puis, un algorithme de quantification a été créé *via* l'interface simplifiée du logiciel Tissue Studio (Definiens, Allemagne), qui utilise une technique spécifique d'analyse nommée « Cognition Network Technology ». La spécificité de cette méthode est que, contrairement aux méthodes classiques, elle examine des réseaux de pixels et non pas des pixels isolés lorsqu'elle traite l'image. Ainsi, chaque élément de l'image est caractérisé par le contexte dans lequel il se trouve, à l'instar du cerveau humain qui va reconnaître un objet grâce à l'assemblage de plusieurs éléments. Cette approche donne donc les outils nécessaires pour reconnaître chacun des composants de la section de côlon (muqueuse,



tumeur, cellules, membrane...) et définir leur localisation dans le tissu les uns par rapport aux autres. Le développement étape par étape et la validation de cette méthode semi-automatisée sont décrits dans l'article qui suit. Son application est illustrée sur des sections de côlon entier de souris APC<sup>Min/+</sup>. En raison de l'importance de la réponse immunitaire lymphocytaire T dans le CCR (Galon et al., 2016; Mlecnik et al., 2016; Pagès et al., 2018), nous avons choisi de détailler l'analyse de ce type cellulaire par un ensemble original de commandes associé à un apprentissage automatique. Néanmoins cet algorithme peut être également utilisé pour d'autres types cellulaires mais aussi sur d'autres modèles murins.




# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Deciphering the immune microenvironment of a tissue by digital imaging and cognition network

A. Lopès<sup>1,2,3</sup>, Al H. Cassé<sup>4</sup>, E. Billard<sup>1,2</sup>, E. Boulcourt-Sambou<sup>4</sup>, G. Roche<sup>1,2</sup>, C. Larois<sup>4</sup>, N. Barnich<sup>1,2</sup>, S. Naimi<sup>4</sup>, M. Bonnet<sup>1,2</sup> <sup>1,2</sup> & B. Dumas<sup>3</sup>

Evidence has highlighted the importance of immune cells in various gut disorders. Both the quantification and localization of these cells are essential to the understanding of the complex mechanisms implicated in these pathologies. Even if quantification can be assessed (e.g., by flow cytometry), simultaneous cell localization and quantification of whole tissues remains technically challenging. Here, we describe the use of a computer learning-based algorithm created in the Tissue Studio interface that allows for a semi-automated, robust and rapid quantitative analysis of immunofluorescence staining on whole colon sections according to their distribution in different tissue areas. Indeed, this algorithm was validated to characterize gut immune microenvironment. Its application to the preclinical colon cancer APC<sup>Min/+</sup> mouse model is illustrated by the simultaneous counting of total leucocytes and T cell subpopulations, in the colonic mucosa, lymphoid follicles and tumors. Moreover, we quantify T cells in lymphoid follicles for which quantification is not possible with classical methods. Thus, this algorithm is a new and robust preclinical research tool, for investigating immune contexture exemplified by T cells but it is also applicable to other immune cells such as other myeloid and lymphoid populations or other cellular phenomenon along mouse gut.

An increasing number of studies have shown the importance of monitoring mucosal immune responses in gut disorders. An exacerbated immune response is the hallmark of inflammatory bowel diseases<sup>1–4</sup>, whereas an impaired immune response is known to be associated with poor prognosis or progression of colorectal cancer (CRC)<sup>5–8</sup>. Because the involved mechanisms remain unclear, novel approaches to study the gut immune system are needed.

Several methods were developed to characterize, quantify and/or localize immune cells in gut tissues. Flow cytometry (FC) is commonly used because it allows simultaneous cellular and functional analysis<sup>9–12</sup>. However, FC does not allow precise immune cell localization or cell-cell interaction characterization. Furthermore, preparing viable single cell suspensions from solid tissues for FC analysis remains challenging and limits the number of sample. Large tissue sections are necessary to reliably monitor the number of interesting cells, which prevents the study of small key areas, such as preneoplastic lesions in oncology. Another approach is cell detection and localization via immunohistochemistry (IHC) with either global manual scoring or quantification on a limited tissue area. However, manual analysis is laborious, time consuming and inaccurate. Indeed, quantification is performed on a few random fields chosen by the experimenter<sup>13</sup>. More recently, a new method called “Imaging Mass Cytometry” (IMC) enables efficient immune cell quantification and localization on mouse liver slides<sup>14</sup>. However, IMC complex data analysis is both time-consuming and expensive and requires sophisticated software and high expertise in bioinformatics<sup>15,16</sup>.

In recent decades, the development of digital image analysis (DIA) has provided alternative solutions for tissue section analysis through rapid and automated segmentation of immunostained cells. A batch of images can be

<sup>1</sup>Clermont Université, UMR 1071 Inserm/Université Clermont-Auvergne, 63000, Clermont-Ferrand, France. <sup>2</sup>INRA, USC-2018, 63000, Clermont-Ferrand, France. <sup>3</sup>Research Biologics, Sanofi R&D, 94400, Vitry-Sur-Seine, France. <sup>4</sup>Histopathology and Bio-Imaging Group, Sanofi R&D, 94400, Vitry-Sur-Seine, France. Al H. Cassé and E. Billard contributed equally. M. Bonnet and B. Dumas jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.H.C. (email: [Alhassan.Casse2@sanofi.com](mailto:Alhassan.Casse2@sanofi.com)) or B.D. (email: [Bruno.Dumas@sanofi.com](mailto:Bruno.Dumas@sanofi.com))

automatically analysed using a customized algorithm<sup>13,17</sup>. An important use of these methods in gut pathologies is probably the Immunoscore<sup>6</sup>, a new prognostic tool for CRC patients that uses *in situ* quantification of CD3<sup>+</sup> tumor-infiltrating T cells<sup>18</sup>. DIA was also used in murine colitis models to study the gut microenvironment, as reported on whole mouse colon sections, via an automated method to evaluate inflammatory areas<sup>19</sup>, but DIA was not used for single cell analysis. Moreover, there is no general method to obtain the fine localization and number of immune cells along a mouse colon.

Here, we present a DIA semi-automated process using Tissue Studio software (version 2.6) to simultaneously discriminate, localize and quantify immune cell populations within distinct areas of a whole colon section. We chose the APC<sup>Min/+</sup> mouse model to validate this approach, as it is a preclinical reference model for CRC<sup>20,21</sup>. Three areas were targeted: the colonic mucosa, lymphoid follicles and tumors, focusing on T cells, the significance of which is well-established in CRC<sup>5-7,9,18,22,23</sup>. We validated the precision and robustness of our method on several colon slides and with different fluorescence patterns despite the tissue feature complexity and background. This pipeline allows precise characterization of the immune microenvironment in small tissue structures, such as lymphoid follicles, and was built to be used to other intestinal tissues and other gut diseases.

## Results

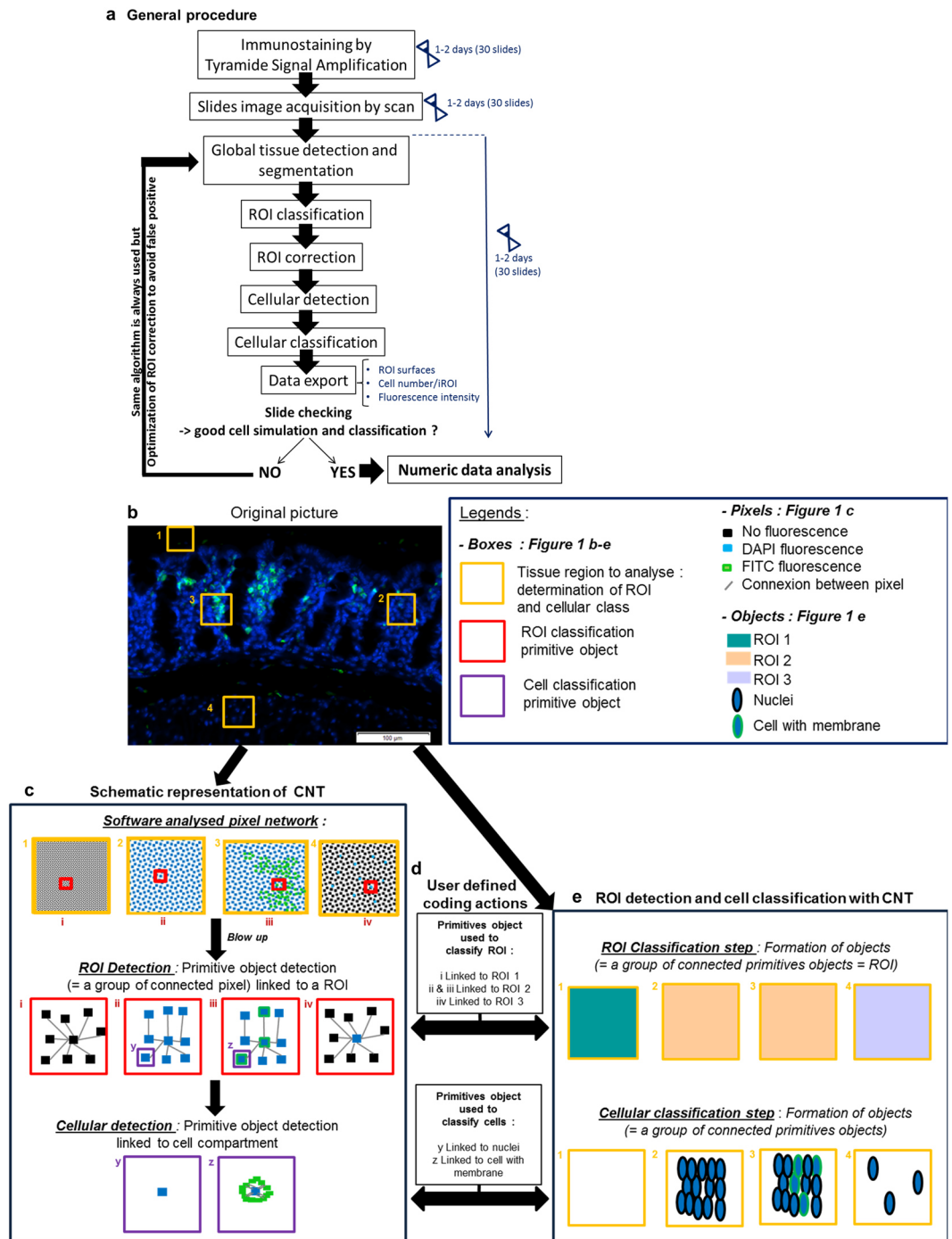
**General DIA procedure based on Cognition Network technology (CNT).** Immunostaining was performed using specific membrane fluorescent labelling associated with Tyramide Signal Amplification, as previously described<sup>6,24-27</sup> (See Supplementary Fig. S1). This staining was completed with DAPI nuclear counterstaining for cell identification and numbering within tissues. We chose paraffin-embedding to preserve the colon structure and allow optimal sample quality for slide digitalization and image analysis processing. Moreover, the fluorescence signal to noise ratio must be managed to avoid signal saturation and allow accurate tissue and cell delimitation.

To decipher the immune microenvironment in distinct regions of interest (ROIs) in the APC<sup>Min/+</sup> colon, we had to develop the optimised DIA algorithm with Tissue Studio software (Definiens, Germany). It was not possible to use the pre-calibrated algorithm available in the software, because of the complexity of detecting multiple cell types in different whole colon regions with precise cell numbering for each ROI. But, the friendly interface of the software allows users to build their new specific algorithm adapted to their scientific problematic and sample. More precisely, users can select, calibrate and organize an extensive series of rules to analyse their images, which are later translated by software in comprehensive language, to allow the automatic execution of the algorithm by the computer. Thus, we have optimised a new algorithm for a whole colon section DIA, by selecting, configuring and classifying various Tissue Studio software functions and rules. The global structure of the developed algorithm is presented in Fig. 1a. This set of commands was developed using an exhaustive catalogue of pre-coded functions, which need to be set and ordered. A brief summary of possible functions and its associated non-configured parameters are described in Supplementary Table 1 together with the available ruleset combination numbering.

All of the rulesets were based on Definiens Cognition Network Technology (CNT)<sup>28</sup>, an object-based image analysis method, which extracts information from the image using a hierarchy of pixel group, called “objects” (See Fig. 1b,c). Contrary to classical image analysis, CNT considers pixels not as an isolated entity but in the image frameworks. In practice, it uses the color, the shape, the size, the context, and their relationship with each group of pixels, or object, to analyse images.

These pixel properties were essential to apply this technology to the whole colon slide (See Fig. 1b–e). In the first step of the algorithm, fluorescence from a colon section (exemplified in Fig. 1b) was detected using DAPI and FITC fluorescent channels and segmented into pixel clustering groups called “primitive objects”, as shown in Fig. 1c. The “primitive objects”, which have a specific fluorescence pattern and spatial network, when grouped together, form an “object”. Depending on the algorithm step, we have linked these specific patterns with a respective group of large “objects” called “ROI” (see Fig. 1d, first line: example of 3 classes of ROI in picture; “ROI1”, “ROI2” and “ROI3”) or with a respective group of small “objects” called “cells” (Fig. 1d; second line; example of two classes of cells: “nuclei” and “cell with membrane”). This established link thanks to selection, calibration and ordering of pre-coded rules in Tissue Studio catalogue, allowed the user to distinguish ROIs and cells on the colon section, as described in Fig. 1e. More precisely, we implemented different ROIs corresponding to each colonic structure and classified them using an automatic ROI classification step and manual refining as necessary, as shown in Fig. 1a. Up to 8 ROI classes can be defined with the software. Finally, we quantified immune cells by implementing cellular detection and classification based on the same CNT process using segmentation and classification iterations<sup>28</sup>. We exported various parameters, such as the ROI area, mean fluorescence intensities and number of cells per ROI, for statistical comparison.

**Specific workflow for mouse colon immune cell detection.** The detailed optimised workflow of this new algorithm is described step-by-step, for single (Fig. 2) and double membrane staining (Supplementary Fig. S2). More precisely, CD45<sup>+</sup> leucocytes were detected using specific FITC labelled antibodies, meanwhile CD4<sup>+</sup> T cells were detected with CD3 and CD4 membrane proteins using Cy3 and FITC labelled antibodies respectively. In each case, nuclei were stained using DAPI fluorochrome. The stainings were performed on colonic sections scanned at 40x magnification, 0.161028 μm/pixel resolution and 16 bit depth. These picture acquisition parameters fix the first step of the algorithm (See Fig. 2a, “General setting” step). The other analysis steps such as tissue detection, ROI classification, cellular analysis and export were chosen, organized and calibrated via an iterative method (Fig. 2 and Supplementary Fig. S2). All of these are described in detail below.



**Figure 1.** Immune cell quantification general procedure and Cognition Network Technology (CNT) principle. (a) The procedure to quantify immune cells is based on a computer learning algorithm and elaborated using Tissue Studio software (Definiens, Munich, Germany). After optimal image acquisition, we evolved the algorithm using five sequential steps: global tissue detection, ROI (Region Of Interest) classification, ROI correction to discriminate the ROIs associated with APC<sup>Min/+</sup> colon tissue, cellular detection and cellular classification to quantify positive membrane stained cells per ROI. (b–e) Particular blow up of a colon region is shown as an example of the digital image analysis process. Information is extracted from the picture using a hierarchy of image-objects, formed by grouping of pixels, after an evolutionary alternation of classification and segmentation steps. For example, in blow up picture (b), areas (yellow boxes) are selected to distinguish various ROIs (ROI 1: box 1; ROI 2: box 2 and 3; and ROI 3: box 4). These selected zones are recorded as a pixel network with CNT (c, top boxes). The image is analysed at the pixel level in a contextual fashion. Specific groups of connected pixels, named “primitive objects” are identified and shown in c (middle red boxes). Then each primitive object is linked with a specific ROI by a coded action (d, top box; ex: primitive object (I) is linked with ROI 1). The same connected primitive objects are finally grouped to form an object associated to a specific ROI as a result of the recognition of ROI-associated primitive-objects. This permits the classification of each selected



colon zones into respective ROI (e, top boxes; ROI 1: Green; ROI 2: Yellow; ROI 3: Blue). The same process is applied for cellular analysis (c, bottom purple boxes), with a more segmented image reaching cellular scale. An object is defined as a cell (e, second line). In that case, primitive objects (c, bottom purple boxes) are smaller, and linked to a cell type (d, second line).

**ROI detection and classification for CD45 immunostaining.** To automatically detect the three immune ROIs (iROIs) in the APC<sup>Min/+</sup> colon: mucosa, lymphoid follicles and tumors (See Supplementary Fig. S3) we first defined the total area to analyse, via automatic global tissue detection using membrane (Fig. 3b) and nuclear stainings (represented in Fig. 3a with alternate red staining). As shown by the flowchart in Fig. 2b, we determined the optimal thresholds for DAPI fluorescence brightness and homogeneity for all slides by up to 10 iterations, on the basis of unstained area exclusion and unique tissue stain area detection at the end of the simulation. Small non-tissue stained areas (<10 μm<sup>2</sup>) were removed from the analysis by adding a minimal size rule. We thus successfully detected a complete colon section (See Fig. 3a: original data; 3b: colon tissue detection by the machine).

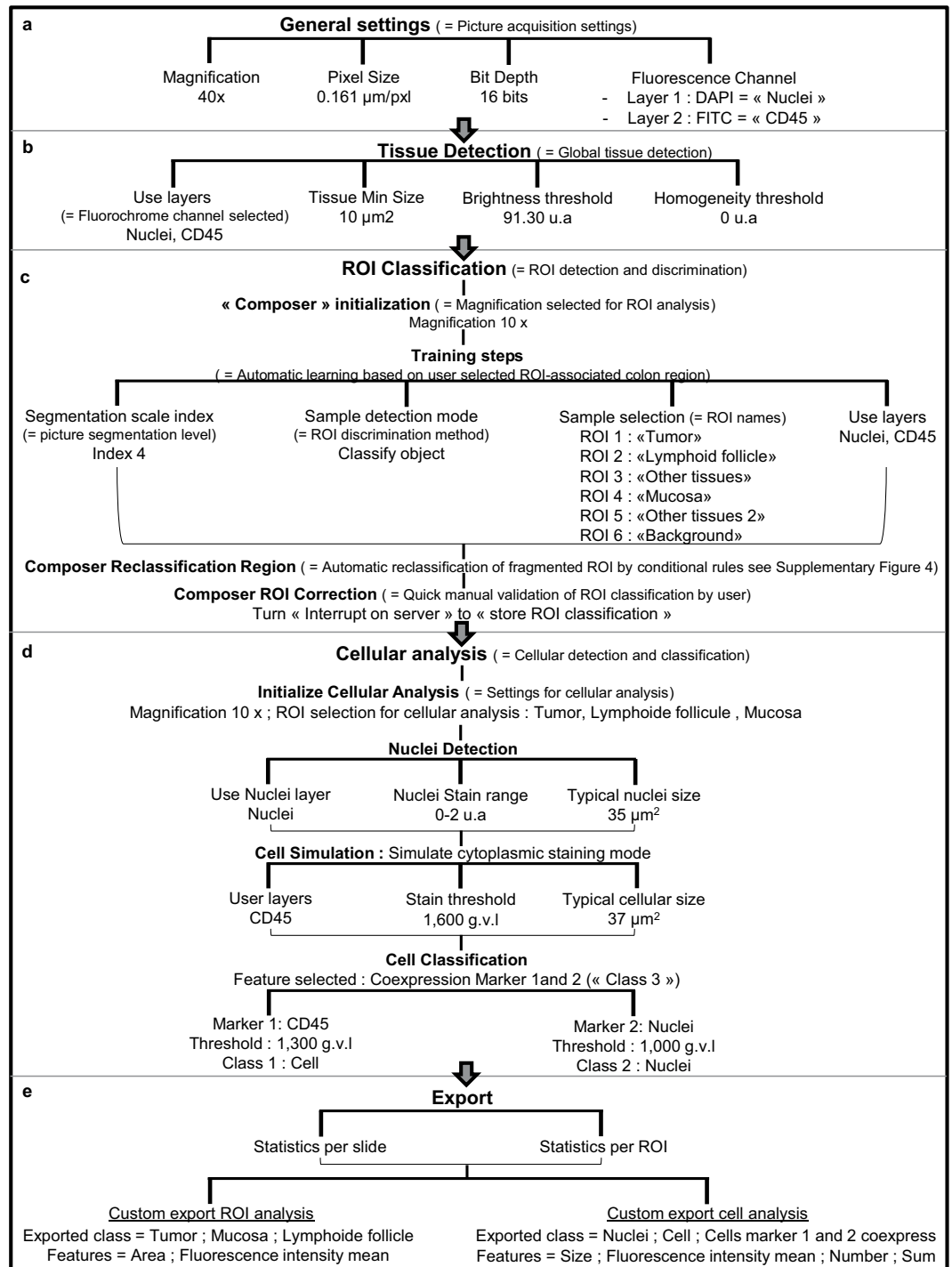
Figure 3d shows the result of the segmentation step of the original mucosa image, which is displayed in Fig. 3c. It consists of the fragmentation of detected tissues into “primitive objects”. Cell individualization and ROI classification are based on this second step. A higher segmentation scale creates small “primitive objects”, which facilitates cell individualization. However, it complicates ROI classification, making it impossible to determine a global fluorescence pattern for each ROI. On the contrary, a low segmentation scale allows precise ROI classification, leading to incorrect cell individualization. We set an efficient segmentation scale of 4 after testing different index values (Figs 2c, 3c: original image of mucosa; Fig. 3d: segmented associated image), so that the ROIs were correctly detected and classified (See Fig. 3e: automatic ROI classification; 3f: ROI reclassification by algorithm; 3g: manual correction).

To conduct this ROI classification, we chose to create three iROI classes and two other ROIs for non-interesting colon regions (“other tissue”) and non-tissue areas (“background”) (See Flowchart in Fig. 2c and the results in Fig. 3e–g). First we implemented a classical computer based learning step called “Training action” in Tissue Studio by recording a precise selection of representative FITC and DAPI labelled primitive objects for each ROI, as exemplified in Fig. 4a. In the first step, the software determined ROI-associated “primitive objects” for each distinct ROI, as represented in Fig. 4a,b. Mucosa, lymphoid follicle and background ROIs were correctly classified at the end of the computer based learning section (Figs 3e and 4c). However, it failed to distinguish the mucosa from other tissue ROI (See Fig. 3e) and the tumor from mucosa or lymphoid follicle (Figs 3e and 4c). In that case, the “primitive-objects” were similar between mucosa and other tissues, or between tumor and lymphoid follicle, and mucosa within a small area, respectively (See tumor-associated “primitive objects”, in Fig. 4b, as an example). To solve this issue, we have added an ROI refining sub-step (named “Reclassification” in Tissue Studio) (See details in Fig. 4d–f). It is based on the selection, organisation and calibration of up to eleven pre-coded conditional rules, from the software library (Summary of the possibilities in Supplementary Table 1). Each of these rules is built in the same fashion (See Fig. 4d,e): it allowed the new classification of an incorrectly classified ROI object into its correct ROI class by selecting a specific characteristic of the object (named “Condition”). More precisely, we implemented and set conditional rules based on the ROI size, tissue complexity and relative borders of each improperly classified ROI (Fig. 4d) which were translated by software (Fig. 4e), allowing a better ROI classification on the whole colon (See result for the whole slide in Fig. 3e,f, white arrows and orange tumor ROI; and see details in Fig. 4f(I) and (II) for example of tumor and Fig. 4f(III) and (IV) for example of other tissue ROI).

To finalize the ROI classification step and to validate the whole process, a visual confirmation was performed as well as a possible ROI refining (Fig. 3g, mucosa: yellow; tumor: orange; lymphoid follicle: green).

**Automated cell detection and classification of CD45<sup>+</sup> cells.** We performed cell detection in the three iROIs (detailed flowchart in Fig. 2d): mucosa (Fig. 5a–d), lymphoid follicles (Fig. 5e–h) and tumors (Fig. 5i–l). To facilitate cell detection, the algorithm was first set to recognize cell nuclei and cellular membranes and, finally, to simulate cells using the “Inside cytoplasmic stain” mode. This mode was optimal for precise cell delimitation despite the blurry DAPI signal resulting from the high cellular density in the lymphoid follicles as shown in Fig. 5e; and in tumors as shown in Fig. 5i. We successfully programmed the algorithm to recognize different cell types on whole colon tissue, with the same settings for the DAPI fluorescence range and mean nuclear area value. We tested several combinations of these parameters. In this step, the grey value level of DAPI was converted into arbitrary units by Tissue Studio software. We determined the optimal fluorescence range (from 0 to 2 arbitrary units (a.u)) and “mean nuclear area”. This area (35 μm<sup>2</sup>) allowed for individualization and detection of nuclei in each ROI using DAPI signals (Fig. 5b: mucosa, 5f: lymphoid follicle, 5j: tumor). With the same iterative method, we set the CD45 fluorescence threshold at 1,600 grey value levels (g.v.l) and the mean cell area at 38 μm<sup>2</sup> for optimal cell delimitation. Cell algorithm detection was finally performed and validated for all of the ROIs using these four parameters simultaneously (Fig. 5c: mucosa, 5g: lymphoid follicle, 5k: tumor).

To discriminate CD45<sup>+</sup> cells (FITC<sup>+</sup>) (Fig. 5, white arrows: negative cells; yellow arrows: positive cells), we implemented a cellular classification step and defined a “positive cell” class based on nuclear and membrane co-staining to avoid incorrect classification due to fluorescence artefacts (e.g., fluorochrome aggregates or red blood cells). Preliminary DAPI and FITC thresholds were set on the basis of the minimal DAPI intensity from 7 random fields of five different colon samples. The maximum FITC intensity was based on 5 control slide random fields without a primary anti-CD45 antibody. We adjusted these parameters after performing simulations to a unique optimal threshold of 1,000 g.v.l for DAPI staining and 1,300 g.v.l for FITC staining (maxima at



**Figure 2.** Optimal digital image analysis algorithm flowchart for whole colon slide: example of CD45 single staining. All algorithm functions were chosen and ordered from the exhaustive Tissue Studio software pre-written rule list. They constituted an innovative program that did not exist in software library, and were optimised to quantify cells in various ROIs from a whole colon stained section. It was developed by an iterative method. (a) First step, “General settings”, is a fixed step by the software. It allows to set the analysis workflow by indicating all the image file parameters (magnification, resolution and fluorescence staining). (b) We implemented a second step, called “Tissue detection” to detect the complete colon tissue on the slide. It is based on user defined optimal parameter settings: fluorescence channel, minimal tissue detected size, and fluorescence brightness and homogeneity. (c) We implemented a third step, “ROI Classification”, to discriminate the various colon regions of interest (ROI). To manage with the complexity of a whole organ slide, we implemented three analysis steps, named composers. First composer is “Initialization”, a mandatory composer in Tissue Studio software to detect ROI. It allows automatic recognition of ROIs by software, using a stock of representative areas, selected on colon section during algorithm development. Second composer is “Reclassification region” based

on a specific series of conditional rules to automatically reclassify the ROIs which were incorrectly classified by the initialization composer. We have added a third composer, “ROI correction” to allow a quick visual checking of “ROI classification” by user. **(d)** Then, to quantify cells of interest in each ROI, we implemented the “Cellular analysis” step. The first action is a mandatory “Initialize Cellular analysis” function, to set the optimal parameters of cellular analysis (magnification and chosen ROIs). Then, we have chosen and ordered three optimal coded functions and their settings to detect all cells and cells of interest (e.g. CD45<sup>+</sup> cells here) in all ROIs: Nuclei Detection, Cell Simulation and Cell classification. **(e)** To finalize this algorithm we selected the export command parameters.

65,536 g.v.l). Thus, CD45<sup>+</sup> cells could be automatically and correctly detected in each iROI for all slides (Fig. 5d: mucosa, 5h: lymphoid follicle, 5l: tumor; yellow cells).

**Validation of the CD45<sup>+</sup> cell quantification.** Quantification was performed on 20 immunostained whole colon sections (including 2 negative controls) from 18 different APC<sup>Min/+</sup> mice (Figs 5 and 6), confirming the robustness of our method for simultaneous analysis of a slide batch. Numerical data, such as the iROI area, total cell number and positive cell number per iROI, were exported (See flowchart in Fig. 2e) and cell density was calculated using equation (1).

$$\begin{aligned} \text{CD45 positive cell density}_{iROI_x} (\text{mm}^2) &= \frac{\text{Total CD45 positive cells } iROI_x}{\text{Total surface } iROI_x \times 10^6} \\ &= \frac{\# \text{ Cell Markers 1 and 2 coexpressed}}{iROI_x (\text{all}) \text{ Area} \times 10^6 (\mu\text{m}^2)} \end{aligned} \quad (\text{Algorithm class}) \quad (1)$$

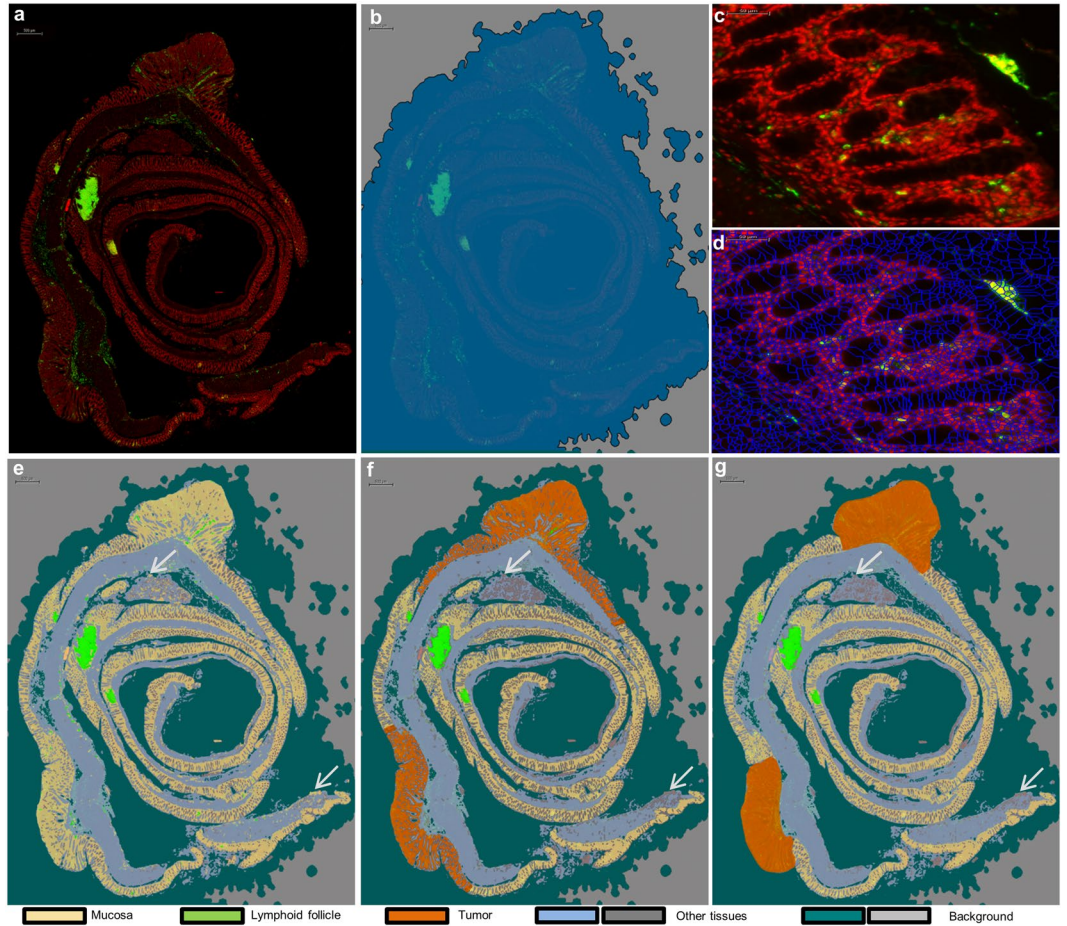
As expected, no positive cells were counted on negative control slides. Moreover, as observed on immunostained APC<sup>Min/+</sup> mouse colons (Fig. 6a–c), the leucocyte density was far higher in lymphoid follicles ( $2.10 \times 10^4$  cells/mm<sup>2</sup>  $\pm$   $0.06 \times 10^4$  cells/mm<sup>2</sup>) than in the mucosa ( $2.97 \times 10^3$  cells/mm<sup>2</sup>  $\pm$   $0.25 \times 10^3$  cells/mm<sup>2</sup>) or tumors ( $3.22 \times 10^3$  cells/mm<sup>2</sup>  $\pm$   $0.52 \times 10^3$  cells/mm<sup>2</sup>) (See Fig. 6d), showing numeric data consistency. As expected for each whole section, we were able to analyse a significant tissue area per animal, from 0.13 mm<sup>2</sup>  $\pm$  0.03 mm<sup>2</sup> (for the smallest iROI: lymphoid follicle) to 4.73 mm<sup>2</sup>  $\pm$  0.28 mm<sup>2</sup> (for the largest iROI: mucosa), which resulted in a significant number of total analysed cells per animal, from  $3.73 \times 10^3 \pm 1.17 \times 10^3$  (for lymphoid follicles) to  $1.17 \times 10^5 \pm 0.07 \times 10^5$  (for the mucosa). Therefore, this method enabled analysis of a significant number of total cells to obtain precise densities of frequent and rare interesting cells in each ROI (Fig. 6b,d).

Thus, we were able to precisely quantify cells in each iROI, a result that was either imprecise by manual scoring or impossible by manual counting due to the high cellular densities in the iROIs. In this way, we were able to compare leucocyte distribution in the three APC<sup>Min/+</sup> mouse gut immune areas: mucosa, lymphoid follicles and tumors (Fig. 6d,  $p < 0.0001$ ).

To confirm CD45<sup>+</sup> leucocyte quantification, we compared the cell density obtained from the digital algorithm measurement (positive cells<sub>iROI</sub>/area<sub>iROI</sub> (mm<sup>2</sup>)) to the density index assessed by manual scoring in each iROI, as it is presented in Fig. 6e (e.g., mucosa). The range of the scoring index was between 0 (no positive cells) and 5 (elevated positive cell density) and was specific to each iROI. The comparison between manual scoring and the DIA density in the mucosa (Fig. 6e, Pearson  $r = 0.6869$ ,  $p < 0.01$ ), tumors and lymphoid follicles (data not shown) highlighted a significant positive correlation that supported the consistency of the numeric data from the algorithm.

**Method application on double staining: CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells.** We adapted the same algorithm to analyse double CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cell immunostaining (See flowchart in Supplementary Fig. S2), in which CD3 and CD4 membrane proteins were revealed by Cy3 (Fig. 7a, red cells) and FITC (Fig. 7a, green cells) fluorochromes, respectively. Cell nuclei were counterstained with DAPI (Fig. 7a–d: blue stain).

Because the fluorescence pattern was different from that of CD45, we had to optimise the main parameters of the algorithm (Fig. S2). We adjusted the ROI classification by computer based learning and ROI reclassification rules (See details in Fig. S4, parameter differences between single and double staining are highlighted in blue). Since CD3 is more frequently detected on T cells than CD4, we used the former for cellular delimitation. The optimal fluorescence thresholds (DAPI: from 0 to 2 a.u.; Cy3: from 48,356 to 65,536 g.v.l) and mean areas (nuclei: 35  $\mu\text{m}^2$ ; cell: 36  $\mu\text{m}^2$ ) were applied. Cell classification was modified using DAPI<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> and DAPI<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cell classes for the successful detection of T cells and CD4<sup>+</sup> T cells, respectively (Fig. 7a). We improved several classification parameters to prevent false CD3<sup>+</sup> cell detection due to paraffin-embedded tissue edge fluorescence properties (see the Troubleshooting section). As for the CD45 analysis, we used unique fluorescence thresholds (DAPI: 500 g.v.l; Cy3: 2, 500 g.v.l; FITC: 1,500 g.v.l; maxima at 65,536 g.v.l) to detect and classify these cell populations in each iROI (Fig. 7b: mucosa, 7c: lymphoid follicle, 7d: tumor). We exported the same numeric data as in the CD45 analysis and added three export rules to obtain CD4<sup>+</sup> T cell quantification in each iROI (Supplementary Fig. S2), and cells densities were calculated using equations (2) and (3).



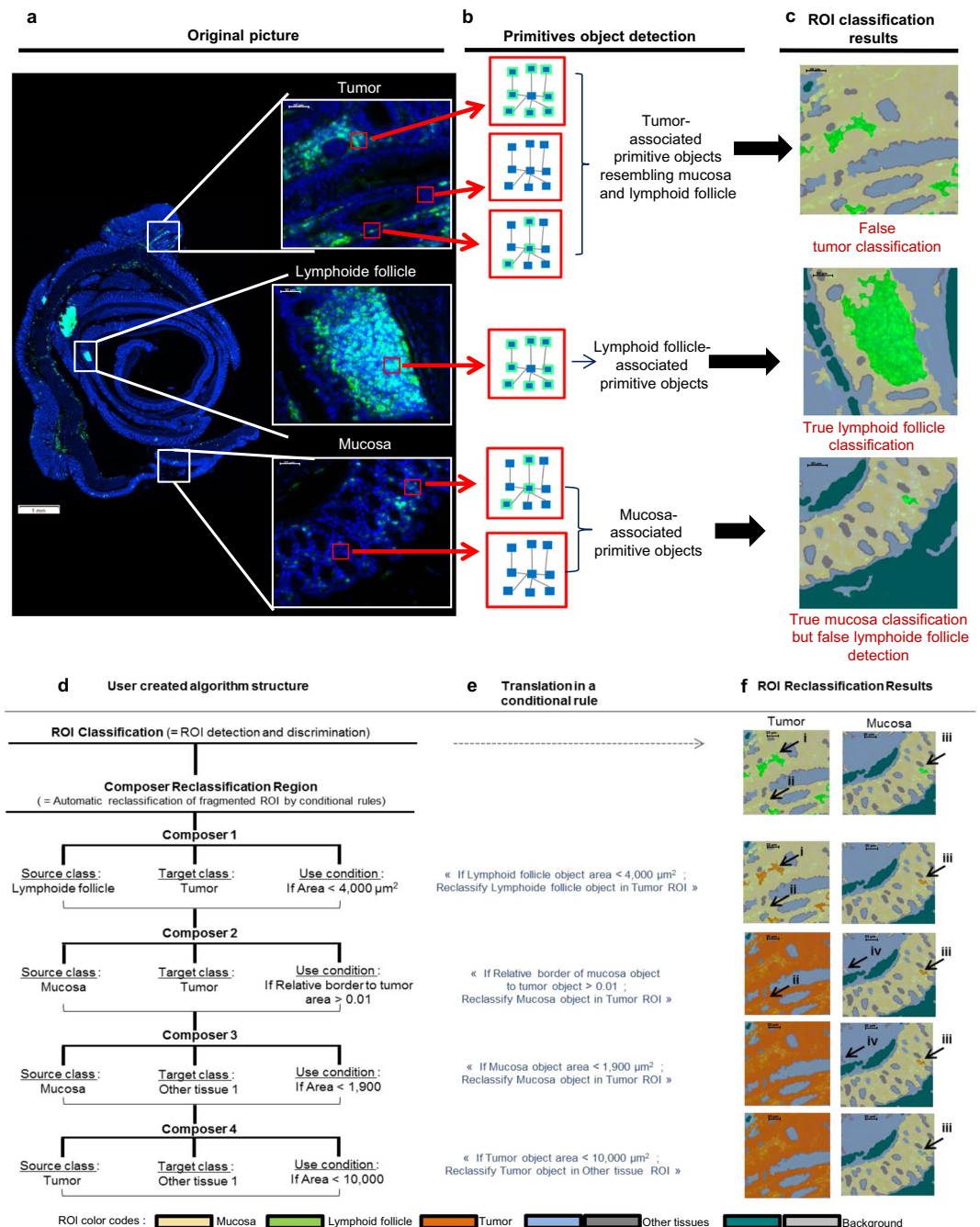
**Figure 3.** ROI classification method after CD45 immunostaining. (a) Representative image of CD45<sup>+</sup> leucocyte staining (green). We detected the whole colon section using a global tissue detection step and DAPI (red) counterstaining, and (b) we simulated data using detected (dark blue) and not detected (light grey) areas. (c,d) Representative validation of the optimal tissue segmentation index on mucosa with immunostaining (c) and segmented mucosa (d). (e–g) For ROI classification, we approved five ROI classes to differentiate between mucosa (beige), lymphoid follicles (green), tumors (orange), other tissues (light blue and dark grey) and background areas (blue green and light grey). (e) We first performed automated ROI classification based on the nuclear and membrane fluorescence signals. This step permitted the precise distinction between mucosa (beige), lymphoid follicles (green) and background (blue-green and dark-grey). (f) We evolved the automated ROI reclassification step by adding conditional rules to detect tumor (orange) and avoid false mucosa detection (grey area). (g) To optimise and control ROI classification before cellular analysis, we added a last step using manual correction. We presented an example of a false ROI classification (white arrow), which was detected as mucosa (e). We corrected this error after ROI reclassification as other tissue (dark grey) (f,g).

$$\begin{aligned}
 CD3 \text{ positive cell density}_{iROI_x} (mm^2) &= \frac{\text{Total CD3 positive cells } iROI_x}{\text{Total surface } iROI_x \times 10^6} \\
 &= \frac{\# \text{ Cell Markers 1 and 2 and 3 coexpressed}}{iROI_x \text{ (all) Area} \times 10^6 (\mu m^2) + iROI_{x\text{bis}} \text{ (all) Area} (\mu m^2) \times 10^6} \\
 &\quad \text{(Algorithm class)}
 \end{aligned} \tag{2}$$

$$\begin{aligned}
 CD4 \text{ positive cell density}_{iROI_x} (mm^2) &= \frac{\text{Total CD4 positive cells } iROI_x}{\text{Total surface } iROI_x \times 10^6} \\
 &= \frac{\# \text{ Cell Markers 1 and 2 coexpressed}}{iROI_x \text{ (all) Area} \times 10^6 (\mu m^2) + iROI_{x\text{bis}} \text{ (all) Area} (\mu m^2) \times 10^6} \\
 &\quad \text{(Algorithm class)}
 \end{aligned} \tag{3}$$

As described above, we validated each step of our method (Fig. 7a–d) on a batch of whole immunostained colon slides (n = 23, including 5 controls) from different mice (n = 18). Numeric data were compared via manual





**Figure 4.** Application of Cognition Network Technology (CNT) on colon ROI classification and user driven improvements. **(a)** An analysis slide is shown with its original picture and specific blow ups corresponding to mucosa, lymphoid tissue and tumor (white boxes), and **(b)** exemplary red boxes pointing out a pixel group as a “primitive-object”. Each of them is automatically associated with a specific ROI, by a stock of ROI-representative “primitive-objects” **(c, ex: mucosa: yellow area; lymphoid follicle: green area)**, that were constituted by selecting specific colon area during the algorithm development. With this automatic learning method, we can distinguish lymphoid follicle and mucosa ROI correctly, due to clearly distinct mucosa and lymphoid follicle associated-primitive-objects **(b,c: middle and bottom boxes)**. On the contrary, tumor-extracted primitive-objects are associated with mucosa and lymphoid follicle-primitive objects **(b; top boxes)**, resulting in an incorrect tumor ROI classification **(c; top box)**. **(d–f)** To solve this issue, we implemented a set of user defined commands to obtain a correct ROI classification. **(d)** We implemented four conditional rules by selecting a ROI couple (the “source class” is the false ROI that needs to be reclassified and the “target class” is the true ROI) and the parameter used to reclassify the ROI. **(e)** Conditional rule selected is translated by the software in a coded rule and **(f)** allows the automatic reclassification of false ROI by software. By using this method we manage to reclassify “false lymphoid follicle” into “tumor”, using a conditional rule based on size object; **(d–f; composer 1, arrow I, II and III)** and “false mucosa” into “tumor”, using a conditional rule based on object proximity with

tumor (**d–f**; composer 2, arrows I, II and III). Same method is used to correct other “false classification” due to confusion between mucosa and other tissue (**d–f**; composer 3, arrows II, III and IV) or tumor and other tissue (**d–f**; composer 4, arrows II, III and IV).

scoring (Fig. 7e,f), showing a strong correlation for both CD3<sup>+</sup> T cell (Fig. 7e, Pearson  $r = 0.8252$ ,  $p < 0.0001$ ) and CD4<sup>+</sup> T cell quantification (Fig. 7f,  $p < 0.05$ ) in the mucosa as well as the other iROIs (data not shown). As expected, a significantly higher density of these cells was observed in the follicle structure (Fig. 7g, Pearson  $r = 0.4999$ ,  $p < 0.0001$ ).

**Troubleshooting.** We used immunofluorescence staining to detect specific immune cells because it allows for multiplexed analysis<sup>26</sup>. However, the variability of fluorescence detection (the mean intensity, and the variation of fluorescence intensity around the mean and its standard deviation), due to the intrinsic properties of some tissue structures and cell components (elastin, red blood cells), influenced our DIA results (See Table 1). More precisely, we encountered three difficulties during algorithm development. First, the fluorescence signal could be heterogeneous from one slide to another due to a non-optimal acquisition and/or staining protocol (Table 1. 1, 2, 5, 6). Second, the signal could be heterogeneous on the same slide due to intrinsic tissue properties (Table 1. 2–5). Third, fluorescence artefacts associated with staining conditions or paraffin embedding were observed (Table 1. 6–7).

To address these phenomena, the staining protocol and image acquisition were optimised (Table 1, sixth column). Importantly, the same conditions can only be applied to a batch of slides when the fluorescence patterns are homogenous on all slides. To this end, it is essential to use the same staining and acquisition parameters (Table 1. 1, 2, 5, 6: sixth column). To obtain optimal signals (homogeneity, minimal and maximal intensity) for DIA, the preferred time to scan a slide batch is up to 10 days after staining. The other optimal parameters are precisely described in the Online Methods.

In cases in which staining and acquisition protocol optimization were insufficient (Table 1. 3, 4, 5, 7), improvements of the DIA algorithm played a key role in preventing analysis errors (see the troubleshooting guide Table 1, fifth column). In particular, fluorescence heterogeneity on the same slide (e.g., due to biological heterogeneous marker distribution or tissue states) caused improper ROI classification. We overcame the inability of Tissue Studio to determine a general fluorescence pattern for each area by adding reclassification rules based on fluorescence-independent parameters, such as the ROI size or tissue complexity (Table 1. 2–4). Fluorescence artefacts inducing false positive cell detection (1.9% of slides for a single staining, or 30.4% of slides for a double staining) could also be solved by minor algorithm modifications. This correction step was more easily achieved if the affected ROI did not contain target cells (Table 1. 6).

Provided attention is paid to these critical points, the pipeline we describe here allows immune colon profiling on numerous slides without failure. It is important to mention that the dependence of the algorithm on membrane detection means that it must be optimised for each new surface marker. However, this can be accomplished quickly by adjusting the numeric parameters according to the recommendations of our troubleshooting guide (Table 1).

## Discussion

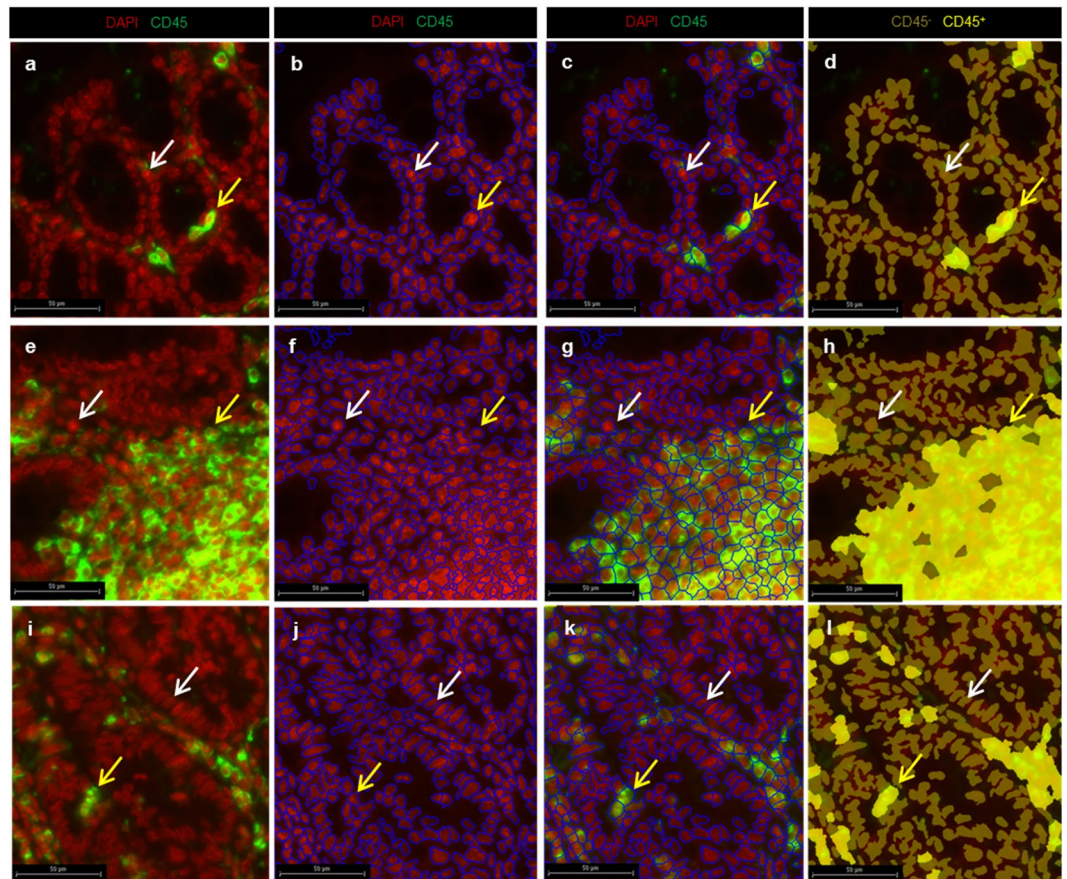
Here, we describe a new quantitative semi-automated method to characterize the immune microenvironment on whole mouse colon slides. Based on CNT, the proposed method allows tissue to cell scale analysis; thus, we are able to simultaneously investigate various ROIs and immune cell populations associated with colonic tissue. A recent immune cell quantification study by Blom and colleagues used another software on a slide of prostate mice tumor<sup>26</sup> but did not distinguish different structures as with our method using ROI classification. Here, we show how to use our method to quantify leucocytes and T cells in three immune colon regions in APC<sup>Min/+</sup> mouse model (mucosa, lymphoid follicle and tumor), and it is possible to implement up to 8 ROIs. This new analysis enables precise quantification of cells and comparison of cell distributions between different areas in whole tissue.

Compared to classical IHC scoring, this method using automatic learning avoids human bias and quantifies cells quickly without laborious manual work. Moreover, as the whole tissue and all the cells are analysed on the slide (from 0.13 to 4.73 mm<sup>2</sup> of tissue and from 10<sup>3</sup> to 10<sup>5</sup> cells), we provide accurate results compared to classical IHC assessment in a few random fields<sup>13</sup>. Therefore, this new method can consider biological variations and rare cell populations.

Our method can act as a complementary tool to flow cytometry (FC) because it allows analysis of significant cell number without requiring a complex and laborious cell extraction process. Cross-correlation and cellular relationships between immune cell density and other staining methods (e.g., FISH, HES, cellular damage staining) performed on consecutive sections are possible, adding new possibilities compared to classical FC studies.

Furthermore, thanks to the development of our algorithm, its step by step description, and its troubleshooting guide (Table 1), it is easier to analyse data than to perform mass spectrometry imaging. If necessary, our algorithm can be easily applied to the Definiens software interface using the Tissue Studio User guide<sup>29</sup>. Additionally, obtaining numerical data is faster than with mass spectrometry or classical IHC. Thus, we developed a fast and simple way to robustly quantify and localize immune cells on numerous tissue samples without the requirement of complex bioinformatics expertise.

Moreover, our method allows the cell density to be determined from microscopic structures, such as lymphoid follicles and small neoplastic lesions, which are not accessible with FC. Because of the Definiens CNT used in our algorithm, we can implement specific settings to detect these structures within the colon and count the associated cells. This gives significant information as the high density of immune cells in lymphoid structures shows the link between gut inflammation and lymphoid follicles, which has already been described in the mouse<sup>30</sup>; furthermore, the importance of the tumor microenvironment has been shown in colorectal cancer patients<sup>6,7,18</sup>.



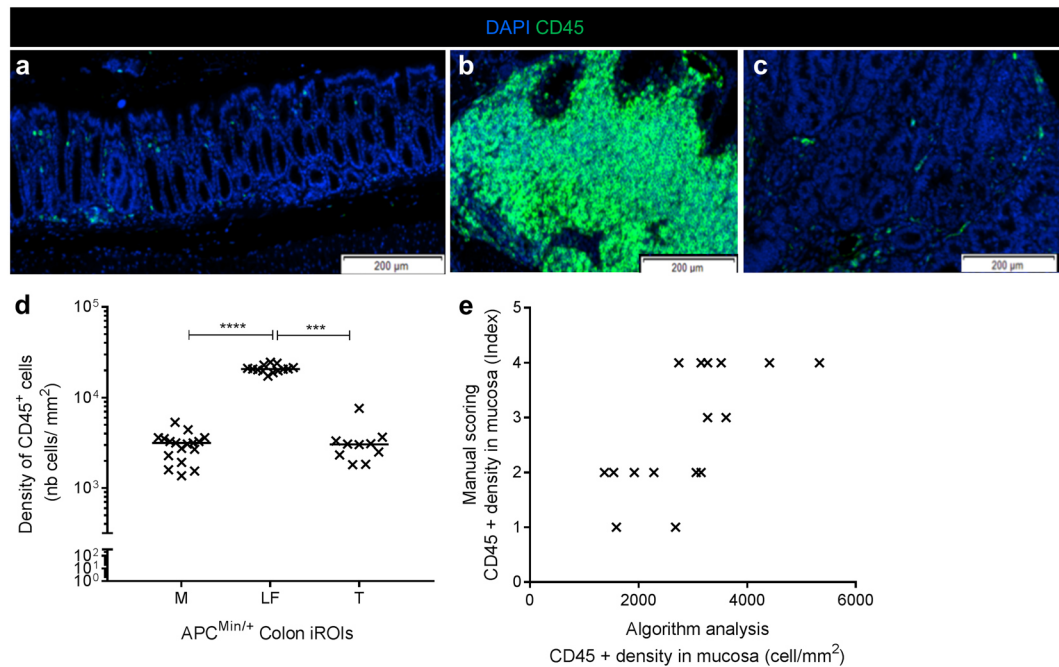
**Figure 5.** Cellular detection and classification method on mucosa (a–d), lymphoid follicles (e–h) and tumor areas (i–l). (a,e,i) Representative CD45<sup>+</sup> leucocyte immunostaining (CD45<sup>+</sup> cells: green; DAPI: red). (b,c) To detect all cells in the mucosa, we used two sequential steps. (b) The first step was nuclear detection as represented by blue delimitation based on DAPI fluorescence and the nuclear mean size as determined by iteration to delimit DAPI ( $35 \mu\text{m}^2 \pm 5 \mu\text{m}^2$ ). (c) Then, we performed cell detection using a second step with nuclear staining, the CD45 membrane signal and the mean cellular size determined by iteration to delimit FITC staining ( $38 \mu\text{m}^2 \pm 5 \mu\text{m}^2$ ). (d) To identify leucocytes, we carried out cell classification of positive cells (CD45<sup>+</sup>, light yellow cells and arrows) and negative cells (CD45<sup>-</sup>, white arrow, dark yellow cells), applying optimal fluorescence thresholds for nuclei and membrane markers. We simultaneously performed all of these steps using the same parameters on lymphoid follicles (e–h) and tumors (i–l). Automated discrimination of CD45<sup>+</sup> cells was successful on all iROIs simultaneously with the same optimal parameters.

Because our algorithm is based on immunofluorescence detection, its settings are sensitive to fluorescence variations (e.g., pattern and intensity). Whereas the method pipeline is validated on different slide sections and stainings, an optimal and reproducible immunostaining protocol is required to analyse a batch of slides. Furthermore, algorithm optimization is needed for each new immunostaining or to develop new membrane markers. A simple software interface<sup>28,29</sup> and troubleshooting guide make this process easier and faster for everyone.

Application of this new, quantitative, easy method could be extended to multiplex studies, such as the work by Blom<sup>26</sup>, as well as to whole sections with various complex structures, such as gut samples, because these settings are optimised for this type of tissue. Application of this method enables precise immune cell characterization in various gut regions of interest (from the epithelium to muscular layers) via cell-cell interaction studies and fine localization of cellular events at different time points along the gut. This method could be useful to better understand both the mechanism of immune dysfunction associated with gut disorders<sup>1–8</sup> and the interaction between pathogenic bacteria (FISH determination) and the immune system<sup>9,10,12,22</sup>.

In summary, here, we describe a powerful method to characterize immune cells in the gut of mice that is user-friendly for the scientific community. We expect that this method will help to decipher the complexity of interactions between the gut microenvironment and gut disorders or their treatments. Moreover, this method could apply to the detection and quantification of cells in any particular microscopic structure that is not reachable by classical means. For example, subtle neuronal immune cross talk in the gut, such as macrophages interacting with mesenteric neurons<sup>31</sup> could be studied using the developed algorithm and method in a quantitative fashion. It will allow scientist to follow the precise and quantitative development of specific microenvironment within a disease context in whole organs for the purposes of preclinical studies.





**Figure 6.** Validation of CD45 leucocyte quantification. (a–c) CD45 immunostaining for each colon area. As expected, we observed a higher leucocyte density in lymphoid follicle (b) than the mucosa (a) or tumors (c). (d) We obtained the same result using the cell quantification algorithm; thus, we validated our method (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p < 0,005$ , one-way analysis of variance). ( $n = 20$  immunostained sections from 18 different mice). (e) Comparison between algorithm quantification of CD45<sup>+</sup> cells in the mucosa and manual scoring showed a positive correlation (\*\* $p < 0,01$ ; Pearson's test,  $r = 0,6869$ ).

## Methods

**Animals.** Studies were performed using 13- to 14-week-old C57BL/6J-ApcMin/p (Min mice; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) in accordance with the French and European Economic Community guidelines (86-60, EEC) for the care of laboratory animals. Studies were approved by the French Regional Ethical Animal Use Committee (No. CE-2912, Apafis#5401). All mice were housed in specific pathogen-free conditions at the animal care facility of Université Clermont Auvergne (Clermont-Ferrand, France).

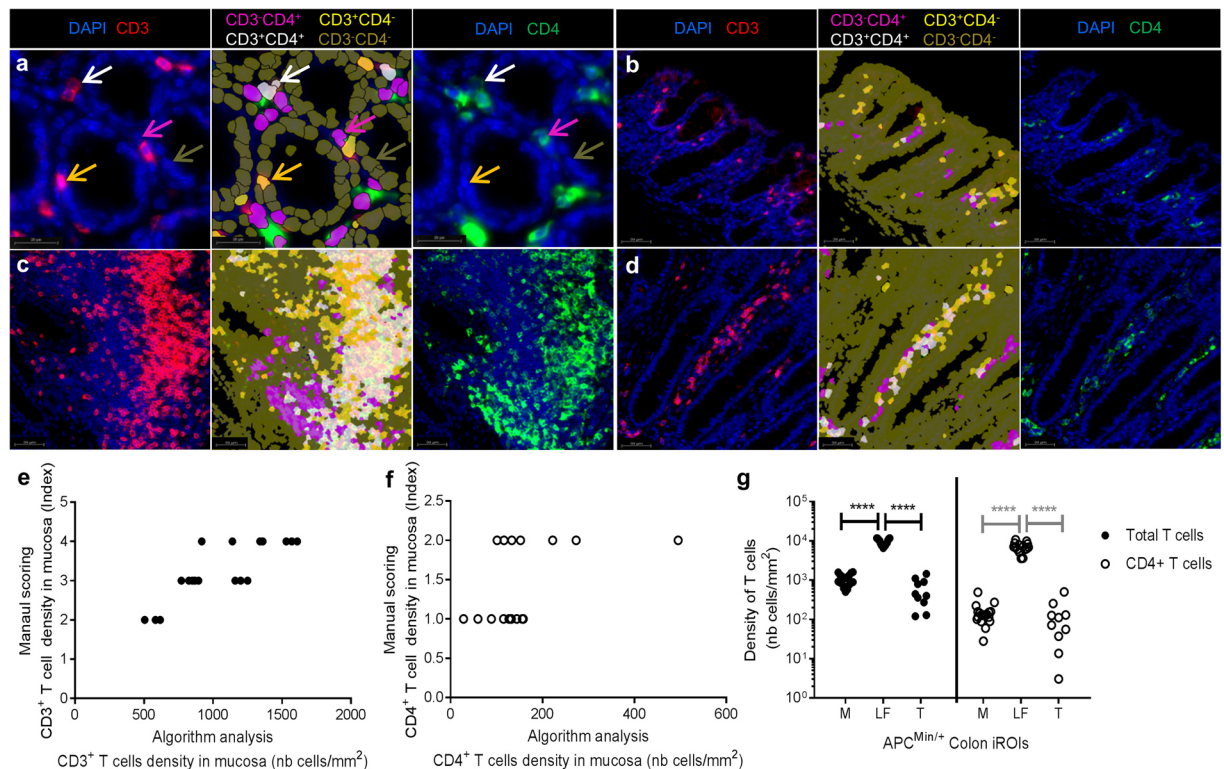
**Tissue harvesting and processing.** The colons were removed from the caecum to the rectum, flushed with PBS, and splayed longitudinally. The colons were swiss-rolled from the distal to proximal end and fixed for 24 h in 10% formalin (Sigma, Tokyo, Japan) at room temperature (RT). Colon blocks were embedded in paraffin (Tissue-Tek Paraffin Wax #4511, Sakura, Leiden, Holland) according to the standard procedure. Paraffin-embedded sections were cut into 5 µm sections on superfrost slides (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA), dried overnight at +37 °C and stored at RT. For long-term storage, slides were stored at +4 °C.

**Immunofluorescence staining (IF) and mounting slides.** All IF staining was performed using an automated stainer, Discovery XT processors (Ventana Medical Systems, Oro Valley, Arizona, USA), and the tyramide signal amplification (TSA)-conjugated fluorochrome method was used to detect each target (CD45, CD3 and CD4) on whole colon slides. Paraffin was removed from slides, and slides were then conditioned with two incubation cycles in EZPrep buffers (Ventana Medical Systems, Oro Valley, Arizona, USA), with a first cycle at 58 °C for 12 min and a second cycle at 60 °C for 4 min. Antigens were retrieved with CC1 program (Ventana Medical Systems, Oro Valley, Arizona, USA) according to the standard procedure (Tris-EDTA buffer pH 7.8 at 95 °C for 44 min). Then, endogenous horseradish peroxidase was blocked with DISC inhibitor reagent (Ventana Medical Systems, Oro Valley, Arizona, USA) for 8 min at RT.

A series of staining steps were performed interspersed with 2 to 3 washing steps using the proprietary Reagent Buffer (Ventana Medical Systems, Oro Valley, Arizona, USA). For CD45 single staining, slides were incubated with primary rabbit anti-CD45 antibody (10558, 2.5 µg/mL; Abcam, Cambridge, UK) at RT for 2 h. For IF, two rounds of 16 min incubations were performed, first with Umap anti-rabbit HRP (Ventana Medical Systems, Oro Valley, Arizona, USA) and second with FITC tyramides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Discovery FITC kit, Ventana Medical Systems, Oro Valley, Arizona, USA) according to the manufacturer's instructions.

For CD4/CD3 double staining, staining was performed in three sequential steps. First, slides were incubated with a primary rat anti-CD4 antibody (4SM95 clone, 2.5 µg/mL, eBioscience, Paris, France) at RT for 1 h. For IF, slides were incubated with a goat anti-Rat IgG secondary antibody (112-065-003, 5.5 µg/mL; Jackson, Baltimore, PA, USA) for 32 min at RT then incubated with Umap anti-goat HRP (Ventana Medical Systems, Oro Valley, Arizona, USA) according to the manufacturer's instructions for 16 min at RT. Finally, they were reacted with





**Figure 7.** Algorithm application on double immunostaining to quantify CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cells. **(a)** Representative focus in the mucosa of CD3 (left image; red) and CD4 (right image; green) immunostaining. We based the cell classification on DAPI (blue) and CD3 and CD4 fluorescence to identify four distinct types of cells: CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> (pink), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> (light yellow), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (white) and CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup> (dark yellow) (middle image). **(b–d)** We validated our classification method and optimal sets on all iROIs: mucosa **(b)**, lymphoid follicles **(c)** and tumors **(d)**. **(e)** Comparisons between the algorithm quantification of CD3<sup>+</sup> cells on the mucosa and manual scoring showed a significant correlation. (\*\*\*\**p* < 0,0001; Pearson's test, *r* = 0,8252). (*n* = 23 immunostained sections from 18 different mice). **(f)** We obtained a significant correlation for CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells between the manual and algorithm quantifications (\**p* < 0,05; Pearson's test, *r* = 0,4999) **(g)** We successfully automated the discrimination and quantification of CD3<sup>+</sup> T cells (fill dot) and CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells (empty dot) on all ROIs simultaneously using the same parameters. A significant increase of the CD3<sup>+</sup> T cell density (\*\*\*\**p* < 0, 0001; one-way analysis of variance) and CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells (\*\*\*\**p* < 0, 0001; one-way analysis of variance) was observed in the lymphoid follicle, as expected.

FITC tyramides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Discovery FITC kit, Ventana Medical Systems, Oro Valley, Arizona, USA) for 16 min at RT. A second step comprising denaturation and neutralization was needed for CD3 staining. More precisely, slides were incubated at 40 °C for 20 min with DISC inhibitor HRP reagent (Ventana Medical Systems, Oro Valley, Arizona, USA). Third, they were incubated with a primary rabbit anti-CD3 antibody (SP7 clone, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA, 5 µg/mL) at RT for 2 h. For IF, slides were incubated with Umap anti-rabbit HRP (Ventana Medical Systems, Oro Valley, Arizona, USA) according to the manufacturer's instructions for 16 min at RT. Finally, a reaction between Rhodamine tyramides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Discovery Rhodamine kit, Ventana Medical Systems, Oro Valley, Arizona, USA) was performed for 16 min at RT.

The cut sections were denatured at 37 °C for 4 min, and cell nuclei were counterstained with DAPI (Ventana Medical Systems, Waltham, MA, USA). Slides were manually mounted with ProLong™ Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and High Precision coverslips (No 1.5 H, Marienfeld, Thuringia, Germany), which are optimal for optical microscopy acquisition.

Negative control slides were also included that lacked any appropriate antibody or, in the case of double staining, omitted one or the other primary antibody.

**Image acquisition.** All slides were acquired automatically at 0,161 µm/pixel resolution using a VS-120-ASW-L100 whole-slide scanner (Olympus, Rungis, France) equipped with a Digital monochrome Olympus XM10 camera 40x objective (NA 0.95). First, a global overview of the whole colon section was performed automatically using an Olympus camera set on brightfield (VC50 camera 4x objective and the mercury lamp U-HGLPS, Lumencor) to define the scan area. Second, a fluorescence image was acquired with automatic focusing (default factors setting) and used DAPI (ex: 350 nm/em: 450 nm), FITC (ex: 495 nm/em: 521 nm) and CY3 (for Rhodamine fluorophore, ex: 550 nm/em: 570 nm) filter sets compatible with light sources (X-Cite exacte Microscope Illumination System) and AT350/50x filter wheels. For CD45 fluorescence imaging, we used 50 ms

Trouble ID	Troubleshooting	Analysis step	Possible cause	Solutions/Optimization criteria	
				During Digital Image Analysis	During staining and image acquisition
1	Partial tissue detection	Global tissue detection	No homogeneous fluorescence signal on whole sections (Intensity, Brightness...)	Choose large thresholds of homogeneity and brightness (0–5 and 0–255)	Use mounting media and a specific IF coverslip (Thickness = 0.17 μm) Image acquisition must be processed 1 to 10 days after staining
2	Background or other tissue have been incorrectly classified in the mucosa ROI, for a large area of section	ROI classification	Poor separation between the specific signal and background	Use ROI reclassification based on the fluorescence signal intensity, compactness and density of tissue Manual correction step	Optimization of the exposure time and fluorescence minimal and maximal intensity during image acquisition
			Imprecise automatic learning due to a heterogeneous fluorescence pattern	Make a new automatic learning algorithm using more representative image objects (segmented part of a ROI) from each ROI	All slides must be stained and scanned with the same procedure and same time
3	Background or other tissue have been incorrectly classified in the mucosa ROI for a small area of section	ROI classification	Imprecise automatic learning due to a heterogeneous fluorescence pattern	Make a new automatic learning algorithm using more representative image objects from each ROI	
			Heterogeneous tissue staining or fluorescence pattern for the same ROI	Use ROI reclassification based on the tissue size and relationship to neighbour object Manual correction	
4	Lymphoid structure has been incorrectly classified as mucosa	ROI classification	Imprecise automatic learning due to a heterogeneous fluorescence pattern	Make a new automatic learning algorithm using more representative image objects from each ROI CAUTION: DO NOT USE follicle objects with weak cell density for correct follicle area distinction	
			Heterogeneous tissue staining or fluorescence pattern for the same ROI	Use ROI reclassification based on the tissue size and relationship to neighbour object Manual correction	
5	Imprecise nuclei detection	Cellular detection	Heterogeneous staining or too blurry fluorescence signal of DAPI	Increase the threshold of DAPI detection	Optimization of staining (Antibody concentration and incubation time) Optimization of automated focus during scan, possibility to apply Extending Focus Imaging)
			Heterogeneous staining or too blurry fluorescence signal of membrane marker	Increase the threshold of membrane marker detection if the fluorescence membrane intensity is too high Decrease the threshold of membrane marker detection if the fluorescence membrane intensity is too low Use the detection mode “growth from nuclei”	Optimization of fluorescence acquisition (exposure time, intensity thresholds)
6	False-positive cells detected	Cellular classification	Imprecise cell detection (cf Troubleshooting 5)	Cf Troubleshooting 5	Cf Troubleshooting 5
			Fluorochrome deposits	Increase the threshold of DAPI for cell classification Increase the minimal size of cells during membrane detection step	Optimization of staining (decrease concentration of detection, decrease time of denaturation by heat, increase wash number and time)
				Exclude aggregates of fluorochromes from the cellular analysis using nuclear filter module	
Tissue autofluorescence on the margin (mucosa and tumor) specific to paraffin-embedded tissue	Exclude area of cellular analysis with the use of new area classification (Mucosa bis, Tumor bis)	Increase the difference between background and specific staining during image acquisition (time exposure, fluorescence intensity thresholds)			
7	Aberrant cellular detection links with specific membrane or nuclear structures (e.g., polynuclear cells)	Cellular detection	Aberrant distinction between the nuclear and membrane signals due to incorrect membrane detection by the algorithm	Decrease the resolution and magnification parameter analysis and only use membrane staining to detect cells	

**Table 1.** Troubleshooting guide. All of the steps are based on the fluorescence intensity and fluorescence intensity thresholds, so they were sensitive to any change. This table provides solutions to overcome these problems and quickly optimise the analysis.

optimal exposure times for the DAPI channel and 25 ms for the FITC channel. For CD3/CD4 fluorescence staining, we used 30 ms optimal exposure times for the DAPI channel, 50 ms for the FITC channel, and 5 ms for the CY3 channel. Fluorescence images were stored as 16-bit greyscale fields and global overview images as 24-bit

RGB colours. All images were acquired with Olyvia VS-ASW FL 2.7 software (Olympus, Rungis, France; build number 11043) and stored under an *ets* format linked to an Olympus proprietary *vsf* file.

**Manual scoring.** Manual scoring was performed on Olyvia VS-ASW FL 2.7 software (Olympus, Rungis, France; build number 11043) on a Z840 HP PC with a 4 cores Intel Xeon CPU E5-2637 V4 (3.50 GHz), 128 GB of RAM, and Windows 7 Enterprise (64 bit). Analyses were performed on 20 different whole colon sections from 18 different mice for CD45 staining (18 slides with IF staining and 2 negative controls without anti-CD45 primary antibody). For T cell analysis, we used the same 18 mice, but we performed analyses on 23 different sections (18 IF stains and 5 controls: 3 without anti-CD3 and CD4 primary antibodies, 1 without anti-CD3 primary antibody, and 1 without anti-CD4 primary antibody). To score leucocytes (CD45<sup>+</sup> cells) and CD3 and CD4 T cell densities, the iROI (mucosa, lymphoid follicle and tumor) of each mouse was observed with a 20x objective and scored separately. For mucosa and tumor, 10 and 7 random fields were observed and scored, respectively, and then the mean was calculated. For lymphoid follicles, the whole lymphoid area was observed. The manual score was determined between 0 (absence of positive immune cells) and 5 (high presence of positive immune cells). The slides were anonymously analysed; to simplify scoring, each specific iROI (mucosa, lymphoid follicle, and tumor) was compared between the different mice, but the iROIs of the same mouse were not compared with each other.

**Digital image analysis and code availability.** Digital image analysis was performed on the same hardware as the manual analysis, using the IF module of Definiens Tissue Studio software version 4.3.1. All images were downloaded in the original format (*ets*, 0.161 μm/pixel resolution; 16-bit depth, 40x objective). Each slide was automatically analysed using 40x viewing resolution for segmentation and cellular analysis steps, and 10x viewing resolution was used for ROI detection and classification steps. Across the entire analysis between ROI correction and cellular analyses steps, the same resolution parameters were selected. Each step was confirmed visually. To obtain the best distinction between the algorithm simulation and the original image, we used a false colour representation (DAPI in red, membrane marker in green). First, algorithm settings (described previously) were established on five representative slides. They then were tested and optimised on 10 randomly selected slides. Finally, they were confirmed on each batch of slides (20–23 slides). Validated algorithm codes were saved as *dax* files that are available at Scientific Report online.

**Numeric data analysis and statistical methods.** The area of each iROI was directly exported by Tissue Studio software using Microsoft Excel tables (Microsoft office professional Plus 2010; Redmond, Washington, USA). CD45 and T cell densities on each iROI were calculated with Excel:

$$\begin{aligned} \text{CD45 positive cell density}_{iROI_x} \text{ (mm}^2\text{)} &= \frac{\text{Total CD45 positive cells } iROI_x}{\text{Total surface } iROI_x \times 10^6} \\ &= \frac{\# \text{ Cell Markers 1 and 2 coexpressed}}{iROI_x \text{ (all) Area} \times 10^6 \text{ (}\mu\text{m}^2\text{)}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{CD3 positive cell density}_{iROI_x} \text{ (mm}^2\text{)} &= \frac{\text{Total CD3 positive cells } iROI_x}{\text{Total surface } iROI_x \times 10^6} \\ &= \frac{\# \text{ Cell Markers 1 and 2 and 3 coexpressed}}{iROI_x \text{ (all) Area} \times 10^6 \text{ (}\mu\text{m}^2\text{)} + iROI_{xbis} \text{ (all) Area} \text{ (}\mu\text{m}^2\text{)} \times 10^6} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{CD4 positive cell density}_{iROI_x} \text{ (mm}^2\text{)} &= \frac{\text{Total CD4 positive cells } iROI_x}{\text{Total surface } iROI_x \times 10^6} \\ &= \frac{\# \text{ Cell Markers 1 and 2 coexpressed}}{iROI_x \text{ (all) Area} \times 10^6 \text{ (}\mu\text{m}^2\text{)} + iROI_{xbis} \text{ (all) Area} \text{ (}\mu\text{m}^2\text{)} \times 10^6} \end{aligned}$$

Statistical analyses were performed using Prism 6.05 (GraphPad Prism, La Jolla, CA, USA). Correlations between manual score and numeric data analyses were calculated using Pearson's correlation coefficient (*r*). One-way analysis of variance test was used to compare cell density between iROIs of the same mouse. *p*-values <0.05 were considered statistically significant.

**Accession code.** Algorithm codes for digital image analysis of whole colon slide, and more precisely for ROI classification and leucocytes and T cells quantification are available on Scientific Report website, in *dax* format. This format must be opened in Tissue Studio Software. Structures and all any details of algorithm code are available in.pdf format in article figures (Figs 1a, 2 and 4d) and in Supplementary information (Supplementary Figs 2 and 3).

## References

1. Yan, Y. *et al.* Temporal and Spatial Analysis of Clinical and Molecular Parameters in Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis. *PLoS ONE* **4**, e6073, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006073> (2009).
2. Hall, L. J. *et al.* Induction and Activation of Adaptive Immune Populations During Acute and Chronic Phases of a Murine Model of Experimental Colitis. *Dig. Dis. Sci.* **56**, 79–89, <https://doi.org/10.1007/s10620-010-1240-3> (2011).
3. Lissner, D. *et al.* Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD: *Inflamm. Bowel Dis.* **1**, <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000384> (2015).
4. Kim, D., Zeng, M. Y. & Núñez, G. The interplay between host immune cells and gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *Exp. Mol. Med.* **49**, e339, <https://doi.org/10.1038/emm.2017.24> (2017).

5. Tosolini, M. *et al.* Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Res.* **71**, 1263–1271, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2907> (2011).
6. Galon, J. *et al.* Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J. Transl. Med.* **10**, 205, <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-205> (2012).
7. Mlecnik, B. *et al.* Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity* **44**, 698–711, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.025> (2016).
8. Jakubowska, K., Kisiielewski, W., Kańczuga-Koda, L., Koda, M. & Famulski, W. Diagnostic value of inflammatory cell infiltrates, tumor stroma percentage and disease-free survival in patients with colorectal cancer. *Oncol. Lett.* <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6639> (2017).
9. Wu, S. *et al.* A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat. Med.* **15**, 1016–1022, <https://doi.org/10.1038/nm.2015> (2009).
10. Kostic, A. D. *et al.* *Fusobacterium nucleatum* Potentiates Intestinal Tumorigenesis and Modulates the Tumor-Immune Microenvironment. *Cell Host Microbe* **14**, 207–215, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.007> (2013).
11. Yu, Y.-R. A. *et al.* A Protocol for the Comprehensive Flow Cytometric Analysis of Immune Cells in Normal and Inflamed Murine Non-Lymphoid Tissues. *PLOS ONE* **11**, e0150606, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150606> (2016).
12. Thiele Orberg, E. *et al.* The myeloid immune signature of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced murine colon tumorigenesis. *Mucosal Immunol.* **10**, 421–433, <https://doi.org/10.1038/mi.2016.53> (2017).
13. Mulrane, L., Rexhepaj, E., Penney, S., Callanan, J. J. & Gallagher, W. M. Automated image analysis in histopathology: a valuable tool in medical diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **8**, 707–725, <https://doi.org/10.1586/14737159.8.6.707> (2008).
14. David, B. A. *et al.* Combination of Mass Cytometry and Imaging Analysis Reveals Origin, Location, and Functional Repopulation of Liver Myeloid Cells in Mice. *Gastroenterology* **151**, 1176–1191, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.08.024> (2016).
15. Newell, E. W. & Cheng, Y. Mass cytometry: blessed with the curse of dimensionality. *Nat. Immunol.* **17**, 890–895, <https://doi.org/10.1038/ni.3485> (2016).
16. Chang, Q. *et al.* Imaging Mass Cytometry. *Cytometry A* **91**, 160–169, <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23053> (2017).
17. Eliceiri, K. W. *et al.* Biological imaging software tools. *Nat. Methods* **9**, 697–710, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2084> (2012).
18. Galon, J. *et al.* Immunoscore and Immunoprofiling in cancer: an update from the melanoma and immunotherapy bridge 2015. *J. Transl. Med.* **14**, <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1029-z> (2016).
19. Kozłowski, C. *et al.* An entirely automated method to score DSS-induced colitis in mice by digital image analysis of pathology slides. *Dis. Model. Mech.* **6**, 855–865, <https://doi.org/10.1242/dmm.011759> (2013).
20. Moser, A. R., Pitot, H. C. & Dove, W. F. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* **247**, 322–324, <https://doi.org/10.1126/science.2296722> (1990).
21. Levy, D. B. *et al.* Inactivation of both APC alleles in human and mouse tumors. *Cancer Res.* **54**, 5953–5958, <http://cancerres.aacrjournals.org/content/54/22/5953> (1994).
22. Mima, K. *et al.* *Fusobacterium nucleatum* and T Cells in Colorectal Carcinoma. *JAMA Oncol.* **1**, 653, <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.1377> (2015).
23. Jochems, C. & Schlom, J. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. *Exp. Biol. Med.* **236**, 567–579, <https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011007> (2011).
24. Stack, E. C., Wang, C., Roman, K. A. & Hoyt, C. C. Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: A review, with an assessment of Tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods* **70**, 46–58, <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2014.08.016> (2014).
25. Feng, Z. *et al.* Multispectral Imaging of T and B Cells in Murine Spleen and Tumor. *J. Immunol.* **196**, 3943–3950, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502635> (2016).
26. Blom, S. *et al.* Systems pathology by multiplexed immunohistochemistry and whole-slide digital image analysis. *Sci. Rep.* **7**, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15798-4> (2017).
27. Parra, E. R. *et al.* Validation of multiplex immunofluorescence panels using multispectral microscopy for immune-profiling of formalin-fixed and paraffin-embedded human tumor tissues. *Sci. Rep.* **7**, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13942-8> (2017).
28. Baatz, M., Zimmermann, J. & Blackmore, C. G. Automated Analysis and Detailed Quantification of Biomedical Images Using Definiens Cognition NetworkTechnology. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **12**, 908–916, <https://doi.org/10.2174/138620709789383196> (2009).
29. Castellanos, J. A., Montiel, J. M. M., Neira, J. & Tardós, J. D. The SPMAP: A probabilistic framework for simultaneous localization and map building. *IEEE Trans. Robot. Autom.* **15**, 948–952, <https://doi.org/10.1109/70.795798> (1999).
30. Bergomas, F. *et al.* Tertiary Intra-tumor Lymphoid Tissue in Colo-Rectal Cancer. *Cancers* **4**, 1–10, <https://doi.org/10.3390/cancers4010001> (2011).
31. Veiga-Fernandes, H. & Artis, D. Neuronal-immune system cross-talk in homeostasis. *Science* **359**, 1465–1466, <https://doi.org/10.1126/science.aap9598> (2018).

## Acknowledgements

We are grateful to Mr. P. Ripaille for his great help in statistical analysis in order to calculate the number of available coded action possibilities in Tissue Studio software. This study was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie, Inserm and Université Clermont-Auvergne (UMR1071), INRA (USC-2018). A. Lopès was supported by a CIFRE grant with Sanofi R&D (2015/622).

## Author Contributions

A.L. did most of the dry and wet lab experiments as part of her PhD training including the *in vivo* experiments, algorithm design, and data analysis, she wrote the paper and the revised version. To use the Definiens software, she was trained by A.C. who helped with using the various imaging equipments. E.B. contributed to *in vivo* experiments, data analysis and paper improvements and revisions. G.R. followed the day to day animal facility work/maintenance and participated in the *in vivo* experiments. E.B.S. trained A.L. on the automatized imaging platform. C.L. screened for the appropriate antibodies used in the study. N.B. opened his lab to *in vivo* experiments and critically revised the manuscript while S.N. opened her lab as head of the Sanofi imaging group. M.B. developed, conceived and coordinated all the experiments, contributed to *in vivo* experiments and data acquisition while revising and finalizing the paper. B.D. developed, conceived and coordinated all the experiments while revising and finalizing the paper.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34731-x>.

**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



# Deciphering immune microenvironment of whole organ slide, by digital imaging and cognition network technology: application to mouse gut.

A. Lopes<sup>1,2,3</sup>, Al H. Casse<sup>4, \*</sup>, E. Billard<sup>1,2, +</sup>, E. Boulcourt-Sambou<sup>4</sup>, G. Roche<sup>1,2</sup>, C. Larois<sup>4</sup>, N. Barnich<sup>1,2</sup>, S. Naimi<sup>4</sup>, M. Bonnet<sup>1,2,+</sup>, B. Dumas<sup>3+\*</sup>.

<sup>1</sup> Clermont Université, UMR 1071 Inserm/Université Clermont-Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup> INRA, USC-2018, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>3</sup> Research Biologics, Sanofi R&D, 94400 Vitry-Sur-Seine, France

<sup>4</sup> Histopathology and Bio-Imaging Group, Sanofi R&D, 94400 Vitry-Sur-Seine, France

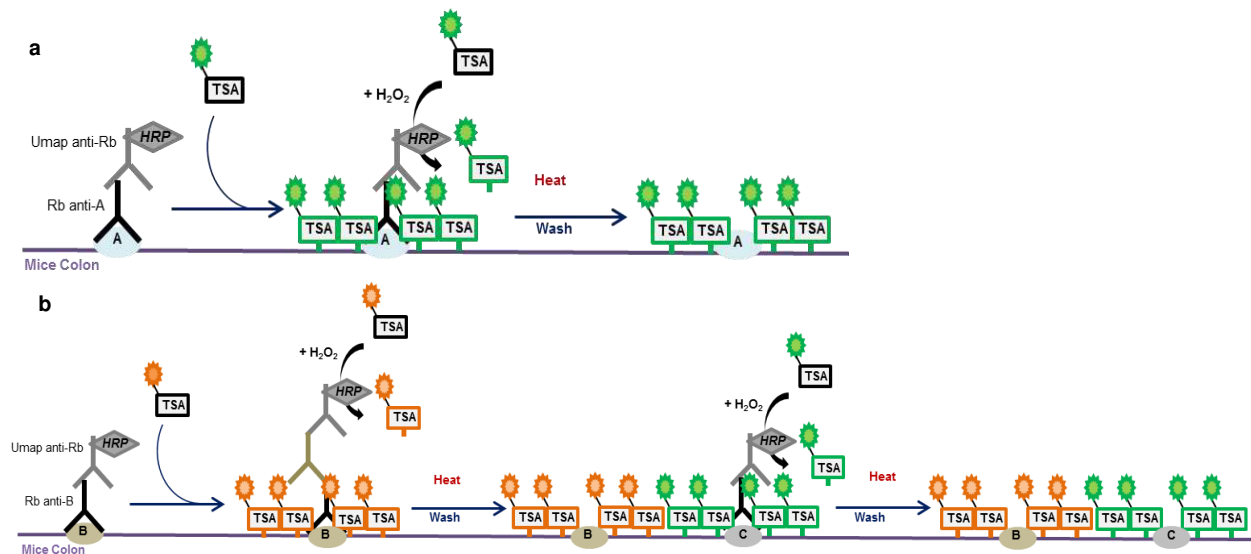
+Contributed equally

\*Corresponding author

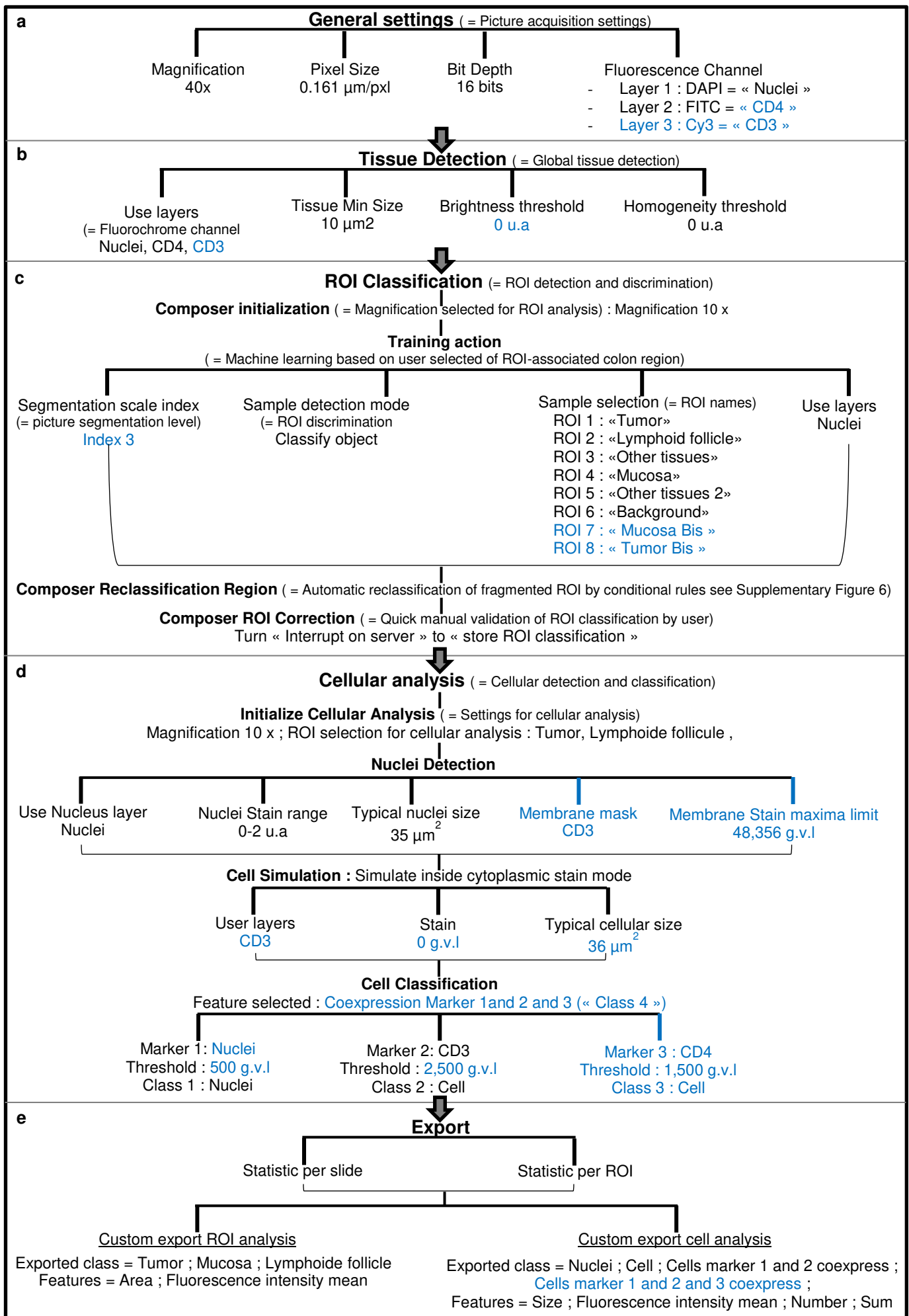
\*Bruno.Dumas@sanofi.com // Alhassan.Casse2@sanofi.com

## Supplementary informations

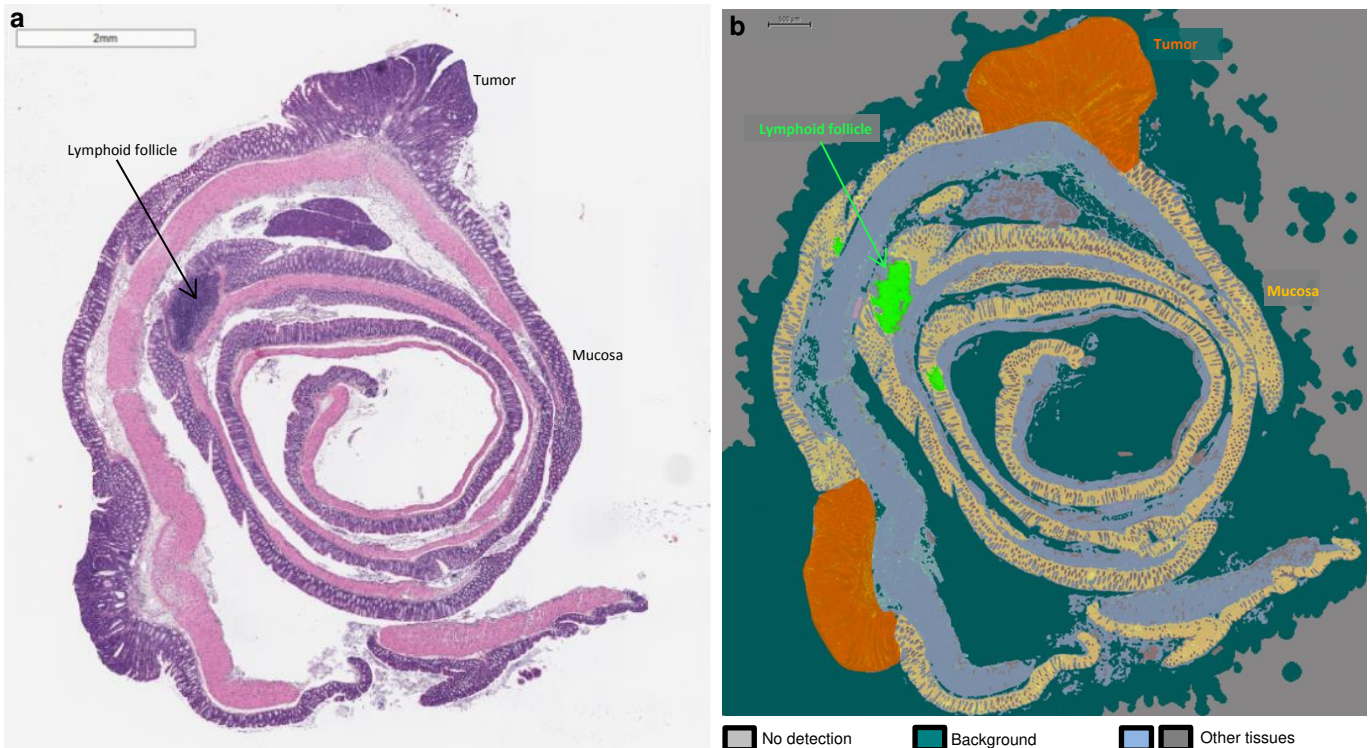
### Supplementary Figures



**Supplementary figure S1.** Optimal immunostaining method for digital image analysis. The Tyramide Signal Amplification method amplifies specific fluorescence signals on IHC colons of APCMin/+ mouse slides and thus allows automated digital analysis. This method is based on the reaction between horseradish peroxidase (HRP) and tyramide (TSA) and is used to reveal the detection of immune membrane markers (A,B,C) during simple (a) and double staining (b). Briefly, an unconjugated primary antibody recognizes a protein of interest (A,B,C) and is then recognized by a secondary antibody coupled with Horseradish Peroxidase (HRP). When tyramide coupled with a fluorochrome is added, it reacts with HRP and becomes activated. The tyramide-fluorochrome complex forms a covalent link with the target protein. Finally, the large number of these complexes amplifies the signal. This technique permits more than simple staining because of a denaturation step by heating (b).

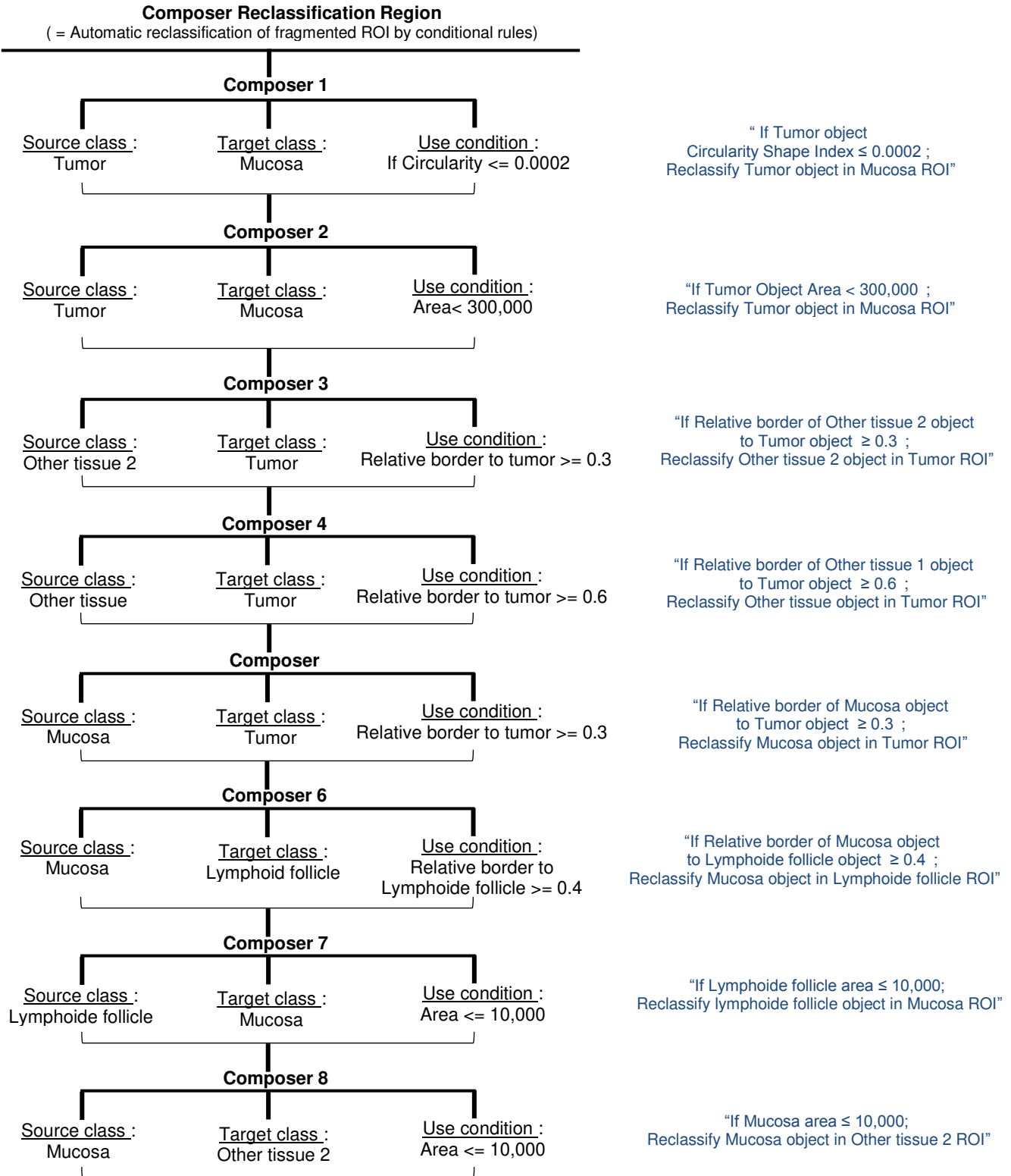


**Supplementary figure S2.** Optimal digital image analysis algorithm flowchart for whole colon slide, for CD3/CD4 double staining. Total T cells and CD4<sup>+</sup> T cells were quantified in the same way as leucocytes CD45<sup>+</sup> cells. Exactly the same orderly rule successions are implemented, the only changes (appear in blue characters in flowchart) are the addition of a new fluorescence channel corresponding to Cy3 fluorochrome (used to reveal the CD3 membrane protein), and the settings of specific parameters based on fluorescence. (a) More precisely, the new fluorescence channel is added in the first step, “General settings”. (b) We optimize “Tissue detection” by adding the Cy3 channel to detect whole tissue and setting the brightness fluorescence threshold. (c) For the “ROI Classification”, minor changes are made. The index of segmentation is decreased to allow a better “primitives-object” formation (determined by iterative method). Besides we add two ROI classes: “Mucosa bis” and “Tumor bis” to class exceptional Mucosa and Tumor ROI without cells of interest but with low auto-fluorescence (in Cy3 fluorescence channel), when it is necessary. It allows measuring the tissue size without counting cells because these ROIs are not selected in final cellular analysis (d. “Initialize Cellular Analysis” step). (d) Concerning the other “Cellular analysis” steps, we allow the detection and classification of total CD3<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells. To this end we designate the CD3 marker (Cy3 channel) as the principal membrane component by adapting the Nuclei detection and Cell simulation (blue characters). Furthermore we implement a third cell class (blue characters in “Cell Classification” step). (e) Rules of exportation are the same as for CD45 analysis, we simply add an export class to obtain the number of CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (blue characters). Composer = ruleset.



**Supplementary figure S3.** A machine learning method to quantify immune cells on various colon structures. We develop an algorithm to discriminate different colon regions (ROI) on the whole colon (a: HES staining slide; b: result of the algorithm process). (b) Then, we implement cell quantification in three regions of interest that contained immune cells (iROIs): mucosa (yellow), tumours (orange), lymphoid follicles (green).





**Supplementary figure S4.** ROI reclassification rules details for CD3CD4 double staining. In the same way that CD45 simple staining, we use a ROI reclassification step to improve the ROI classification step precision. Same features are used to implemented the conditional rules: Area of object (**Composer 2, 7** and **8**) and the proximity between two objects ("relative border to" ; **Composer 3-6**). We add a new feature to improve this reclassification based on three different fluorescence markers by implementing conditional rule based on the object shape and more precisely on the object circularity (**Composer 1**). Composer: ruleset.

Coded available action set	Block Action Goal (linked with whole colon slide analysis)	List of available coded actions (for each block action)	Available function	Function-associated parameters	Total number of possible rulesets
General Setting	Set the workflow parameter for digital image analysis	Unique fixed solution depend on image acquisition parameters		- Magnification - Pixel Size - Bit Depth - Fluorescence channel	1
Tissue detection	Complete detection of whole colon tissue	Unique tissue detection	* Automatic detection	- Tissue minimal size - Fluorescence Brightness - Fluorescence Homogeneity	$\approx 6.3 \times 10^7$
ROI classification	Distinction of the APC Min colon ROIs  ROI Obtained size	- Manual ROI selection	ND	NA	NA
		- Initialization composer	* Optimized ROI analysis magnification set	Magnification	100
		- Training composer	* Selection of sample to allow training based – based discrimination of ROI and automatic ROI classification	- Segmentation scale - Panel of selected sample	Up to 8
		- Cut a bottleneck composer - Create a Region composer - Create Margin	ND	ND	ND
		- ROI reclassification	* Reclassify one ROI class to another ROI class based on 3 conditions (= on up to 3 parameters)	15 parameters for each couple of ROI : - <u>Fluorescence intensity</u> : mean, standard deviation, pixel ratio between 2 marker - <u>ROI Geometry</u> : circularity , compactness, border index, density, elliptic fit, roundness, shape index - <u>Relation between object</u> : Number of objects, border to object, relative border to an object, area ratio between two objects	$\approx 9.1 \times 10^{415}$ (for analysis of 3 ROIs)
		- ROI correction	* Select object OR/AND * Select polygon To correct ROI	NA	1
Cellular analysis	Detect cells  Classify cells  Quantify cells	-Initialize cell analysis	* Optimized cellular analysis magnification set	Magnification	6
			* Selection of ROI to make cellular analysis	ROI discrimination	Up to 8
		- Nucleus detection	* Detection of nuclei based on nuclear marker	- Fluorescence intensity of nuclear marker - Typical nuclei size	
		-Nucleus Morphology filter -Marker area detection -Vessel detection - Membranes and cells - Spot detection - Marker area classification - Nucleus classification - Membrane classification - Vessel classification	ND	ND	18 for a simple staining or 336 for a double staining
		- Cell simulation	* Detect cells	- Choice of simulation mode : “inside cytoplasmic stain” or “growth from nuclei” - Fluorescence intensity of membrane marker	
		- Cell classification	* Classify and quantify cells	- Optimal threshold to distinct positive cells to negative cells, for a marker	
Export Settings	Set parameter to export numeric data	Default export	* Export Numeric data per object *Export data per ROI object	NA	3
		Custom export for cellular analysis	* Export all data associated with cellular analysis	50 parameters based on fluorescence, geometry, position... of cells	ND
		Custom export for ROI analysis	* Export all data for ROI analysis	See ROI reclassification parameters	ND
		Heat Map	ND	ND	ND

**Supplementary Table 1.** Overview of available coded actions on Tissue Studio software. Definiens Tissue Studio software provides an exhaustive list of pre-coded functions. These functions are associated with five principal action family (or sets): “General setting”, to set analysis workflow parameters; “Tissue detection”; “ROI classification”, “Cellular Analysis” and “Export settings”. Each set of actions contains different possible coded actions. Besides, various function and parameters could be selected to implement a coded action. It results in a great number of available possible ruleset combinations. This table developed more precisely the actions that we used to develop algorithm to quantify cell on whole APC<sup>Min/+</sup> mice colon. Thanks to its user-friendly interface, any user can choose and order these functions to build new rulesets, adapted to his/her scientific problematic.

## Supplementary methods

**Numbering of possible rulesets available in Tissue Studio Software.** To determine the number of possible rulesets for each action we calculate the total number of possible combinations. When parameters are fixed by image acquisition we considered that there is one unique possibility, as for “General Settings”. When action contains only one parameter setting as “ROI Classification \_Initialization and Training” composer; and “Cellular Analysis\_Initialize cell analysis” we simply report the number of possible choice in the software.

For tissue detection, this step is composed of the setting choices. Each marker has the same independent choice of settings. Even if they are used at the same time, we considered that these parameters are independent so the number of combination is calculated by equation (1).

For ROI classification, with the software we can choose to implement up to 11 reclassification rules with a specific order, so there are  $\sum_{k=1}^{11} k!$  possibilities of reclassification conditions, with  $k$  is the chosen number of reclassification rules. For each of these rules we have to choose 1 to 3 conditions, so there are  $\sum_{i=1}^3 \binom{3}{i}$  possibilities of condition choices, with  $i$  is the chosen number of the conditions. Finally, for each condition we have to choose 1 to 40 parameters, so there are  $\sum_{j=1}^{40} \binom{40}{j}$  possibilities of parameters choices, with  $j$  is the number of chosen parameters. For these conditional rules we have to choose 2 of 5 ROIs defined in the algorithm, so there are  $\binom{5}{2}$  of ROIs couple. In conclusion the number of ROI reclassification succession rules is calculated by equation (2).

For cellular analysis, if we are interested only in nuclei and membrane object, there are 2 possibilities to detect nuclei and 3 possibilities to detect membrane. Then, to classify cells we can choose  $\binom{3}{2}$  condition of marker expression or co-expression for a simple staining for example. So the number of Cellular analysis rules is calculated by the equation (3).

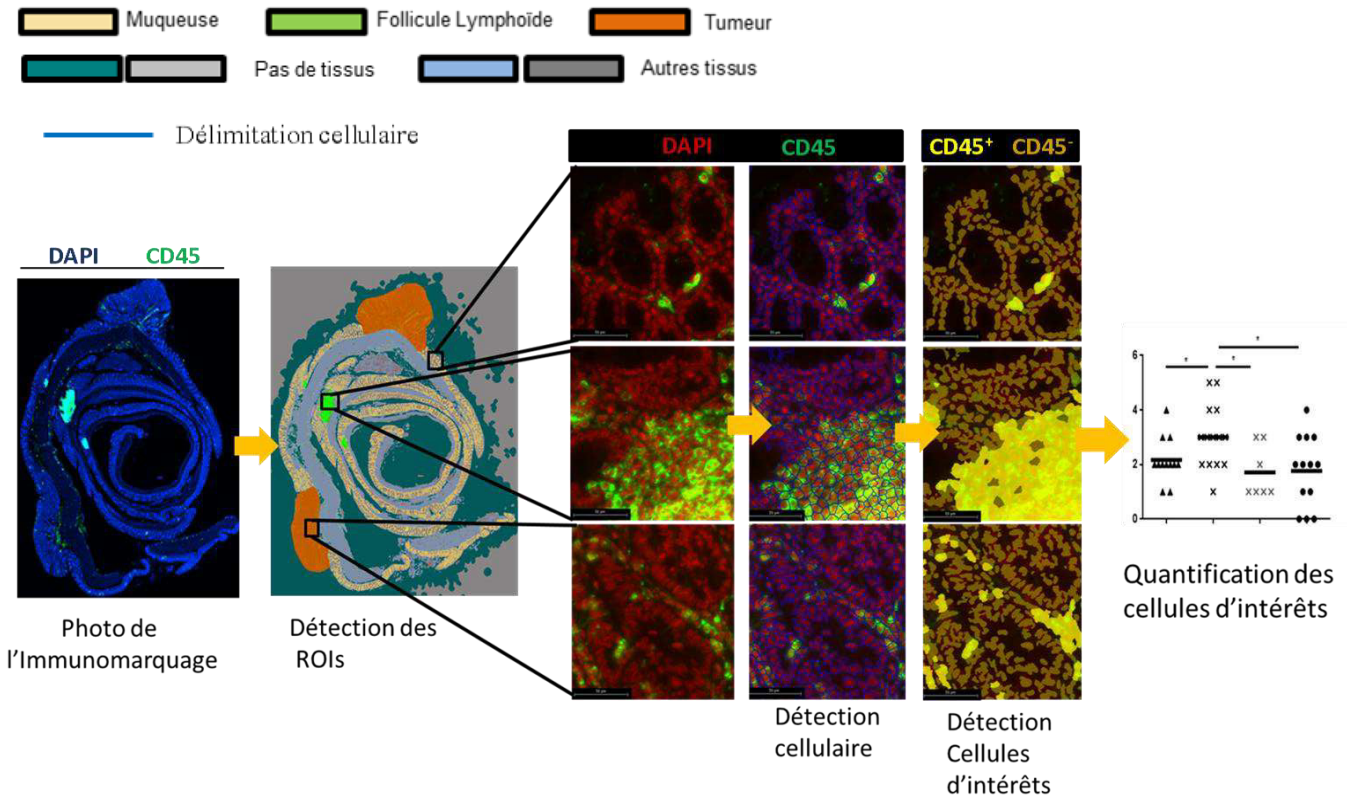
## Supplementary equations

$$(1) \text{N}_{\text{marker 1 (Tissue Min Size)}} \times \text{N}_{\text{marker 2 (Fluorescence Brightness)}} \times \text{N}_{\text{marker 3 (Fluorescence Homogeneity)}} \\ = 51 \times 255 \times 301 \\ \approx 3.9 \times 10^6 \text{ possible rules combinations} \\ \text{With N: number of possibility for a parameter}$$

$$(2) \sum_{k=1}^{11} k! \times \left( \binom{5}{2} \times \sum_{i=1}^3 \binom{3}{i} \times \sum_{j=1}^{40} \binom{40}{j} \right)^k \\ \approx 9.1 \times 10^{415} \text{ possible rules combinations}$$

$$(3) 2 \times 3 \times \binom{3}{2} \\ = 18 \text{ possible rules for cellular analysis of a simple staining}$$





**Figure 33 : Principe de l'algorithme d'analyse d'image développé et validé.** La méthode développée sur la base de la « Cognition Network Technology » (CNT) va permettre d'analyser une section entière de côlon marquée par immunofluorescence. Après l'acquisition de l'image, l'algorithme va tout d'abord distinguer chaque compartiment du côlon (ROIs), grâce à une étape de « machine learning » lors de la « **détection des ROIs** ». Il s'agit d'un apprentissage du logiciel pour reconnaître ces ROIs à partir d'une sélection de captures d'images de chaque compartiment, que nous avons au préalable enregistrées. Pour permettre une distinction précise de ces ROIs une étape de reclassification des ROIs et de correction manuelle ont également été implémentées. Cette étape nous permet de détecter et localiser la muqueuse (jaune), la tumeur (orange) et les follicules lymphoïdes (vert). Ensuite, des étapes de **détection cellulaire** ont été ajoutées pour permettre de distinguer les cellules dans chaque compartiment, en fonction du marquage nucléaire (DAPI) et du marquage membranaire basé sur la détection d'une protéine spécifique de chaque type cellulaire, sur l'exemple il s'agit du CD45, spécifique des leucocytes. La **détection des cellules d'intérêt** est ensuite réalisée par la distinction des cellules marquées positivement pour la protéine d'intérêt selon un seuil de fluorescence déterminé. Ceci va permettre de **quantifier les cellules immunitaires** précisément et automatiquement dans les trois ROIs coliques. DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole ; ROIs : Region Of Interest ; CD45 : antigène leucocytaire commun

## I.2- Commentaires

Il s'agit de la première description d'une méthode semi-automatisée permettant d'analyser précisément la texture immunitaire d'une section entière de côlon de souris en distinguant ses différentes régions, malgré la complexité induite par le traitement d'un organe dans sa totalité. Ce travail permet de mettre à disposition de la communauté internationale un algorithme capable de distinguer, de quantifier et de localiser tous types de cellules immunitaires marquées par immunofluorescence dans différents compartiments du tissu (**Figure 33**).

La structure de l'algorithme comporte trois étapes clés : (i) la détection globale du tissu qui permet à la fois de définir la surface de côlon totale à analyser et d'éliminer des artefacts de fluorescence éventuels, qui pourraient être source d'imprécision lors de l'analyse ; (ii) la reconnaissance des régions d'intérêt (ROIs) ou « ROI reclassification », qui permet de définir les trois compartiments immunitaires coliques importants dans le CCR : la muqueuse saine, les follicules lymphoïdes, et la tumeur ; (iii) la détection et la quantification de cellules immunitaires spécifiques lors de l'étape de l'analyse cellulaire ou « cellular analysis ». Cette succession de règles est basée en partie sur le traitement des signaux de fluorescence d'un marquage nucléaire au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) et d'au moins un marquage membranaire caractéristique de la cellule d'intérêt. Pour permettre l'analyse numérique des sections de côlon, il est essentiel que l'immunomarquage délimite parfaitement les cellules, et la fluorescence doit être assez intense pour être détectable à un faible grossissement. Pour répondre à ces critères, les tissus analysés ont été préalablement inclus en paraffine pour préserver leur structure, et nous avons utilisé une méthode d'amplification du signal fluorescent (TSA : « *Tyramide signal amplification* ») lors des immunomarcages (**Article 1\_Figure S1**). Concernant la création de l'algorithme, nous avons sélectionné, ordonné et paramétré toutes ses fonctions et actions, à partir du catalogue exhaustif du logiciel Tissue Studio® (Definiens, Allemagne). Cette structure a ensuite été traduite par le logiciel dans le langage codé développé par Definiens : « *Cognition Network Language* » (**Article 1\_Figures 2 et S2**).

Nous avons réalisé un effort particulier pour permettre la distinction de trois régions d'intérêt dans le côlon (**Article 1\_Figure 3**). La première étape assez classique de la « *ROI classification* », appelée « *machine learning* », se base sur l'apprentissage par le logiciel à reconnaître automatiquement les différentes zones du tissu. Il effectue cette action grâce à un



échantillon représentatif de chaque structure, que nous avons préalablement sélectionné et enregistré. Cette étape a permis de distinguer les structures facilement différenciables : muqueuse, follicule lymphoïde, zones non considérées comme région d'intérêt (« autres tissus »), et zones sans tissu. En revanche, la distinction entre la tumeur et les follicules lymphoïdes ou la muqueuse n'a pas été possible par cette seule technique. Comme décrit dans cet article, les motifs de pixels extraits de l'image numérique de la section colique et associés à chaque région d'intérêt, qui permettent au logiciel de classer chaque zone de l'image, sont trop similaires et entraînent une classification erronée de zones tumorales en muqueuse ou en follicule lymphoïde (**Article 1\_Figure 4**). Nous avons donc intégré une étape de reclassification des régions d'intérêt, grâce à l'implémentation de règles conditionnelles (exemple : « si la taille du Follicule Lymphoïde est inférieure à  $x \mu\text{m}^2$  alors il faut le classer en Tumeur »). Ces règles sont basées sur trois critères déterminés de façon itérative lors de la mise au point de cet algorithme : la forme, la taille des objets primitifs (« *primitive objects* ») et leur inter-connexion. Si nécessaire, pour affiner cette classification, nous avons également ajouté une étape de sélection manuelle. Ces trois étapes ont permis la bonne distinction de toutes les régions du côlon avec précision et de façon rapide et reproductible (**Article 1\_Figure 4**).

Afin de quantifier les cellules dans les régions d'intérêt, un bloc d'actions d'analyse cellulaire a ensuite été implémenté (**Article 1\_Figure 5**). La difficulté rencontrée lors de cette étape est de rendre automatique l'analyse cellulaire, c'est-à-dire de déterminer des paramètres identiques pour l'étude de types cellulaires distincts (cellules immunitaires, épithéliales, stromales...) dans des zones où les densités cellulaires sont différentes. En particulier, les follicules sont densément peuplés en cellules immunitaires, rendant le signal du DAPI difficilement distinguable et entraînant ainsi une mauvaise délimitation des noyaux par le logiciel. Ainsi, nous n'avons pas pu utiliser le processus de simulation cellulaire qui s'effectue par la détection du marqueur nucléaire, classiquement utilisé en analyse numérique d'image. Nous avons alors implémenté des fonctions qui permettent d'identifier les cellules sur la base à la fois des marqueurs nucléaire et membranaire. De plus, pour affiner la délimitation cellulaire, en particulier dans les follicules lymphoïdes ou dans certaines zones très désorganisées des tumeurs, nous avons désigné le signal membranaire comme le paramètre déterminant la délimitation cellulaire. Les valeurs de quantification obtenues ont été validées en les comparant avec l'indice numérique associé déterminé sur chaque échantillon colique par analyse manuelle (**Article 1\_Figures 6 et 7**), ainsi qu'en les comparant avec les données de la littérature (Akeus et al., 2014; Li et al., 2012; Tanner et al., 2016).





L'enchaînement de ces fonctions a permis la caractérisation précise de populations immunitaires dans les trois régions d'intérêt du côlon, de façon reproductible. Néanmoins, lors du développement de l'algorithme nous avons été confrontés à des erreurs d'analyse (taux d'erreur de 1,9% pour un simple marquage et 30% pour un double marquage), soit induites par une hétérogénéité de fluorescence inter-lames ou intra-lame, soit par des artefacts de fluorescence. Ces causes d'imprécision d'analyse sont toutes liées aux propriétés intrinsèques des sections entières de tissu. Comme décrit dans l'article, certaines imprécisions peuvent être corrigées par optimisation du protocole de marquage, d'autres le sont par des optimisations de l'algorithme. La structure de l'algorithme et les réglages décrits dans ce travail ont été optimisés pour traiter les images de tissus en corrigeant automatiquement ces erreurs d'analyse. Nous avons ajouté à notre description un guide de correction des erreurs, si nécessaire (*Article 1\_Table 1*). Ce guide permettra surtout aux nouveaux utilisateurs d'adapter l'algorithme à de nouveaux marquages, car il présente toutes les difficultés auxquelles nous avons été confrontés lors du développement de la méthode ainsi que les solutions appropriées que nous avons validées. Notre approche étant dépendante des signaux de fluorescence du marquage, elle a en effet l'inconvénient de devoir être ré-optimisée à chaque nouvel immunomarquage. Néanmoins, l'utilisation du guide que nous mettons à disposition rend cette optimisation rapide et simple.

Nous avons validé cette méthode sur plusieurs sections de côlon, marquées par des anticorps et des fluorochromes différents. La simplicité d'utilisation de la méthode, grâce à l'interface du logiciel, permet son application sans expertise en bio-informatique ou programmation, contrairement à l'imagerie par spectrométrie de masse. Son automatisation rend possible une analyse rapide et sans induction de biais par l'observateur, comparativement à la quantification manuelle sur lame traitées par IHC classique et quantification manuelle. Ainsi nous avons montré la possibilité d'analyser un tissu entier (0,12 à 4,73 mm<sup>2</sup> ont été analysés pour les sections de côlon) en peu de temps (24 heures pour 35 lames dans notre étude, de la détection du tissu à l'obtention des valeurs numériques) avec un nombre significatif de cellules (10<sup>3</sup> à 10<sup>5</sup> en fonction du compartiment observé). Ceci montre la puissance de notre méthode par rapport à la lecture et la quantification manuelle. Cette particularité rend notre approche complémentaire de l'analyse en cytométrie de flux, car elle traite un nombre comparable de cellules sans nécessité de protocole d'extraction complexe et en les localisant



précisément dans le tissu. L'atout majeur de notre méthode est la possibilité d'étudier des compartiments de petite taille, comme les follicules lymphoïdes ou les lésions néoplasiques.

En conclusion, nous mettons à disposition une nouvelle méthode robuste et reproductible pour caractériser avec précision la texture immunitaire du côlon murin. Son originalité par rapport à des approches similaires utilisées chez l'homme (Galon et al., 2016; Mlecnik et al., 2016; Pagès et al., 2018) ou la souris (Blom et al., 2017; Kozłowski et al., 2013) est une quantification cellulaire sur une section d'organe entier, en distinguant les différentes régions associées. Cet outil nous a permis d'envisager une analyse fine des interactions entre les souches *E. coli*-colibactine positives et les cellules immunitaires dans le contexte du CCR. Les résultats associés sont décrits dans l'article 2 qui suit.

Cette nouvelle méthode sera aussi utilisable à une plus large échelle, car elle est adaptable à toute structure similaire au côlon, telle que l'intestin entier. Ceci met à disposition de nouvelles possibilités pour étudier les interactions du système immunitaire avec d'autres acteurs (bactériens, cellules épithéliales...) et ainsi mieux comprendre les mécanismes des pathologies digestives, mais aussi ceux régissant la réponse aux traitements et l'axe cerveau-intestin.



## **II- Infection chronique par les souches d'*Escherichia coli colibactine-positives* : Impacts sur le micro-environnement immunitaire colique dans le contexte du cancer colorectal**

### II.1- Contexte de l'étude

Il est de plus en plus évident que le microbiote joue un rôle important dans la carcinogénèse colique. En effet, il a été montré une dysbiose chez les patients CCR (Amitay et al., 2018; Park et al., 2018; Villéger et al., 2018). Le transfert de ce microbiote dysbiotique de patients à des modèles murins axéniques prédisposés au CCR accélère le développement tumoral, renforçant ainsi le rôle du microbiote dans le CCR (Wong et al., 2017). Parmi les espèces bactériennes impliquées, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis* et *Escherichia coli* sont particulièrement étudiées. De nombreux travaux montrent l'implication du micro-environnement immunitaire colique et notamment de la population lymphocytaire T dans la tumorigénèse induite par les dysbioses associées au CCR. En effet, l'effet pro-carcinogène du microbiote dysbiotique de patients CCR chez les modèles murins axéniques prédisposés au CCR est associé à une amplification de l'inflammation et à une modulation des lymphocytes T (LT) coliques (Wong et al., 2017). Il a également été montré que le microbiote colique pouvait moduler le recrutement des LT (Th1, Treg, Th17) dans des tumeurs primaires de patients CCR greffées à des souris (Cremonesi et al., 2018). De plus, d'autres pathogènes associés au CCR, tels que *Fusobacterium nucleatum* et *Bacteroides fragilis*, ont la capacité de diminuer spécifiquement la réponse anti-tumorale LT et d'augmenter la réponse pro-tumorale ainsi que l'inflammation dans des modèles murins de CCR (Kostic et al., 2013; Thiele Orberg et al., 2017a; Wu et al., 2009). L'association entre *F. nucleatum* et la diminution des LT dans la tumeur a également été montrée chez l'homme (Mima et al., 2015).

Concernant les souches d'*E. coli* associées au CCR, et en particulier les *E. coli* colibactine-positives, il a été montré que celles-ci pouvaient moduler le micro-environnement *via* notamment l'induction de la sénescence cellulaire qui provoque la libération de facteurs de croissance et ainsi stimule la prolifération anarchique des cellules environnantes, suggérant un effet pro-tumoral à distance de la colibactine (Cognoux et al., 2014; Dalmaso et al., 2014). Il a également été montré un lien intéressant entre ces souches et l'inflammation associée au CCR. Il a été montré, dans des modèles murins de CCR associés aux colites infectés par ces bactéries,



que l'inflammation et les défenses immunitaires sont essentielles pour le pouvoir carcinogène de cette souche (Arthur et al., 2014). Cependant l'activation des processus pro-inflammatoires de l'hôte avec notamment une augmentation des cytokines IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-22 et IL-17, semble indépendante de la colibactine (Arthur et al., 2012, 2014; Tomkovich et al., 2017). Des études *in vitro* ont aussi démontré qu'elles pouvaient induire dans les macrophages l'expression du gène codant pour l'enzyme pro-inflammatoire COX-2, indépendamment de la présence de l'îlot *pks* (Raisch et al., 2015).

Même si les études publiées jusqu'à maintenant montrent une association entre les *E. coli* colibactine-positives et CCR, elles restent parcellaires et nécessitent d'être approfondies notamment sur des modèles de CCR non associés aux colites. L'étude de la modulation de la réponse lymphocytaire T anti-tumorale et/ou du recrutement de neutrophiles pro-inflammatoires apparaît pertinente au vu de l'importance de ces cellules dans le CCR (Fletcher et al., 2018; Galon et al., 2012; Kim et al., 2017; Pagès et al., 2018; Pine et al., 2015; Powell and Huttenlocher, 2016; Tosolini et al., 2011).

Le but de ce travail est donc d'étudier l'effet de la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5, isolée d'un patient atteint de CCR, sur le micro-environnement immunitaire colique, dans le modèle murin de prédisposition génétique au CCR APC<sup>Min/+</sup>. Nous avons caractérisé l'implication de la colibactine dans cet effet en étudiant en parallèle de la souche 11G5, son mutant colibactine-négatif 11G5 $\Delta$ C1bQ. Nous nous sommes intéressés à la tumorigenèse, à l'inflammation colique et à la modulation de la quantité des neutrophiles pro-inflammatoires ainsi que des lymphocytes T impliqués dans la réponse anti-tumorale (LT totaux CD3<sup>+</sup>, LT CD8<sup>+</sup> et LT CD4<sup>+</sup>). L'étude de ces populations cellulaires a été réalisée simultanément sur trois compartiments coliques d'intérêts : la muqueuse, les tumeurs et les follicules lymphoïdes, en utilisant notamment l'outil de quantification de marquages par immunofluorescence décrits dans l'article 1. Nous avons également étudié la réponse LT, après infection chronique par la souche 11G5, au sein des ganglions mésentériques où se fait l'activation des réponses lymphocytaires contre les antigènes intestinaux. Les résultats concernant les modulations quantitatives des populations lymphocytaires T ont ensuite été confirmés sur la collection de prélèvements de patients atteints de CCR opérés dans le service de chirurgie digestive du CHU de Clermont-Ferrand. Etant données les modulations mises en évidence, nous avons également étudié l'effet de l'infection par la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5 sur l'efficacité d'une immunothérapie anti-PD-1 sur un modèle de tumeurs sous-cutanées syngéniques d'origine colique (MC-38).





# **Colibactin-positive *E. coli* induces a pro-carcinogenic immune environment leading to immunotherapy resistance in colorectal cancer.**

A. Lopès<sup>1,2,3</sup>, E. Billard<sup>1,2</sup>, Al H. Casse<sup>4</sup>, R. Villeger<sup>1,2</sup>, J. Veziat<sup>1,2,5</sup>, G. Roche<sup>1,2</sup>, G. Carrier<sup>1,2,5</sup>, P. Sauvanet<sup>1,2,5</sup>, E. Miot-Noirault<sup>6</sup>, F. Pages<sup>7,8,9,10</sup>, S. Naimi<sup>4</sup>, D. Pezet<sup>1,2,5</sup>, N. Barnich<sup>1,2</sup>, B. Dumas<sup>3</sup>, M. Bonnet<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup> Clermont Université, UMR 1071 Inserm/Université Clermont-Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup> INRA, USC-2018, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>3</sup> Research Biologics, Sanofi R&D, 94400 Vitry-Sur-Seine, France

<sup>4</sup> Histopathology and Bio-Imaging Group, Sanofi R&D, 94400 Vitry-Sur-Seine, France

<sup>5</sup> Chirurgie digestive, Centre Hospitalier Universitaire, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>6</sup> Clermont Université, UMR 1240 Inserm/Université d'Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand

<sup>7</sup> Inserm U872, Laboratory of Integrative Cancer Immunology, Paris, France

<sup>8</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>9</sup> Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie, Sorbonne Universités, Paris, France

<sup>10</sup> Immunomonitoring Platform, Laboratory of Immunology, AP-HP, Assistance Publique-Hopitaux de Paris, Georges Pompidou European Hospital, Paris, France

\*Corresponding author : [Mathilde.Bonnet@uca.fr](mailto:Mathilde.Bonnet@uca.fr)

## ABSTRACT

**Background & Aims** Increasing evidence links the immune microenvironment, microbiota and colorectal cancer (CRC). Colibactin-producing *E. coli* are more frequently detected in CRC patient mucosa and exhibit procarcinogenic properties in CRC murine models. The aim of this work was to evaluate the impact of chronic infection by colibactin-producing *E. coli* on immune cells in APC<sup>min/+</sup> mice colon and in human CRC tumors.

**Methods** APC<sup>min/+</sup> mice were per os inoculated with a colibactin-producing *E. coli* strain (11G5), a non-producing colibactin *E. coli* mutant (11G5ΔC1bQ), a non-pathogenic *E. coli* (K-12) or PBS. Induction of oxidative stress and inflammation during infection was evaluated by using optical in vivo imaging. After 7 weeks, the number and the volume of polyps were evaluated. Immunofluorescent staining of immune cells (neutrophils and T cell populations) was performed to quantify positive cells in three colon areas: mucosa, lymphoid follicle and tumor. In parallel, quantification of immune cells (lymphoid populations) was performed in mesenteric lymph nodes (MLNs) by flow cytometry. T cells immunostainings were also performed on human CRC known for their colibactin-producing *E. coli* status. Anti-PD-1 immunotherapy efficacy was determined in MC38 tumor bearing-WT mice infected with 11G5.

**Results** We confirmed the induction of tumoral growth in a colibactin-dependent manner. Using optical imaging, we detected a significant increase of oxidative stress and inflammation in the gut thirty days after 11G5 infection. We observed a significant increase of lymphoid follicle size in the gut of mice infected with the 11G5 strain together with an increase of neutrophils in the mucosa and lymphoid follicles of 11G5 infected mice. Moreover we observed a decrease of CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the mucosa of the 11G5 group. In the same way, CD3<sup>+</sup> T cells were decreased in the tumor margin of human CRC samples which were colonized by colibactin-producing *E. coli*. In addition, we noticed a significant decrease of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> anti-inflammatory T cells in mesenteric lymph nodes of 11G5 infected APC<sup>min/+</sup> mice, negatively correlated with gut bacterial colonization. Finally, we showed that colibactin-producing *E. coli* infection induces a resistance of the MC38 tumors to anti-mouse PD-1 immunotherapy.

**Conclusions** We report that chronic infection by colibactin-producing *E. coli* created a specific inflammatory environment in the colon which could be associated with colibactin-carcinogenic effect and tumoral resistance to immunotherapy. Colibactin-producing *E. coli* could be a new biomarker to predict anti-PD-1 response in CRC patients.

## INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the third most common malignancy and is the fourth leading cause of cancer-related deaths in men and the third leading cause among women worldwide<sup>1</sup>. Host factors associated with environmental and nutritional factors play an important role in the colorectal carcinogenesis. In the recent two decades, growing attention has been given to the role of intestinal microbiota dysbiosis in CRC-carcinogenesis<sup>2,3</sup>. Studies showed a reduction of tumorigenesis in the intestines of animals raised in a germ-free environment, in both genetically induced or colitis-associated CRC mouse models<sup>4-6</sup>. Moreover, colorectal cancer patients often exhibit a distinct microbiota composition compared to healthy population<sup>2,7,8</sup>. Mechanisms by which intestinal microbiota dysbiosis has been shown to promote colorectal carcinogenesis are not yet elucidated. Association of exposure to antibiotics in early life with colorectal adenoma risk development at the age of 60, suggests the impact of microbiota dysbiosis at the first steps of the carcinogenesis<sup>9</sup>. Recently Wong et al. showed that gavage with stools from colorectal cancer patients promote intestinal carcinogenesis in germ-free and azoxymethane-(AOM)-carcinogen mice models<sup>10</sup>. Despite the large number of studies, CRC associated dysbiosis is only partly defined. However, some bacterial strains, such as *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Escherichia coli*, play a well-established role in CRC development<sup>11-15</sup>.

Even if *E. coli* is a commensal bacterium, several strains have acquired some virulence factors including genotoxins, such as colibactin<sup>16-18</sup>. The colibactin toxin, a hybrid polyketide non-ribosomal peptide is encoded by the polyketide synthase (*pks*) pathogenicity island<sup>19</sup>. This colibactin-*pks*-island was preferentially detected in CRC samples in comparison to non-neoplastic control<sup>7,20-23</sup>. *Pks*-island gene (*clbB* gene) was highly enriched in familial adenomatous polyposis (FAP) patients' colonic mucosa compared to healthy individuals<sup>12</sup>. In the same way, Nakatsu et al. detected *pks*-positive bacteria in adenoma suggesting the

presence of these bacteria during early stages of carcinogenesis<sup>7</sup>. Colibactin is a genotoxin which induces DNA double-strand breaks in epithelial cells, leading to genomic instability which could be involved in colorectal carcinogenesis<sup>16,17,24</sup>. Moreover, it was demonstrated *in vitro* that CRC-associated *E. coli* induce oxidative stress in epithelial cells which could also lead to genomic instability<sup>25,26</sup>. In addition to this genotoxic effect, other pro-carcinogenic properties of colibactin-producing *E. coli* have been reported in several mice models. Indeed, these bacteria could induce cellular senescence accompanied by the production of growth factors, such as the hepatocyte growth factor, leading to an increase of tumor growth in chemically-induced colitis-associated CRC (CAC) models<sup>11</sup>. In addition, experiments using other CAC mice models (IL-10<sup>-</sup>/AOM) showed that colibactin-producing *E. coli* were able to highly persist in the gut, and to induce epithelial damages and cell proliferation<sup>27</sup>. In this study, the bacterial cancer-promoting activity was dependent on inflammation. However, even if inflammation seems to play a crucial role, the histological score of tumoral inflammation was generally unchanged in infected-animals as described in Apc<sup>Min/+</sup>/IL-10<sup>-</sup> or Apc<sup>Min/+</sup> by Tomkovich *et al.* and Bonnet *et al.* respectively<sup>4,13</sup>. In conclusion, the mechanisms by which CRC-associated *E. coli* promote colorectal carcinogenesis are diverse and some-what specific to the animal models and the microbial status of the animals (germ-free or SPF). However, modulation of immune response and inflammation seems to play a central role in these mechanisms.

The aim of this work was to evaluate the impact of chronic infection by colibactin-producing *E. coli* in the APC<sup>Min/+</sup> mice colon focusing on inflammation and immune cells. Apc<sup>Min/+</sup> mice (*Apc*: Adenomatous polyposis coli; *Min*: Multiple Intestinal Neoplasia) is one of the best-known CRC models, with a germinal mutation in one *Apc* gene allele. Alterations in the *Apc* tumor suppressor gene occur very early in the transformation process and are found in a majority of sporadic colorectal tumors. Then, we choose to continue our investigations in this

animal model, more representative of the majority of sporadic CRC than CAC models since colitis-associated CRC represent less than 1% of all cases. First, we confirmed the procarcinogenic effect of colibactin in this model comparing a CRC-colibactin-positive *E.coli* strain (11G5) to its mutant (11G5 $\Delta$ ClbQ) which is unable to produce colibactin. We monitored the *in vivo* production of inflammation and oxidative stress by optical imaging. In addition, the pro-inflammatory enzyme myeloperoxidase (MPO) and neutrophils modulation were investigated in colon tissue after chronic infection. Because T-cell modulation seems to be central for CRC carcinogenesis and anti-tumoral immune response<sup>28</sup>, we set out to evaluate the T cell infiltration in the whole colon of Apc<sup>Min/+</sup> mice in the presence or absence of colibactin-positive-*E.coli*. We completed our analyses on 11G5-infected APC<sup>Min/+</sup> mice, by flow cytometry studying T-cells from the mesenteric lymph nodes (MLNs) which are an important site for T cell activation for the colon<sup>29</sup>. In parallel, we evaluated the T-cell populations in a collection of human CRC samples previously characterized for their *pks* island status. Finally, since the colibactin-positive *E.coli* had a strong effect on T cell numbering, we evaluated the impact of the chronic infection on anti-tumoral response mediated by anti-PD-1 immunotherapy treatment using the MC38 syngenic CRC tumor model.

## RESULTS

*The CRC-associated E. coli 11G5 stimulates colon tumor development in Min mice in a colibactin-dependent manner*

To define the pro-carcinogenic properties of colibactin-producing *E.coli*, we used APC<sup>Min/+</sup> mice chronically infected by the colon cancer-associated *E. coli* 11G5 as previously described<sup>13</sup>. In parallel, we evaluated the effect of the infection by non-producing colibactin

*E. coli* 11G5 $\Delta$ ClbQ or the commensal-*E. coli* K12. Significant increases in the number and size of tumors were observed in the 11G5-colonized Min mice in comparison to non-infected animals (PBS) or 11G5 $\Delta$ ClbQ or K12-*E. coli*-infected animals [Figures 1A and 1B]. Polyps were distributed from proximal to distal colon without specific localization [Supplementary Figure 1]. Histological analysis indicated that all polyps were adenocarcinomas (data not shown). Determination of bacterial colonization in the stools of mice from 2 to 50 days post-infection (p.i.), showed that 11G5 and 11G5 $\Delta$ ClbQ-infected mice were chronically infected with similar levels of colonization. In contrast, significantly reduced bacterial levels were detected in stools of mice infected with *E. coli* K-12 [Figure 1C]. Moreover, high levels of 11G5 or 11G5 $\Delta$ ClbQ strains in the colonic and ileal tissues of infected-mice have been confirmed at 50 days p.i., as well as the total clearance of the K12 *E. coli* strain [Figure 1D]. Localisation of 11G5 strain along the digestive tract was assessed by optical imaging using bioluminescent technology. Figure 1E showed that 24 hours p.i., the 11G5 strains was preferentially localized on the caecum and the proximal colonic area. Induction of inflammation was monitored 3, 14 and 49 days p.i. by optical imaging using XenoLight Rediject Inflammation probe. For all the mice, inflammation was localized preferentially in the abdomen area [Figure 1F]. Quantitation of the BLI signals showed a significant increase of inflammation only for 11G5-infected animals at a late step of the infection [Figure 1G]. To complete these data, the level of pro-inflammatory enzyme (MPO) and anti-inflammatory cytokines (TGF- $\beta$  and IL-10) were investigated [Supplementary Figure 2]. A weak but significant increase of the MPO was detected in both stools and colonic tissues of 11G5-infected mice [Supplementary Figure 2]. In parallel, a decrease of the two anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  was observed [Supplementary Figure 2]. In conclusion, these data suggest that 11G5 strains promotes tumor development in a colibactin-dependent manner with an increase of gut inflammation. To continue our investigations, we selected the 11G5 $\Delta$ ClbQ

*E.coli* strain as colibactin-non-producing strain because of its potential to chronically infect the APC<sup>Min/+</sup> mice gut, compared to the K12 strain which was eliminated from the tractus.

*The colon cancer-associated E. coli 11G5 strain induces an increase of lymphoid follicle numbers and a decrease of mucosal leucocytes in Min mice colon.*

To evaluate the effect of 11G5 chronic infection on leucocytes population, single immunofluorescence staining for CD45 leucocyte specific protein was performed and quantified on colonic sections from infected Min mice and control mice (non-infected and 11G5ΔC1bQ-infected). The analyses were performed on three colonic areas: lymphoid follicles, mucosa and tumors. Representative images were shown for these 3 areas in Figure 2A, Figure 2F, and Supplementary Figure 3A respectively. Lymphoid follicle numbers and total size per colon were significantly increased in 11G5-infected animals in comparison to both control groups [Figures 2B and 2C]. Interestingly, the lymphoid follicle size significantly correlated with tumoral development only in the 11G5-infected group (p=0.02) [Figure 2D]. In this colonic lymphoid follicles, density of leucocytes was determined as the number of CD45<sup>+</sup> cells per unit of tissue surface area assessed by digital image analysis. No difference was observed between the different groups of animals regarding the leucocytes density in lymphoid follicles [Figure 2E]. In contrast, a decrease of the CD45-positive cells density was observed in the 11G5 infected mucosa [Figure 2F], and this decrease was noticed all along the colon. This observation was confirmed by the quantitation of the CD45 signal in the total colon rolls of each animals in the 3 groups [Figure 2G]. In addition, a decrease of CD45-positive cells density was also observed on the tumor areas of the 11G5-infected group [Supplementary Figure 3B].



*The colon cancer-associated E. coli 11G5 strain induces an imbalance of immune cells population in mucosa of Min mice colon.*

Firstly, to assess neutrophil percentage in lymphoid follicle, colonic mucosa and tumors on 11G5-infected Min mice and control colonic sections (non-infected and 11G5 $\Delta$ ClbQ-infected), a staining for Ly6G neutrophil specific surface protein was performed on colon section at 50 days p.i.. Results were reported as the percentage of neutrophils, determined as the ratio of Ly6G<sup>+</sup> cell density measured by digital image analysis to CD45<sup>+</sup> leucocytes density. Representative images were shown for lymphoid follicles [Figure 3A], mucosa [Figure 3C] and tumors [Figure 3E] for the 3 groups of mice. In these three areas, neutrophils represented around 1% of leucocytes population. No difference of neutrophils percentages were showed in lymphoid follicles or in tumors between the 11G5-infected animal group and the control groups. In the mucosa, a significant increase of neutrophils percentage was observed in the 11G5-infected mice [Figure 3D].

Secondly, T cell populations were investigated by analyzing the total T cells population by CD3 staining and CD8 or CD4 subpopulations by double staining at 50 days p.i., in lymphoid follicle, colonic mucosa and tumors on infected and control Min mice colonic sections (non-infected and 11G5 $\Delta$ ClbQ-infected). Representative CD3 staining of lymphoid follicles, mucosa and tumors were shown on Figures 4A, 4C and 4E respectively. No variation of CD3<sup>+</sup> T cells density was observed on lymphoid follicles of the three groups of animals. A significant decrease of CD3<sup>+</sup> T cells density was observed all along the mucosa of 11G5-infected animals in comparison to the control groups animals [Figure 4D]. In the same way, a significant decrease of CD3<sup>+</sup> cells was observed in the tumors [Figure 4F]. As shown in Figure 4E, intra-tumoral repartition of CD3<sup>+</sup> cells was heterogeneous and the decrease was particularly observed in the margin of the polyps (see arrows on Figure 4E.). Focusing on CD4 and CD8 T cell subpopulations, we demonstrated a variation in the CD8<sup>+</sup> population

after 11G5 chronic infection. Figure 4G and Supplementary Figure 4 reported the results of the double CD8/CD3 staining. A significant decrease of CD8<sup>+</sup> population was observed all along the mucosa of 11G5-infected mice while no variation was measured on lymphoid follicles and tumors [Figure 4G]. Representative images of CD4/CD3 double staining in lymphoid follicles, mucosa and tumors were reported in Supplementary Figure 5. No difference was observed for CD4 population regardless the animal groups or the studied colonic areas [Supplementary Figure 5].

*The colon cancer-associated E. coli 11G5 strain induces a decrease of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell populations in mesenteric lymph nodes (MLNs) of Min mice.*

We then studied the effect of chronic infection of the gut by colibactin-producing *E.coli* in MLNs. Interestingly, we detected the 11G5 strain in MLNs of 6/8 animals (75%) and the 11G5ΔC1bQ strain in only 1/7 animals (14%) [Figure 5A]. The 11G5 strain translocation was only observed in APC<sup>Min/+</sup> mice. Indeed, no translocation was detected on WT mice (data not shown). CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> populations were investigated in MLNs by flow cytometry. No significant variation was observed between the three groups for total cells viability [Supplementary Figure S6], CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> populations [Figures 5B and 5C]. Significant decreases of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> were observed in the 11G5-infected animals only [Figures 5D and 5F]. Interestingly, these decreases were correlated with the level of bacteria translocation in the MLNs [Figures 5D and 5F]. In addition, a negative correlation was observed between CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg cells and the 11G5-bacterial translocation level in MLNs [Supplementary Figure S6].

*pks-positive-E. coli* colonization is associated with a decrease of tumor infiltrating-lymphocytes T cells (TILs) at the invasive margin of human CRC samples.

CD3 and CD8 stainings were performed on 40 CRC tumors samples at the immunomonitoring Platform of the Hôpital Européen Georges Pompidou (Paris). The densities of CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in colon tumor and invasive margin regions were determined and correlated with the *E. coli* colonization and the presence of *pks*-positive bacteria. No significant correlation was observed between colonization of the tissue by *E.coli* and CD3<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cell populations (data not shown). Figure 6 showed a significant decrease of CD3<sup>+</sup> cells in *pks*-positive tumors only in the invasive margin. Regarding CD8 staining, a weaker decrease than for CD3 staining was observed in the invasive margin of the *pks*-positive tumors (p=0.08) [Supplementary Figure S7].

*Infection with the colon cancer-associated E. coli 11G5 strain induces a resistance to the anti-mouse PD-1 immunotherapy.*

Because chronic infection of the gut with 11G5 strains induces a decrease of anti-tumoral immunity, we investigated the impact of this infection on the anti-mouse PD-1 therapy efficacy. For this purpose, we chose the MC38 murine tumors grafts on C57Bl6 mice as animal model. Animals were firstly orally infected with the 11G5 strain and 9 days post-infection MC38 cells were subcutaneously inoculated. Then MC38 tumors-bearing mice were injected with anti-PD-1 treatment or the isotype antibody control at 8, 11, 14, 18, 20 and 22 days after MC38-cells inoculation. Figures 7 A and B showed that anti-PD-1 treatment did not impact the bacterial colonization of the gut. In Figure 7C, we observed a significant response of MC38 tumors to anti-PD-1 treatment. Indeed, tumoral growth rate was significantly slowed, demonstrating the anti-tumoral efficacy of the anti-PD-1 treatment in our

experimental conditions. In contrast, no anti-tumoral effect was observed in animals infected with the 11G5 strains and subjected to the same treatment [Figure 7D].

## DISCUSSION

Cancer-inducing properties of colibactin-producing *E.coli* strains have been demonstrated<sup>4,11,12,20,27</sup>. Colibactin mechanism of action is still hypothetical as the toxin has never been purified. It has been reported that genes present in the *pks* island encoding for colibactin synthesis are significantly induced during development of CRC<sup>30</sup>. A number of publications have described the cancer-inducing properties of colibactin-producing *E.coli* using different animal models mostly mimicking CAC forms<sup>4,11,20</sup>. We previously described a pro-carcinogenic activity of colibactin-producing *E.coli* in APC<sup>Min/+</sup> Mice model which is representative of CIN (Chromosomal INstability) form of CRC<sup>13</sup>. Here using a mutant unable to produce colibactin, we confirmed that this impact on carcinogenesis is dependent of this genotoxin. Indeed, even if the colibactin-producing-11G5 strain and its isogenic mutant 11G5ΔCibQ exhibited the same elevated level of colonization in the gastrointestinal tract, polyps number and tumoral volume were significantly increased only in the colon of 11G5-infected mice. Moreover, we observed after 24 hours of inoculation, that the colibactin-producing *E.coli* strain was preferentially detected in the caecum and proximal areas of the colon. This result suggests that bacteria persist in these areas during the chronic infection while the pro-carcinogenic properties impacted all the colon of infected Min mice. In the first publication describing *in vitro* colibactin effect, it was suggested that direct contact between bacteria and target cells was required to induce double strand DNA breaks and genomic instability<sup>17</sup>. However, other studies already described a bystander effect of the colibactin-producing *E.coli*, in which a cellular senescence is induced in infected cells and is

characterized by the production of growth factors that could promote the proliferation of uninfected cells and, subsequently, tumor growth<sup>11,31</sup>. Our data confirmed that pro-carcinogenic effects of the colibactin-producing *E.coli* are not restricted to their persistence site. Moreover, focusing on immune cells, we showed here the impact of chronic infection by the colibactin-producing *E.coli* on the immune microenvironment.

Our work suggest that the exposure of the gut mucosa to colibactin-producing *E.coli* during 7 weeks results in a pro-tumoral colonic microenvironment signature with an increase of inflammation and a decrease of some anti-tumoral cells. *In vivo*, we observed an increase of intestinal inflammation in the digestive tract of Min mice which increased levels of pro-inflammatory enzyme MPO, lymphoid follicles number and size, and neutrophils percentage in the colonic mucosa. All these modulations were statistically significant but correspond to a weak induction. Histological analyses and leucocytes quantitation did not reveal massive infiltrate after infection in the tumors. As other tumorigenic pathogens, colibactin-producing *E. coli* could subvert host immunity and establish persistent infections associated with low grade but chronic inflammation. Inflammation observed by *in vivo* optical imaging at the late stage of infection was probably a consequence of the accelerated tumoral development induced by the infection. In the same way, previous works performed on CAC models showed that inflammation is essential for carcinogenic properties of colibactin-producing *E.coli*, while no significant increase in inflammatory score was observed in the colon of *E coli*-infected mice<sup>4,27</sup>. Our data suggest that, through recruitment of neutrophils in the mucosa, colibactin-producing *E.coli* could generate a proinflammatory microenvironment confirmed by the MPO increase in both the proximal colonic area and the stools. Because the increase of neutrophils number is weak, direct effects of colibactin-producing *E.coli* on epithelial cells could be also involved in this inflammation via their properties to induce oxidative stress, DNA damage and

senescence<sup>11,16,17,25,32</sup>. It was previously demonstrated that accumulation of damaged DNA and cell senescence can also give rise to tumor promoting chronic inflammation<sup>33,34</sup>. Of note, we measured a decrease of anti-inflammatory cytokines in the proximal colon mucosa after infection which could amplify the inflammation in the colibactin-producing *E.coli* infected-mucosa. Because Raisch et al. previously demonstrated that induction of COX2 and inflammation in colibactin-producing *E.coli* –infected macrophages is not linked to colibactin, macrophages were not investigated on the present study<sup>36</sup>. Together with neutrophil and inflammation increases on colon of APC<sup>Min/+</sup> mice infected with colibactin-producing *E.coli*, we observed a significant decrease of T cells density in a colibactin dependent manner. We focused our investigations on T cells population because they have a known anti-tumoral effect and seem to play a central role on CRC development as suggested by efficacy of anti CTLA-4 and anti-PD1 antibodies targeting T cells in human cancer therapy<sup>35</sup>. Here we showed a decrease of CD3<sup>+</sup> T cells in both colonic mucosa and tumor, and of CD8<sup>+</sup> T cells in the mucosa, while CD4<sup>+</sup> T cells were not modified in tumor and colonic mucosa of infected-APC<sup>Min/+</sup> mice. We confirmed the decrease of CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell populations in the invasive margin of *pks* positive human CRC tumors. These findings support an alteration of the immunosurveillance following colibactin-producing *E. coli* chronic infection. Indeed, CD8<sup>+</sup> T cells were widely described to be key effectors capable of recognizing and destroying the tumoral cells via their cytotoxic functions<sup>37–40</sup>. Even if the functions of T cells were not investigated in our study, the MC38-tumors resistance to the anti-PD-1 therapy in 11G5-infected mice was in favor of the depletion of tumor-reactive T cell fraction. Indeed, the anti-PD-1 is supposed to counter-balance T cell exhaustion and restore their anti-tumoral effector properties, thus its inefficiency in 11G5-infected mice associated to the decrease of T cell density strongly suggest that tumour-specific T cells are decreased in these mice<sup>41</sup>. In addition, the decrease of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg in the MLNs after infection

and translocation of the 11G5-*E. coli* was consistent with the alteration of the anti-tumoral immunity in the colon. Indeed, it was described that adoptive transfer of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg can induce tumor regression in the APC<sup>Min/+</sup> mice<sup>42</sup>. In conclusion, we identified a pro-tumoral signature of the immune cells after colibactin-producing *E. coli* chronic infection which could participate in the cancer-promoting activity of the colibactin. In our results, modulation of immune cells identified on the non-neoplastic colonic mucosa and induced by colibactin-producing *E. coli* chronic infection, could reflect early events of the carcinogenesis. Several recent studies showed that the CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> infiltration patterns are progressively altered in the normal adenoma-carcinoma sequence, and also in adenomas, suggesting that immunosurveillance and immunoediting occur in very early stages of CRC development in response to tumorigenic alterations<sup>43-45</sup>. Moreover, colibactin-producing *E. coli* have already been identified in human at adenoma stage, suggesting that the modulation of the micro-environment in our study could be an early event of the carcinogenesis<sup>7,12</sup>.

In addition to their pro-carcinogenic effect, presence of colibactin-producing *E. coli* could affect the efficacy of anti-tumoral treatments. Because we observed an impact of the infection on immune cells and particularly on T cells, we tested the effect of anti-PD-1 immunotherapy. To monitor easily the tumoral growth, we chose to test the immunotherapy on the MC38-subcutaneous graft in mice infected orally by colibactin-producing *E. coli*. Experimental therapeutic response of this model was shown to be sensitive to the microbiota environment. Indeed it was used in different studies to evaluate the impact of several micro-organisms on the efficacy of anti-PD-1 antibodies<sup>46-50</sup>. With this model, we showed that colibactin-producing *E. coli* infection induces a resistance of the MC38 tumors to anti-PD-1 immunotherapy. It is known that CRCs heavily infiltrated with TILs are associated with good prognosis, with infiltration of CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, or CD45RO<sup>+</sup> memory T cells as a strong

prognostic factor<sup>28</sup>. Here we showed a significant decrease of CD3<sup>+</sup> cells in human tumors colonized by some *pks*-positive *E. coli* suggesting a relation between the presence of this bacteria and CRC prognostic. We previously showed a relationship between poor prognostic factors for CRC (TNM stage) and colonization of mucosa by colibactin-producing *E. coli*<sup>13</sup>. In addition, it was recently described that *E. coli* species were more abundant in stools of melanoma patients resistant to anti-PD-1 antibody<sup>46</sup>. Our work suggests that colibactin-producing *E. coli* could be a new biomarker to predict anti-PD-1 response in CRC patients. Large multicenter prospective clinical studies are needed to evaluate the prognostic value of the colibactin-producing *E. coli* for CRC management.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Bacteria strains*

The representative CRC-colibactin-producing *E. coli* strain named 11G5 was isolated from the colonic tissue of a patient with colon cancer as previously described and was resistant to ampicillin and kanamycin<sup>21</sup>. Its isogenic *pks*-negative mutant (11G5ΔC1bQ) was previously described by Cougnoux et al<sup>11</sup> and resistant to ampicillin, kanamycin and spectinomycin. The commensal rifampicin-resistant *E. coli* strain K-12 MG1655 (laboratory stock) was used as the non-pathogenic control. For *in vivo* imaging, the bioluminescent 11G5 strain was obtained by transformation with pAT881 plasmids<sup>51</sup>.

### *Animals*

All studies were approved by local ethical committee (No. CE-2912) and the French Ethical Animal Use Committee (Apafis#5401 and Apafis#13812). Studies were performed using 6- to 7-week-old C57BL/6J-Apc<sup>Min/+</sup> (Min mice; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) female mice or wild-type (WT) C57BL/6J mice (Charles River Laboratories,



L'Abresle, France). All mice were housed in conventional conditions at the animal care facility of Université Clermont Auvergne (Clermont-Ferrand, France).

### *Chronic infection animal model*

Bacterial infection of C57BL/6J-Apc<sup>Min/+</sup> female was performed as previously described<sup>13</sup>. To enhance *E. coli* strain colonization, we administered streptomycin (2.5 g/L) for 3 days prior to oral inoculation with bacteria ( $\approx 1 \times 10^8$  bacteria in PBS) or PBS alone (non-infected controls). Three *E. coli* strains were tested: the *pks*-positive 11G5 strain, its isogenic mutant 11G5 $\Delta$ C1bQ and the K-12 MG1655 commensal strain. We periodically quantified faecal bacterial colonization as colony-forming unit per stool as previously described<sup>52</sup>. Fifty days after inoculation, the mice were sacrificed. The colons were removed from the caecum to the rectum. Then, the polyps were counted. Tissues were prepared for bacterial colonization, immunostaining and molecular biology experiments. Mesenteric lymph nodes (MLNs) were harvested and homogenized then bacterial colonization was evaluated by selective culture and immune cell were analysed by flow cytometry. According to the parameters studied, at least 6 animals per group were tested and the experiments were reproduced at least twice.

For bioluminescence imaging (BLI), the same protocol of chronic infection was performed using luminescent 11G5 strain in 10 C57BL/6J-Apc<sup>Min/+</sup> mice. Six and 24h post 11G5-inoculation, bioluminescence imaging was performed using a dedicated high-sensitivity peltier-cooled (-90°C) backlit charge-coupled device camera (IVIS Spectrum®, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). All acquisitions were performed under the same exposure condition according to BLI imaging, with acquisition setting being setup depending upon signal at the time of acquisition. Prior to imaging, animals were anaesthetized with 2-3% isoflurane in an induction chamber; then 2% isoflurane in air/O<sub>2</sub> was continuously delivered

via a nose cone system in the dark box up the imaging system (delivers gas to up to 5 mice). After 24 hours, the mice were sacrificed. The colons were removed and imaged using IVIS spectrum.

*Inflammation monitoring in the APC<sup>Min/+</sup> mice:*

To monitor inflammation, in non-infected and infected APC<sup>Min/+</sup> mice for 3, 14 and 49 days post-infection, we performed an intraperitoneal (i.p.) injection of 150  $\mu$ L of XenoLight Rediject Inflammation probe per mouse. Mice were then imaged 10 minutes post i.p. injection of the probe (exposure time of 5 minutes). Prior to imaging, animals were anesthetized with 2%-3% isoflurane in an induction chamber; then, 2% isoflurane in air/O<sub>2</sub> was continuously delivered via a nose cone system in the dark box of the imaging system. Quantitative analysis was performed using Living Image® Software (Caliper Life Science, USA) by region of interest (ROI) being delineated manually over organs exhibiting probe accumulation. Every image series had the same scales, set manually, to facilitate visual comparison of signal intensity at each time points. For BLI signal quantification, photon flux was expressed as radiance in p/s/cm<sup>2</sup>/sr and normalized with signal background determined on muscle of each animal.

*Quantification of myeloperoxidase and cytokines in colonic tissue*

Following mouse sacrifice, proximal colonic tissue was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used. We performed an enzyme-linked immunosorbent assay to determine the levels of MPO in all the tissues according to manufacturer's instructions (R&D systems, Minneapolis, MN, USA). Data were standardized to whole

protein quantification using DC<sup>TM</sup> Protein Assay according to manufacturer's instructions (Bio-Rad<sup>®</sup>, Hercules, CA, USA).

Cytokine levels (IL-10, TGF- $\beta$ ) were determined at transcriptional level by qRT-PCR. Total RNA from proximal colonic tissue were extracted with the NucleoSpin<sup>®</sup> RNA/Protein kit (Macherey-Nagel<sup>®</sup>, Düren, Germany) according to the manufacturer's recommended protocol. The integrity and the quality of the extracted total RNA were evaluated by agarose gel electrophoresis and spectrophotometer measurements (260 and 280 nm). RNA samples were subjected to reverse transcription using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit<sup>®</sup> and non-specific random hexamer primers (Ambion) at 37 °C for 120 minutes, according to the manufacturer's recommended protocol. To amplify and quantify target transcripts, reverse transcribed samples (cDNA) were subjected to PCR amplification using SsoAdvanced<sup>TM</sup> Universal SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad) in 10  $\mu$ L containing a final concentration of 0.1  $\mu$ M of each specific primer [Table 1]. The reaction conditions were initial cycle at 95 °C for 10 minutes followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 seconds, annealing and extension for 1 minute at 60 °C. Gene expression values were calculated by the  $\Delta\Delta$ Ct method. Expression levels (RQ) of target genes were normalized to the S26 ribosomal protein gene as housekeeping gene. For each gene, expression in 11G5-infected mice was compared to that of uninfected mice.

#### *Immunofluorescent staining and quantitation of immune cells*

At the end of the experiment the colons were swiss-rolled from the distal to proximal end and fixed for 24 h in 10% formalin (Sigma, Tokyo, Japan) at room temperature. Blocks were embedded in paraffin and cut into 5  $\mu$ m sections, then the tissue sections were prepared for hematoxylin-eosin-safranin staining or immunofluorescence stainings to analyse colonic

immune cells in three regions of interest: mucosa, lymphoid follicle and tumor. Immunostainings were performed in four serial sections to target four immune cell populations: leucocytes (CD45<sup>+</sup> staining); neutrophils (Ly6G<sup>+</sup>); CD4 T cell (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>); CD8 T cells (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). All antibodies used in this study are described in Table 2. All IF stainings were performed using an automated stainer, Discovery XT processors (Roche, Bâle, Swiss), and the tyramide signal amplification (TSA)-conjugated fluorochrome method was used on whole colon slides. Cells quantification was made on the whole colonic mucosa by a specific digital image analysis process<sup>53</sup>. See supplementary material for all full detailed protocols.

#### *Mesenteric lymph nodes (MLNs) immune cells analysis by flow cytometry*

All antibodies used in this study are described in Table 2. MLNs were immediately harvested and crushed in ice-cold PBS 2% FCS through nylon-meshed cell strainers. MLNs derived cells were washed in PBS and stained with fixable Viability Dye eFluor450 (eBioscience) according to manufacturer's instructions. Cell were then washed and incubated at 4°C with anti-CD16/CD32 before surface staining of CD3, CD4, CD8, CD25, TCR $\beta$  immune receptors. For intra-cellular staining of Foxp3 transcription factor, cells were preliminary permeabilized with Fixation/Permeabilization reagent according to manufacturer's instructions (eBioscience™ Fixation/Permeabilization Concentrate). Data were acquired on a BD LSR II flow cytometer (Becton-Dickinson Bioscience), and analyses were performed using FlowJo™ software (TreeStar).

#### *Immune contexture determination on human CRC biopsies*

Immune contexture (CD3 and CD8 densities) were determined on 40 CRC samples from the MiPaCor collection samples (DC-2017-2972). Patients underwent surgery for

resectable colon cancer in the Digestive and Hepatobiliary Surgery Department of the University Hospital of Clermont-Ferrand. All the samples were previously tested for *pks* status on colonic tissues by PCR<sup>25</sup>. We selected 20 *pks*-negative and 20 *pks*-positive samples. After colonic resection, fresh specimens were transported to the Pathology Department laboratory of the University Hospital of Clermont-Ferrand, fixed in buffered 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, cut into 5 µm slices. Two tissue paraffin sections of 4 µm were processed for immunohistochemistry by the reference centre (Immunomonitoring Platform, Hôpital Européen Georges Pompidou AP-HP, Inserm, Paris, France) as previously described<sup>28</sup>. Digital images of the stained tissue sections were obtained at 20× magnification and 0.45 µm/pixel resolution. The densities of CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in colon tumor and invasive margin regions were determined as previously described<sup>28</sup>.

#### *Improvement of 11G5 impact on anti-PD-1 mAb efficacy in mice*

The transplantable MC38 CRC cells derived from C57BL/6J mice were kindly provided by Dr G.Azar (Sanofi). Cells were maintained as monolayers using culture medium consisting of DMEM (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% FCS (Biowest, Nuaille, France), 1% glutamin, 1% hepes, 1 mM non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate at 37 °C in a humidified incubator containing 5% CO<sub>2</sub>. Experiments were performed in 6-to 8-week old WT C57BL/6J male mice with 8 animals per group. To enhance *E. coli* strain colonization, we administrated streptomycin (2,5 g/L) for 3 days before oral inoculation of bacteria ( $\approx 1 \times 10^9$  bacteria) or PBS alone (non-infected controls). Nine days after infection, mice were anesthetized by isoflurane inhalation and were inoculated with  $1.10^6$  MC38 cells by dorsal subcutaneous injection at day 0 of the experiment. At 8, 11, 14, 18, 20 and 22 days after tumor cell injection, non-infected or 11G5-infected mice were injected intraperitoneality (i.p) with the PD-1 specific blocking antibody (mu anti-PD-1; mIgG1 –a chimeric version of the RPM1–14 rat monoclonal antibody with a mouse IgG1 Fc

domain) or an IgG1 isotype control antibody (mIgG1, clone 1B711) (10 $\mu$ g/g of mice). Antibodies used were obtained from Sanofi R&D (Vitry-Sur-Seine, France). To evaluate potential toxicity, body weight was measured twice a week. To monitor tumoral growth, tumor volume in mm<sup>3</sup> was calculated twice a week from the measurement of two perpendicular diameters using a caliper according to the formula  $L \times S^2 / 2$  where L and S are the largest and smallest diameters in mm respectively. The mice were sacrificed at day 30 of the experiment. Tumors were removed and weighted.

### *Statistical analyses*

The bacterial colony count in tissues and fecal samples were compared using the Kruskal-Wallis non-parametric analysis. Fisher exact test of  $\chi^2$  analysis was used for comparison of the proportion of MLNs positive for bacteria translocation. For all other parameters, one-way ANOVA followed by Tukey's post-test or unpaired Student t test were used. Correlations were determined by Spearman test. All tests were performed using Graph Pad Prism 7 (StataCorp, College Station, TX, USA). p-values  $\leq .05$  were considered statistically significant.

**Acknowledgments:** This study was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie, Inserm and Université Clermont-Auvergne (UMR1071), INRA (USC-2018) and by grants from the Conseil Régional d’Auvergne, CPER EPICURE 2016. We thank Michael Rodrigues and Florence Marliot for their technical assistance, Arnaud Briat and Leslie Mazuel from In vivo Imaging Auvergne platform, the CICS platform from Université Clermont-Auvergne for assistance with the transmission electron microscopy as well as Abdelkrim Alloui (Animal Facilities) for animal care. We kindly thank Catherine Grillot Courvalin (Institut Pasteur, Paris, France) and G.Azar (Sanofi) for providing pAT881 plasmid and MC38 cells respectively. A. Lopès was supported by a CIFRE grant (2015/622).

## References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359-386.
2. Tilg H, Adolph TE, Gerner RR, et al. The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer. *Cancer Cell* 2018;33:954–964. Available at: [https://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108\(18\)30072-2](https://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108(18)30072-2) [Accessed September 25, 2018].
3. Mendonça LABM, Santos Ferreira R dos, Cássia Avellaneda Guimarães R de, et al. The Complex Puzzle of Interactions Among Functional Food, Gut Microbiota, and Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology* 2018;8. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00325/full> [Accessed October 5, 2018].
4. Tomkovich S, Yang Y, Winglee K, et al. Locoregional Effects of Microbiota in a Preclinical Model of Colon Carcinogenesis. *Cancer Research* 2017;77:2620–2632. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-16-3472> [Accessed August 29, 2018].
5. Dove WF, Clipson L, Gould KA, et al. Intestinal neoplasia in the ApcMin mouse: independence from the microbial and natural killer (beige locus) status. *Cancer research* 1997;57:812–814. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/57/5/812.short> [Accessed September 5, 2017].
6. Li Y, Kundu P, Seow SW, et al. Gut microbiota accelerate tumor growth via c-jun and STAT3 phosphorylation in APC Min/+ mice. *Carcinogenesis* 2012;33:1231–1238. Available at:

<https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgs137> [Accessed September 5, 2017].

7. Nakatsu G, Li X, Zhou H, et al. Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis. *Nat Commun* 2015;6:8727.
8. Feng Q, Liang S, Jia H, et al. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nat Commun* 2015;6:6528.
9. Cao Y, Wu K, Mehta R, et al. Long-term use of antibiotics and risk of colorectal adenoma. *Gut* 2018;67:672–678.
10. Wong SH, Zhao L, Zhang X, et al. Gavage of Fecal Samples From Patients With Colorectal Cancer Promotes Intestinal Carcinogenesis in Germ-Free and Conventional Mice. *Gastroenterology* 2017;153:1621-1633.e6. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508517360389> [Accessed August 28, 2018].
11. Cougnoux A, Dalmaso G, Martinez R, et al. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* 2014;63:1932–1942.
12. Dejea CM, Fathi P, Craig JM, et al. Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science* 2018;359:592–597.
13. Bonnet M, Buc E, Sauvanet P, et al. Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin Cancer Res* 2014;20:859–867.
14. Wu S, Rhee K-J, Albesiano E, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nature Medicine* 2009;15:1016–1022. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.2015> [Accessed September 5, 2017].
15. Mima K, Sukawa Y, Nishihara R, et al. *Fusobacterium nucleatum* and T Cells in Colorectal Carcinoma. *JAMA Oncology* 2015;1:653. Available at: <http://oncology.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaoncol.2015.1377> [Accessed September 15, 2017].
16. Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, et al. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:11537–11542.
17. Nougayrède J-P, Homburg S, Taieb F, et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 2006;313:848–851.
18. Vizcaino MI, Crawford JM. The colibactin warhead crosslinks DNA. *Nat Chem* 2015;7:411–417.
19. Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA, et al. Molecular Epidemiology and Phylogenetic Distribution of the *Escherichia coli* pks Genomic Island. *Journal of Clinical Microbiology* 2008;46:3906–3911. Available at: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00949-08> [Accessed September 10, 2018].
20. Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 2012;338:120–123.



21. Buc E, Dubois D, Sauvanet P, et al. High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. *PLoS ONE* 2013;8:e56964.
22. Prorok-Hamon M, Friswell MK, Alswied A, 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. Available at: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2013-304739> [Accessed June 26, 2018].
23. Eklöf V, Löfgren-Burström A, Zingmark C, et al. Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection: Fecal microbial markers in colorectal cancer detection. *International Journal of Cancer* 2017;141:2528–2536. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.31011> [Accessed June 26, 2018].
24. Bossuet-Greif N, Vignard J, Taieb F, et al. The Colibactin Genotoxin Generates DNA Interstrand Cross-Links in Infected Cells. *MBio* 2018;9.
25. Gagnière J, Bonnin V, Jarrousse A-S, et al. Interactions between microsatellite instability and human gut colonization by *Escherichia coli* in colorectal cancer. *Clin Sci* 2017;131:471–485.
26. Maddocks ODK, Short AJ, Sonnenberg MS, et al. Attaching and Effacing *Escherichia coli* Downregulate DNA Mismatch Repair Protein In Vitro and Are Associated with Colorectal Adenocarcinomas in Humans. *PLOS ONE* 2009;4:e5517. Available at: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0005517> [Accessed September 9, 2018].
27. Arthur JC, Gharaibeh RZ, Mühlbauer M, et al. Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer. *Nat Commun* 2014;5:4724.
28. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* 2018;391:2128–2139.
29. Houston SA, Cerovic V, Thomson C, et al. The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Mucosal Immunol* 2016;9:468–478.
30. Muehlbauer M, Gharaibeh R, Arthur JC, et al. 825 Intestinal Inflammation Targets *E. Coli* NC101 Transcriptome Response and Promotes Development of Colorectal Cancer (CRC). *Gastroenterology* 2013;144:S-144-S-145. Available at: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(13\)60520-X/abstract](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(13)60520-X/abstract) [Accessed October 5, 2018].
31. Dalmaso G, Cougnoux A, Delmas J, et al. The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment. *Gut Microbes* 2014;5:675–680. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/19490976.2014.969989> [Accessed September 6, 2018].
32. Maddocks ODK, Scanlon KM, Sonnenberg MS. An *Escherichia coli* effector protein promotes host mutation via depletion of DNA mismatch repair proteins. *MBio* 2013;4:e00152-00113.
33. Rodier F, Coppé J-P, Patil CK, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 2009;11:973–979.

34. Zheng L, Dai H, Zhou M, et al. Fen1 mutations result in autoimmunity, chronic inflammation and cancers. *Nature Medicine* 2007;13:812–819. Available at: <http://www.nature.com/articles/nm1599> [Accessed October 5, 2018].
35. Fletcher R, Wang Y-J, Schoen RE, et al. Colorectal cancer prevention: Immune modulation taking the stage. *Biochim Biophys Acta* 2018;1869:138–148.
36. Raisch J, Rolhion N, Dubois A, et al. Intracellular colon cancer-associated *Escherichia coli* promote protumoral activities of human macrophages by inducing sustained COX-2 expression. *Laboratory investigation* 2015;95:296. Available at: <http://search.proquest.com/openview/9fca454eb1b1800884c7f3a871410357/1?pq-origsite=gscholar&cbl=25033> [Accessed September 15, 2017].
37. Colangelo T, Polcaro G, Muccillo L, et al. Friend or foe? The tumour microenvironment dilemma in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2017;1867:1–18.
38. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology* 2006;6:836–848. Available at: <http://www.nature.com/articles/nri1961> [Accessed September 4, 2018].
39. Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* 2013;14:1014–1022.
40. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 2007;450:903–907.
41. Simon S, Labarriere N. PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? *Oncoimmunology* 2017;7. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5739549/> [Accessed September 16, 2018].
42. Erdman SE, Sohn JJ, Rao VP, et al. CD4+ CD25+ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in *ApcMin/+* mice. *Cancer research* 2005;65:3998–4004. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/65/10/3998.short> [Accessed September 5, 2017].
43. Jang TJ. Progressive Increase of Regulatory T Cells and Decrease of CD8+ T Cells and CD8+ T Cells/Regulatory T Cells Ratio during Colorectal Cancer Development, Progressive Increase of Regulatory T Cells and Decrease of CD8+ T Cells and CD8+ T Cells/Regulatory T Cells Ratio during Colorectal Cancer Development. *The Korean Journal of Pathology, The Korean Journal of Pathology* 2013;47:443–451. Available at: <https://www.jpathol.org/journal/view.php?doi=10.4132/KoreanJPathol.2013.47.5.443> [Accessed September 23, 2018].
44. Maglietta A, Maglietta R, Staiano T, et al. The Immune Landscapes of Polypoid and Nonpolypoid Precancerous Colorectal Lesions Shiku H, ed. *PLOS ONE* 2016;11:e0159373. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0159373> [Accessed September 23, 2018].
45. Yuan A, Steigen SE, Goll R, et al. Dendritic cell infiltration pattern along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *APMIS* 2008;116:445–456. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0463.2008.00879.x> [Accessed September 23, 2018].
46. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* 2018;eaan4236. Available at:

<http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aan4236> [Accessed December 22, 2017].

47. Matson V, Fessler J, Bao R, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* 2018;359:104–108.
48. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1–based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* 2018:eaan3706. Available at: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aan3706> [Accessed December 22, 2017].
49. Sivan A, Corrales L, Hubert N, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* 2015;350:1084–1089.
50. Vetizou M, Pitt JM, Daillere R, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* 2015;350:1079–1084. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aad1329> [Accessed February 5, 2018].
51. Foucault M-L, Thomas L, Goussard S, et al. In vivo bioluminescence imaging for the study of intestinal colonization by *Escherichia coli* in mice. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:264–274.
52. Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, et al. Crohn’s disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med* 2009;206:2179–2189.
53. Lopès A, Casse AH, Billard E. Deciphering immune microenvironment of whole organ slide, by digital imaging and cognition network technology: application to mouse gut. *Scientific Reports* 2018.

## Table

**Table 1. List of primers used for qRT-PCR assays**

<b>Name</b>	<b>Gene bank accession</b>	<b>Primer Sequences 5' - 3'</b>
IL-10	NM_010548.2	F: GCCAGAGCCACATGCTCCTA R: GATAAGGCTTGGCAACCCAAGTAA
TGF- $\beta$	NM_011577	F: GTGTGGAGCAACATGTGGA ACTCTA R: TTGGTTCAGCCACTGCCGTA
S26	NM_013765	F: TTGTCATTCGGAACATIGTAG R: GACCTCCACCAAAGCC

**Table 2.** Antibodies used in immunofluorescence for staining of whole colon sections (IHC-IF) or flow cytometry (FC).

Used for	Target	Species	Clone	Manufacturer	Fluorochrome / coupled Protein
IHC-IF	CD45	Rabbit	NA	Abcam	NA
	Ly6G	Rat	1A8	Biolegend	NA
	CD3	Rabbit	SP7	ThermoFisher	NA
	CD4	Rat	4SM95	ThermoFisher	NA
	CD8	Rat	4SM15	ThermoFisher	NA
	Rat IgG	Goat	NA	Jackson	NA
	Rabbit IgG	NS	NS	Roche	HRP
	Rat IgG	NS	NS	Roche	HRP
	Goat IgG	NS	NS	Roche	HRP
	FC	TCR- $\beta$	Armenian Hamster	H57-597	ThermoFisher
CD3		Rat	17A2	ThermoFisher	APC-eFluor780
CD4		Rat	RM4-5	ThermoFisher	APC
CD8		Rat	53-6.7	ThermoFisher	PerCP-eFluor 710

CD25	Rat	3C7	ThermoFisher	A488
FoxP3	Rat	FJK-16s	ThermoFisher	PE
CD16/	Rat	93	ThermoFisher	NA
CD32				

---

#### Figure legend

**Figure 1. The colon cancer-associated *E. coli* 11G5 strain stimulates colon tumor development in *Apc*<sup>Min/+</sup> mice, in a *pks* dependent manner.** (A) Number of visible colonic polyps in non-infected mice (PBS alone) and in mice infected with *pks*<sup>+</sup> 11G5, *pks*<sup>-</sup> 11G5ΔC1bQ and the K12-commensal *E. coli* strains at 50 days postinfection (p.i). (B) Volume of polyps for each group of mice at 50 days p.i. (C) Level of colonization measured in the stools of each infected mice group from 2 to 50 days p.i. (D) Level of bacterial colonisation in colon and ileum at 50 days p.i. (E) Localisation of 11G5 strain along the mouse digestive tract was assessed using bioluminescence at 6 and 24 hours p.i. C: Colon, SI: Small Intestine, Ca: caecum, P: Proximal; D: Distal. (F-G) Monitoring of intra-digestive inflammation in infected mice by optical imaging using XenoLight Rediject Inflammation probe. (F) Representative images obtained at 49 days p.i. (G) Bioluminescent signals were quantified from ROI drawn manually at 3, 14 and 49 days p.i. Results were expressed as ratio between digestive signal ROI (average radiance in p/s/cm<sup>2</sup>/sr) and muscle ROI as signal background. \**p* < .05, \*\**p* < .01. R.O.I.: Region Of Interest.

**Figure 2. The colon cancer-associated *E. coli* 11G5 strain modulates the global immune environment in colon by inducing an increase of lymphoid follicle numbers and a decrease of leucocytes in mucosa of APC<sup>Min/+</sup> mice .** Single immunofluorescence staining (IF) for CD45 leucocytes specific surface protein (green) was performed on colon section at 50 days p.i., to assess lymphoid follicle number and size, and leucocytes density. (A) Representative IF images of colonic mucosa-associated lymphoid follicle for one mouse of each group. Blue : 4',6-diaminodino-2-phenylindole (DAPI); Green : CD45 staining. (B) Means of the number of lymphoid follicle per colon for each group of mice. (C) The lymphoid follicles size per colon was assessed by digital image analysis. (D) Correlation between lymphoid follicle size and total colonic polyps volume in 11G5 infected mice was analysed (Spearman test). (E) Density of leucocytes in colonic lymphoid follicle was assessed by digital image analysis for each mouse. Density of leucocytes was obtained as the number of CD45<sup>+</sup> cells per lymphoid follicle surface. (F) Representative IF images of CD45 staining in the colonic mucosa of one mouse from each group. (G) Density of leucocytes in colonic mucosa of each mice was assessed by digital image analysis in the total colonic mucosa section for each mouse. Density of leucocytes was expressed as the number of CD45<sup>+</sup> cells per tissue surface area unit. (A-G) Means  $\pm$  SEM for each group of mice were reported. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ .

**Figure 3. The colon cancer-associated *E. coli* 11G5 strain modulates specific immune pro-inflammatory cells in colon by inducing an increase of neutrophils in mucosa of APC<sup>Min/+</sup> mice.** Single IF staining (IF) for Ly6G neutrophil specific surface protein (orange) was performed on colon section at 50 days p.i., to assess neutrophil percentage in lymphoid follicle, colonic mucosa and tumors. Results were reported as percentage of neutrophils determined as the ratio of Ly6G<sup>+</sup> cell density measured by digital image analysis to leucocytes

density (CD45<sup>+</sup> staining on a serial section). (A) Representative IF images of neutrophils in lymphoid follicle. Blue : 4',6-diaminodino-2-phenylindole (DAPI); Orange : Ly6G staining. (B) Percentages of neutrophils in lymphoid follicle for each group of mice. (C) Representative IF images of neutrophils in the colonic mucosa of one mouse from each group. The boxes represent a zoom in on the typical polynuclear structure of these cells. (D) Percentages of neutrophils in colonic mucosa for each group of mice. (E) Representative IF images of neutrophils in tumoral area for 11G5 infected and control mice. (F) Density of neutrophils in colonic tumor of mice. Data were reported as the mean  $\pm$  SEM. \* $p < .05$ .

**Figure 4. The colon cancer-associated *E. coli* 11G5 strain modulates anti-tumoral T cells in the colon of APC<sup>Min/+</sup> mice.** IF staining (IF) for CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> was performed on colon section at 50 days p.i. Cells density and percentage were obtained by digital image analyze of each stained sections. (A) Representative IF image of CD3<sup>+</sup> T cells in lymphoid follicle of one mouse from each group. Blue : 4',6-diaminodino-2-phenylindole (DAPI); Orange : CD3 staining. (B) Density of CD3<sup>+</sup> T cells in lymphoid follicle for each group of mice. (C) Representative IF image of CD3<sup>+</sup> T cells in the colonic mucosa of one mouse from each group. (D) Density of CD3<sup>+</sup> T cells in mucosa for each group of mice. (E) Representative IF image showing the repartition of tumor-infiltrating lymphocytes, TILs, M: Mucosa, T: Tumor area, Yellow arrows : base of polyps. (F) Density of TILs for each group of mice. (G) CD8<sup>+</sup> T cells density in lymphoid follicle, mucosa and tumor. Data were reported as mean  $\pm$  SEM. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ .

**Figure 5. The colon cancer-associated *E. coli* 11G5 strain translocates to mesenteric lymph nodes (MLNs) and modulates immune cells through the decrease of a CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells subpopulation.** MLNs from mice were analyzed at 50 days p.i. (A) Bacterial



translocation in MLNs. (B-G) Percentages of immune cells were determined by flow cytometry analysis. (B) Percentages of CD3<sup>+</sup> T cells among live cells were visualized by side scatter (SSC) versus CD3. (C) Percentages of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells among T cells. (D) Percentages of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells. (E) Correlation analyze between CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells and MLNs 11G5 *E. coli* colonization (Spearman test). (F) The CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> percentages among CD8<sup>+</sup> T cells. (G) Analyze of correlation between CD25+CD8+ T cells and MLNs colonization by *E. coli* 11G5 (Spearman test). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\*\* $p < .0001$ .

**Figure 6. Association between *pks*<sup>+</sup> *Escherichia coli* colonization and decrease of tumor infiltrating-lymphocytes T cells (TILs) at the invasive margin, of colorectal cancer (CRC) patients (n=40).** (A) Immunohistochemistry picture of TILs detection in CRC patients harboring *pks*<sup>+</sup> *E. coli* strains (top box) and in patients harboring *pks*<sup>-</sup> *E.coli* strains (bottom box). (B) Densities of TILs in tumor and at the invasive margin of patients colonized by *pks*<sup>+</sup> or *pks*<sup>-</sup> *E. coli*, were assessed by digital image analysis. \* $p = .05$ .

**Figure 7. Anti-tumoral effect of PD-1 based immunotherapy on growth rate of MC38 murine colonic tumors in *pks*<sup>+</sup> *E. coli* pre-infected mice.** Level of 11G5-bacterial colonization in feces (A) or in colonic tissue (B) was similar in mice wathever the injected treatment (isotype control or RMP1-14 antibodies). (C) Significant response of PD-1 based immunotherapy (RMP1-14 antibody) on MC38 tumors growth rate. (D) No antitumoral effect of PD-1 based immunotherapy was observed on mice pre-infected by *pks*<sup>+</sup> *E. coli* 11G5 strain.

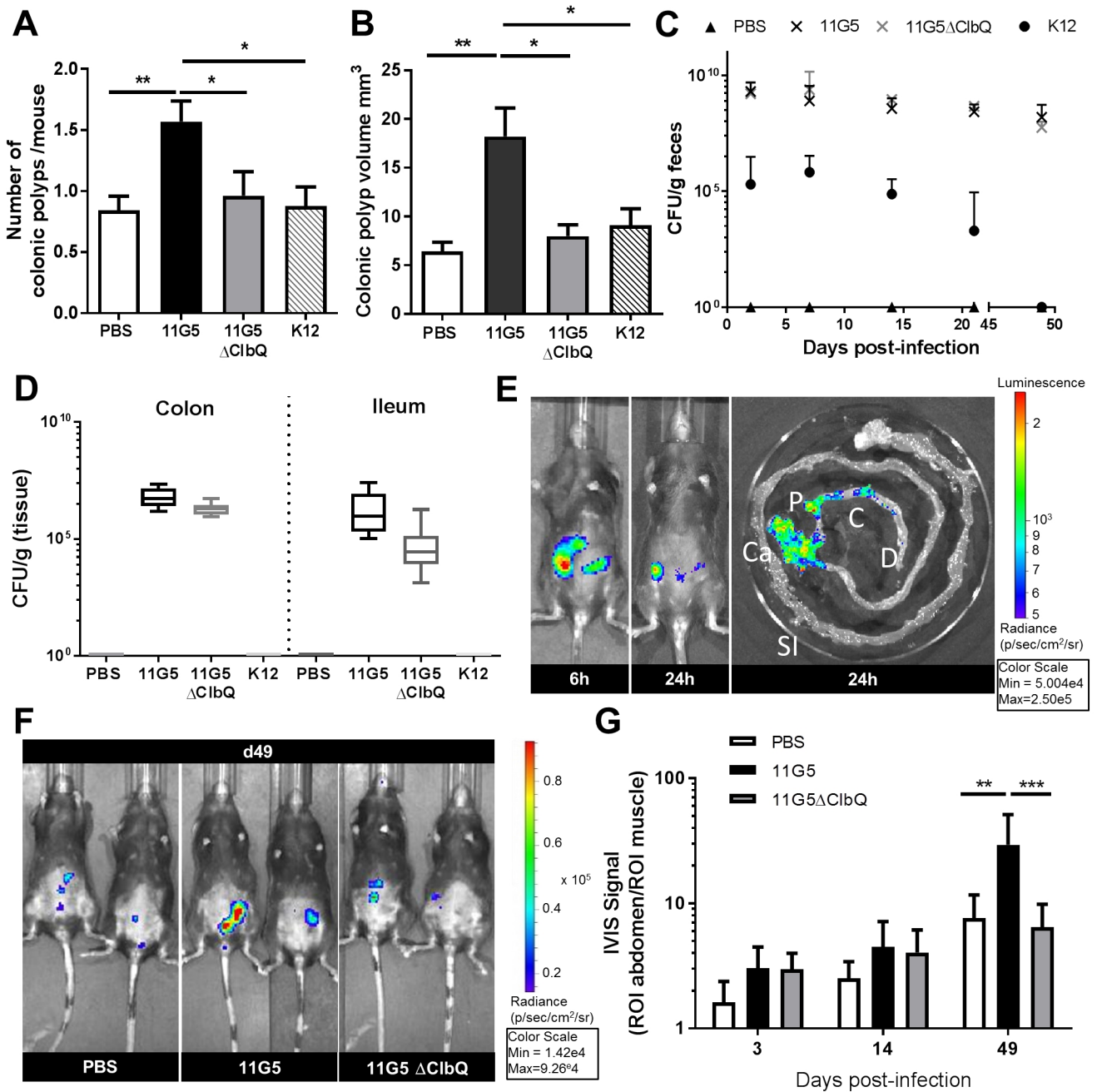
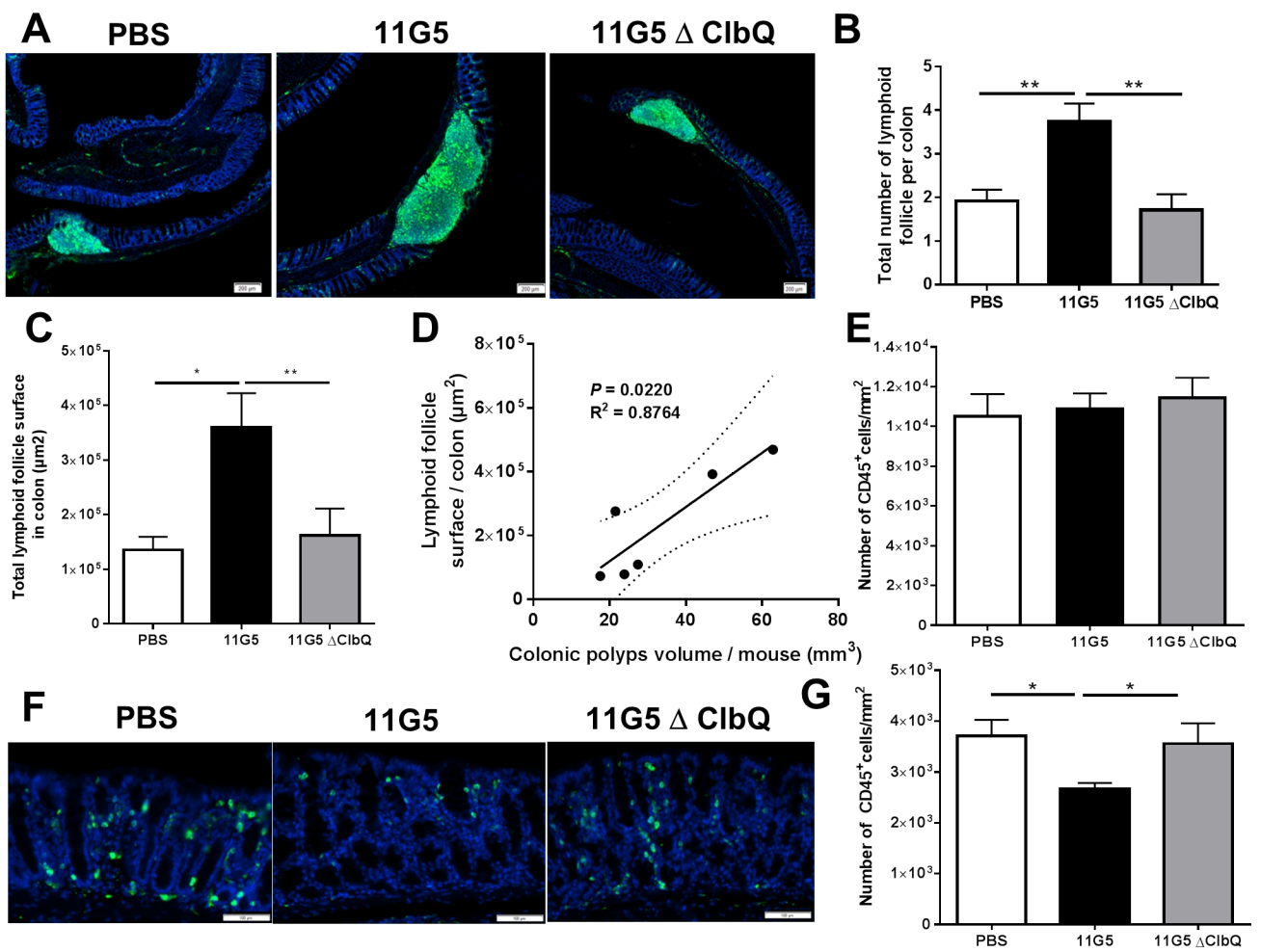


Figure 1.



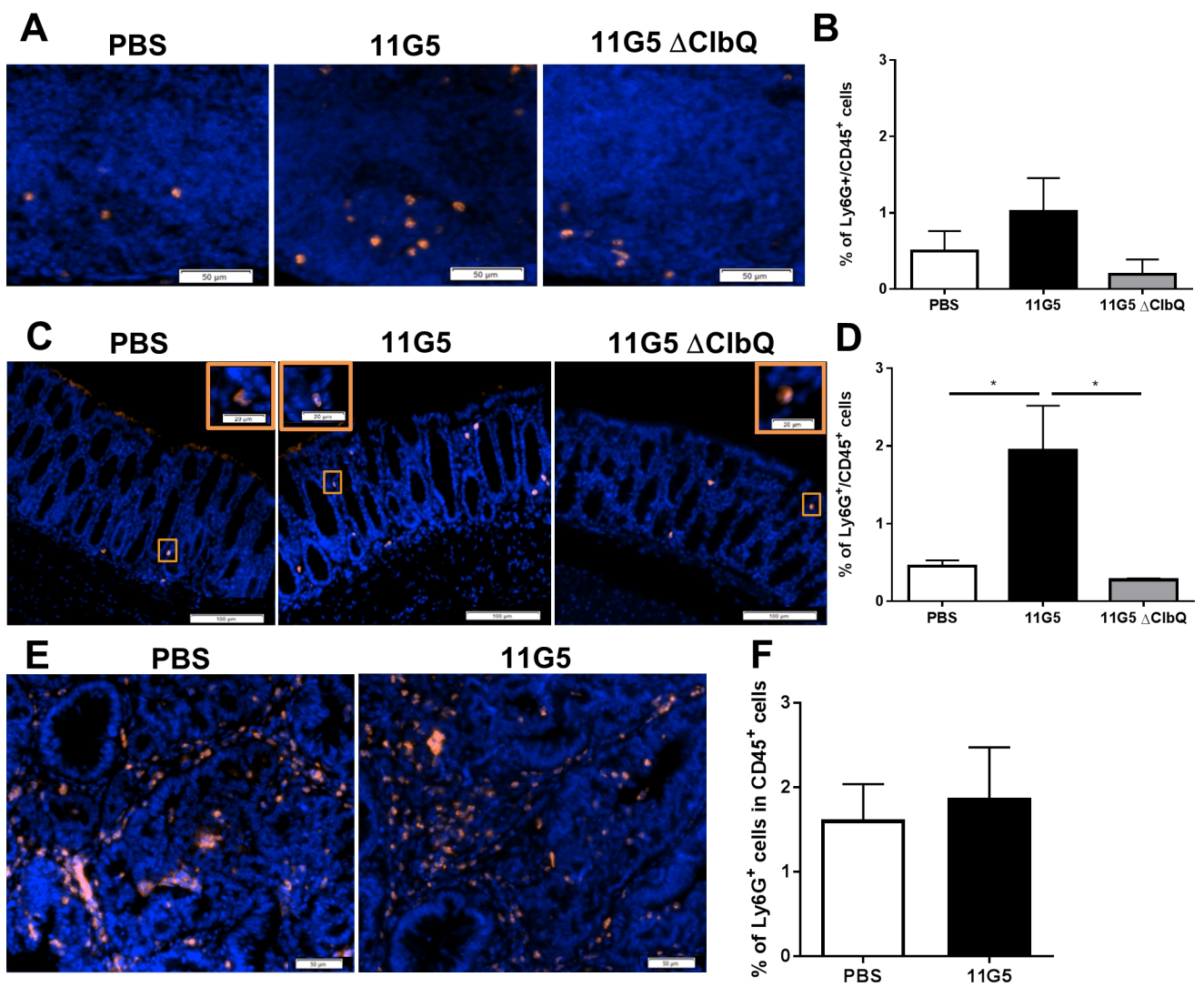


Figure 3.

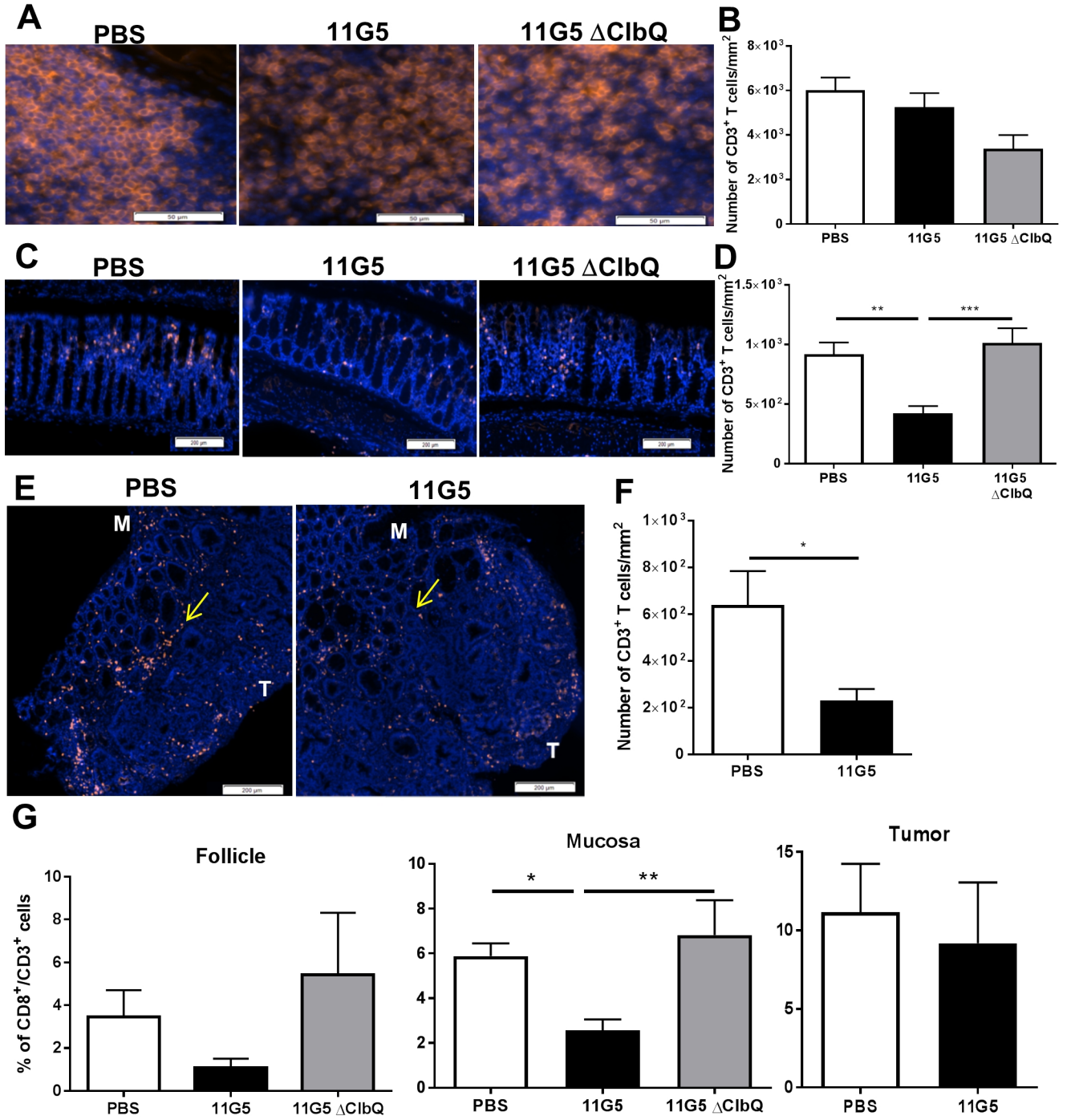


Figure 4.



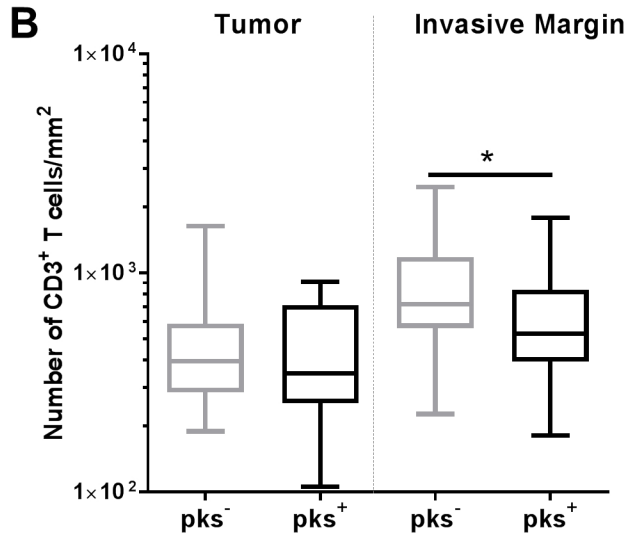
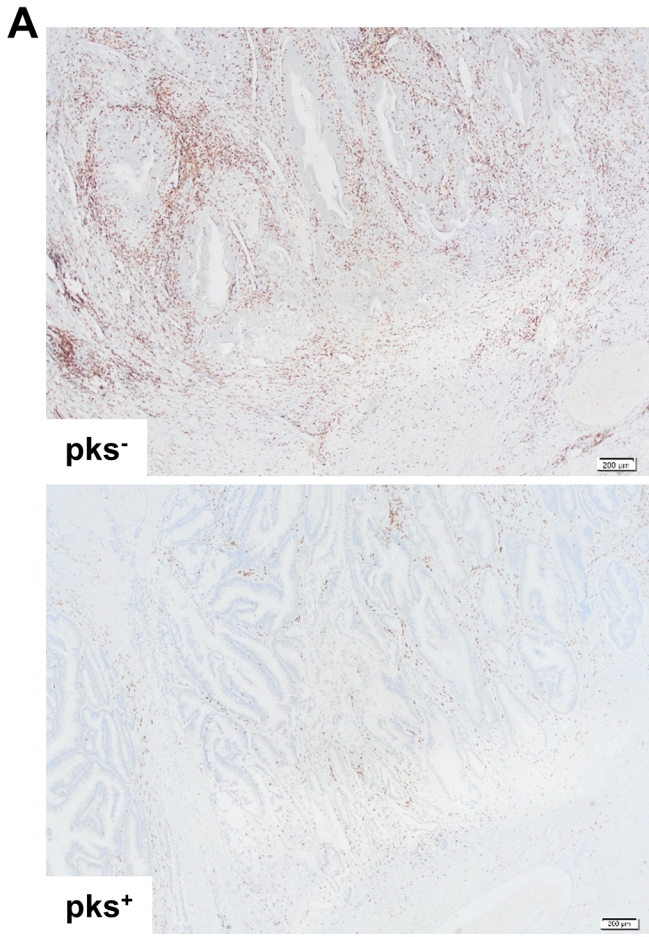
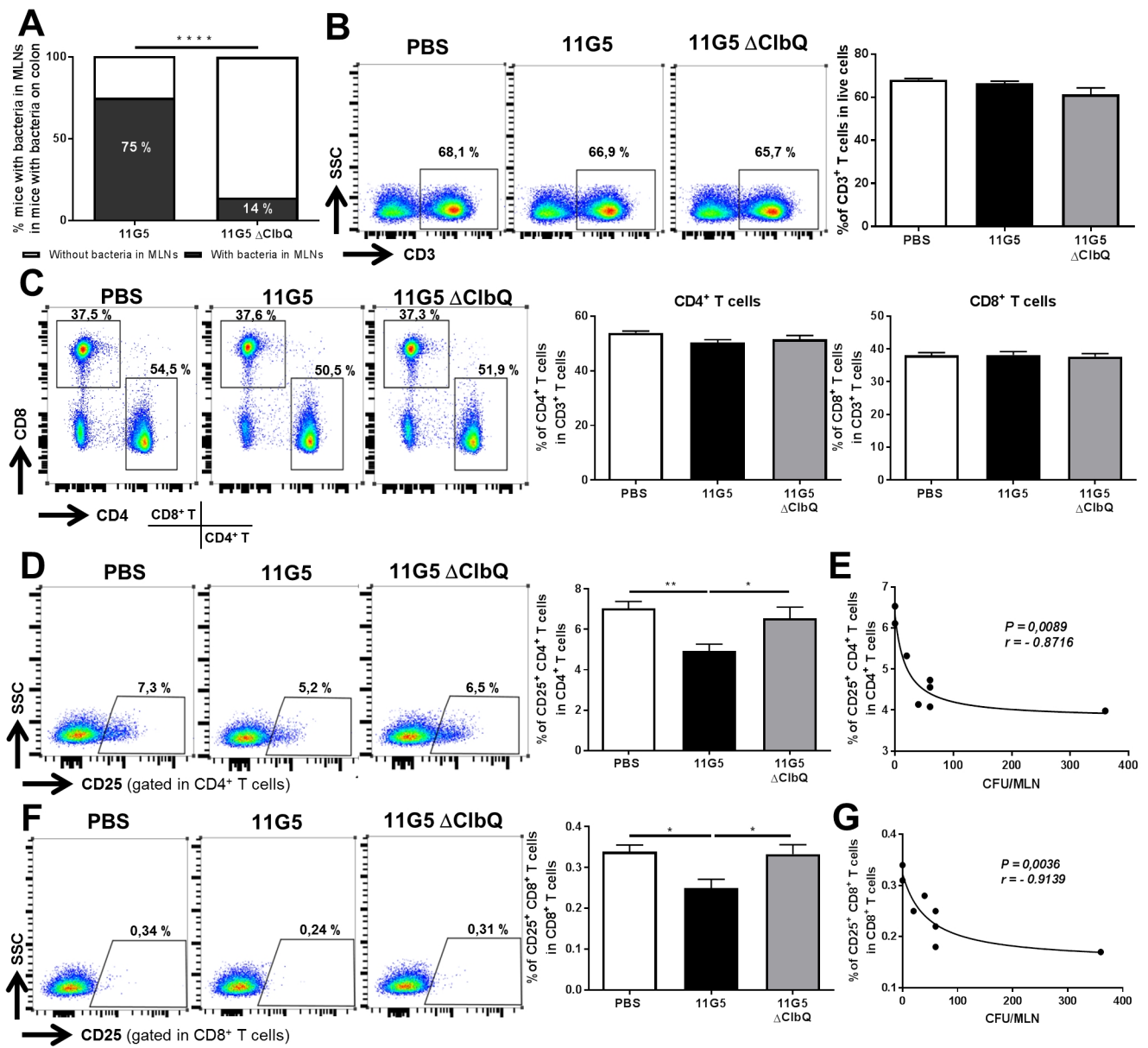


Figure 6.



**Figure 5.**

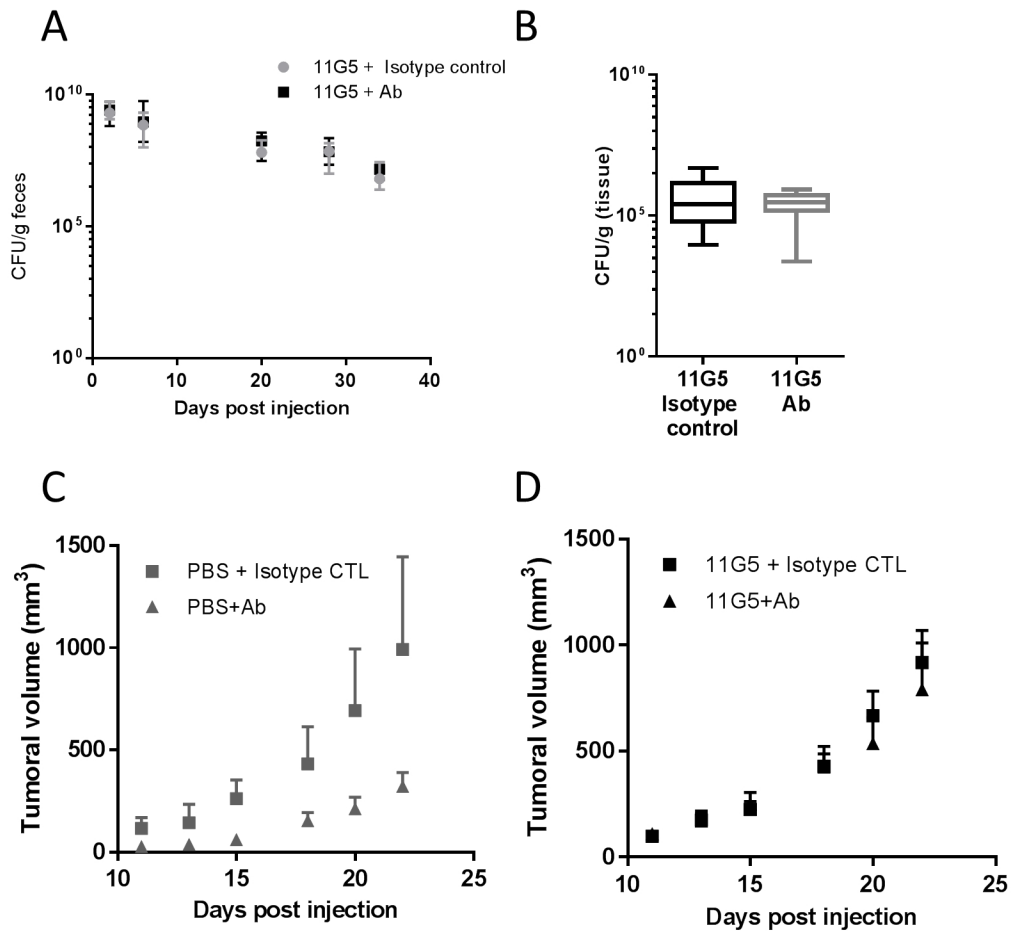


Figure 7.



## **SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS**

### *Immunofluorescence (IF) staining of colonic immune cells.*

All IF stainings were performed using an automated stainer, Discovery XT processors (Roche, Bâle, Swiss), and the tyramide signal amplification (TSA)-conjugated fluorochrome method was used on whole colon slides. After removal of all paraffin from slides, antigens were retrieved with CC1 program (Roche, Bâle, Swiss), according to the standard procedure. Then, endogenous horseradish peroxidase was blocked with DISC inhibitor reagent (Roche, Bâle, Swiss) for 8 min at RT. A series of staining steps were performed interspersed with 2 to 3 washing steps using the proprietary Reagent Buffer (Roche, Bâle, Swiss). For CD45 (leucocytes) and Ly6G (neutrophils) single staining, slides were incubated with primary antibodies at RT for 2 h. For IF, two rounds of 16 min incubations were performed, first with Umap anti-primary antibody HRP (Roche, Bâle, Swiss) and second with FITC (for CD45 detection) or Cy3 (for Ly6G detection) tyramides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Discovery FITC kit or Discovery Cy3 kit, Roche, Bâle, Swiss) according to the manufacturer's instructions.

CD4/CD3 and CD8/CD3 double staining were performed in three sequential steps. First, slides were incubated with a primary rat anti-CD4 or rat anti-CD8 antibody respectively, at RT for 1 h. For IF, slides were incubated with a goat anti-Rat IgG secondary antibody for 32 min at RT then incubated with Umap anti-goat HRP (Roche, Bâle, Swiss) according to the manufacturer's instructions for 16 min at RT. Finally, FITC tyramides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Discovery FITC kit, Roche, Bâle, Swiss) were incubated for 16 min at RT. A second step comprising denaturation and neutralization was needed for CD3 staining. More precisely, slides were incubated at 40°C for 20 min with DISC inhibitor HRP reagent (Roche, Bâle, Swiss). Third, CD3 protein was stained with the same protocol previously described for Ly6G staining.

Finally, cell nuclei were counterstained with DAPI (Roche, Bâle, Swiss). Slides were manually mounted with ProLong™ Gold Antifade Mountant (Thermo fisher, Waltham, MA,

USA) and High Precision coverslips (No 1.5H, Marienfeld, Thuringia, Germany). Negative control slides were also included that lacked any appropriate antibody or, in the case of double staining, omitted one or the other primary antibody.

This experiment was reproduced from two (Leucocytes and Neutrophils analysis) to three times (T cells analysis), with from 3 to 8 mice per group for each experiment.

#### *Acquisition settings of whole colon stained slides.*

All slides were acquired automatically at 0,161  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  resolution using a VS-120-ASW-L100 whole-slide scanner (Olympus, Rungis, France) equipped with a Digital monochrome Olympus XM10 camera 40x objective (NA 0.95). For CD45 fluorescence imaging, we used 50 ms optimal exposure times for the DAPI channel and 25 ms for the FITC channel. For Ly6G fluorescence imaging, we used 50 ms optimal exposure times for the DAPI channel and 5 ms for the CY3 channel. For CD3/CD4 fluorescence staining, we used 30 ms optimal exposure times for the DAPI channel, 50 ms for the FITC channel, and 5 ms for the CY3 channel. For CD3/CD8 fluorescence staining, we used 30 ms optimal exposure times for the DAPI channel, 70 ms for the FITC channel, and 5 ms for the CY3 channel.

#### *Immune cells numbering by digital image analysis (DIA).*

Each slide was automatically analysed by a specific DIA Algorithm, developed for this study and based on Definiens Cognition Network Technology<sup>®</sup>. All steps and settings are previously detailed<sup>53</sup>. Briefly, immune cells were quantified in a whole colon slide by distinguishing three regions of interest (ROIs): mucosa, lymphoid follicles and tumors. After a segmentation step, the global tissue on slide was detected. Then we proceeded with a ROI detection step by machine learning to distinguish the three colon ROIs. Finally we quantified immune cells by detecting the coexpression of nuclear marker 4',6-diaminodino-2-

phenylindole (DAPI) and a specific immune cell receptor: CD3 for T cells, CD8 and CD3 for cytotoxic T cells, CD4 and CD3 for helper T cells and Ly6G for neutrophils. The density was obtained as the number of positive cells per unit tissue surface area for leucocytes (CD45<sup>+</sup> cells) and T cells (CD3<sup>+</sup> cells). The proportion of neutrophils was calculated from the ratio of the Ly6G density to the CD45 density. In the same way, the proportion of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells were calculated from the ratio of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> cell density respectively to that of CD3<sup>+</sup> cells.

**Supplementary Figure S1. *Escherichia coli pks<sup>+</sup>* promotes tumor development in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice colon whatever the colonic area.** For each mice, distribution of the tumors from proximal to distal colon was reported. No difference of tumors distribution was observed between the four groups of mice (Fisher test). Data are combined from 3 independent experiments.

**Supplementary Figure S2. *pks<sup>+</sup>* *Escherichia coli* induces both an increase of pro-inflammatory biomarkers and a decrease of anti-inflammatory cytokines in mouse.** The quantitation was done in uninfected (PBS), and *pks<sup>+</sup>* (11G5) or *pks<sup>-</sup>* (11G5 $\Delta$ ClbQ) *E. coli* infected mice at 50 days post-infection (p.i). (A-B) Myeloperoxidase (MPO) was quantitated by ELISA in both feces (A) and colonic tissues (B) and was significantly increased in 11G5-infected mice. (C) Relative quantitation of IL-10 and TGF- $\beta$  cytokines on colonic tissues measured by real-time qPCR. Both anti-inflammatory cytokines were significantly decreased on 11G5-infected mice. **\*\* $p < .01$ , \* $p < .05$ .**

**Supplementary Figure S3. *Escherichia coli pks<sup>+</sup>* modulates global tumor immune infiltrate by inducing a decrease of leucocytes density.** (A) Leucocytes density in colonic tumor of mice infected with *pks<sup>+</sup>* *E. coli* strain 11G5, or control PBS. Leucocytes density was assessed by digital image analysis of whole stained colon section (B), Blue : 4',6-diaminodino-2-phenylindole (DAPI); Green : CD45, leucocytes specific surface protein. Data are representative from four independent experiment and are expressed as the mean  $\pm$  SEM. **\* $p < .05$ .**

**Supplementary Figure S4. *Escherichia coli pks*<sup>+</sup> induces a specific decrease of CD8<sup>+</sup> T cells in colonic mucosa.** Colonic T cells were observed and quantified at 50 days post-infection (p.i), using immunofluorescence staining of a whole tissue section and digital image analysis respectively. Blue : DAPI ; Orange : CD3, T cell specific membrane protein ; Green : CD8, cytotoxic T cell membrane protein. Picture of CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells in lymphoid follicle (A) and mucosa (B) of mice infected by *pks*<sup>+</sup> *E. coli* strain 11G5, *pks*<sup>-</sup> *E. coli* strain 11G5ΔC1bQ, or control uninfected mice, were assessed. (C) Immunofluorescence stainings of tumor infiltrating CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells for control and 11G5 *pks*<sup>+</sup> *E. coli* infected mice. Data are representative from two independent experiments.

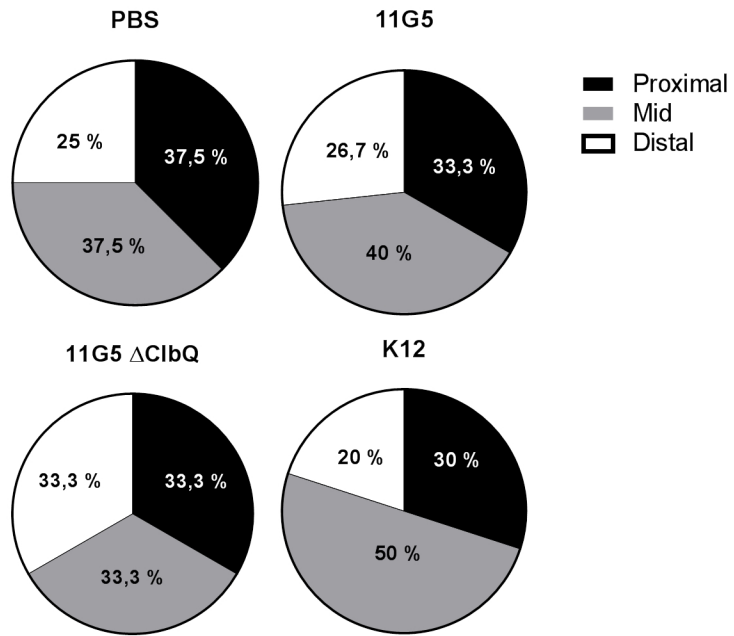
**Supplementary Figure S5. *Escherichia coli pks*<sup>+</sup> has no effect on colonic CD4<sup>+</sup> T cells populations.** CD4<sup>+</sup> T cells from control (PBS) and infected mice by *pks*<sup>+</sup> (11G5) or *pks*<sup>-</sup> (11G5ΔC1bQ) *E. coli* strain were observed and quantified at 50 days post-infection (p.i), using digital image analysis of stained whole colon. Blue : DAPI ; Orange : CD3, T cell specific membrane protein ; Green : CD4, helper T cell membrane protein. (A-F) CD4<sup>+</sup> T cells numbering in lymphoid follicle (A: quantitation , B : immunofluorescence staining (IF) picture), mucosa (C : quantitation , D : IF picture) and tumor (E : quantitation , F : IF picture). Data are representative from two independent experiments and are expressed as the mean ± SEM.

**Supplementary Figure S6. *Escherichia coli pks*<sup>+</sup> translocates to mesenteric lymph nodes (MLNs) with neither effect on total MLN cells nor on specific FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells.** MLNs from control uninfected mice (PBS), and mice infected with *pks*<sup>+</sup> (11G5) or *pks*<sup>-</sup> (ΔC1bQ) *E. coli* strain were analyzed at 50 days post-infection (p.i). (A) The quantitation of MLNs colonization by 11G5 and 11G5ΔC1bQ *E. coli* strain. (B) The numbering and viability rate of total cells in MLNs were assessed using an automated cell counter. (C) FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>

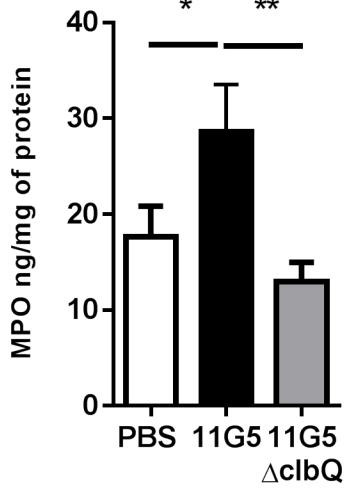
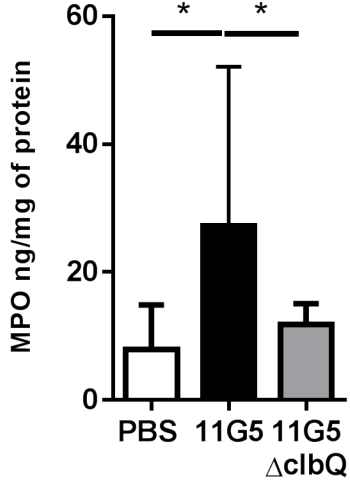
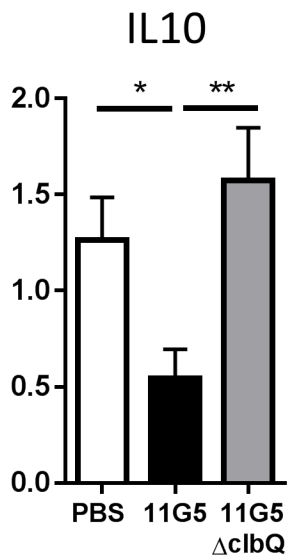
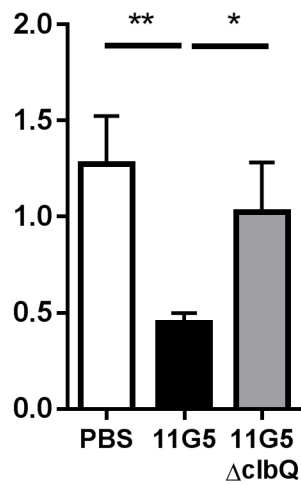
TCR- $\beta^+$  T cells percentages in CD4 $^+$  TCR- $\beta^+$  T cells were obtained by flow cytometry. (D) Significant correlation between FoxP3 $^+$ CD4 $^+$  TCR- $\beta^+$  T cells and MLNs colonization by 11G5. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n = from 6 to 8 mice per group). **\*\* $p < .01$** .

**Supplementary Figure S7. *pks* $^+$  *Escherichia coli* colonization in colorectal cancer (CRC) patients is not associated with a CD8 $^+$  tumor-infiltrating T cells (TILs) density variation.**

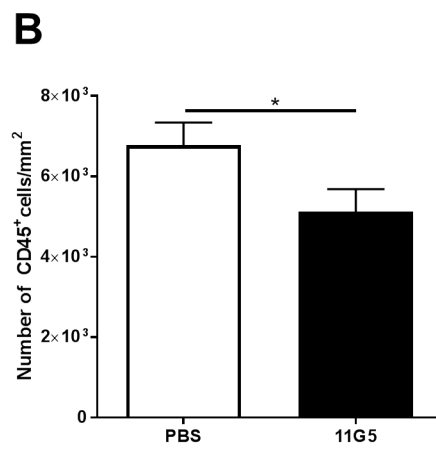
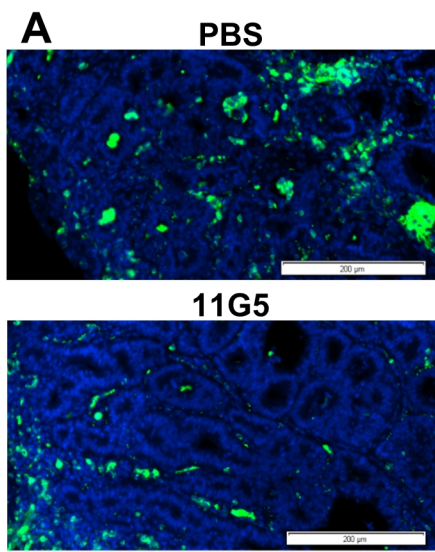
(A) Immunohistochemistry image of CD8 $^+$  TILs detection in CRC patients harboring *pks* $^+$  *E.coli* strains. (B) Densities of CD8 $^+$  TILs in tumor and at the invasive margin of patients colonized by *pks* $^+$  or *pks* $^-$  *E. coli*, were assessed by digital image analysis. (n = 40).



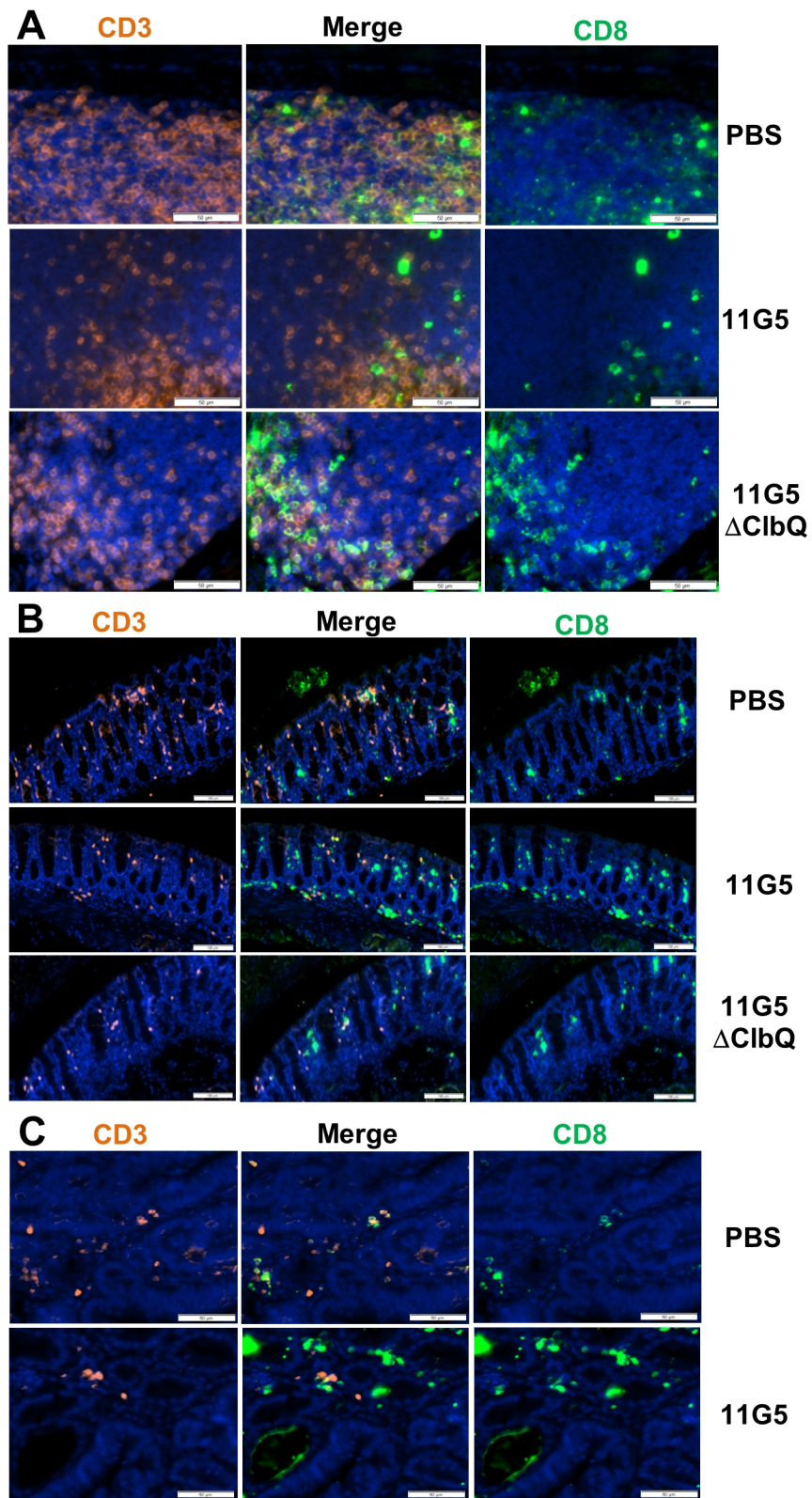
**Supplementary Figure 1.**

**A****B****C****TGF $\beta$** 

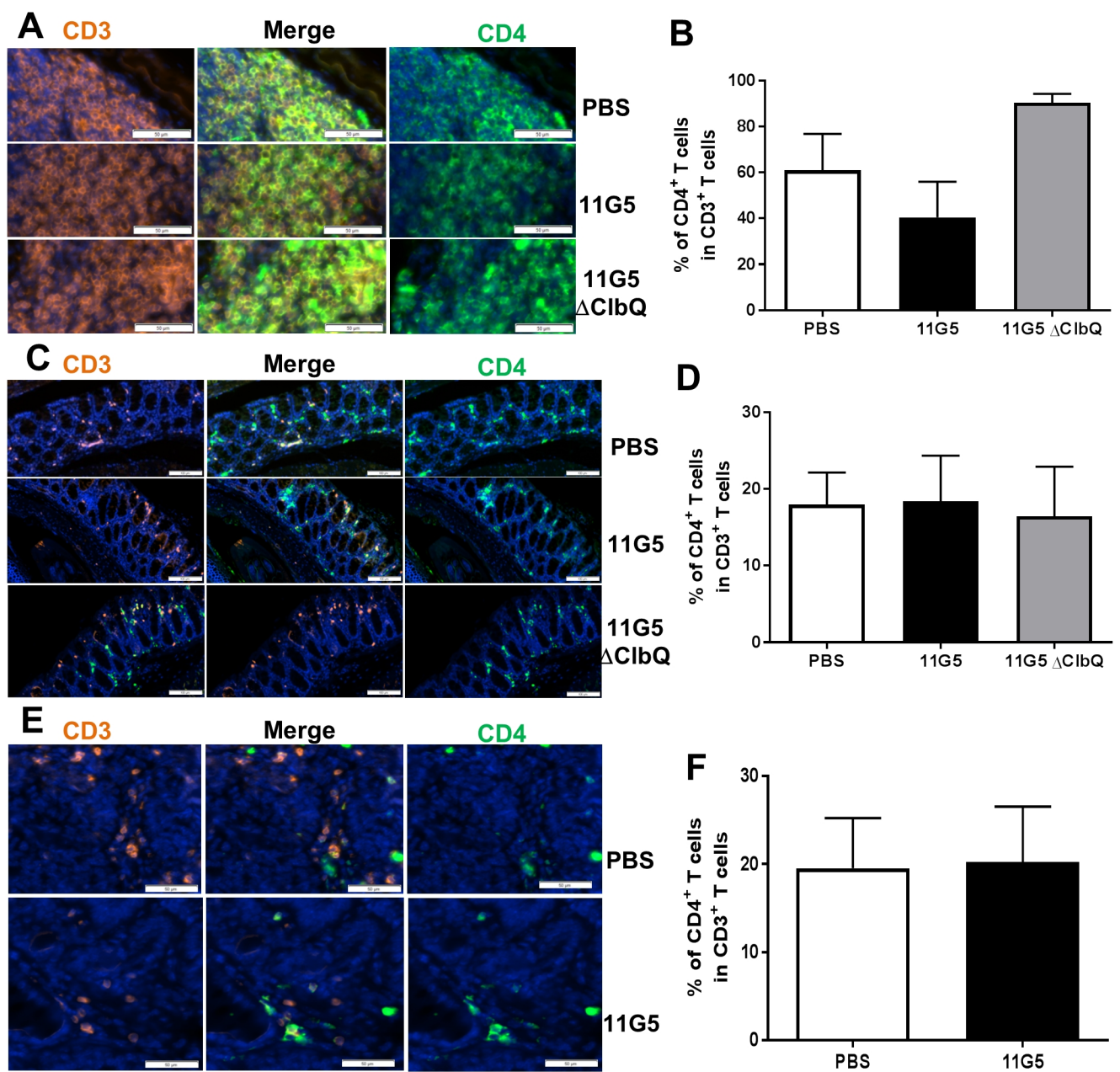




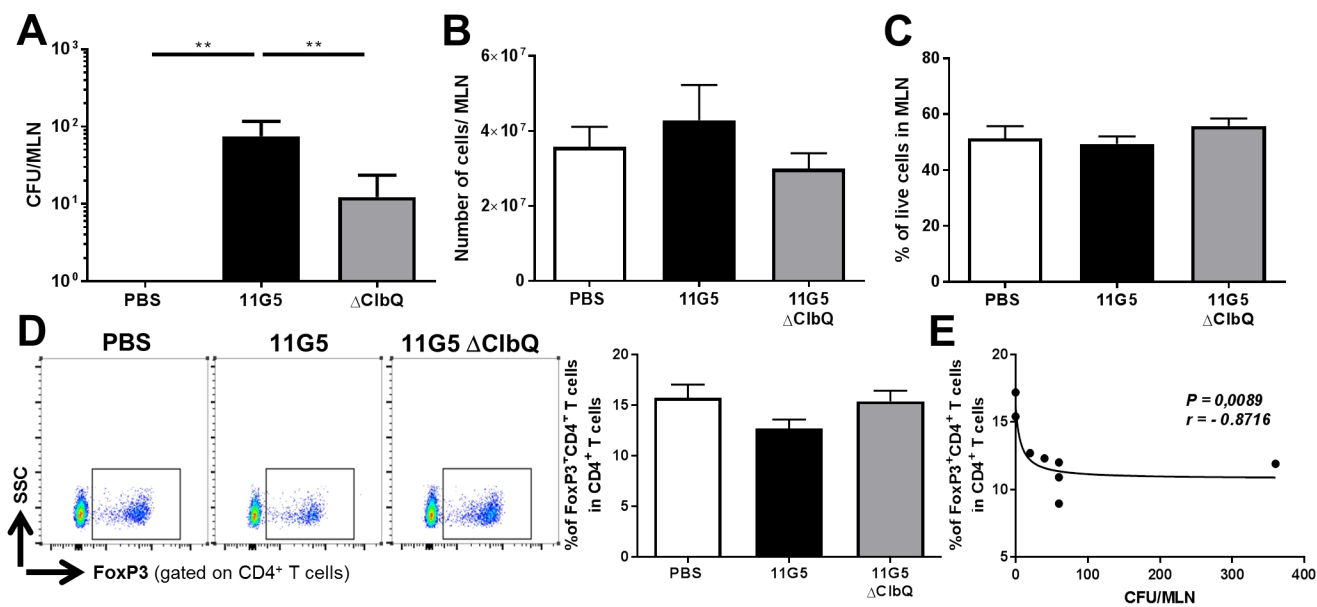
**Supplementary Figure 3.**



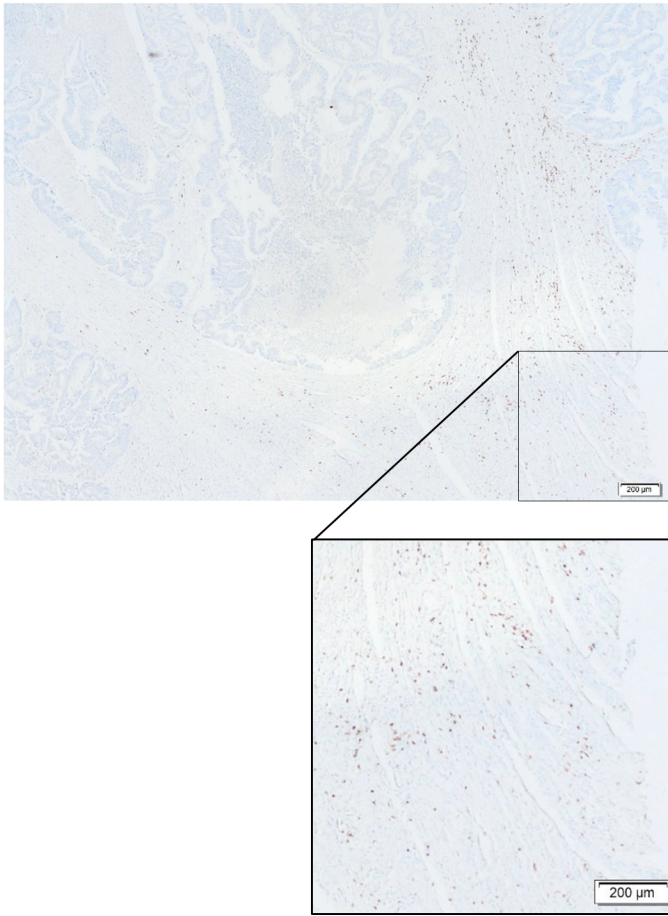
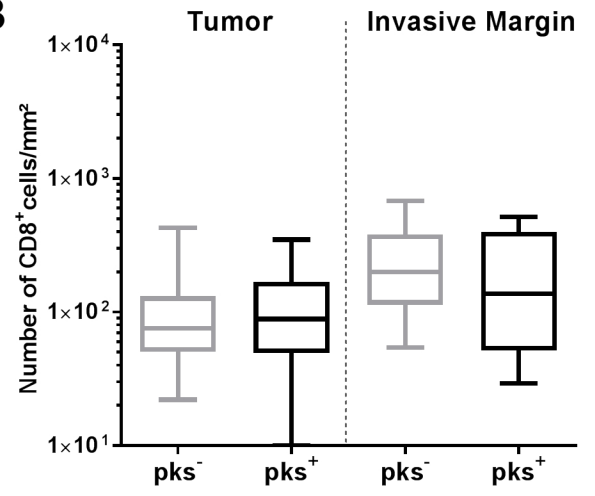
Supplementary Figure S4.



Supplementary Figure S5.

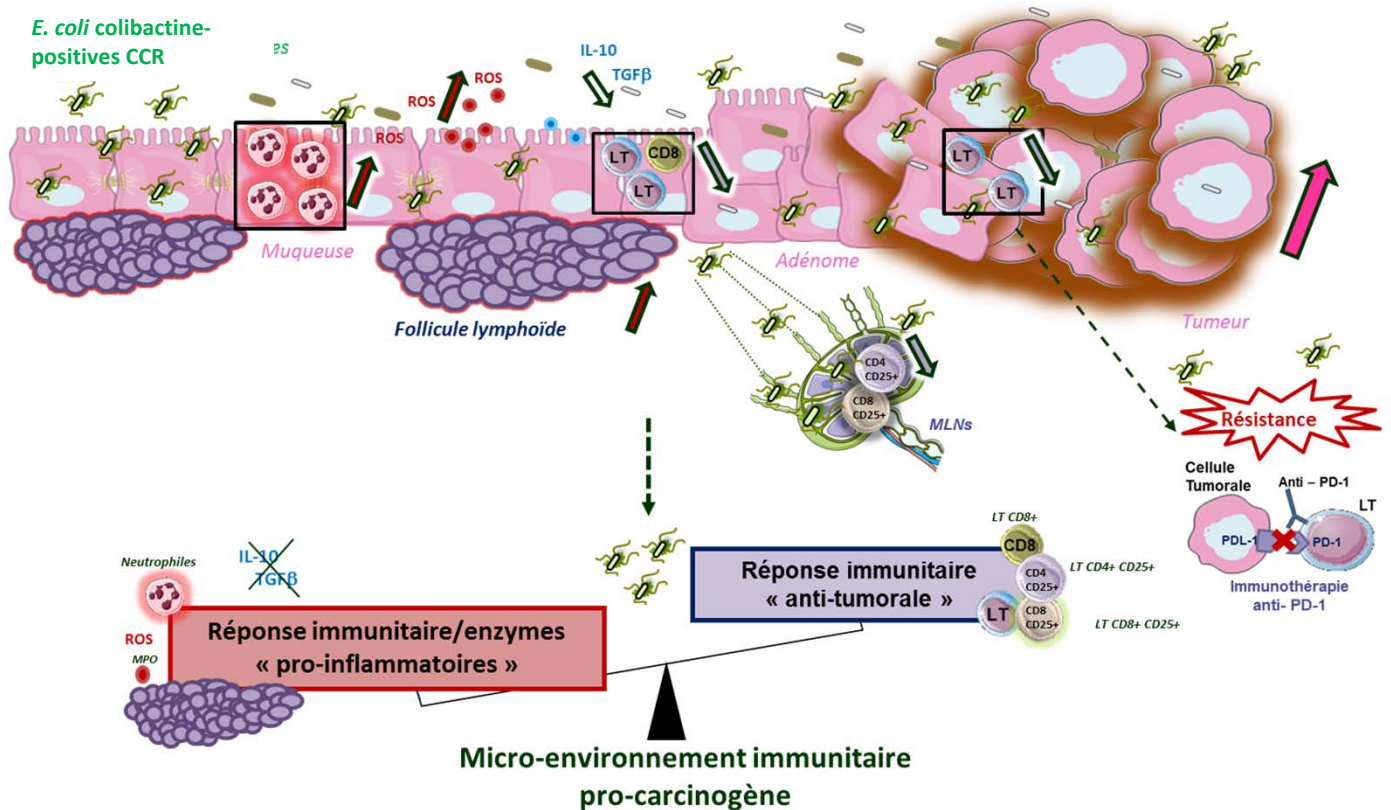


Supplementary Figure S6.

**A****B**

Supplementary Figure S7.





**Figure 34 : Schéma bilan de la modulation de l'environnement immunitaire et de l'efficacité de l'immunothérapie anti-PD-1 par *Escherichia coli* colibactine-positif.** Nous avons montré que les bactéries *E. coli* colibactine-positives induisent un environnement immunitaire pro-carcinogène dépendant de la colibactine. En effet d'une part, ces bactéries favorisent l'inflammation dans la muqueuse *via* le recrutement des neutrophiles et l'implication directe du stress oxydant (ROS : espèces réactives de l'oxygène et MPO : myéloperoxydase), l'augmentation de l'aire folliculaire et la diminution des cytokines anti-inflammatoires (IL-10 : Interleukine 10 et TGF-β : *Transforming Growth Factor* β). D'autre part, ces bactéries diminuent la réponse lymphocytaire T anti-tumorale dans la muqueuse et la tumeur (LT : lymphocyte T ; LT CD8<sup>+</sup> : Lymphocyte T cytotoxique) dans le modèle murin APC<sup>Min/+</sup> mais également dans les tumeurs de patients. Les bactéries *E. coli* colibactine-positives ont la capacité de transloquer dans les ganglions mésentériques (MLNs) et d'impacter là encore la réponse LT en diminuant les LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> potentiellement anti-tumoraux dans le modèle APC<sup>Min/+</sup>. Ainsi ce déséquilibre des réponses immunitaires régissant l'homéostasie colique peut être impliqué dans la carcinogénèse colique. Il a également été montré que ces bactéries induisent une résistance à l'immunothérapie anti-PD-1 pouvant être étroitement liée à leur pouvoir immunosuppresseur *via* la diminution des LT cytotoxiques dans la tumeur. En effet, ce traitement quand il fonctionne, permet de lever les inhibitions de la réponse immunitaire anti-tumorale, en majorité médiée par les LT, en inhibant la liaison du récepteur PD-1 des LT avec son ligand PDL-1 présent sur les cellules tumorales (ou myéloïdes). PD-1 : *Programmed cell death 1*; PDL-1 : *Programmed cell death ligand 1*.

## II.2- Commentaires

À travers ces travaux, nous confirmons l'effet pro-carcinogène de la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5 isolée d'un patient atteint de CCR dans un modèle murin de CCR de type CIN. Nous montrons également pour la première fois l'induction, dépendante de la colibactine, d'un micro-environnement immunitaire colique pro-tumoral *via* l'augmentation de la micro-inflammation, la diminution de la réponse anti-inflammatoire et de la réponse anti-tumorale des lymphocytes T. Enfin, nous démontrons que l'infection colique avec la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5 induit une résistance à une immunothérapie ciblant PD-1 (**Figure 34**).

Concernant la confirmation du pouvoir carcinogène de la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5 dans le modèle APC<sup>Min/+</sup> (**Article 2\_Figure 1**), nous montrons pour la première fois sur ce modèle murin représentatif du type tumoral CIN que cet effet est dépendant de la colibactine. Bien que le niveau de colonisation par les souches *E. coli* colibactine-positif (11G5) et *E. coli* colibactine-négative (11G5 $\Delta$ ClbQ) soit identique au niveau du tractus digestif, l'augmentation du développement tumoral n'est observée que chez les souris infectées par la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5 (**Article 2\_Figure 1.C et 1.D**). Ce résultat confirme les études précédentes effectuées sur d'autres modèles murins de CCR (xénogreffes, induction d'inflammation par voie chimique ou mutations génétiques).

Le développement tumoral est observé tout le long du côlon, alors que ces bactéries semblent préférentiellement localisées au niveau du caecum et dans la zone proximale du côlon (**Article 2\_Figure 1.E et S1**). Il s'agit des premières études de distribution *in vivo* de ce type de bactéries. Nos résultats suggèrent un effet carcinogène de la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5, à distance de son site de colonisation préférentiel. Pourtant, des études *in vitro* concernant les mécanismes d'action de la colibactine liés au pouvoir carcinogène de cette souche, et notamment sa capacité à générer des dommages de l'ADN, ont démontré que cet effet nécessitait le contact de la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5 avec les cellules épithéliales (Cuevas-Ramos et al., 2010; Nougayrède et al., 2006). Ces deux observations ne s'excluent pas l'une et l'autre, mais au contraire peuvent être complémentaires. En effet, il est possible que cet effet à distance soit une conséquence d'événements cellulaires ou sécrétoires après contact de cette souche avec les cellules épithéliales, au sein de la muqueuse colique. Un effet à distance a déjà été montré par le laboratoire M2iSH qui a mis en évidence *in vivo* que l'infection par la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5 induit la sénescence des cellules infectées, associée à





la sécrétion du facteur de croissance HGF capable de stimuler la prolifération des cellules environnantes (Cougoux et al., 2014). De même, dans notre travail, nous avons montré un effet de l'infection chronique sur certaines populations immunitaires tout le long de la muqueuse colique, suggérant là-aussi un effet « *bystander* » de l'infection bactérienne.

Nous avons mis en évidence que la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5 induit un micro-environnement immunitaire colique pro-carcinogène, un déséquilibre entre les réponses pro- et anti-inflammatoires en faveur d'une micro-inflammation, et ce, de manière dépendante de la colibactine. Plus précisément, nous avons observé une augmentation de l'inflammation intra-abdominale (**Article 2\_Figures 1.F, 1.G**), de l'aire folliculaire associée à la muqueuse (**Article 2\_Figures 2.A à 2.C**), de la proportion de neutrophiles au sein de la muqueuse (**Article 2\_Figure 3**) et de la concentration de l'enzyme pro-inflammatoire MPO (**Article 2\_ S2.A et S2.B**).

Les études *in vivo* décrivant l'impact des souches *E. coli* colibactine-positives sur le micro-environnement immunitaire ont jusqu'à présent montré que ces souches sont capables d'induire une inflammation colique, de façon indépendante de la colibactine (Arthur et al., 2012, 2014; Tomkovich et al., 2017). Il est important de souligner que ces études ont été réalisées dans des modèles murins de CCR associés à une colite, donc présentant déjà une réponse inflammatoire exacerbée avant l'infection bactérienne, contrairement à notre modèle (Arthur et al., 2012, 2014; Tomkovich et al., 2017). De plus, il est important de noter que l'inflammation que nous observons lors de notre étude est moins forte que celle décrite dans les modèles murins de colite induite. Enfin nos résultats suggèrent que le stress oxydant contribuerait à cette micro-inflammation induite par la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5, comme le témoigne l'augmentation de la MPO induite par cette souche, déjà connue comme un effet de la colibactine (Cuevas-Ramos et al., 2010; Nougayrède et al., 2006; Veziat et al., 2016). Les neutrophiles pourraient participer à établir ce micro-environnement pro-inflammatoire puisqu'ils sont augmentés dans la muqueuse colique spécifiquement après infection par la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5 dans notre étude, et qu'ils sont des producteurs de la MPO (Kjeldsen et al.; Klebanoff et al., 2013; Wieser et al., 2016). Cependant, la proportion de neutrophiles dans la muqueuse reste relativement faible, suggérant également que l'induction de stress oxydant dans le côlon après infection chronique par cette souche pourrait impliquer d'autres cellules, et notamment les cellules épithéliales.

L'augmentation du nombre de follicules associés à la muqueuse et de leur taille en contexte d'infection chronique par la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5 est décrite pour la



première fois. Il s'agit d'un événement localisé, qui ne peut pas être mis en évidence par une étude globale après dissociation tissulaire ne distinguant pas follicules lymphoïdes et muqueuse. La corrélation avec l'augmentation du volume tumoral chez les souris infectées suggère que cette exacerbation de l'aire folliculaire est en lien avec la carcinogenèse colique (**Article 2\_Figure 2.D**), comme il a été déjà décrit dans un modèle murin de CCR induit par une inflammation (AOM/DSS) (Bergomas et al., 2011). Dans cette étude, une augmentation de la micro-inflammation est positivement corrélée avec celle de l'aire folliculaire, ces deux phénomènes étant également associés à la croissance tumorale. Bien que les mécanismes reliant ces processus au CCR restent encore mal connus, nous pouvons suspecter qu'ils sont en lien avec l'installation d'une inflammation chronique. Cette induction pourrait être provoquée notamment par la sécrétion de cytokines spécifiques par les cellules épithéliales, comme il a été montré pour la formation des follicules lymphoïdes induite par l'infection à *H. pylori*. Dans les modèles d'infection par *H. pylori in vitro* et chez la souris, cet effet est dépendant de l'augmentation de la cytokine CXCL13 et de sa fixation sur son récepteur CXCR5 exprimé sur les cellules immunitaires et notamment les LT (Shomer et al., 2003; Winter et al., 2010). Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse dans notre modèle. De même, une interaction des *E. coli* colibactine-positives avec les myofibroblastes et/ou fibroblastes de la *lamina propria* pourrait contribuer à l'induction de ces follicules lymphoïdes, puisque ce type cellulaire est fortement impliqué dans la formation des aires folliculaires (Barone et al., 2016).

En parallèle de cet effet pro-inflammatoire de la souche *E. coli* colibactine-positive, il a été également observé, au niveau de la muqueuse colique proximale, une diminution de l'expression des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- $\beta$ , spécifiquement après infection par cette souche (**Article 2\_Figure S2.C**). Cet effet pourrait donc amplifier la mise en place du micro-environnement pro-inflammatoire dans la muqueuse, car les cytokines permettant de diminuer l'activation du système immunitaire sont ainsi moins présentes dans l'environnement colique (Becker et al.; Berg et al.; Erdman et al., 2005; Terzić et al., 2010; Yoshimura et al., 2010). De plus, il a été montré chez des modèles murins que ces cytokines peuvent diminuer la croissance tumorale dans le cas du CCR en diminuant l'inflammation, renforçant ainsi notre hypothèse (Becker et al.; Berg et al.; Erdman et al., 2005; Terzić et al., 2010).

En contexte d'infection chronique par la souche *E. coli* colibactine-positive 11G5, nous avons observé une diminution de la densité des leucocytes totaux dans la muqueuse et les tumeurs, induite spécifiquement par cette souche (**Article 2\_Figure 2.F, 2.G, S2.A et S3.B**). Ceci est concordant avec notre hypothèse d'une inflammation à bas bruit et suggère que cette



inflammation est dépendante non pas des leucocytes totaux mais de populations cellulaires précises, telles que les neutrophiles et les cellules épithéliales. Enfin, la répartition des leucocytes est différente après l'infection chronique par la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5, puisqu'en parallèle de la diminution de la densité des leucocytes dans la muqueuse, on observe une augmentation de l'aire folliculaire et donc une accumulation des leucocytes dans des sites localisés de la muqueuse. La diminution des leucocytes dans la muqueuse pourrait être liée à une altération de l'immunosurveillance. Il serait essentiel de caractériser l'activation cellulaire des leucocytes dans les follicules lymphoïdes et leur impact potentiel sur les cellules épithéliales environnantes.

En parallèle, nous avons mis en évidence une signature pro-tumorale du micro-environnement immunitaire induite par la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5 avec notamment la diminution de la densité de LT dans la muqueuse et les tumeurs coliques chez les souris APC<sup>Min</sup> (**Article 2\_Figure 4**). Cette observation a été confirmée sur les prélèvements de patients atteints de CCR (**Article 2\_Figure 6**). Les LT, et en particulier les LT CD8<sup>+</sup>, dont la proportion au sein de la population lymphocytaire T globale est diminuée par l'infection par la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5, sont largement décrits pour être des effecteurs clés de la réponse anti-tumorale, capables de reconnaître et détruire les cellules tumorales *in vivo* et *in vitro* via leurs fonctions cytotoxiques (Colangelo et al., 2017; Dunn et al., 2006; Gajewski et al., 2013; Koebel et al., 2007). Nos résultats suggèrent donc une diminution de l'immunosurveillance dans la muqueuse colique ainsi qu'une baisse de la réponse anti-tumorale dans la tumeur. Cet effet sur les LT est également observé dans les ganglions mésentériques (MLNs) qui drainent le côlon et constituent un des principaux lieux d'initiation des réponses lymphocytaires T contre des antigènes intestinaux. En effet, nous avons pu observer, chez les souris APC<sup>Min/+</sup> chroniquement infectées, que la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5 a la capacité de transloquer vers les MLNs de façon dépendante de la colibactine. En parallèle les proportions des LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> de ce compartiment sont diminuées après l'infection chronique (**Article 2\_Figure 5**). La proportion de ces cellules est inversement corrélée à la colonisation des MLNs par cette souche, suggérant que le pouvoir immunomodulateur de la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5 pourrait être directement lié à sa translocation dans cet organe. Bien que d'autres études complémentaires soient nécessaires pour élucider le rôle de ces LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> dans la carcinogenèse induite par *E. coli*, des données de la littérature suggèrent qu'ils pourraient avoir un rôle de cellules régulatrices. En particulier, il a été mis en évidence dans des tissus de patients CCR que les LT



CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> font partie de la famille des LT régulateurs et ont un profil anti-inflammatoire (Chaput et al., 2009). Plus intéressant encore, le transfert adoptif de LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, apparentés eux aussi aux LT régulateurs, induisent une régression du développement tumoral dans le modèle APC<sup>Min/+</sup>, par la sécrétion d'IL-10 qui diminue l'inflammation impliquée dans la carcinogenèse (Erdman et al., 2005). Ceci montre que, bien que les LT régulateurs soient surtout connus pour leur rôle pro-tumoral lorsqu'ils infiltrent les tumeurs, ils auraient aussi un rôle anti-tumoral dans le CCR s'ils sont présents dans la muqueuse. Ainsi, la diminution de ces populations dans les MLNs pourrait être répercutée au niveau du côlon, avec un effet potentiellement pro-tumoral. Cette hypothèse est appuyée par la diminution d'IL-10 que nous observons au niveau du côlon.

Notre étude est principalement descriptive, et il serait nécessaire de vérifier que la diminution de la densité des LT dans la muqueuse colique s'accompagne bien d'une perte de l'activité anti-tumorale. Néanmoins, la mise en évidence dans notre étude de la résistance au traitement anti-PD-1, suggère que la population de LT affectée après infection par la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5, participe à la réponse anti-tumorale. En effet, l'efficacité des stratégies thérapeutiques anti-PD-1 reposent sur la restauration de l'activité anti-tumorale des lymphocytes en présence de l'anticorps anti-PD-1 (Sharpe and Pauken, 2018). L'absence de cette réponse dans les souris infectées par la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5 pourrait donc s'expliquer par une perte des LT anti-tumoraux chez ces souris.

Aucune étude n'avait observé cet effet spécifique des souches *E. coli* colibactine-positives sur les LT. Toutefois, lors de notre étude nous utilisons une méthode de quantification des cellules immunitaires sur une section de côlon entière qui nous permet de distinguer les variations dans la muqueuse et dans les follicules lymphoïdes. Au vu de l'importante densité de cellules immunitaires dans les follicules lymphoïdes, d'autres techniques d'analyse ne permettant pas cette distinction ne seraient peut-être pas capables de détecter les variations des LT au sein de la muqueuse colique. De plus, toutes les études analysant l'effet des souches *E. coli* colibactine-positives sur les LT en lien avec le CCR, ont été réalisées dans des modèles de colite induite (AOM/DSS ou souris IL-10 KO). Cette inflammation peut moduler à la fois le micro-environnement bactérien (Richard et al., 2018b) mais aussi la réponse immunitaire et notamment la réponse lymphocytaire T (Shintani et al., 1997; Takizawa et al., 1995). Au contraire, notre étude est réalisée sur le modèle murin APC<sup>Min/+</sup> ne présentant pas d'altération importante du système immunitaire colique par rapport aux souris sauvages (Coletta et al.,



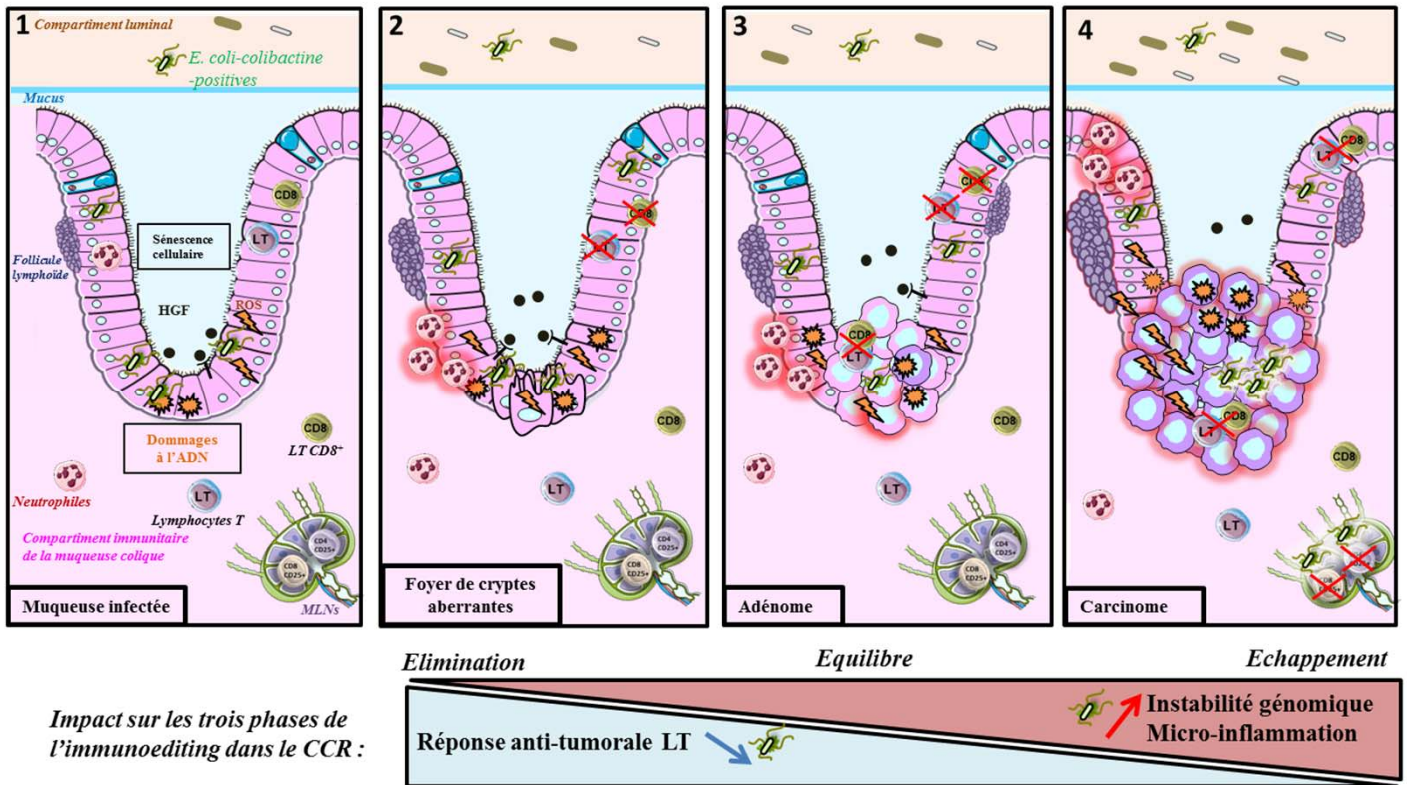


2003; Kettunen et al., 2003), ce qui pourrait favoriser la mise en évidence de la modulation des populations lymphocytaires T par la souche *E. coli* colibactine-positive 11G5.

La diminution de la densité des LT totaux associée à la présence de bactéries *E. coli* colibactine-positives, observée dans notre étude à la fois dans le modèle murin APC<sup>Min/+</sup> et dans la zone marginale des tumeurs des patients atteints de CCR, renforce l'hypothèse du laboratoire M2iSH que ces bactéries pourraient être un facteur de mauvais pronostic. Les données publiées par le laboratoire montrant que les souches *E. coli* colibactine-positives sont préférentiellement détectées dans les stades avancés du CCR (Bonnet et al., 2014) et chez les patients porteurs de tumeurs de phénotype MSS, de mauvais pronostic (Gagnière et al., 2017). De plus, il a été montré qu'une faible densité de LT infiltrant les tumeurs (TILs) est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de CCR (Galon et al., 2012; Mlecnik et al., 2016; Pagès et al., 2005, 2018; Tosolini et al., 2011). Bien qu'il ne s'agisse que de mise en relation d'études indépendantes, ces études suggèrent une possible association entre le pronostic des patients atteints de CCR et ces trois facteurs : le phénotype tumoral, l'infiltrat lymphocytaire T dans la tumeur et la colonisation par des souches *E. coli* colibactine-positives.

D'autres part, la présence de bactéries *E. coli* colibactine-positives dans la muqueuse des patients pourrait être un marqueur de non-réponse aux immunothérapies anti-PD-1. En effet, nous avons pu démontrer que l'infection par la souche *E. coli* colibactine-positive 11G5 induit une résistance à cette thérapie. Ce résultat pourrait être expliqué par la diminution de densité des LT induite par la souche *E. coli* colibactine-positive 11G5. Des études fonctionnelles sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Une modulation de l'efficacité des anticorps anti-PD-1 par d'autres composants du microbiote a déjà été montrée dans d'autres cancers, *via* notamment une modulation des LT (Gopalakrishnan et al., 2018; Matson et al., 2018; Routy et al., 2018b; Sivan et al., 2015; Vetizou et al., 2015a), ce qui renforce notre hypothèse. Il est important de souligner qu'une de ces études montre que l'espèce *E. coli* est plus abondante dans les fèces de patients atteints de mélanome non répondeurs à un anticorps thérapeutique anti-PD-1 comparativement aux patients répondeurs (Gopalakrishnan et al., 2018).

En conclusion, ces travaux ont mis en évidence que l'infection chronique par des bactéries *E. coli* colibactine-positives pouvait favoriser un micro-environnement pro-carcinogène en augmentant les processus pro-inflammatoires, ainsi qu'en diminuant la réponse anti-inflammatoire et la réponse anti-tumorale des lymphocytes T. Ces trois mécanismes pourraient jouer un rôle promoteur dans le CCR et favoriser une boucle d'amplification de la



**Figure 35 : Hypothèse quant à l'implication des bactéries *Escherichia coli* colibactine-positives dans la carcinogénèse colique en lien avec le micro-environnement immunitaire pro-tumoral qu'elles induisent.** 1. Une infection chronique d'une muqueuse colique susceptible à la carcinogénèse colorectale CCR, par les bactéries *E. coli* colibactine-positives induirait des modifications de l'épithélium via la génération de dommages à l'ADN, et la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) (éclairs oranges) par les cellules infectées. Ces cellules infectées peuvent également entrer en sénescence et produire des facteurs de croissance tels que l'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) pouvant stimuler la prolifération anarchique des cellules voisines. 2. Ces effets pro-carcinogènes des souches *E. coli* colibactine-positives sur les cellules épithéliales pourraient entraîner la formation de foyers de cryptes aberrantes, accompagnée du recrutement de neutrophiles pro-inflammatoires. Ces cellules anormales pourraient ne pas être éliminées par le processus d'immunosurveillance, impliquant notamment les lymphocytes T (LT et LT CD8<sup>+</sup>) dans la destruction de ces cellules (phase d'élimination de l'interaction entre les tumeurs et le système immunitaire, décrit par les 3E), car les bactéries *E. coli* colibactine-positives pourraient diminuer le nombre de LT présents dans la muqueuse. 3. La persistance de ces souches dans la muqueuse colique entraînerait une boucle d'amplification de la carcinogénèse colique par leurs effets sur les cellules épithéliales et le micro-environnement, pouvant aboutir à la formation d'un adénome. De plus, l'instabilité génomique que pourraient induire les bactéries *E. coli* colibactine-positives sur les cellules épithéliales, et la micro-inflammation potentiellement augmentée par ces souches via la production de ROS par les neutrophiles et les cellules épithéliales, accompagnée d'une croissance de l'aire folliculaire colique, pourraient favoriser la génération de clones tumoraux (cellule tumorale violette) (phase d'équilibre des 3E) pouvant échapper au système immunitaire. 4. Ces processus pourraient conduire à l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire, conduisant à la formation d'un carcinome. De plus, le maintien des effets des souches *E. coli* colibactine-positives sur les cellules épithéliales et les LT, à ce temps tardif de la carcinogénèse, amplifierait cet échappement tumoral via l'augmentation significative de la micro-inflammation et la diminution de la réponse anti-tumorale LT au sein des tumeurs. Ainsi, ces bactéries en agissant à la fois sur les cellules épithéliales en favorisant leur transformation maligne, mais également sur le micro-environnement pour amplifier cette transformation et inhiber leur destruction par les LT, pourraient entraîner une accélération de la carcinogénèse mais également le passage à la phase d'échappement tumoral de ces tumeurs. L'implication d'autres composants du microbiote et d'autres composants du micro-environnement (métabolites, autres cellules...) est envisageable dans ces mécanismes.

carcinogénèse induite par ces *E. coli* colibactine-positives. Au vu à la fois de nos résultats, des caractéristiques carcinogènes de ces souches ainsi que du principe d'immunoédition (3E) appliqué au CCR décrivant les interactions du système immunitaire avec les cellules tumorales coliques (Élimination-Équilibre-Échappement) (Fletcher et al., 2018), nous pouvons proposer certaines hypothèses mécanistiques concernant les étapes de la carcinogénèse où ces modulations du micro-environnement immunitaire induites par ces souches pourraient intervenir (**Figure 35**). En effet, les bactéries *E. coli* colibactine-positives étant identifiées dans 58 % des adénomes c'est-à-dire à une étape précoce de la carcinogénèse colique, nous pouvons supposer qu'elles auraient un rôle aux étapes précoces de la tumorigénèse *via* leurs effets sur les cellules épithéliales coliques rapportés dans la littérature (induction de dommages à l'ADN, de ROS, profil de sénescence sécrétoire, diminution de la protéine MLH1). Ces processus conduiraient à la formation de foyers de cryptes aberrantes dans la muqueuse colique et pourraient ensuite induire une micro-inflammation à bas bruit *via* le recrutement de neutrophiles qui sont les premières cellules immunitaires mobilisées lors de la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale et/ou anti-bactérienne. Cette micro-inflammation pourrait amplifier la formation de ces foyers tumoraux qui ne seraient pas correctement éliminés par le processus d'immunosurveillance médié par les LT (réponse anti-tumorale basale dans la muqueuse, essentielle pour la phase d'élimination) car celui-ci serait altéré en parallèle par les souches *E. coli* colibactine-positives, favorisant la croissance tumorale. L'effet persistant de ces souches à la fois sur les cellules épithéliales (instabilité génomique, production de ROS) et sur le micro-environnement immunitaire (micro-inflammation, diminution de l'immunosurveillance) lors de l'infection chronique pourrait participer à la formation d'adénomes précoces (phase d'équilibre ; (Fletcher et al., 2018)). Ces phénomènes, toujours accompagnés par l'altération de la réponse des LT, favoriseraient alors l'échappement tumoral, et donc l'évolution vers un stade plus tardif dans la carcinogénèse, comme le suggèrent la diminution de la réponse anti-tumorale LT dans les tumeurs et la non-réponse à l'immunothérapie anti-PD-1 induite par les souches *E. coli* colibactine-positives qui témoigne de la forte suppression de cette réponse.



# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---



Ces travaux nous ont permis de confirmer et préciser l'effet pro-carcinogène des bactéries *E. coli* colibactine-positives dans le CCR, notamment en induisant un environnement immunitaire pro-tumoral dans le côlon. Cette étude a notamment pu être développée grâce à la mise en place d'une technique de quantification des populations cellulaires identifiées par immunomarquage, sur la totalité du colon tout en distinguant certaines structures particulières (tumeur, muqueuse colique et follicules lymphoïdes). Nous avons aussi montré que l'infection chronique de souris par des bactéries *E. coli* colibactine-positives induit une résistance à une immunothérapie ciblant le *checkpoint* immunologique PD-1. Ces résultats appellent de nouvelles études dont les objectifs sont détaillés ci-dessous. .

## **I- Mécanismes impliqués dans la modulation des cellules immunitaires par les *Escherichia coli* colibactine-positives en contexte d'infection chronique du côlon, et impact sur la carcinogène**

### **I.1-Etude des modulations à des stades plus précoces de l'infection**

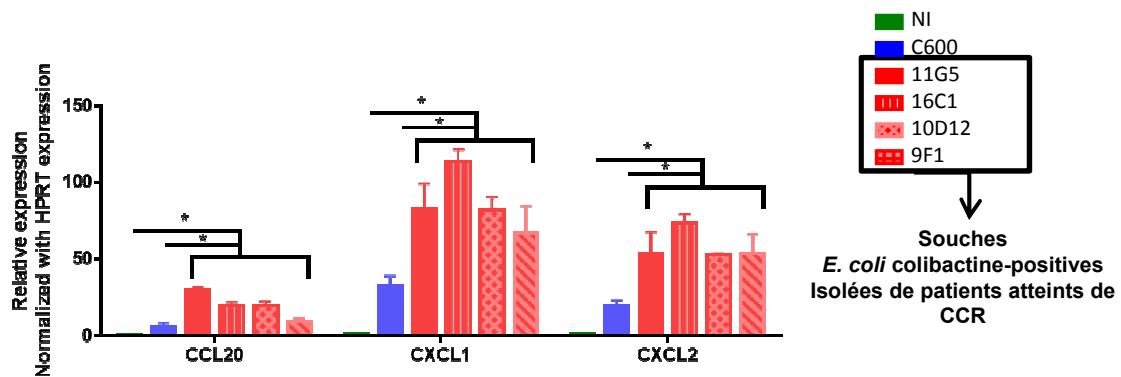
Dans cette étude, les effets de l'infection chronique ont été étudiés à un stade tardif de la carcinogène c'est-à-dire 51 jours post-infection. Nous avons montré que les modulations induites par l'infection chronique sont réparties tout le long du côlon alors que les bactéries *E. coli* colibactine-positives luminescentes se concentrent, 24 heures après l'infection, préférentiellement au niveau du caecum et dans la zone proximale du colon. Ceci suggère que l'infection pourrait conduire à une cascade d'évènements cellulaires et moléculaires mettant en jeu des effets à distance et notamment des modulations des cellules immunitaires. Même si nous proposons des hypothèses mécanistiques (**Figure 35**), il est pour l'instant difficile de déterminer exactement la cinétique de ces événements au cours des différentes étapes de la carcinogène. Lors de notre étude, des modulations du microenvironnement ont été observées à la fois au niveau des tumeurs coliques mais aussi au niveau de la muqueuse. Ces variations observées dans la muqueuse pourraient être représentatives des mécanismes induits lors des premières étapes de la carcinogène. À l'heure actuelle, la plupart des études sur modèles murins ont été effectuées à des stades tardifs de la carcinogène. Des mécanismes précoces de régulation de certaines cellules immunitaires et de sécrétion de cytokines pourraient ne pas perdurer dans le temps et ainsi être non détectables aux temps tardifs de la carcinogène II





paraît donc indispensable de poursuivre notre travail sur le modèle APC<sup>Min/+</sup> en réalisant une étude cinétique à différents temps après l'infection. Dejea et al, dans leur travail ont montré une induction de la réponse immunitaire T (Th17) 60 heures après co-infection par *E. coli* colibactine-positives et *B. fragilis* EBFT-positives dans la muqueuse de souris traitées à l'AOM (Dejea et al., 2018). Ainsi un temps de 72 heures après infection avec la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5 sera étudié en comparaison avec le mutant *E. coli* colibactine-négatif 11G5 $\Delta$ C1bQ et une souche commensale comme contrôles. Un temps de 2 semaines sera également étudié pour déterminer les modulations à un stade intermédiaire de l'exposition chronique. Dans tous les cas, la méthode de quantification décrite dans l'article 1 sera un outil déterminant, car elle permettra de quantifier et discriminer des populations immunitaires dans des zones de petites tailles, favorisant ainsi l'analyse des régions néoplasiques et/ou des follicules lymphoïdes, quelle que soit leur taille. Les mêmes populations immunitaires que celles ciblées dans le contexte d'infection chronique du modèle APC<sup>Min/+</sup>, décrites dans cette thèse, seront étudiées (leucocytes, neutrophiles, lymphocytes T totaux, LT CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>). De plus, des prélèvements coliques proximaux où se concentre la bactérie, seront réalisés et des dosages d'enzymes pro-inflammatoires comme la MPO mais aussi de cytokines (IL-10, TGF- $\beta$ , IL-8, INF- $\gamma$ , IL-2, CXCL-2) seront effectués par ELISA afin de déterminer si une micro-inflammation localisée est induite dans cette zone d'implantation des bactéries. La détection de ces cytokines, sur les lames de côlon des souris APC<sup>Min/+</sup> pourront aussi être envisagées pour cibler ces cytokines et permettre de les localiser finement dans le côlon.

À l'heure actuelle, nous n'avons pas localisé les bactéries au niveau cellulaire dans nos modèles animaux, ni chez les patients. Une première étude de FISH sur des prélèvements de patients CCR avait localisé des *E. coli* adhérentes dans la muqueuse (Swidsinski et al., 1998). Récemment, Dejea et al ont mis en évidence par FISH des bactéries *E. coli* au niveau des adénomes chez des patients atteints de FAP (Dejea et al., 2018). Nous envisageons de déterminer par des techniques de FISH, la localisation des bactéries *E. coli* colibactine-positives sur les sections de côlon et de MLNs des souris APC<sup>Min/+</sup> de nos études. Associés au FISH, des co-marquages avec des marqueurs spécifiques des cellules T, macrophages, cellules dendritiques ou des cellules épithéliales seront effectués pour localiser précisément les bactéries dans le tissu et déterminer la nature des cellules infectées lors de la cinétique.



**Figure 36 : Induction de chimiokines par les souches *E. coli* colibactine-positives *in vitro*.** Quantification de l'expression relative (par rapport au gène de ménage GAPDH) des chimiokines CCL20, CXCL-1 et CXCL-2 par qRT-PCR, sur des cellules coliques non infectées T84 (colonne verte : NI) ; ou après 3 heures d'infection (MOI =100) par différentes souches *E. coli* colibactine-positives isolées de patients atteints de CCR (colonne rouge : 11G5, 16C1, 10D12, 9F1) ou par une souche commensale *E. coli* colibactine-négative (Colonne bleue : C600). \*  $P < 0,05$

## I.2- Implication des cellules épithéliales coliques dans la modulation du micro-environnement immunitaire et de la carcinogène

Différents travaux décrivent que les cellules épithéliales pourraient jouer un rôle important dans les mécanismes pro-carcinogènes induits par les bactéries *via* l'induction de stress oxydant, d'interactions avec les cellules immunitaires et l'induction de dommages de l'ADN et de la sénescence (Bossuet-Greif et al., 2018; Cougnoux et al., 2014; Cuevas-Ramos et al., 2010; Dalmaso et al., 2014; Nougayrède et al., 2006). La sénescence des cellules épithéliales coliques induites par l'infection pourrait également jouer un rôle sur la modulation de certaines cellules immunitaires comme les LT *via* l'induction de MDSCs (Burton and Stolzing, 2018; Mitri et al., 2014). Ainsi, il serait intéressant de confirmer si ces processus sont également engagés en contexte d'infection chronique du modèle murin APC<sup>Min/+</sup> par les *E. coli* colibactine-positives notamment à des temps précoces après l'infection. Pour se faire des immunomarquages ciblant l'indicateur de dommage à l'ADN,  $\gamma$ -H2AX, et des colorations de la  $\beta$ -galactosidase caractéristique de la sénescence cellulaire pourront être réalisées sur les sections de côlon de ces souris.

Lors de notre étude, bien que la production de la MPO et des ROS puisse être associée à l'augmentation des neutrophiles, la faible proportion de ces cellules immunitaires dans la muqueuse suggère que les neutrophiles ne sont pas les seuls acteurs impliqués dans l'induction du stress oxydant. L'induction du stress oxydant par les cellules épithéliales infectées par la souche 11G5 a déjà été démontrée (Gagnière et al. 2017). Pour vérifier cette hypothèse *in vivo*, un co-marquage de la MPO et de la cytokératine 20 pourra être réalisé pour permettre l'identification et la quantification de cellules épithéliales impliquées dans l'inflammation.

De plus, la sécrétion par les cellules épithéliales de chimiokines impliquées dans le CCR pourrait être étudiée. Nous avons observé, dans une expérience préliminaire avec la lignée cellulaire T84, l'augmentation de l'expression des transcrits codant les chimiokines CCL20, CXCL-1 et CXCL-2 après 3 heures d'infection par différentes souches *E. coli* colibactine-positives (**Figure 36**). En plus de leur rôle connu dans le recrutement des LT, des neutrophiles ou des cellules myéloïdes suppressives (MDSCs), CXCL-1 et CCL20 sont augmentées chez les patients CCR et favorisent l'angiogenèse, la prolifération et/ou la migration cellulaires *in vitro* et dans des modèles murins associés au CCR (Frick et al., 2016; Itatani et al., 2016; Wang et al., 2006, 2017a; Yu et al., 2018; Zhuo et al., 2018). Ceci renforce donc l'hypothèse de l'implication des cellules épithéliales dans le CCR induit par les souches *E. coli* colibactine-



positives *via* la sécrétion de ces chimiokines. Il est donc nécessaire de vérifier si ces chimiokines sont également augmentées dans les côlons des souris APC<sup>Min/+</sup> infectées chroniquement, par dosage ELISA, qRT-PCR mais également par immunomarquages en ciblant ces chimiokines et les cellules épithéliales (Cytokératine 20). Il est également possible que cette chimiokine soit augmentée à des temps plus précoces, d'où l'importance d'analyser l'expression des chimiokines lors des études de cinétiques décrites précédemment.

### I.3-Mécanismes impliqués dans la modulation des cellules LT

Étant donné le rôle clé des lymphocytes T à la fois dans les étapes précoces (immunosurveillance) et tardives (réponse anti-tumorale) de la carcinogenèse colique, il est essentiel de préciser à quelles étapes de la carcinogenèse les lymphocytes T sont régulés par l'infection, mais aussi d'identifier les mécanismes qui conduisent la diminution de leur densité.

#### I.3.a) Implication de l'augmentation des cellules myéloïdes induites par les cellules épithéliales coliques sénescents

Il a récemment été montré qu'une accumulation de cellules sénescents dans les tumeurs (prostate, peau) pourrait favoriser la mise en place d'un environnement immunosuppresseur. Plus précisément, les cellules sénescents induiraient un recrutement massif de cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) qui entraîneraient l'inhibition de la réponse lymphocytaire T anti-tumorale (Burton and Stolzing, 2018; Mitri et al., 2014). Les bactéries *E. coli* colibactine-positives étant responsables de l'induction de la sénescence des cellules épithéliales (Cougnoux et al., 2014; Dalmasso et al., 2014), l'implication de ce mécanisme dans la diminution de la densité des LT induite par l'infection serait une piste intéressante. Une autre étude impliquant *B. fragilis* dans une immunomodulation en lien avec le CCR a également mis en évidence le rôle immunosuppresseur des MDSCs sur la réponse LT anti-tumorale par la production de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) (Thiele Orberg et al., 2017a). Pour vérifier ces hypothèses, des immunomarquages par IHC permettant de détecter les cellules myéloïdes suppressives (cellules CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup>) et iNOS seront effectués sur les échantillons de côlon de souris APC<sup>Min/+</sup> aux différents temps d'infection. Les résultats seront corrélés aux données de sénescence obtenues (cf ci-dessus).



Si une augmentation des MDSCs est observée et est associée à une augmentation des cellules sénescents, le recrutement de ces MDSCs par la sénescence cellulaire pourra être exploré, dans le modèle de cellules coliques murines MC-38. Ces cellules pourront être infectées *in vitro* par les bactéries *E. coli* colibactine-positives puis une fois la sénescence induite, elles seront injectées en sous-cutanée à des souris C57BL/6. A un temps précoce de 72H, et à un temps tardif (3 semaines), les souris seront mises à mort et les cellules myéloïdes (CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>) de l'infiltrat tumoral seront alors quantifiées par cytométrie de flux. L'expression de iNOS par ces cellules sera également analysée. Nous pourrions alors vérifier le pouvoir immunosuppresseur des MDSCs isolées des tumeurs de ce modèle murin, par leur co-culture avec des LT CD8<sup>+</sup> activés préalablement et marqués au CFSE pour suivre leur prolifération. Pour cette expérience, l'utilisation de LT de souris transgéniques OT-I, porteurs d'un récepteur T (TCR) transgénique capable de reconnaître spécifiquement le peptide 257-264 de l'ovalbumine, serait adaptée puisque leur activation est facile *in vitro* en ajoutant ce peptide dans le milieu de culture.

### I.3.b) Impact direct des bactéries *E. coli* colibactine-positives sur la réponse LT

Il n'est pas exclu que les *E. coli* colibactine-positives puissent directement induire une diminution des LT par un mécanisme qu'il faut identifier, et ainsi participer à la baisse de l'immunosurveillance anti-tumorale. Les mécanismes potentiellement impliqués dans la modulation des LT par une infection directe de ces cellules par les *E. coli* colibactine-positives pourraient être liés au pouvoir génotoxique de ces souches. En effet, il a été montré que ces bactéries pouvaient induire des dommages de l'ADN puis l'apoptose des LT (Marcq et al., 2014). De plus, il est connu que la sénescence de cette population cellulaire peut conduire à des dysfonctionnements du système immunitaire (Burton and Stolzing, 2018).

Si lors des expériences de FISH, les bactéries *E. coli* colibactine-positives sont observées dans les LT ou à proximité immédiate de ces cellules, des expérimentations *in vitro* pourront être initiées afin de mieux comprendre les conséquences de cette interaction. Par exemple, une infection directe de LT CD3<sup>+</sup> et/ou de LT CD8<sup>+</sup> (lignées cellulaires et/ou cellules primaires de souris) avec les souches *E. coli* colibactine-positives pourra être réalisée. L'induction de dommages à l'ADN et de sénescence cellulaire par les souches *E. coli* colibactine-positives, directement sur les LT pourra être étudiée par coloration de la β-

**Table 2 : Liste des genres et espèces microbiens à cibler pour l'étude d'une dysbiose associée à l'infection chronique par *E. coli* colibactine-positifs.** Les espèces et genre listées sont capables de moduler le micro-environnement immunitaire colique ou certaines cellules immunitaires. Case violette : étude chez l'homme ; Case blanche : étude dans modèle murin ; Case kaki : étude *in vitro*. TAMs : Tumor-Associated-Macrophages

Implication	Espèce/ Genre bactérien à cibler	Effets rapportés	Références
Modulation de l'environnement immunitaire	<i>Treponema</i> <i>Desulfovibrio</i>	Associés à un infiltrat fort de LT dans les tumeurs CCR	Cremonesi et al, 2018
	<i>Prevotella</i> <i>Bacteroides</i> <i>Fretibacterium</i>	Associés à un infiltrat faible de LT dans les tumeurs CCR	
	<i>Clostridium</i>	Maturation LT Induction de la réponse Th17 Organisation et maturation des structures lymphoïdes	
	<i>Bacteroides fragilis</i>	Induction de la réponse Th17 Induction réponse Th17 quand association avec <i>E. coli</i> -colibactine- <i>positive</i> Induction de MDSCs Inhibition de la réponse LT CD8+	Wu et al, 2009 / Thiele-Oberg et al, 2017 Dejea et al, 2018 Thiele-Oberg et al, 2017 Thiele-Oberg et al, 2017
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Induction de MDSCs Induction de Neutrophiles Induction de Macrophages M2 Induction de TAMs Inhibition de la réponse LT CD8+ Associé à faible infiltrat LT CD3+ dans les tumeurs CCR	Kostic et al, 2013 Mima et al, 2015
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Augmentation de l'activité des neutrophiles	Clarke et al, 2010
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Induction d'une inflammation	Garrett et al, 2010 Garrett et al, 2010
	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Propriétés anti-inflammatoire	Sokol et al, 2008



galactosidase et par le marquage intranucléaire de  $\gamma$ -H2AX. Des tests de prolifération (suivie grâce à un marquage préalable au CFSE) et de sécrétion de cytokines (dosage de l'IFN- $\gamma$  sécrété, marquage de l'IFN- $\gamma$  intracellulaire) seront aussi effectués après stimulation des LT par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28.

Un triple marquage des LT CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) et de  $\gamma$ -H2AX pourra aussi être envisagé sur les sections de côlon des souris APC<sup>Min/+</sup> aux différents temps de cinétique ce qui permettra éventuellement d'observer ces mécanismes avant la diminution de la population lymphocytaire T.

#### I.4- Implication de facteurs microbiens associés à l'infection chronique par des *E. coli* colibactine-positives

En plus des cellules épithéliales et immunitaires, d'autres composants du micro-environnement colique tel que le microbiote intestinal pourraient participer à l'effet pro-carcinogène associé à l'infection chronique par les *E. coli* colibactine-positives.

##### I.4.a) Interaction des souches *E. coli* colibactine-positives avec d'autres bactéries coliques

A l'heure actuelle, la plupart des études sur les effets pro-carcinogènes des bactéries s'intéresse à un seul type de bactéries. Il a été montré récemment qu'un modèle murin de CCR (AOM) co-infecté par *B. fragilis* producteurs de BFT et par *E. coli* colibactine-positives présentait un développement tumoral et une réponse des LT Th17 plus forts que dans les modèles mono-colonisés, suggérant un effet synergique de ces deux types bactériens lors de la co-infection (Dejea et al., 2018).

De nombreuses publications rapportent l'effet de multiples espèces bactériennes sur l'environnement immunitaire colique dans des modèles animaux et/ou chez l'homme (**Tableau 2**). Nous étudierons si l'abondance de ces genres et espèces bactériennes est modifiée lors de l'infection chronique par les bactéries *E. coli* colibactine-positives, afin de savoir si les modulations du micro-environnement pourraient être liées à un déséquilibre de ce microbiote et/ou à des interactions entre *E. coli* colibactine-positive et une ou plusieurs de ces espèces. Pour ce faire, la détection et la quantification des bactéries listées dans le Tableau 2 pourront être réalisées sur les échantillons (fèces, côlons, tumeurs) des modèles murins APC<sup>Min/+</sup> utilisés



pour les travaux décrits dans ce manuscrit. Des techniques de séquençage de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal pourront être utilisées ainsi qu'une quantification par qPCR des espèces cibles. Une localisation de ces espèces microbiennes pourra également être réalisée par FISH sur les tissus coliques de ces souris. Ces données pourront ensuite être corrélées au niveau de colonisation par les bactéries *E. coli* colibactine-positives, à l'expression de la colibactine et aux différents paramètres de l'environnement immunitaire colique (LT, neutrophiles, cytokines, MPO...). Ces études du microbiote pourront être réalisées à des temps plus précoces de l'infection afin de comprendre si les évolutions du micro-environnement immunitaire colique précèdent ou suivent l'évolution du microbiote colique.

Ces études phylogénétiques pourront être complétées par des études métagénomiques et de métabolomiques afin d'évaluer les modulations fonctionnelles du microbiote. Plus particulièrement l'étude de métabolites pouvant influencer la réponse immunitaire pourra être réalisée. Par exemple, il a été observé que les AGCC, tel que le propionate et l'acétate, induisent le recrutement mais également l'activation des neutrophiles (Brestoff and Artis, 2013; Sina et al., 2009; Vinolo et al., 2011). Ils peuvent également augmenter la prolifération des LT régulateurs (Furusawa et al., 2013; Zitvogel et al., 2016). D'autres métabolites sont connus pour moduler la réponse des LT, comme le lactate qui inhibe leur fonction cytotoxique et qui est impliqué dans leur entrée en état d'anergie au sein du micro-environnement tumoral (Beckermann et al., 2017; Busk et al., 2011). Une étude des métabolites présents dans les fèces, le côlon et la tumeur pourra donc également être réalisée en parallèle de l'étude du microbiote sur notre modèle murin d'infection, en ciblant plus particulièrement les AGCC et le lactate.

#### I.4.b) Précision concernant l'implication des facteurs de virulence des souches *E. coli* colibactine-positives

L'étude de l'expression des facteurs de virulence des souches *E. coli* colibactine-positives, en particulier la colibactine, et de leur association avec la carcinogénèse colique, pourra également être réalisée sur les prélèvements des souris APC<sup>Min/+</sup> mais également dans les prélèvements de patients atteints de CCR.

En effet, comme décrit plus haut, il sera important de localiser les bactéries dans les tissus pour mieux comprendre leur interaction avec le micro-environnement. En plus de la localisation il sera intéressant de déterminer et quantifier l'expression de la colibactine par ces



souches dans les trois compartiments du côlon des souris APC<sup>Min/+</sup> (muqueuse, follicule lymphoïdes, tumeurs) mais également dans les MLNs. Pour ce faire des techniques de qRT-PCR des gènes de l'îlot *pks* pourront être utilisées, puisque la colibactine n'a pas été purifiée à ce jour. Ces mêmes études sur la localisation des souches et l'expression de la colibactine pourront être réalisées sur les prélèvements de muqueuses et de tumeurs de la cohorte de patients atteints du CCR opérés au CHU de Clermont-Ferrand. L'interaction entre la colibactine et d'autres acteurs du micro-environnement dans la carcinogenèse induite par les souches *E. coli* colibactine-positives, pourra ainsi être étudiée.

Enfin, il pourrait être intéressant de séquencer le génome des souches isolées de patients CCR pour identifier des facteurs de virulence permettant l'infection chronique dans le colon : comme la présence d'adhésines particulières ou de mucinases.

## **II- Étude de la fonctionnalité des cellules immunitaires modulées par l'infection chronique**

Les modulations du micro-environnement dans notre étude sont mises en évidence par la détection de phénotypes cellulaires et restent pour l'instant descriptives. Il est nécessaire de vérifier la fonctionnalité des cellules immunitaires mises en cause, pour mieux préciser les propriétés pro-carcinogènes de ce type de souche.

Le meilleur outil pour les tests de fonctionnalité reste la cytométrie de flux. De nombreux tests ont été réalisés lors de cette thèse pour utiliser cette technique sur les tumeurs coliques des souris APC<sup>Min/+</sup>, mais la taille des tumeurs (6 à 30 mg) ne permet pas l'extraction d'un nombre suffisant de cellules pour permettre une analyse précise de l'infiltrat immunitaire tumoral. Ainsi, des marquages par immunohistochimie en ciblant les LT ou/et les neutrophiles ainsi que les cytokines/enzymes respectives qu'elles produisent (IFN- $\gamma$ , MPO, IL-8...) sur les côlons de souris APC<sup>Min/+</sup> sont envisageables en utilisant la technique de l'algorithme pour la quantification.



## II.1- Étude de la fonctionnalité des LT anti-tumoraux (LT CD8+, LT CD4+CD25+, et LT CD8+CD25+)

En fonction de leur localisation, de leur phénotype et de leur état d'activation, l'implication des LT peut être différente dans le CCR. L'étude de leur fonctionnalité *via* l'analyse des cytokines qu'ils produisent est donc essentielle. En particulier, les LT anti-tumoraux CD8<sup>+</sup> activés produisent de l'IFN- $\gamma$  qui leur permet d'avoir une activité cytotoxique contre la tumeur (Dunn et al., 2002; Pardoll, 2012). Les LT régulateurs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> peuvent également avoir un rôle anti-tumoral dans le CCR s'ils réduisent l'inflammation de la muqueuse, par la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Erdman et al., 2005). Ainsi, dans notre étude la diminution des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- $\beta$  dans le côlon peut être reliée à la diminution des LT régulateurs observée dans les MLNs, qui sont les principaux organes sources d'effecteurs immunitaires pour le côlon. Nous n'avons pas vu de variations d'IFN- $\gamma$  par PCR dans la muqueuse proximale colique mais cela ne veut pas dire qu'aucune variation n'existe au niveau cellulaire. Nous envisageons donc d'effectuer sur les sections de côlon des souris APC<sup>Min/+</sup> des co-marquages des LT CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> et de l'IFN- $\gamma$  pour permettre de co-localiser ces cellules et cette cytokine, ce qui témoignera de leur activation cytotoxique (Fiorelli et al., 1998; Pardoll, 2012). La sécrétion d'IL-10 par les LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> pourrait aussi être étudiée de la même manière au niveau des MLNs.

## II.2- Étude de la fonctionnalité des neutrophiles

L'induction de l'inflammation et du stress oxydant observée par luminescence en caméra dédiée petit animal, ainsi que l'augmentation de la MPO dans les fèces et dans le colon suite à l'infection chronique, suggèrent que les neutrophiles détectés seraient activés et sécréteurs de MPO et de ROS (Klebanoff et al., 2013; Sionov et al., 2014). Il est nécessaire de confirmer que cette activation des neutrophiles, *via* notamment l'étude de leur capacité à sécréter de la MPO. Ainsi, un double marquage Ly6G/MPO pourra être effectué pour vérifier que les neutrophiles qui sont augmentés chez les souris APC<sup>Min/+</sup> sont actifs et jouent un rôle dans l'induction de la micro-inflammation. L'implication des neutrophiles et leur fonction dans le développement tumoral pourront également être vérifiées en les déplaçant chez les souris APC<sup>Min/+</sup> grâce à l'utilisation d'anticorps anti-Ly6G (clone 1A-8), d'après le protocole déjà





utilisé par Lakritz et al (Lakritz et al., 2015). Après déplétion puis infection par la souche 11G5, l'inflammation et le développement tumoral pourront être étudiés.

### **III - Induction d'une résistance aux immunothérapies ciblant le couple de checkpoints immunologique PD-1/PDL-1**

Nos travaux décrits dans ce manuscrit ont mis en évidence pour la première fois que l'infection par les bactéries *E. coli* colibactine-positives entraînent une résistance à une immunothérapie ciblant le *checkpoint* immunologique PD-1 dans le modèle murin de greffe syngénique sous-cutanée MC-38. Il est indispensable de comprendre les mécanismes impliqués dans cette résistance, ce qui pourra être entrepris dans les modèles murins de CCR disponibles au laboratoire M2iSH.

#### **III.1- Confirmation de la résistance induite par l'infection par les *E. coli* colibactine-positives sur la réponse à l'immunothérapie anti-PD-1 dans d'autres modèles**

Nous avons choisi de réaliser nos premières expériences sur le modèle de greffes sous-cutanées de cellules tumorales coliques MC-38. Ce modèle semblait pertinent car les études récentes cherchant à comprendre l'impact du microbiote sur la réponse aux immunothérapies contre le mélanome, utilisent notamment les greffes sous-cutanées de cellules MC-38 avec inoculation des bactéries dans le tube digestif des animaux (Gopalakrishnan et al., 2018; Matson et al., 2018; Routy et al., 2018b; Sivan et al., 2015; Vetizou et al., 2015a). Grâce à un nombre d'animaux non limitant, l'utilisation de ce modèle nous permet d'accroître la puissance statistique de nos études par rapport aux modèles APC<sup>Min/+</sup>. De plus la croissance tumorale est beaucoup plus rapide (1 mois contre 3 mois pour le modèle APC<sup>Min/+</sup>) et son suivi est facilité grâce à l'accessibilité sous-cutanée de la tumeur.

Étant donné les résultats prometteurs que nous avons obtenus sur le modèle MC38, il paraît maintenant intéressant de les confirmer dans le modèle APC<sup>Min/+</sup>. Cela implique de vérifier préalablement que le modèle de souris APC<sup>Min/+</sup> répond à ce type de traitement. L'effet immunosuppresseur de l'interaction du *checkpoint* immunologique PD-1 avec son ligand PDL-1 a été observé dans le modèle APC<sup>Min/+</sup> (Jayakumar and Bothwell, 2017) suggérant que ce modèle animal pourrait être utilisé pour évaluer l'efficacité de ce type d'immunothérapie. Après



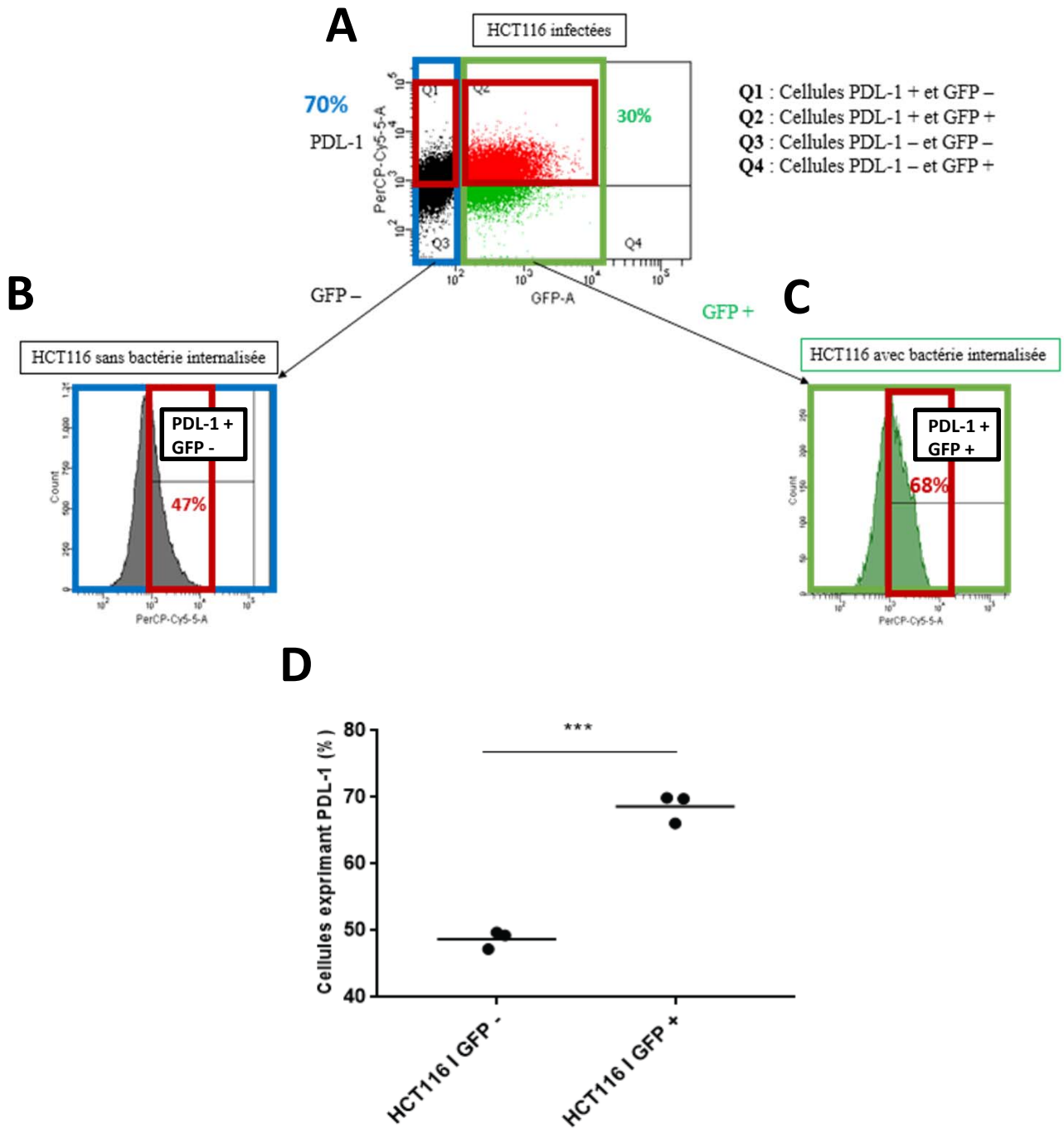
validation de la réponse à l'anti-PD-1 dans le modèle APC<sup>Min/+</sup>, l'impact de l'infection chronique par les bactéries *E. coli* colibactine-positives sur l'efficacité de cette immunothérapie pourra être évalué. Comme dans ce modèle la croissance tumorale ne peut être suivie manuellement, il est envisagé d'utiliser la plateforme d'imagerie petit animal (IMOST, Clermont-Ferrand) et notamment une détection par PET/CT (Tomographie par Émission de Positrons et tomodensitomètre à rayons X). Des études supplémentaires pour confirmer l'implication de la colibactine dans cette résistance au traitement pourront également être réalisées en utilisant le mutant isogénique  $\Delta$ C1bQ de la souche *E. coli* colibactine-positive 11G5.

Ces études pourront être élargies à d'autres types de cancer, aux vues de l'effet bénéfiques ou délétères de certains composants du microbiote sur des immunothérapies anti-checkpoints immunologiques (Derosa et al., 2018; Routy et al., 2018a). L'effet de l'infection chronique par les souches *E. coli* colibactine-positives sur l'efficacité des anti-PD-1 pourra être étudié sur les cellules de mélanomes B16B16 injectées en sous-cutanées chez de souris C57BL/6J.

## III.2- Étude des mécanismes liés à la résistance à l'immunothérapie anti-PD-1

### III.2.a) Implication de la diminution de l'infiltrat de LT dans la tumeur en contexte d'infection chronique par *E. coli* colibactine-positives

Il est bien décrit que l'effet anti-tumoral des immunothérapies ciblant PD-1/PDL-1 est dû en majorité à la restauration de la réponse des LT présents sur le site tumoral (Pardoll, 2012; Sharpe and Pauken, 2018; Simon and Labarriere, 2017). Dans le mélanome, il a été décrit que la résistance aux immunothérapies anti-*checkpoints* immunologiques est associée à un faible infiltrat de LT intra-tumoraux, à la fois dans les modèles murins et chez les patients (Jenkins et al., 2018; Peng et al., 2016). De même, dans le CCR, le phénotype MSS résistant à l'immunothérapie est associé à un faible infiltrat immunitaire comparativement au phénotype MSI (Xiao and Freeman, 2015). Ces données vont bien dans le sens d'un rôle essentiel de l'infiltrat immunitaire dans la réponse à ce type de traitement. Nos résultats obtenus sur le modèle APC<sup>Min/+</sup> et sur les patients atteints de CCR, montrent une diminution des LT associée



**Figure 37 : Augmentation de l'expression du ligand de checkpoint immunologique PDL-1 induite par l'internalisation des bactéries *E. coli* colibactine-positives 11G5.** Après 24h d'infection par la souche *E. coli* colibactine-positive 11G5 GFP<sup>+</sup> (souche isolée de patient atteint de CCR et transformée avec le plasmide CmR pH56575 specR-GFP) de la lignée cellulaire HCT116 (adénocarcinome colique humain), l'expression de la protéine membranaire PDL-1 a été analysée par cytométrie de flux. **(A)** La proportion de cellules infectées exprimant PDL-1 a été mesurée. Les cellules ayant internalisé les bactéries (soit 30 % de la population cellulaire infectée) (GFP<sup>+</sup>PDL-1<sup>+</sup> ; **Q2**) ont été comparées aux cellules infectées n'ayant pas internalisé les bactéries (soit 70% des cellules (GFP<sup>-</sup>PDL-1<sup>+</sup> ; **Q1**). On observe une augmentation de la proportion de cellules exprimant PDL-1 lorsqu'elles ont internalisé les bactéries **(C)** comparativement aux cellules n'ayant pas internalisé les bactéries **(B)**. **(D)** En effet 68% des cellules ayant internalisé la souche *E. coli* colibactine-positive 11G5 GFP<sup>+</sup> expriment PDL-1 à leur membrane contre seulement 47% des cellules n'ayant pas internalisé ces bactéries. Ces résultats nécessitent d'être reproduits et confirmés. PDL-1 : Programmed cell death ligand 1; \*\*\*  $P < 0,001$

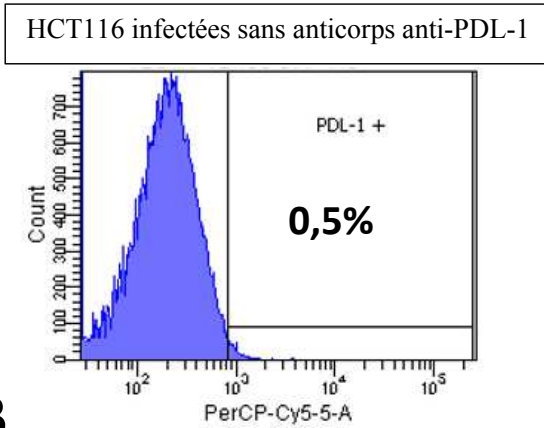
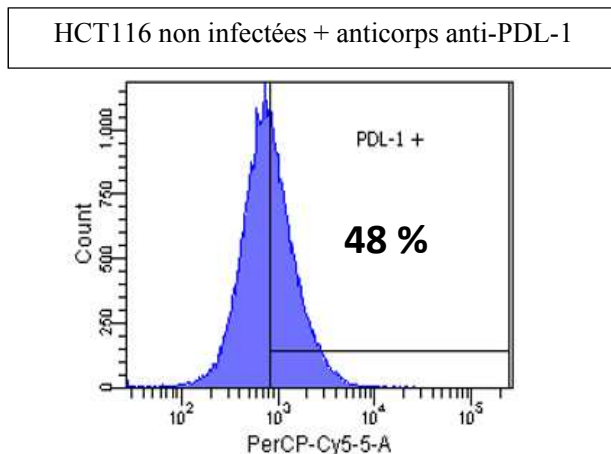
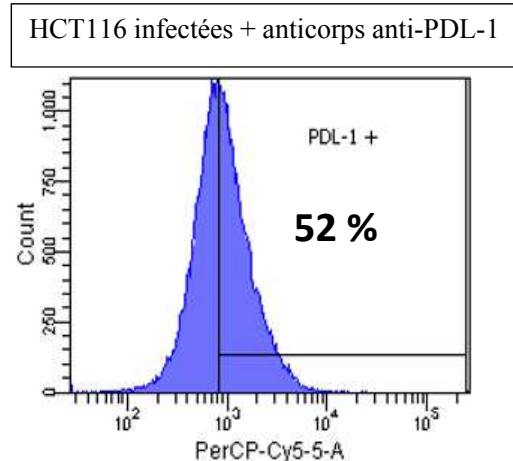
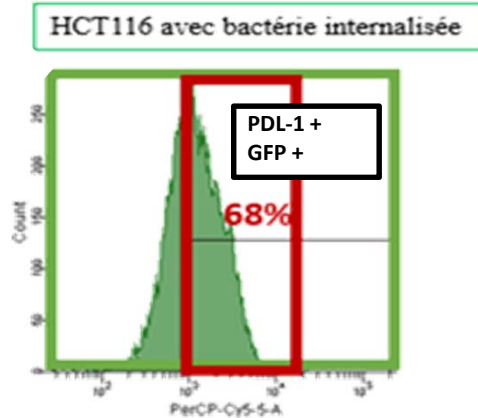
à l'infection chronique par *E. coli* colibactine-positif, qui pourrait expliquer la résistance à l'immunothérapie anti-PD-1. Néanmoins, il est nécessaire de confirmer cette hypothèse en comparant l'infiltrat des tumeurs MC-38 provenant des souris infectées par *E. coli* colibactine-positif n'ayant pas répondu au traitement avec les souris infectées ayant répondu au traitement et avec les souris non infectées. Les lymphocytes T seront quantifiés par cytométrie en flux après dissociation des tumeurs.

### III.2.b) Modulation de l'expression du ligand PDL-1 par *E. coli* colibactine-positif

L'effet direct de *E. coli* colibactine-positif sur l'expression des *checkpoints* immunologiques ou de leur ligands sera également exploré. En effet, une augmentation de l'expression du ligand inhibiteur des LT PDL-1 sur les cellules coliques pourrait également expliquer une moindre réponse au traitement anti-PD-1, en renforçant l'inhibition des LT. Il a déjà été observé que des pathogènes pouvaient stimuler l'expression de ces *checkpoints* immunologiques, par exemple *H. pylori* induit l'expression de PDL-1 sur les cellules épithéliales gastriques et sur les cellules dendritiques (Beswick et al., 2007; Keir et al., 2008; Silva et al., 2016; Wu et al., 2010c). Des études préliminaires ont été réalisées dans le cadre du stage de DUT de Fanny Lauterbach, encadrée lors de cette thèse. Des cellules épithéliales coliques HCT116 ont été infectées par la souche *E. coli* colibactine-positif 11G5 exprimant la GFP. En parallèle l'expression de PDL-1 a été étudiée par cytométrie de flux. Nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de PDL-1 seulement sur les cellules présentant une infection intracellulaire (**Figures 37 et 38**). Ces résultats sont préliminaires et cet effet de la souche sera confirmé *in vivo*.

### III.2.c) Implication du microbiote associé à l'infection par *E. coli* colibactine-positif

Le microbiote intestinal associé à l'infection par *E. coli* colibactine-positif pourrait également contribuer à la résistance à l'anticorps anti-PD-1 induite par cette infection. En effet, il est connu que le microbiote peut impacter la réponse aux anti-cancéreux, que ce soit la chimiothérapie (Daillère et al., 2016; Viaud et al., 2013) ou les traitements par immunothérapie ciblant les *checkpoints* immunologiques (Gopalakrishnan et al., 2018; Matson et al., 2018; Routy et al., 2018b; Sivan et al., 2015; Vetizou et al., 2015a) (**Tableau 3**). Il a été montré que

**A****B****C****D**

**Figure 38 : L'augmentation de l'expression de PDL-1 induite par les bactéries *E. coli* colibactine-positives, nécessite l'internalisation des bactéries.** Après 24h d'infection par la souche *E. coli* colibactine-positive 11G5 GFP<sup>+</sup> (souche isolée de patient atteint de CCR et transformée avec le plasmide CmR pH56575 specR-GFP) de la lignée cellulaire HCT116 (adénocarcinome colique humain), l'expression de la protéine membranaire PDL-1 a été analysée par cytométrie de flux. **(A)** Témoin négatif de l'expression de PDL-1 : cellules HCT116 sans anticorps anti-PDL-1. **(B-C)** Nous n'avons pas constaté de différence d'expression de PDL-1, entre les cellules non infectées **(B)** et infectées **(C)** après 24h d'infection par la souche *E. coli* colibactine-positive 11G5 GFP<sup>+</sup>. **(D)** Néanmoins l'augmentation de la proportion des cellules exprimant PDL-1 après l'internalisation de la bactérie suggère que les bactéries *E. coli* colibactine-positives 11G5 doivent être internalisées pour augmenter l'expression de PDL-1 sur la membrane de ces cellules. Ces résultats nécessitent d'être reproduits et confirmés. PDL-1 : Programmed cell death ligand 1

**Tableau 3 : Liste des genres et espèces microbiens à cibler pour l'étude d'une dysbiose associée à l'induction de la résistance à l'immunothérapie anti-PD-1, en contexte d'une infection chronique à *E. coli* colibactine-positifs.** Certains de ces genres et espèces listés sont capables d'augmenter ou de diminuer l'efficacité des chimiothérapie et/ou immunothérapies anti-cancéreuses ciblant des *checkpoints* immunologiques dans des modèles murins. D'autres ont une abondance enrichie soit chez les patients répondeurs ou soit chez les patients non répondeurs à ce type d'immunothérapie. PD-1 : Programmed cell death 1. PDL-1 : Programmed cell death ligand 1. CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4.

Case violette : étude chez l'homme ; Case blanche : étude dans modèle murin ; Case kaki : étude *in vitro*

Implication	Espèce/ Genre bactérien à cibler	Effets reportés	Références
Efficacité des immnothérapies	<i>Bacteroidales</i>	Associés aux patients non répondeurs à anti-PD1	
	<i>Faecalibacterium</i>	Associés aux patients répondeurs à anti-PD1	Gopalakrishan et al, 2018
	<i>Clostridiales</i>	Associés aux patients répondeurs à anti-PD1	
	<i>Bacteroides</i>	Augmentation de l'efficacité d'un anti-CTLA-4	Vétizou et al, 2015
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>		Viaud et al, 2013
	<i>Enterococcus hirae</i>	Augmentation de l'efficacité du cyclophosphamide par modulation du système immunitaire	Viaud et al, 2013 / Daillières et al, 2016
	<i>Barnesiella intestinihominis</i>		Viaud et al, 2013 / Daillières et al, 2016
	<i>Akkermansia muciniphila</i>	Augmentation de l'efficacité d'un anti-PD1 et/ou anti-CTLA-4	Routy et al, 2018
	<i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium breve</i>	Augmentation de l'efficacité d'un anti-PDL1	Sivan et al, 2015
	<i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Veillonella parvula</i> <i>Parabacteroides merdae</i> <i>Lactobacillus sp.</i>	Associés aux patients répondeurs à anti-PD1	Matson et al, 2018
	<i>Ruminococcus obeum</i> <i>Roseburia intestinalis</i>	Associés aux patients non répondeurs à anti-PD1	Matson et al, 2018
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Associés aux patients non répondeurs à anti-PD1	Gopalakrishan et al, 2018





la sur-représentation de certaines espèces bactériennes est associée à une meilleure réponse à des immunothérapies ciblant PD-1 chez des patients atteints de différents types de cancers (mélanome, poumons... ) alors que d'autres espèces sont associées à une résistance des patients à ce type de traitement (Gopalakrishnan et al., 2018; Matson et al., 2018; Routy et al., 2018b). Ainsi, il serait intéressant d'identifier si certaines espèces ayant un effet bénéfique sur la réponse à ce type de traitement, telles que *Bifidobacterium longum* et *Akkermansia muciniphila*, sont diminuées après l'infection chronique par *E. coli* colibactine-positives dans les souris C57BL/6 porteuses de tumeurs MC38. De la même manière nous pourrions observer si les espèces déjà décrites comme étant associées à une résistance au traitement chez l'homme, sont enrichies chez ces souris après infection par ces bactéries, comme par exemple *Bacteroides thetaiomicon*, *Ruminococcus obeum* et *Roseburia intestinalis*. La détection et la quantification de ces bactéries seront étudiées comme décrit précédemment, dans les fèces et les muqueuses de ces souris, et les données seront comparées entre souris répondeuses et non répondeuses au traitement. Pour confirmer le rôle clé du microbiote dans la résistance au traitement, l'efficacité de l'immunothérapie anti-PD-1 sera testée chez des souris axéniques porteuses des tumeurs MC-38 auxquelles sera transféré le microbiote des souris infectées par *E. coli* colibactine-positives résistantes au traitement ou répondeuses. La réponse de ces souris pourra être comparée à celle d'animaux mono-colonisés par la souche *E. coli* colibactine-positive 11G5 afin de déterminer si la résistance à cette immunothérapie est induite uniquement par la monocolonisation ou par une interaction des souches *E. coli* colibactine-positives avec d'autres composants du microbiote.

La compréhension des mécanismes par lesquels les bactéries *E. coli* colibactine-positives induiraient cette résistance à l'anti-PD-1 pourrait apporter de nouvelles cibles thérapeutiques pour lever la résistance à ce type de traitement chez des patients colonisés par ce type de souche.



## **IV- *Escherichia coli* colibactine-positif : nouveau marqueur de mauvais pronostic pour la réponse aux immunothérapies anti-PD-1 chez les patients atteints de CCR ?**

Plusieurs études suggèrent que différentes dysbioses pourraient être des marqueurs de mauvais pronostic du CCR (Routy et al., 2018a; Tilg et al., 2018b; Villéger et al., 2018). Le laboratoire M2iSH a montré une relation entre colonisation de la muqueuse par les *E. coli* cyclomoduline-positives et les formes de CCR de mauvais pronostic (stade TNM élevé) (Bonnet et al., 2014). Ces résultats ont été confirmés par une étude menée par Eklöf et al, dans un autre laboratoire, qui montre que les *E. coli* cyclomoduline-positives (*clbA*<sup>+</sup>) sont détectées dans les fèces de patients CCR, leur abondance étant plus forte à un stade avancé (adénocarcinome par rapport à lésions dysplasiques) (Eklöf et al., 2017).

La diminution spécifique des LT observée lors de notre étude à la marge des tumeurs de patients atteints de CCR porteurs de souches *E. coli* colibactine-positives suggère aussi la valeur pronostique de la présence de ce type de souche. En effet, il est établi grâce à de nombreuses études chez l'homme qu'un infiltrat pauvre en LT (LT CD3<sup>+</sup>, LT CD45RO<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup>) dans la marge des tumeurs CCR est un marqueur de mauvais pronostic chez les patients. En effet, la détermination de la densité de deux populations de LT (CD3<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> ou CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>) dans la marge et au centre des tumeurs de patients permet de définir un Immunoscore variant de 0 (faible densité de LT dans les deux régions tumorales) à 4 (forte densité des LT dans les deux régions tumorales). Il a été montré que plus la valeur de l'Immunoscore est élevée, meilleur sera le pronostic du patient (Galon et al., 2012, 2014, 2016; Mlecnik et al., 2016; Pagès et al., 2018; Tosolini et al., 2011). Ainsi il serait intéressant d'étudier si la colonisation par *E. coli* colibactine-positives pourrait être un marqueur de l'infiltrat immunitaire T des tumeurs. Pour ce faire, d'autres études sur un nombre plus important de patients atteints de CCR pourront être réalisées, à travers lesquelles la densité de LT dans les tumeurs et l'Immunoscore des patients pourront être corrélés à leur colonisation par ces souches aussi bien dans les selles que dans les tissus (muqueuse, tumeur).

Récemment, l'immunothérapie ciblant le *checkpoint* immunologique PD-1 a montré de très bons résultats sur des cancers colorectaux de phénotype MSI ou déficients pour le système de réparation de l'ADN MMR (dMMR), alors que les cancers colorectaux de phénotype MSS sont



résistants à ce type de thérapie (Le et al., 2015). Depuis, le pembrolizumab (nouvel anticorps thérapeutique anti-PD-1) a été approuvé par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) pour les patients atteints de CCR de phénotypes MSI ou dMMR (O'Neil et al., 2017). Le laboratoire M2iSH a mis en évidence pour la première fois dans nos travaux que l'infection par les bactéries *E. coli* colibactine-positives peut induire une résistance à une immunothérapie ciblant le *checkpoint* immunologique PD-1 dans le modèle murin de CCR de greffe syngénique sous-cutanée MC-38. De manière intéressante, la prévalence des bactéries *E. coli* colibactine-positives est plus élevée chez les patients avec des tumeurs de phénotype MSS (Gagnière et al., 2017). La présence de ces bactéries chez les patients pourrait donc être un marqueur prédictif de la résistance aux immunothérapies anti-PD-1 dans les CCR de type MSS.

Afin de confirmer ces hypothèses, des études cliniques sont nécessaires. Il serait envisageable, dans des essais cliniques testant des thérapies anti-PD-1, d'inclure des prélèvements de fèces et des biopsies de tissus pour détecter la présence de bactéries colibactine-positives. Pour détecter ce type de bactéries rapidement chez les patients, la méthode de référence est d'effectuer une PCR ciblant les gènes de l'îlot *pks* (Arthur et al., 2012; Dejea et al., 2018; Gagnière et al., 2017). Il est important de noter que l'îlot *pks* n'est pas seulement porté par l'espèce *E. coli* mais aussi par d'autres espèces bactériennes : *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, et *Citrobacter koseri* (Faïs et al., 2018). Ainsi il sera important de compléter cette détection d'un gène ou plusieurs gènes de l'îlot *pks* par une quantification par PCR quantitative de l'espèce *E. coli*. Dans l'idéal, la détection dans les fèces sera privilégiée pour son caractère non invasif. L'analyse de l'infiltrat des LT et la détermination de l'Immunoscore des tumeurs pourront être menées en parallèle pour vérifier la prédictibilité et l'interdépendance de ces marqueurs. La réponse au traitement anti-PD-1 sera suivie, notamment la survie sans récurrence à 5 ans, ainsi que la survie globale. Il est important de préciser qu'il sera essentiel de distinguer les patients en fonction de leur phénotype MSS et MSI lors de l'analyse si l'étude inclut les deux types de phénotypes tumoraux.



# CONCLUSION

---





Ces travaux de thèse ont permis de préciser l'effet d'une infection chronique par *E. coli* colibactine-positive, d'une part sur le micro-environnement immunitaire colique et son implication sur la carcinogenèse colique, et d'autre part sur l'efficacité anti-tumorale des traitements par immunothérapie ciblant le *checkpoint* immunologique PD-1. Afin d'étudier les interactions microbiote-système immunitaire-hôte, nous avons choisi de travailler sur le modèle APC<sup>Min/+</sup>, modèle murin de référence du CCR et immunocompétent.

Nous avons développé et validé une nouvelle méthode pour quantifier les cellules immunitaires dans le côlon du modèle murin APC<sup>Min/+</sup>. En complément des techniques déjà en place au laboratoire, cette méthode basée sur des marquages immunofluorescents et sur l'analyse numérique semi-automatisée des images nous a permis de distinguer, quantifier et localiser des populations cellulaires dans trois compartiments d'intérêt d'une section colique entière : la muqueuse, les follicules lymphoïdes et les tumeurs. Une analyse précise de l'environnement immunitaire colique a ainsi été obtenue dans le modèle de souris APC<sup>Min/+</sup> chroniquement infectées par la souche *E. coli* colibactine-positive 11G5 isolée de patient atteint de CCR. Nous avons ainsi montré *in vivo* que cette bactérie induit un environnement pro-carcinogène dépendant de la présence de la colibactine, avec le recrutement d'une population pro-inflammatoire, les neutrophiles, l'expression accrue de l'enzyme pro-inflammatoire MPO et la diminution de la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires. Cet environnement pro-carcinogène est également caractérisé par un nombre plus faible des Lymphocytes T (LT) dans la muqueuse, la tumeur et les ganglions mésentériques en contexte d'infection par *E. coli* colibactine-positive, suggérant une altération de la réponse anti-tumorale. Cet effet immunosuppresseur sur la défense anti-tumorale de l'hôte a été confirmé chez les patients atteints de CCR et porteurs des *E. coli* colibactine-positives. Enfin, nous avons démontré qu'une infection par *E. coli* colibactine-positive induit une résistance à une immunothérapie anti-tumorale ciblant le *checkpoint* immunologique PD-1, connu pour être surexprimé notamment par les LT dans le micro-environnement tumoral. Ces résultats suggèrent que la diminution de l'infiltrat lymphocytaire T induite par l'infection chronique du tube digestif par des *E. coli* colibactine-positives pourrait être liée à cette résistance aux traitements.

Ainsi, les travaux effectués lors de cette thèse confirment le rôle clé de certaines bactéries du microbiote intestinal dans la carcinogenèse colique et la réponse aux traitements anti-cancéreux. À plus long terme, ces résultats pourraient permettre d'utiliser la détection des *E. coli* colibactine-positives comme marqueur de mauvais pronostic du CCR, notamment vis-à-vis de la réponse aux stratégies ciblant le *checkpoint* immunologique PD-1/PDL1.



# RÉFÉRENCES

---



- Abdulmir, A.S., Hafidh, R.R., Mahdi, L.K., Al-jeboori, T., and Abubaker, F. (2009). Investigation into the controversial association of *Streptococcus gallolyticus* with colorectal cancer and adenoma. *BMC Cancer* 9, 403.
- Abdulmir, A.S., Hafidh, R.R., and Bakar, F.A. (2010). Molecular detection, quantification, and isolation of *Streptococcus gallolyticus* bacteria colonizing colorectal tumors: inflammation-driven potential of carcinogenesis via IL-1, COX-2, and IL-8. *Mol Cancer* 9, 249.
- Abdulmir, A.S., Hafidh, R.R., and Abu Bakar, F. (2011). The association of *Streptococcus bovis/gallolyticus* with colorectal tumors: the nature and the underlying mechanisms of its etiological role. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30, 11.
- Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews Immunology* 10, 131–144.
- Abt, M.C., Osborne, L.C., Monticelli, L.A., Doering, T.A., Alenghat, T., Sonnenberg, G.F., Paley, M.A., Antenus, M., Williams, K.L., Erikson, J., et al. (2012). Commensal Bacteria Calibrate the Activation Threshold of Innate Antiviral Immunity. *Immunity* 37, 158–170.
- Acheson, D.W.K., and Luccioli, S. (2004). Microbial-gut interactions in health and disease. *Mucosal immune responses. Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18, 387–404.
- Adegboyega, P.A., and Ololade, O. (2004). Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in normal kidneys. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 12, 71–74.
- Adloff, M., Arnaud, J.P., Ollier, J.C., and Schloegel, M. (1989). [Can the prognosis of patients treated surgically in cancer of the rectum or colon be improved by follow-up? Prospective study of 909 patients]. *Chirurgie* 115, 228–236; discussion 236-237.
- Ahluwalia, B., Magnusson, M.K., and Öhman, L. (2017). Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 52, 1185–1193.
- Ahn, J., Sinha, R., Pei, Z., Dominianni, C., Wu, J., Shi, J., Goedert, J.J., Hayes, R.B., and Yang, L. (2013). Human Gut Microbiome and Risk for Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst* 105, 1907–1911.
- Akeus, P., Langenes, V., von Mentzer, A., Yrlid, U., Sjöling, Å., Saksena, P., Raghavan, S., and Quiding-Järbrink, M. (2014). Altered chemokine production and accumulation of regulatory T cells in intestinal adenomas of APCMin/+ mice. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 63, 807–819.
- Akisik, E., Buğra, D., Yamaner, S., and Dalay, N. (2011). Analysis of  $\beta$ -catenin alterations in colon tumors: a novel exon 3 mutation. *Tumour Biol* 32, 71–76.
- Alam, A., Leoni, G., Quiros, M., Wu, H., Desai, C., Nishio, H., Jones, R.M., Nusrat, A., and Neish, A.S. (2016). The microenvironment of injured murine gut elicits a local pro-restitutive microbiota. *Nat Microbiol* 1, 15021.
- Alam, M., Midtvedt, T., and Uribe, A. (1994). Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. *Scand. J. Gastroenterol.* 29, 445–451.
- Aleksandrova, K., Pischon, T., Jenab, M., Bueno-de-Mesquita, H.B., Fedirko, V., Norat, T., Romaguera, D., Knüppel, S., Boutron-Ruault, M.-C., Dossus, L., et al. (2014). Combined impact of healthy lifestyle factors on colorectal cancer: a large European cohort study. *BMC Med* 12, 168.

- Algars, A., Irjala, H., Vaittinen, S., Huhtinen, H., Sundström, J., Salmi, M., Ristamäki, R., and Jalkanen, S. (2012). Type and location of tumor-infiltrating macrophages and lymphatic vessels predict survival of colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* *131*, 864–873.
- Allaire, J.M., Crowley, S.M., Law, H.T., Chang, S.-Y., Ko, H.-J., and Vallance, B.A. (2018). The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol.* *39*, 677–696.
- Allaj, V., Guo, C., and Nie, D. (2013). Non-steroid anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and cancer. *Cell Biosci* *3*, 8.
- Amano, H., Hayashi, I., Endo, H., Kitasato, H., Yamashina, S., Maruyama, T., Kobayashi, M., Satoh, K., Narita, M., Sugimoto, Y., et al. (2003). Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J. Exp. Med.* *197*, 221–232.
- Amitay, E.L., Krilaviciute, A., and Brenner, H. (2018). Systematic review: Gut microbiota in fecal samples and detection of colorectal neoplasms. *Gut Microbes* 1–15.
- André, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., et al. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* *350*, 2343–2351.
- Anzai, A., Shimoda, M., Endo, J., Kohno, T., Katsumata, Y., Matsuhashi, T., Yamamoto, T., Ito, K., Yan, X., Shirakawa, K., et al. (2015). Adventitial CXCL1/G-CSF expression in response to acute aortic dissection triggers local neutrophil recruitment and activation leading to aortic rupture. *Circ. Res.* *116*, 612–623.
- Arnold, M., Sierra, M.S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* *66*, 683–691.
- Arthur, J.C., and Jobin, C. (2013). The complex interplay between inflammation, the microbiota and colorectal cancer. *Gut Microbes* *4*, 253–258.
- 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.
- Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R., Honda, K., et al. (2008). ATP drives lamina propria T<sub>H</sub>17 cell differentiation. *Nature* *455*, 808–812.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., et al. (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* *331*, 337–341.
- Atkin, W.S., Morson, B.C., and Cuzick, J. (1992). Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N. Engl. J. Med.* *326*, 658–662.

- Attene-Ramos, M.S., Nava, G.M., Muellner, M.G., Wagner, E.D., Plewa, M.J., and Gaskins, H.R. (2010). DNA damage and toxicogenomic analyses of hydrogen sulfide in human intestinal epithelial FHs 74 Int cells. *Environ. Mol. Mutagen.* *51*, 304–314.
- Aykan, N.F. (2015). Red Meat and Colorectal Cancer. *Oncol Rev* *9*.
- Bachmann, R., Leonard, D., Delzenne, N., Kartheuser, A., and Cani, P.D. (2017). Novel insight into the role of microbiota in colorectal surgery. *Gut* *66*, 738–749.
- Bailey, C., Negus, R., Morris, A., Ziprin, P., Goldin, R., Allavena, P., Peck, D., and Darzi, A. (2007). Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer. *Clin. Exp. Metastasis* *24*, 121–130.
- 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. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* *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.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* *357*, 539–545.
- Banasaz, M., Norin, E., Holma, R., and Midtvedt, T. (2002). Increased Enterocyte Production in Gnotobiotic Rats Mono-Associated with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology* *68*, 3031–3034.
- Bancroft, G.J., Schreiber, R.D., and Unanue, E.R. (1991). Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol. Rev.* *124*, 5–24.
- Barault, L., Veyrie, N., Jooste, V., Lecorre, D., Chapusot, C., Ferraz, J.-M., Lièvre, A., Cortet, M., Bouvier, A.-M., Rat, P., et al. (2008). Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int. J. Cancer* *122*, 2255–2259.
- Barone, F., Gardner, D.H., Nayar, S., Steinthal, N., Buckley, C.D., and Luther, S.A. (2016). Stromal Fibroblasts in Tertiary Lymphoid Structures: A Novel Target in Chronic Inflammation. *Front Immunol* *7*.
- Bartsch, H., and Nair, J. (2006). Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Arch Surg* *391*, 499–510.
- Basnet, S., Zhang, Z.-Y., Liao, W.-Q., Li, S.-H., Li, P.-S., and Ge, H.-Y. (2016). The Prognostic Value of Circulating Cell-Free DNA in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *J Cancer* *7*, 1105–1113.
- Bauer, H., and Levenson, S.M. THE RESPONSE OF THE LYMPHATIC TISSUE TO THE MICROBIAL FLORA. STUDIES ON GERMFREE MICE. *42*, 13.
- Beauchemin, N., and Arabzadeh, A. (2013). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* *32*, 643–671.

- Beccattini, S., Taur, Y., and Pamer, E.G. (2016). Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends in Molecular Medicine* 22, 458–478.
- Becker, C., Fantini, M.C., Schramm, C., Lehr, H.A., Wirtz, S., Nikolaev, A., Kiesslich, R., Huber, S., Ito, H., Nishimoto, N., et al. TGF- $\beta$  Suppresses Tumor Progression in Colon Cancer by Inhibition of IL-6 trans-Signaling. 11.
- Beckermann, K.E., Dudzinski, S.O., and Rathmell, J.C. (2017). Dysfunctional T cell metabolism in the tumor microenvironment. *Cytokine Growth Factor Rev* 35, 7–14.
- Bedoui, S.A., Barbirou, M., Stayoussef, M., Dallel, M., Mokrani, A., Makni, L., Mezlini, A., Bouhaouala, B., Yacoubi-Loueslati, B., and Almawi, W.Y. (2018). Association of interleukin-17A polymorphisms with the risk of colorectal cancer: A case-control study. *Cytokine* 110, 18–23.
- Belcheva, A., Irrazabal, T., Robertson, S.J., Streutker, C., Maughan, H., Rubino, S., Moriyama, E.H., Copeland, J.K., Surendra, A., Kumar, S., et al. (2014). Gut Microbial Metabolism Drives Transformation of Msh2-Deficient Colon Epithelial Cells. *Cell* 158, 288–299.
- Belkaid, Y., and Hand, T.W. (2014). Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell* 157, 121–141.
- Benhattar, J., Losi, L., Chaubert, P., Givel, J.C., and Costa, J. (1993). Prognostic significance of K-ras mutations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 104, 1044–1048.
- Berg, D.J., Davidson, N., Kühn, R., Müller, W., Menon, S., Holland, G., Thompson-Snipes, L., Leach, M.W., and Rennick, D. Enterocolitis and Colon Cancer in Interleukin-10-deficient Mice Are Associated with Aberrant Cytokine Production and CD4 $\alpha$  TH1-like Responses. 11.
- Bergomas, F., Grizzi, F., Doni, A., Pesce, S., Laghi, L., Allavena, P., Mantovani, A., and Marchesi, F. (2011). Tertiary Intratumor Lymphoid Tissue in Colo-Rectal Cancer. *Cancers* 4, 1–10.
- Bernstein, A.M., Song, M., Zhang, X., Pan, A., Wang, M., Fuchs, C.S., Le, N., Chan, A.T., Willett, W.C., Ogino, S., et al. (2015). Processed and Unprocessed Red Meat and Risk of Colorectal Cancer: Analysis by Tumor Location and Modification by Time. *PLoS One* 10.
- Bernstein, H., Bernstein, C., Payne, C., Dvorakova, K., and Garewal, H. (2005). Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 589, 47–65.
- Berntsson, J., Nodin, B., Eberhard, J., Micke, P., and Jirström, K. (2016). Prognostic impact of tumour-infiltrating B cells and plasma cells in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 139, 1129–1139.
- Béroud, C., and Soussi, T. (1996). APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 24, 121–124.
- Beswick, E.J., Pinchuk, I.V., Das, S., Powell, D.W., and Reyes, V.E. (2007). Expression of the Programmed Death Ligand 1, B7-H1, on Gastric Epithelial Cells after Helicobacter pylori Exposure Promotes Development of CD4 $^{+}$  CD25 $^{+}$  FoxP3 $^{+}$  Regulatory T Cells. *Infect Immun* 75, 4334–4341.
- Betts, G., Jones, E., Junaid, S., El-Shanawany, T., Scurr, M., Mizen, P., Kumar, M., Jones, S., Rees, B., Williams, G., et al. (2012). Suppression of tumour-specific CD4 $^{+}$  T cells by regulatory T cells is associated with progression of human colorectal cancer. *Gut* 61, 1163–1171.



- Bhattacharya, N., Yuan, R., Prestwood, T.R., Penny, H.L., DiMaio, M.A., Reticker-Flynn, N.E., Krois, C.R., Kenkel, J.A., Pham, T.D., Carmi, Y., et al. (2016). Normalizing Microbiota-Induced Retinoic Acid Deficiency Stimulates Protective CD8+ T Cell-Mediated Immunity in Colorectal Cancer. *Immunity* 45, 641–655.
- 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.
- Bibeau, F., Bouard, G., and Pho, D. (2018). Classifications moléculaires et immunes des cancers colorectaux : implication pour la prise en charge clinique. *Colon Rectum* 12, 138–144.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenauf, A.C., Angell, H., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Berger, A., et al. (2013). Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* 39, 782–795.
- Birkeland, S.A., Storm, H.H., Lamm, L.U., Barlow, L., Blohmé, I., Forsberg, B., Eklund, B., Fjeldborg, O., Friedberg, M., and Frödin, L. (1995). Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int. J. Cancer* 60, 183–189.
- Bishehsari, F., Mahdavinia, M., Vacca, M., Malekzadeh, R., and Mariani-Costantini, R. (2014). Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: environmental factors, molecular pathways, and opportunities for prevention. *World J. Gastroenterol.* 20, 6055–6072.
- Blaschitz, C., and Raffatellu, M. (2010). Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. *J. Clin. Immunol.* 30, 196–203.
- Blazkova, H., Krejčíková, K., Moudry, P., Frisan, T., Hodny, Z., and Bartek, J. (2010). Bacterial intoxication evokes cellular senescence with persistent DNA damage and cytokine signalling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14, 357–367.
- Blom, S., Paavolainen, L., Bychkov, D., Turkki, R., Mäki-Teeri, P., Hemmes, A., Välimäki, K., Lundin, J., Kallioniemi, O., and Pellinen, T. (2017). Systems pathology by multiplexed immunohistochemistry and whole-slide digital image analysis. *Scientific Reports* 7.
- Boleij, A., and Tjalsma, H. (2012). Gut bacteria in health and disease: a survey on the interface between intestinal microbiology and colorectal cancer. *Biol Rev Camb Philos Soc* 87, 701–730.
- Boleij, A., and Tjalsma, H. (2013). The itinerary of *Streptococcus gallolyticus* infection in patients with colonic malignant disease. *The Lancet Infectious Diseases* 13, 719–724.
- 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.* 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* 60, 208–215.
- Boleij, A., Dutilh, B.E., Kortman, G.A.M., Roelofs, R., Laarakkers, C.M., Engelke, U.F., and Tjalsma, H. Bacterial Responses to a Simulated Colon Tumor Microenvironment\* □S. 12.

- Boltin, D., Goldberg, E., Bugaevsky, O., Kelner, E., Birkenfeld, S., Gingold-Belfer, R., Keller, N., Niv, Y., and Dickman, R. (2015). Colonic carriage of *Streptococcus bovis* and colorectal neoplasia: a prospective 17-year longitudinal case-control study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 27, 1449–1453.
- Bond, C.E., Umapathy, A., Buttenshaw, R.L., Wockner, L., Leggett, B.A., and Whitehall, V.L.J. (2012a). Chromosomal Instability in BRAF Mutant, Microsatellite Stable Colorectal Cancers. *PLoS ONE* 7, e47483.
- Bond, C.E., Umapathy, A., Ramsnes, I., Greco, S.A., Zhen Zhao, Z., Mallitt, K.-A., Buttenshaw, R.L., Montgomery, G.W., Leggett, B.A., and Whitehall, V.L.J. (2012b). p53 mutation is common in microsatellite stable, BRAF mutant colorectal cancers. *Int. J. Cancer* 130, 1567–1576.
- Bonnet, M., Buc, E., Sauvanet, P., Darcha, C., Dubois, D., Pereira, B., Déchelotte, P., Bonnet, R., Pezet, D., and Darfeuille-Michaud, A. (2014). Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin. Cancer Res.* 20, 859–867.
- Borst, J., Ahrends, T., Bąbała, N., Melief, C.J.M., and Kastenmüller, W. (2018). CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 635–647.
- Boshoff, C., and Weiss, R. (2002). AIDS-related malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 2, 373–382.
- 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.
- Boursi, B., Mamtani, R., Haynes, K., and Yang, Y.-X. (2015). Recurrent antibiotic exposure may promote cancer formation – Another step in understanding the role of the human microbiota? *European Journal of Cancer* 51, 2655–2664.
- Bouskra, D., Brézillon, C., Bérard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I.G., and Eberl, G. (2008). Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* 456, 507–510.
- Boutron, M.C., Faivre, J., Quipourt, V., Senesse, P., and Michiels, C. (1995). Family history of colorectal tumours and implications for the adenoma-carcinoma sequence: a case control study. *Gut* 37, 830–834.
- Boutron-Ruault, M.C., Senesse, P., Méance, S., Belghiti, C., and Faivre, J. (2001). Energy intake, body mass index, physical activity, and the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nutr Cancer* 39, 50–57.
- Brancato, S.K., and Albina, J.E. (2011). Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *Am. J. Pathol.* 178, 19–25.
- Branquinho, D., Freire, P., and Sofia, C. (2016). NOD2 mutations and colorectal cancer - Where do we stand? *World J Gastrointest Surg* 8, 284–293.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.*
- Brestoff, J.R., and Artis, D. (2013). Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nature Immunology* 14, 676–684.

- van den Broek, M.E., Kägi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W.K., Melief, C.J., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1996). Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J. Exp. Med.* *184*, 1781–1790.
- Bronckaers, A., Balzarini, J., and Liekens, S. (2008). The cytostatic activity of pyrimidine nucleosides is strongly modulated by *Mycoplasma hyorhinis* infection: Implications for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology* *76*, 188–197.
- 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*. *Microbiology* *154*, 571–583.
- Broussard, E.K., Kim, R., Wiley, J.C., Marquez, J.P., Annis, J.E., Pritchard, D., and Disis, M.L. (2013). Identification of Putative Immunologic Targets for Colon Cancer Prevention Based on Conserved Gene Upregulation from Preinvasive to Malignant Lesions. *Cancer Prev Res* *6*, 666–674.
- 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.
- Buettner, M., and Bode, U. (2012). Lymph node dissection—understanding the immunological function of lymph nodes. *Clin. Exp. Immunol.* *169*, 205–212.
- Bullman, S., Pedamallu, C.S., Sicinska, E., Clancy, T.E., Zhang, X., Cai, D., Neubergh, D., Huang, K., Guevara, F., Nelson, T., et al. (2017). Analysis of *Fusobacterium* persistence and antibiotic response in colorectal cancer. *Science* eaa15240.
- Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* *13*, 1–27.
- Burnet, M. (1957). Cancer—A Biological Approach. *Br Med J* *1*, 841–847.
- Burns, M.B., Montassier, E., Abrahante, J., Priya, S., Niccum, D.E., Khoruts, A., Starr, T.K., Knights, D., and Blekhman, R. (2018). Colorectal cancer mutational profiles correlate with defined microbial communities in the tumor microenvironment. *PLOS Genetics* *14*, e1007376.
- Burton, D.G.A., and Stolzing, A. (2018). Cellular senescence: Immunosurveillance and future immunotherapy. *Ageing Research Reviews* *43*, 17–25.
- Busk, M., Walenta, S., Mueller-Klieser, W., Steiniche, T., Jakobsen, S., Horsman, M.R., and Overgaard, J. (2011). Inhibition of tumor lactate oxidation: consequences for the tumor microenvironment. *Radiother Oncol* *99*, 404–411.
- Butt, J., Romero-Hernández, B., Pérez-Gómez, B., Willhauck-Fleckenstein, M., Holzinger, D., Martin, V., Moreno, V., Linares, C., Dierssen-Sotos, T., Barricarte, A., et al. (2016). Association of *Streptococcus gallolyticus* subspecies *gallolyticus* with colorectal cancer: Serological evidence. *Int. J. Cancer* *138*, 1670–1679.
- Cadet, J., Douki, T., and Ravanat, J.-L. (2010). Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radic. Biol. Med.* *49*, 9–21.
- Cai, F., Dupertuis, Y.M., and Pichard, C. (2012). Role of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation on colorectal cancer risk and treatments. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* *15*, 99–106.

Campoli, M., and Ferrone, S. (2008). HLA antigen changes in malignant cells: Epigenetic mechanisms and biologic significance. *Oncogene* 27, 5869–5885.

Cao, Y., Wu, K., Mehta, R., Drew, D.A., Song, M., Lochhead, P., Nguyen, L.H., Izard, J., Fuchs, C.S., Garrett, W.S., et al. (2018). Long-term use of antibiotics and risk of colorectal adenoma. *Gut* 67, 672–678.

Caprioli, A. (1983). Partial Purification and Characterization of an Escherichia coli Toxic Factor That Induces Morphological Cell Alterations. 39, 7.

Cario, E., Gerken, G., and Podolsky, D.K. (2007). Toll-Like Receptor 2 Controls Mucosal Inflammation by Regulating Epithelial Barrier Function. *Gastroenterology* 132, 1359–1374.

Carol, M., Lambrechts, A., Van Gossum, A., Libin, M., Goldman, M., and Mascart-Lemone, F. (1998). Spontaneous secretion of interferon  $\gamma$  and interleukin 4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes. *Gut* 42, 643–649.

Carr, P.R., Walter, V., Brenner, H., and Hoffmeister, M. (2016). Meat subtypes and their association with colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer* 138, 293–302.

Carstensen, B., Soll-Johanning, H., Villadsen, E., Søndergaard, J.O., and Lynge, E. (1996). Familial aggregation of colorectal cancer in the general population. *Int. J. Cancer* 68, 428–435.

Cassatella, M.A. (2006). On the production of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2L) by human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 79, 1140–1149.

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

Castets, M., Broutier, L., Molin, Y., Brevet, M., Chazot, G., Gadot, N., Paquet, A., Mazelin, L., Jarrosson-Wuilleme, L., Scoazec, J.-Y., et al. (2011). DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature* 482, 534–537.

Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D., and Banchereau, J. (1996). CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J. Exp. Med.* 184, 695–706.

Cepek, K.L., Shaw, S.K., Parker, C.M., Russell, G.J., Morrow, J.S., Rimm, D.L., and Brenner, M.B. (1994). Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* 372, 190–193.

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

Cerwenka, A., Bakker, A.B.H., McClanahan, T., Wagner, J., Wu, J., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (2000). Retinoic Acid Early Inducible Genes Define a Ligand Family for the Activating NKG2D Receptor in Mice. *Immunity* 12, 721–727.

Chae, W.-J., Gibson, T.F., Zelterman, D., Hao, L., Henegariu, O., and Bothwell, A.L.M. (2010). Ablation of IL-17A abrogates progression of spontaneous intestinal tumorigenesis. *PNAS* 107, 5540–5544.

- Chan, A.T., Ogino, S., and Fuchs, C.S. (2007). Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N. Engl. J. Med.* *356*, 2131–2142.
- Chan, A.T., Arber, N., Burn, J., Chia, W.K., Elwood, P., Hull, M.A., Logan, R.F., Rothwell, P.M., Schrör, K., and Baron, J.A. (2012). Aspirin in the chemoprevention of colorectal neoplasia: an overview. *Cancer Prev Res (Phila)* *5*, 164–178.
- Chan, E.C., Jiang, F., Peshavariya, H.M., and Dusting, G.J. (2009). Regulation of cell proliferation by NADPH oxidase-mediated signaling: potential roles in tissue repair, regenerative medicine and tissue engineering. *Pharmacol. Ther.* *122*, 97–108.
- Chang, Q., Bournazou, E., Sansone, P., Berishaj, M., Gao, S.P., Daly, L., Wels, J., Theilen, T., Granitto, S., Zhang, X., et al. (2013). The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis. *Neoplasia* *15*, 848–862.
- Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., and Itano, N. (2014). Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)* *6*, 1670–1690.
- Chao, A., Thun, M.J., Jacobs, E.J., Henley, S.J., Rodriguez, C., and Calle, E.E. (2000). Cigarette smoking and colorectal cancer mortality in the cancer prevention study II. *J. Natl. Cancer Inst.* *92*, 1888–1896.
- Chaput, N., Louafi, S., Bardier, A., Charlotte, F., Vaillant, J.-C., Ménégau, F., Rosenzweig, M., Lemoine, F., Klatzmann, D., and Taieb, J. (2009). Identification of CD8+ CD25+ Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut* *58*, 520–529.
- Chaput, N., Lepage, P., Coutzac, C., Soularue, E., Le Roux, K., Monot, C., Boselli, L., Routier, E., Cassard, L., Collins, M., et al. (2017). Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Annals of Oncology* *28*, 1368–1379.
- Chassaing, B., and Darfeuille-Michaud, A. (2011). The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* *140*, 1720–1728.
- Chatgililoglu, C., and O'Neill, P. (2001). Free radicals associated with DNA damage. *Experimental Gerontology* *36*, 1459–1471.
- Chen, G.Y., Shaw, M.H., Redondo, G., and Nunez, G. (2008). The Innate Immune Receptor Nod1 Protects the Intestine from Inflammation-Induced Tumorigenesis. *Cancer Research* *68*, 10060–10067.
- Chen, J., Domingue, J.C., and Sears, C.L. (2017). Microbiota dysbiosis in select human cancers: Evidence of association and causality. *Seminars in Immunology* *32*, 25–34.
- Chen, T.-C., Tsai, J.-P., Huang, H.-J., Teng, C.-C., Chien, S.-J., Kuo, H.-C., Huang, W.-S., and Chen, C.-N. (2011). Regulation of cyclooxygenase-2 expression in human bladder epithelial cells infected with type I fimbriated uropathogenic *E. coli*. *Cell. Microbiol.* *13*, 1703–1713.
- Chen, W., Liu, F., Ling, Z., Tong, X., and Xiang, C. (2012). Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS ONE* *7*, e39743.
- Chen, X., Song, M., Zhang, B., and Zhang, Y. (2016). Reactive Oxygen Species Regulate T Cell Immune Response in the Tumor Microenvironment.
- Cheroutre, H. (2004). Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 217–246.

- Cheroutre, H., Lambomez, F., and Mucida, D. (2011). The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 445–456.
- Chew, S.S., and Lubowski, D.Z. (2001). Clostridium septicum and malignancy. *ANZ J Surg* *71*, 647–649.
- Cho, I., and Blaser, M.J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics* *13*, 260–270.
- Cho, Y.B., Chun, H.-K., Yun, H.R., Kim, H.C., Yun, S.H., and Lee, W.Y. (2009). Histological grade predicts survival time associated with recurrence after resection for colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* *56*, 1335–1340.
- Christoffersson, G., Vågesjö, E., Vandooren, J., Lidén, M., Massena, S., Reinert, R.B., Brissova, M., Powers, A.C., Opdenakker, G., and Phillipson, M. (2012). VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood* *120*, 4653–4662.
- Chu, H., and Mazmanian, S.K. (2013). Innate immune recognition of the microbiota promotes host-microbial symbiosis. *Nature Immunology* *14*, 668–675.
- Chua, W., Charles, K.A., Baracos, V.E., and Clarke, S.J. (2011). Neutrophil/lymphocyte ratio predicts chemotherapy outcomes in patients with advanced colorectal cancer. *Br. J. Cancer* *104*, 1288–1295.
- Chung, C.K., Zaino, R.J., and Stryker, J.A. (1982). Colorectal carcinoma: Evaluation of histologic grade and factors influencing prognosis. *Journal of Surgical Oncology* *21*, 143–148.
- Chung, L., Thiele Orberg, E., Geis, A.L., Chan, J.L., Fu, K., DeStefano Shields, C.E., Dejea, C.M., Fathi, P., Chen, J., Finard, B.B., et al. (2018). Bacteroides fragilis Toxin Coordinates a Pro-carcinogenic Inflammatory Cascade via Targeting of Colonic Epithelial Cells. *Cell Host & Microbe* *23*, 203-214.e5.
- Cianchi, F., Cuzzocrea, S., Vinci, M.C., Messerini, L., Comin, C.E., Navarra, G., Perigli, G., Centorrino, T., Marzocco, S., Lenzi, E., et al. (2010). Heterogeneous expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase within colorectal tumors: Correlation with tumor angiogenesis. *Digestive and Liver Disease* *42*, 20–27.
- Claesson, M.J., Cusack, S., O’Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J.R., Falush, D., Dinan, T., Fitzgerald, G., et al. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*, 4586–4591.
- Clarke, C.N., and Kopetz, E.S. (2015). BRAF mutant colorectal cancer as a distinct subset of colorectal cancer: clinical characteristics, clinical behavior, and response to targeted therapies. *Journal of Gastrointestinal Oncology* *6*, 660-667–667.
- Clayton, T.A., Baker, D., Lindon, J.C., Everett, J.R., and Nicholson, J.K. (2009). Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 14728–14733.
- Clemente, C.G., Mihm, M.C., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., and Cascinelli, N. (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* *77*, 1303–1310.

- Clements, A., Young, J.C., Constantinou, N., and Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 3, 71–87.
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., and Gordon, D.M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports* 5, 58–65.
- Clevers, H. (2013). The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell* 154, 274–284.
- Colangelo, T., Polcaro, G., Muccillo, L., D’Agostino, G., Rosato, V., Ziccardi, P., Lupo, A., Mazzoccoli, G., Sabatino, L., and Colantuoni, V. (2017). Friend or foe? The tumour microenvironment dilemma in colorectal cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1867, 1–18.
- Cole, K.E., Strick, C.A., Paradis, T.J., Ogborne, K.T., Loetscher, M., Gladue, R.P., Lin, W., Boyd, J.G., Moser, B., Wood, D.E., et al. (1998). Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J. Exp. Med.* 187, 2009–2021.
- Coletta, P.L., Muller, A., and Jones (2003). Lymphodepletion in the *ApcMin/+* mouse model of intestinal tumorigenesis. *Blood* 103, 1050–1058.
- Collier-Hyams, L.S., Sloane, V., Batten, B.C., and Neish, A.S. (2005). Cutting edge: bacterial modulation of epithelial signaling via changes in neddylation of cullin-1. *J. Immunol.* 175, 4194–4198.
- Collins, D., Hogan, A.M., and Winter, D.C. (2011). Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 12, 504–512.
- Comayras, C., Tasca, C., Oswald, E., and Rycke, J.D. (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, 8.
- Compton, C.C. (2003). Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod. Pathol.* 16, 376–388.
- Compton, C.C. (2007). Optimal Pathologic Staging: Defining Stage II Disease. *Clin Cancer Res* 13, 6862s-6870s.
- Compton, C., Fenoglio-Preiser, C.M., Pettigrew, N., and Fielding, L.P. (2000). American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer* 88, 1739–1757.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* 17, 1195–1214.
- Coombes, J.L., and Maloy, K.J. (2007). Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells. *Semin. Immunol.* 19, 116–126.
- Cooper, H.S., Everley, L., Chang, W.C., Pfeiffer, G., Lee, B., Murthy, S., and Clapper, M.L. (2001). The role of mutant *Apc* in the development of dysplasia and cancer in the mouse model of dextran sulfate sodium-induced colitis. *Gastroenterology* 121, 1407–1416.
- Coppedè, F. (2014). Epigenetic biomarkers of colorectal cancer: Focus on DNA methylation. *Cancer Letters* 342, 238–247.

Cordeiro, J.V., and Jacinto, A. (2013). The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 249–262.

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. (2017). Colorectal neoplasm in cases of *Clostridium septicum* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bacteraemia. *European Journal of Internal Medicine* *41*, 68–73.

Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Lagergård, T., and Thelestam, M. (1999). The cytolethal distending toxin from the chancroid bacterium *Haemophilus ducreyi* induces cell-cycle arrest in the G2 phase. *Journal of Clinical Investigation* *103*, 107–115.

Cortes-Bratti, X., Karlsson, C., Lagergård, T., Thelestam, M., and Frisan, T. (2001). The *Haemophilus ducreyi* Cytolethal Distending Toxin Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis via the DNA Damage Checkpoint Pathways. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 5296–5302.

Corvaisier-Chiron, M., and Beauvillain, C. (2010). Les lymphocytes T régulateurs et les lymphocytes Th17 : fonctions physiologiques et pathologiques. *Revue Francophone des Laboratoires* *2010*, 31–40.

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.

Cougnoux, A., Delmas, J., Gibold, L., Faïs, 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.

Couturier-Maillard, A., Secher, T., Rehman, A., Normand, S., De Arcangelis, A., Haesler, R., Huot, L., Grandjean, T., Bressenot, A., Delanoye-Crespin, A., et al. (2013). NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *Journal of Clinical Investigation*.

Crabbé, P.A., Bazin, H., Eyssen, H., and Heremans, J.F. (1968). The normal microbial flora as a major stimulus for proliferation of plasma cells synthesizing IgA in the gut. The germ-free intestinal tract. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* *34*, 362–375.

Cremonesi, E., Governa, V., Garzon, J.F.G., Mele, V., Amicarella, F., Muraro, M.G., Trella, E., Galati-Fournier, V., Oertli, D., Däster, S.R., et al. (2018). Gut microbiota modulate T cell trafficking into human colorectal cancer. *Gut* [gutjnl-2016-313498](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313498).

Crespo-Sanjuán, J., Calvo-Nieves, M.D., Aguirre-Gervás, B., Herreros-Rodríguez, J., Velayos-Jiménez, B., Castro-Alija, M.J., Muñoz-Moreno, M.F., Sánchez, D., Zamora-González, N., Bajo-Grañeras, R., et al. (2015). Early detection of high oxidative activity in patients with adenomatous intestinal polyps and colorectal adenocarcinoma: myeloperoxidase and oxidized low-density lipoprotein in serum as new markers of oxidative stress in colorectal cancer. *Lab Med* *46*, 123–135.

Crome, S.Q., Clive, B., Wang, A.Y., Kang, C.Y., Chow, V., Yu, J., Lai, A., Ghahary, A., Broady, R., and Levings, M.K. (2010). Inflammatory effects of ex vivo human Th17 cells are suppressed by regulatory T cells. *J. Immunol.* *185*, 3199–3208.

Cross, A.J., Boca, S., Freedman, N.D., Caporaso, N.E., Huang, W.-Y., Sinha, R., Sampson, J.N., and Moore, S.C. (2014). Metabolites of tobacco smoking and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis* *35*, 1516–1522.



- Croxen, M.A., and Finlay, B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 26–38.
- Cuevas-Ramos, G., Petit, C.R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2010). *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 11537–11542.
- Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H.-J., Lynch, H.T., Minsky, B., Nordlinger, B., and Starling, N. (2010). Colorectal cancer. *Lancet* *375*, 1030–1047.
- Custodio, A., and Feliu, J. (2013). Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: beyond KRAS mutations. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *85*, 45–81.
- 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*, 70.
- Daillère, R., Vétizou, M., Waldschmitt, N., Yamazaki, T., Isnard, C., Poirier-Colame, V., Duong, C.P.M., Flament, C., Lepage, P., Roberti, M.P., et al. (2016). *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* Facilitate Cyclophosphamide-Induced Therapeutic Immunomodulatory Effects. *Immunity* *45*, 931–943.
- Dalmaso, 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.
- D’Alterio, C., Nasti, G., Polimeno, M., Ottaiano, A., Conson, M., Circelli, L., Botti, G., Scognamiglio, G., Santagata, S., De Divitiis, C., et al. (2016). CXCR4-CXCL12-CXCR7, TLR2-TLR4, and PD-1/PD-L1 in colorectal cancer liver metastases from neoadjuvant-treated patients. *Oncoimmunology* *5*, e1254313.
- Dao, T., Korontsvit, T., Zakhaleva, V., Haro, K., Packin, J., and Scheinberg, D.A. (2009). Identification of a Human Cyclin D1-Derived Peptide that Induces Human Cytotoxic CD4 T Cells. *PLOS ONE* *4*, e6730.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiaez, 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.
- De Simone, V., Ronchetti, G., Franzè, E., Colantoni, A., Ortenzi, A., Fantini, M.C., Rizzo, A., Sica, G.S., Sileri, P., Rossi, P., et al. (2015). Interleukin-21 sustains inflammatory signals that contribute to sporadic colon tumorigenesis. *Oncotarget* *6*, 9908.
- Dejea, C.M., Fathi, P., Craig, J.M., Boleij, A., Taddese, R., Geis, A.L., Wu, X., Shields, C.E.D., Hechenbleikner, E.M., and Huso, D.L. (2018). Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science* *359*, 592–597.

- Del Vecchio, F., Mastroiaco, V., Di Marco, A., Compagnoni, C., Capece, D., Zazzeroni, F., Capalbo, C., Alesse, E., and Tessitore, A. (2017). Next-generation sequencing: recent applications to the analysis of colorectal cancer. *Journal of Translational Medicine* *15*.
- Derosa, L., Routy, B., Kroemer, G., and Zitvogel, L. (2018). The intestinal microbiota determines the clinical efficacy of immune checkpoint blockers targeting PD-1/PD-L1. *Oncoimmunology* *7*, e1434468.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M.L., and Relman, D.A. (2008). The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLoS Biology* *6*, e280.
- Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M., and Raulet, D.H. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* *413*, 165–171.
- Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* *1*, 447–456.
- Dik, V.K., van Oijen, M.G.H., Smeets, H.M., and Siersema, P.D. (2016). Frequent Use of Antibiotics Is Associated with Colorectal Cancer Risk: Results of a Nested Case–Control Study. *Dig Dis Sci* *61*, 255–264.
- 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* *138*, 962–966.
- Domingo, J.L., and Nadal, M. (2017). Carcinogenicity of consumption of red meat and processed meat: A review of scientific news since the IARC decision. *Food Chem. Toxicol.* *105*, 256–261.
- Dominguez-Bello, M.G., Blaser, M.J., Ley, R.E., and Knight, R. (2011). Development of the Human Gastrointestinal Microbiota and Insights From High-Throughput Sequencing. *Gastroenterology* *140*, 1713–1719.
- Dorhoi, A., and Du Plessis, N. (2018). Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Chronic Infections. *Front Immunol* *8*.
- Doulabi, H., Rastin, M., Shabahangh, H., Maddah, G., Abdollahi, A., Nosratabadi, R., Esmaeili, S.-A., and Mahmoudi, M. (2018). Analysis of Th22, Th17 and CD4+ cells co-producing IL-17/IL-22 at different stages of human colon cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* *103*, 1101–1106.
- 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 Research* *57*, 812–814.
- Drew, D.A., Devers, T.J., O'Brien, M.J., Horelik, N.A., Levine, J., and Rosenberg, D.W. (2014). HD chromoendoscopy coupled with DNA mass spectrometry profiling identifies somatic mutations in microdissected human proximal aberrant crypt foci. *Mol. Cancer Res.* *12*, 823–829.
- Duan, J., and Kasper, D.L. (2011). Regulation of T cells by gut commensal microbiota. *Curr Opin Rheumatol* *23*, 372–376.
- Dubois, D., Delmas, J., Cady, A., Robin, F., Sivignon, A., Oswald, E., and Bonnet, R. (2010). Cyclomodulins in Urosepsis Strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* *48*, 2122–2129.

- Dubrow, R., Edberg, S., Wikfors, E., Callan, D., Troncale, F., Vender, R., Brand, M., and Yapp, R. (1991). Fecal carriage of *Streptococcus bovis* and colorectal adenomas. *Gastroenterology* *101*, 721–725.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* *3*, 991–998.
- Dunn, G.P., Koebel, C.M., and Schreiber, R.D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology* *6*, 836–848.
- Dzutsev, A., Goldszmid, R.S., Viaud, S., Zitvogel, L., and Trinchieri, G. (2015). The role of the microbiota in inflammation, carcinogenesis, and cancer therapy. *European Journal of Immunology* *45*, 17–31.
- E, J., Yan, F., Kang, Z., Zhu, L., Xing, J., and Yu, E. (2018). CD8+CXCR5+ T cells in tumor-draining lymph nodes are highly activated and predict better prognosis in colorectal cancer. *Hum. Immunol.* *79*, 446–452.
- Eaden, J.A., Abrams, K.R., and Mayberry, J.F. (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* *48*, 526–535.
- Eberhart, C.E., Coffey, R.J., Radhika, A., Giardiello, F.M., Ferrenbach, S., and DuBois, R.N. (1994). Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* *107*, 1183–1188.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* *308*, 1635–1638.
- Edge, S.B., and Compton, C.C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Annals of Surgical Oncology* *17*, 1471–1474.
- Edin, S., Wikberg, M.L., Dahlin, A.M., Rutegård, J., Öberg, Å., Oldenberg, P.-A., and Palmqvist, R. (2012). The Distribution of Macrophages with a M1 or M2 Phenotype in Relation to Prognosis and the Molecular Characteristics of Colorectal Cancer. *PLoS ONE* *7*, e47045.
- 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: Fecal microbial markers in colorectal cancer detection. *International Journal of Cancer* *141*, 2528–2536.
- El Messaoudi, S., Mouliere, F., Du Manoir, S., Bascoul-Mollevi, C., Gillet, B., Nouaille, M., Fiess, C., Crapez, E., Bibeau, F., Theillet, C., et al. (2016). Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care. *Clin. Cancer Res.* *22*, 3067–3077.
- Ellmerich, S., Schöller, M., Durantou, B., Gossé, F., Galluser, M., Klein, J.P., and Raul, F. (2000). Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. *Carcinogenesis* *21*, 753–756.
- Ellyard, J.I., Simson, L., and Parish, C.R. (2007). Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens* *70*, 1–11.
- Elzagheid, A., Emaetig, F., Alkikhia, L., Buhmeida, A., Syrjänen, K., El-Faitori, O., Latto, M., Collan, Y., and Pyrhönen, S. (2013). High cyclooxygenase-2 expression is associated with advanced stages in colorectal cancer. *Anticancer Res.* *33*, 3137–3143.

- Engel, A.M., Svane, I.M., Rygaard, J., and Werdelin, O. (1997). MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice. *Scand. J. Immunol.* *45*, 463–470.
- Engels, E.A., Pfeiffer, R.M., Fraumeni, J.F., Kasiske, B.L., Israni, A.K., Snyder, J.J., Wolfe, R.A., Goodrich, N.P., Bayakly, A.R., Clarke, C.A., et al. (2011). Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA* *306*, 1891–1901.
- Eppert, K., Scherer, S.W., Ozcelik, H., Pirone, R., Hoodless, P., Kim, H., Tsui, L.C., Bapat, B., Gallinger, S., Andrulis, I.L., et al. (1996). MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* *86*, 543–552.
- Erdman, S.E., Sohn, J.J., Rao, V.P., Nambiar, P.R., Ge, Z., Fox, J.G., and Schauer, D.B. (2005). CD4+ CD25+ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in ApcMin/+ mice. *Cancer Research* *65*, 3998–4004.
- Erreni, M., Mantovani, A., and Allavena, P. (2011). Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer. *Cancer Microenvironment* *4*, 141–154.
- Escobar-Páramo, P., Grenet, K., Le Menac’h, A., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Rahimy, M.C., Andremont, A., et al. (2004). Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 5698–5700.
- Espín, J.C., González-Sarriás, A., and Tomás-Barberán, F.A. (2017). The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. *Biochem. Pharmacol.* *139*, 82–93.
- Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Cooke, M.S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* *567*, 1–61.
- Eyking, A., Ey, B., Rünzi, M., Roig, A.I., Reis, H., Schmid, K.W., Gerken, G., Podolsky, D.K., and Cario, E. (2011). Toll-like receptor 4 variant D299G induces features of neoplastic progression in Caco-2 intestinal cells and is associated with advanced human colon cancer. *Gastroenterology* *141*, 2154–2165.
- Faïs, T., Delmas, J., Barnich, N., Bonnet, R., and Dalmasso, G. (2018). Colibactin: More Than a New Bacterial Toxin. *Toxins (Basel)* *10*.
- Falk, P.G., Hooper, L.V., Midtvedt, T., and Gordon, J.I. (1998). Creating and Maintaining the Gastrointestinal Ecosystem: What We Know and Need To Know from Gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev* *62*, 1157–1170.
- Farraye, F.A., Odze, R.D., Eaden, J., and Itzkowitz, S.H. (2010). AGA technical review on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *138*, 746–774, 774.e1-4; quiz e12-13.
- 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, Q., Liang, S., Jia, H., Stadlmayr, A., Tang, L., Lan, Z., Zhang, D., Xia, H., Xu, X., Jie, Z., et al. (2015). Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nat Commun* 6, 6528.
- Feng, T., Wang, L., Schoeb, T.R., Elson, C.O., and Cong, Y. (2010). Microbiota innate stimulation is a prerequisite for T cell spontaneous proliferation and induction of experimental colitis. *The Journal of Experimental Medicine* 207, 1321–1332.
- 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.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Dyba, T., Randi, G., Bettio, M., Gavin, A., Visser, O., and Bray, F. (2018). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European Journal of Cancer*.
- Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M., and Münz, C. (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J. Exp. Med.* 195, 343–351.
- Ferrone, C., and Dranoff, G. (2010). Dual Roles for Immunity in Gastrointestinal Cancers. *JCO* 28, 4045–4051.
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., and Huelsken, J. (2007). Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7551–7559.
- Finn, O.J. (2008). Cancer immunology. *N. Engl. J. Med.* 358, 2704–2715.
- Finn, O.J. (2018). A Believer’s Overview of Cancer Immunosurveillance and Immunotherapy. *The Journal of Immunology* 200, 385–391.
- Fiorelli, V., Gendelman, R., Sirianni, M.C., Chang, H.K., Colombini, S., Markham, P.D., Monini, P., Sonnabend, J., Pintus, A., Gallo, R.C., et al. (1998). gamma-Interferon produced by CD8+ T cells infiltrating Kaposi’s sarcoma induces spindle cells with angiogenic phenotype and synergy with human immunodeficiency virus-1 Tat protein: an immune response to human herpesvirus-8 infection? *Blood* 91, 956–967.
- Flemer, B., Herlihy, M., O’Riordain, M., Shanahan, F., and O’Toole, P.W. (2018). Tumour-associated and non-tumour-associated microbiota: Addendum. *Gut Microbes* 1–5.
- Fletcher, R., Wang, Y.-J., Schoen, R.E., Finn, O.J., Yu, J., and Zhang, L. (2018). Colorectal cancer prevention: Immune modulation taking the stage. *Biochim. Biophys. Acta* 1869, 138–148.
- van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 241–260.
- Flossmann, E., and Rothwell, P.M. (2007a). Commentary: aspirin and colorectal cancer an epidemiological success story. *Int J Epidemiol* 36, 962–965.
- Flossmann, E., and Rothwell, P.M. (2007b). Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. *The Lancet* 369, 1603–1613.

Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T., and Roth, J. (2007). S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 28–37.

Formica, V. (2014). Immune reaction and colorectal cancer: Friends or foes? *World Journal of Gastroenterology* *20*, 12407.

Forsberg, L., de Faire, U., and Morgenstern, R. (2001). Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch. Biochem. Biophys.* *389*, 84–93.

Forssell, J., Oberg, A., Henriksson, M.L., Stenling, R., Jung, A., and Palmqvist, R. (2007). High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin. Cancer Res.* *13*, 1472–1479.

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.

Freisling, H., Arnold, M., Soerjomataram, I., O’Doherty, M.G., Ordóñez-Mena, J.M., Bamia, C., Kampman, E., Leitzmann, M., Romieu, I., Kee, F., et al. (2017). Comparison of general obesity and measures of body fat distribution in older adults in relation to cancer risk: meta-analysis of individual participant data of seven prospective cohorts in Europe. *British Journal of Cancer* *116*, 1486–1497.

Freter, R., Brickner, H., Fekete, J., Vickerman, M.M., and Carey, E. (1983). Survival and Implantation of *Escherichia coli* in the Intestinal Tract. *INFECT. IMMUN.* *39*, 18.

Frick, V.O., Rubie, C., Keilholz, U., and Ghadjar, P. (2016). Chemokine/chemokine receptor pair CCL20/CCR6 in human colorectal malignancy: An overview. *World J Gastroenterol* *22*, 833–841.

Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., and Albelda, S.M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- $\beta$ : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* *16*, 183–194.

Fridman, W.H. (2018). From Cancer Immune Surveillance to Cancer Immunoediting: Birth of Modern Immuno-Oncology. *The Journal of Immunology* *201*, 825–826.

Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 298–306.

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

Fuchs, C.S., Giovannucci, E.L., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Speizer, F.E., and Willett, W.C. (1994). A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *331*, 1669–1674.

Funada, Y., Noguchi, T., Kikuchi, R., Takeno, S., Uchida, Y., and Gabbert, H.E. (2003). Prognostic significance of CD8<sup>+</sup> T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* *10*, 309–313.

Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., et al. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* *504*, 446–450.

- Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lécuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., et al. (2009). The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. *Immunity* 31, 677–689.
- Gabriel, E., Attwood, K., Al-Sukhni, E., Erwin, D., Boland, P., and Nurkin, S. (2018). Age-related rates of colorectal cancer and the factors associated with overall survival. *J Gastrointest Oncol* 9, 96–110.
- Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9, 162–174.
- Gagnière, J., Raisch, J., Veziat, J., Barnich, N., Bonnet, R., Buc, E., Bringer, M.-A., Pezet, D., and Bonnet, M. (2016). Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 22, 501–518.
- 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.* 131, 471–485.
- Gajewski, T.F., Schreiber, H., and Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* 14, 1014–1022.
- Galdiero, M.R., Bonavita, E., Barajon, I., Garlanda, C., Mantovani, A., and Jaillon, S. (2013). Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* 218, 1402–1410.
- Galdiero, M.R., Varricchi, G., Loffredo, S., Mantovani, A., and Marone, G. (2018a). Roles of neutrophils in cancer growth and progression. *Journal of Leukocyte Biology* 103, 457–464.
- Galdiero, M.R., Varricchi, G., Loffredo, S., Mantovani, A., and Marone, G. (2018b). Roles of neutrophils in cancer growth and progression. *Journal of Leukocyte Biology* 103, 457–464.
- Galiatsatos, P., and Foulkes, W.D. (2006). Familial adenomatous polyposis. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 385–398.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* 313, 1960–1964.
- Galon, J., Pagès, F., Marincola, F.M., Angell, H.K., Thurin, M., Lugli, A., Zlobec, I., Berger, A., Bifulco, C., and Botti, G. (2012). Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *Journal of Translational Medicine* 10, 205.
- Galon, J., Bindea, G., Mlecnik, B., Angell, H., Lagorce, C., Toldosi, A.M., Berger, A., and Pagès, F. (2014). Microenvironnement immunitaire et cancer - Intérêt de l'immunoscore pour prédire l'évolution clinique. *Med Sci (Paris)* 30, 439–444.
- Galon, J., Fox, B.A., Bifulco, C.B., Masucci, G., Rau, T., Botti, G., Marincola, F.M., Ciliberto, G., Pages, F., Ascierto, P.A., et al. (2016). Immunoscore and Immunoprofiling in cancer: an update from the melanoma and immunotherapy bridge 2015. *Journal of Translational Medicine* 14.
- Ganal, S.C., Sanos, S.L., Kallfass, C., Oberle, K., Johner, C., Kirschning, C., Lienenklaus, S., Weiss, S., Staeheli, P., Aichele, P., et al. (2012). Priming of Natural Killer Cells by Nonmucosal Mononuclear Phagocytes Requires Instructive Signals from Commensal Microbiota. *Immunity* 37, 171–186.

- Ganz, T. (2000). Paneth cells--guardians of the gut cell hatchery. *Nat. Immunol.* *1*, 99–100.
- Garland, C.D., Lee, A., and Dickson, M.R. (1982). Segmented filamentous bacteria in the rodent small intestine: Their colonization of growing animals and possible role in host resistance to *Salmonella*. *Microbial Ecology* *8*, 181–190.
- Garrigou, S., Perkins, G., Garlan, F., Normand, C., Didelot, A., Le Corre, D., Peyvandi, S., Mulot, C., Niarra, R., Aucouturier, P., et al. (2016). A Study of Hypermethylated Circulating Tumor DNA as a Universal Colorectal Cancer Biomarker. *Clin. Chem.* *62*, 1129–1139.
- Gatti, R.A., and Good, R.A. (1971). Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* *28*, 89–98.
- Geis, A.L., Fan, H., Wu, X., Wu, S., Huso, D.L., Wolfe, J.L., Sears, C.L., Pardoll, D.M., and Housseau, F. (2015). Regulatory T cell response to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* colonization triggers IL-17-dependent colon carcinogenesis. *Cancer Discov* *5*, 1098–1109.
- Geller, L.T., Barzily-Rokni, M., Danino, T., Jonas, O.H., Shental, N., Nejman, D., Gavert, N., Zwang, Y., Cooper, Z.A., Shee, K., et al. (2017). Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science* *357*, 1156–1160.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* *195*, 327–333.
- Gharagozloo, M., Kalantari, H., Rezaei, A., Maracy, M.R., Salehi, M., Bahador, A., Hassannejad, N., Narimani, M., Sanej, M.H., Bayat, B., et al. (2015). The decrease in NKG2D+ Natural Killer cells in peripheral blood of patients with metastatic colorectal cancer. *Bratisl Lek Listy* *116*, 296–301.
- Ghuman, S., Van Hemelrijck, M., Garmo, H., Holmberg, L., Malmström, H., Lambe, M., Hammar, N., Walldius, G., Jungner, I., and Wulaningsih, W. (2017). Serum inflammatory markers and colorectal cancer risk and survival. *Br. J. Cancer* *116*, 1358–1365.
- Giovannucci, E. (1995). Insulin and colon cancer. *Cancer Causes Control* *6*, 164–179.
- Girardi, M., Oppenheim, D.E., Steele, C.R., Lewis, J.M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* *294*, 605–609.
- Gold, J.S., Bayar, S., and Salem, R.R. (2004). Association of *Streptococcus bovis* bacteremia with colonic neoplasia and extracolonic malignancy. *Arch Surg* *139*, 760–765.
- Goodwin, A.C., Shields, C.E.D., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*, 15354–15359.
- Gopalakrishnan, V., Spencer, C.N., Nezi, L., Reuben, A., Andrews, M.C., Karpinets, T.V., Prieto, P.A., Vicente, D., Hoffman, K., Wei, S.C., et al. (2018). Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* *eaan4236*.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 953–964.



- Goss, K.H., and Groden, J. (2000). Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J. Clin. Oncol.* *18*, 1967–1979.
- Grady, W.M., and Pritchard, C.C. (2014). Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicol Pathol* *42*, 124–139.
- Graham, R.P., Vierkant, R.A., Tillmans, L.S., Wang, A.H., Laird, P.W., Weisenberger, D.J., Lynch, C.F., French, A.J., Slager, S.L., Raissian, Y., et al. (2015). Tumor Budding in Colorectal Carcinoma: Confirmation of Prognostic Significance and Histologic Cutoff in a Population-based Cohort. *Am. J. Surg. Pathol.* *39*, 1340–1346.
- Grahn, N., Hmani-Aifa, M., Fransén, K., Söderkvist, P., and Monstein, H.-J. (2005). Molecular identification of *Helicobacter* DNA present in human colorectal adenocarcinomas by 16S rDNA PCR amplification and pyrosequencing analysis. *J. Med. Microbiol.* *54*, 1031–1035.
- Graillet, V., Dormoy, I., Dupuy, J., Shay, J.W., Huc, L., Mirey, G., and Vignard, J. (2016). Genotoxicity of Cytolethal Distending Toxin (CDT) on Isogenic Human Colorectal Cell Lines: Potential Promoting Effects for Colorectal Carcinogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* *6*.
- Grancher, A., Michel, P., Di Fiore, F., and Sefrioui, D. (2018). [Aspirin and colorectal cancer]. *Bull Cancer* *105*, 171–180.
- Granot, Z., Henke, E., Comen, E.A., King, T.A., Norton, L., and Benezra, R. (2011). Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell* *20*, 300–314.
- Gras Navarro, A., Björklund, A.T., and Chekenya, M. (2015). Therapeutic potential and challenges of natural killer cells in treatment of solid tumors. *Front Immunol* *6*, 202.
- Grassl, C., Luckow, B., Schlöndorff, D., and Dendorfer, U. (1999). Transcriptional regulation of the interleukin-6 gene in mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* *10*, 1466–1477.
- Greene, F.L., Stewart, A.K., and Norton, H.J. (2002). A New TNM Staging Strategy for Node-Positive (Stage III) Colon Cancer. *Ann Surg* *236*, 416–421.
- Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destrée, O., Kielman, M., and Clevers, H. (2005). Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* *129*, 626–638.
- Grivennikov, S.I. (2013). Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Seminars in Immunopathology* *35*, 229–244.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* *140*, 883–899.
- Grivennikov, S.I., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C.A., Schnabl, B., Jauch, D., Taniguchi, K., Yu, G.-Y., Österreicher, C.H., Hung, K.E., et al. (2012). Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* *491*, 254–258.
- Grizzi, F. (2013). Prognostic value of innate and adaptive immunity in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* *19*, 174.
- Grosse-Steffen, T., Giese, T., Giese, N., Longerich, T., Schirmacher, P., Hänsch, G.M., and Gaida, M.M. (2012). Epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma and pancreatic

tumor cell lines: the role of neutrophils and neutrophil-derived elastase. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 720768.

Guastadisegni, C., Colafranceschi, M., Ottini, L., and Dogliotti, E. (2010). Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur. J. Cancer* 46, 2788–2798.

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.

Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., et al. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine* 21, 1350–1356.

Güngör, N., Knaapen, A.M., Munnia, A., Peluso, M., Haenen, G.R., Chiu, R.K., Godschalk, R.W.L., and van Schooten, F.J. (2010). Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. *Mutagenesis* 25, 149–154.

Gunter, M.J., Probst-Hensch, N.M., Cortessis, V.K., Kulldorff, M., Haile, R.W., and Sinha, R. (2005). Meat intake, cooking-related mutagens and risk of colorectal adenoma in a sigmoidoscopy-based case-control study. *Carcinogenesis* 26, 637–642.

Guo, Y., and Li, H.-Y. (2014). Association between *Helicobacter pylori* infection and colorectal neoplasm risk: a meta-analysis based on East Asian population. *J Cancer Res Ther* 10 Suppl, 263–266.

Guo, S., Li, L., Xu, B., Li, M., Zeng, Q., Xiao, H., Xue, Y., Wu, Y., Wang, Y., Liu, W., et al. (2018). A Simple and Novel Fecal Biomarker for Colorectal Cancer: Ratio of *Fusobacterium Nucleatum* to Probiotics Populations, Based on Their Antagonistic Effect. *Clin. Chem.*

Gupta, R.A., and Dubois, R.N. (2001). Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat. Rev. Cancer* 1, 11–21.

Guthrie, L., Gupta, S., Daily, J., and Kelly, L. (2017). Human microbiome signatures of differential colorectal cancer drug metabolism. *NPJ Biofilms Microbiomes* 3, 27.

Gutting, T., Burgermeister, E., Härtel, N., and Ebert, M.P. (2018). Checkpoints and beyond – Immunotherapy in colorectal cancer. *Seminars in Cancer Biology.*

Guyton, K., and Alverdy, J.C. (2017). The gut microbiota and gastrointestinal surgery. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 43–54.

Hacker, J., and Kaper, J.B. (2000). Pathogenicity Islands and the Evolution of Microbes. *Annual Review of Microbiology* 54, 641–679.

Haghjoo, E., and Galan, J.E. (2004). *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 4614–4619.

Hagymási, K., and Tulassay, Z. (2014). *Helicobacter pylori* infection: New pathogenetic and clinical aspects. *World Journal of Gastroenterology* 20, 6386.

Hakansson, A., and Molin, G. (2011). Gut Microbiota and Inflammation. *Nutrients* 3, 637–682.

- Half, E., Bercovich, D., and Rozen, P. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis* 4, 22.
- Hall, J.A., Bouladoux, N., Sun, C.M., Wohlfert, E.A., Blank, R.B., Zhu, Q., Grigg, M.E., Berzofsky, J.A., and Belkaid, Y. (2008). Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. *Immunity* 29, 637–649.
- Hall, L.J., Faivre, E., Quinlan, A., Shanahan, F., Nally, K., and Melgar, S. (2011). Induction and Activation of Adaptive Immune Populations During Acute and Chronic Phases of a Murine Model of Experimental Colitis. *Digestive Diseases and Sciences* 56, 79–89.
- Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., Kiyono, H., et al. (2002). Identification of Multiple Isolated Lymphoid Follicles on the Antimesenteric Wall of the Mouse Small Intestine. *The Journal of Immunology* 168, 57–64.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., and Winterbourn, C.C. (1998). Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood* 92, 3007–3017.
- Han, F., Shang, X., Wan, F., Liu, Z., Tian, W., Wang, D., Liu, Y., Wang, Y., Zhang, B., and Ju, Y. (2018). Clinical value of the preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio and red blood cell distribution width in patients with colorectal carcinoma. *Oncology Letters* 15, 3339–3349.
- Han, S.-W., Kim, H.-P., Shin, J.-Y., Jeong, E.-G., Lee, W.-C., Lee, K.-H., Won, J.-K., Kim, T.-Y., Oh, D.-Y., Im, S.-A., et al. (2013). Targeted Sequencing of Cancer-Related Genes in Colorectal Cancer Using Next-Generation Sequencing. *PLoS One* 8.
- Han, Y.W., Ikegami, A., Rajanna, C., Kawsar, H.I., Zhou, Y., Li, M., Sojar, H.T., Genco, R.J., Kuramitsu, H.K., and Deng, C.X. (2005). Identification and Characterization of a Novel Adhesin Unique to Oral Fusobacteria. *J Bacteriol* 187, 5330–5340.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Handa, O., Naito, Y., and Yoshikawa, T. (2010). *Helicobacter pylori*: a ROS-inducing bacterial species in the stomach. *Inflammation Research* 59, 997–1003.
- Haque, T., Greene, K.G., and Crockett, S.D. (2014). Serrated neoplasia of the colon: what do we really know? *Curr Gastroenterol Rep* 16, 380.
- zur Hausen, H. (2009). The search for infectious causes of human cancers: Where and why. *Virology* 392, 1–10.
- Hawcroft, G., Ko, C.W.S., and Hull, M.A. (2007). Prostaglandin E2-EP4 receptor signalling promotes tumorigenic behaviour of HT-29 human colorectal cancer cells. *Oncogene* 26, 3006–3019.
- Healy, A.R., Nikolayevskiy, H., Patel, J.R., Crawford, J.M., and Herzon, S.B. (2016). A Mechanistic Model for Colibactin-Induced Genotoxicity. *J Am Chem Soc* 138, 15563–15570.
- Hendrickson, H. (2009). Order and Disorder during *Escherichia coli* Divergence. *PLOS Genetics* 5, e1000335.

- Hensley, K., and Floyd, R.A. (2002). Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 377–383.
- Hermesen, J.L., Schurr, M.J., Kudsk, K.A., and Faucher, L.D. (2008). Phenotyping *Clostridium septicum* Infection: A Surgeon's Infectious Disease. *Journal of Surgical Research* 148, 67–76.
- Hickey, T.E., Majam, G., and Guerry, P. (2005). Intracellular Survival of *Campylobacter jejuni* in Human Monocytic Cells and Induction of Apoptotic Death by Cytholethal Distending Toxin. *Infection and Immunity* 73, 5194–5197.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., and Hatakeyama, M. (2002). SHP-2 Tyrosine Phosphatase as an Intracellular Target of *Helicobacter pylori* CagA Protein. *Science* 295, 683–686.
- Hill, M.J., Drasar, B.S., Hawksworth, G., Aries, V., Crowther, J.S., and Williams, R.E. (1971). Bacteria and aetiology of cancer of large bowel. *Lancet* 1, 95–100.
- Hoffman, W., Lakkis, F.G., and Chalasani, G. (2016). B Cells, Antibodies, and More. *Clin J Am Soc Nephrol* 11, 137–154.
- Hohenberger, P., and Herfarth, C. (1994). Pre- and Postoperative Carcinoembryonic Antigen Determinations in Hepatic Resection for Colorectal Metastases. *Ann. Surg.* 9.
- Holmdahl, R., Sareila, O., Olsson, L.M., Bäckdahl, L., and Wing, K. (2016). Ncf1 polymorphism reveals oxidative regulation of autoimmune chronic inflammation. *Immunological Reviews* 269, 228–247.
- Homann, N. (2001). Alcohol and upper gastrointestinal tract cancer: the role of local acetaldehyde production. *Addict Biol* 6, 309–323.
- Hooper, L.V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P.G., and Gordon, J.I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 291, 881–884.
- Hoppes, W.L., and Lerner, P.I. (1974). Nonenterococcal group-D streptococcal endocarditis caused by *Streptococcus bovis*. *Ann. Intern. Med.* 81, 588–593.
- Hoshi, T., and Heinemann, S. (2001). Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J. Physiol. (Lond.)* 531, 1–11.
- Housseau, F., and Sears, C.L. (2010). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF)-mediated colitis in Min (Apc+/-) mice. *Cell Cycle* 9, 3–5.
- Housseau, F., Wu, S., Wick, E.C., Fan, H., Wu, X., Llosa, N.J., Smith, K.N., Tam, A., Ganguly, S., Wanyiri, J.W., et al. (2016). Redundant Innate and Adaptive Sources of IL17 Production Drive Colon Tumorigenesis. *Cancer Res.* 76, 2115–2124.
- Howe, J.R., Mitros, F.A., and Summers, R.W. (1998). The risk of gastrointestinal carcinoma in familial juvenile polyposis. *Ann. Surg. Oncol.* 5, 751–756.
- Huang, J.Y., Lee, S.M., and Mazmanian, S.K. (2011). The human commensal *Bacteroides fragilis* binds intestinal mucin. *Anaerobe* 17, 137–141.

Huang, W.-W., Hsieh, K.-P., Huang, R.-Y., and Yang, Y.-H. (2017). Role of cyclooxygenase-2 inhibitors in the survival outcome of colorectal cancer patients: A population-based cohort study. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 33, 308–314.

Huber, S., Gagliani, N., Zenewicz, L.A., Huber, F.J., Bosurgi, L., Hu, B., Hedl, M., Zhang, W., O'Connor, W., Murphy, A.J., et al. (2012). IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* 491, 259–263.

Huh, J.W., Kim, H.R., and Kim, Y.J. (2010). Lymphovascular or perineural invasion may predict lymph node metastasis in patients with T1 and T2 colorectal cancer. *J. Gastrointest. Surg.* 14, 1074–1080.

Humphries, A., and Wright, N.A. (2008). Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 415–424.

Huxley, R.R., Ansary-Moghaddam, A., Clifton, P., Czernichow, S., Parr, C.L., and Woodward, M. (2009). The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: A quantitative overview of the epidemiological evidence. *International Journal of Cancer* 125, 171–180.

Huycke, M., and R Moore, D. (2002). In vivo production of hydroxyl radical by *Enterococcus faecalis* colonizing the intestinal tract using aromatic hydroxylation. *Free Radical Biology & Medicine* 33, 818–826.

Huycke, M.M., Moore, D., Joyce, W., Wise, P., Shepard, L., Kotake, Y., and Gilmore, M.S. (2001). Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases. *Molecular Microbiology* 42, 729–740.

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. (2013). Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science* 342, 967–970.

Iizumi, T., Battaglia, T., Ruiz, V., and Perez Perez, G.I. (2017). Gut Microbiome and Antibiotics. *Arch. Med. Res.* 48, 727–734.

Imai, Y., Kubota, Y., Yamamoto, S., Tsuji, K., Shimatani, M., Shibatani, N., Takamido, S., Matsushita, M., and Okazaki, K. (2005). Neutrophils enhance invasion activity of human cholangiocellular carcinoma and hepatocellular carcinoma cells: an in vitro study. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20, 287–293.

Irrazabal, T., and Martin, A. (2015). T Regulatory Cells Gone Bad: An Oncogenic Immune Response against Enterotoxigenic *B. fragilis* Infection Leads to Colon Cancer. *Cancer Discov* 5, 1021–1023.

Irrazábal, T., Belcheva, A., Girardin, S.E., Martin, A., and Philpott, D.J. (2014). The Multifaceted Role of the Intestinal Microbiota in Colon Cancer. *Molecular Cell* 54, 309–320.

Isomoto, H., Moss, J., and Hirayama, T. (2010). Pleiotropic actions of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA. *Tohoku J. Exp. Med.* 220, 3–14.

Itatani, Y., Kawada, K., Inamoto, S., Yamamoto, T., Ogawa, R., Taketo, M.M., and Sakai, Y. (2016). The Role of Chemokines in Promoting Colorectal Cancer Invasion/Metastasis. *Int J Mol Sci* 17.

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. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139, 485–498.

Jakubowska, K., Kisielowski, W., Kańczuga-Koda, L., Koda, M., and Famulski, W. (2017). Diagnostic value of inflammatory cell infiltrates, tumor stroma percentage and disease-free survival in patients with colorectal cancer. *Oncology Letters*.

Janakiram, N.B., and Rao, C.V. (2014). The Role of Inflammation in Colon Cancer. *Inflammation and Cancer* 25–52.

Janakiram, N.B., Mohammed, A., and Rao, C.V. (2011). Role of lipoxins, resolvins, and other bioactive lipids in colon and pancreatic cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 30, 507–523.

Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., and Reddy, D.N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 21, 8787–8803.

Jang, T.J. (2013). Progressive Increase of Regulatory T Cells and Decrease of CD8+ T Cells and CD8+ T Cells/Regulatory T Cells Ratio during Colorectal Cancer Development, Progressive Increase of Regulatory T Cells and Decrease of CD8+ T Cells and CD8+ T Cells/Regulatory T Cells Ratio during Colorectal Cancer Development. *The Korean Journal of Pathology, The Korean Journal of Pathology* 47, 443–451.

Jasperson, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W., and Burt, R.W. (2010). Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* 138, 2044–2058.

Jass, J.R. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50, 113–130.

Jauregui, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbonnelle, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., et al. (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 9, 560.

Jayakumar, A., and Bothwell, A.L.M. (2017). Stat6 Promotes Intestinal Tumorigenesis in a Mouse Model of Adenomatous Polyposis by Expansion of MDSCs and Inhibition of Cytotoxic CD8 Response. *Neoplasia* 19, 595–605.

Jenkins, R.W., Barbie, D.A., and Flaherty, K.T. (2018). Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer* 118, 9–16.

Jess, T., Rungoe, C., and Peyrin-Biroulet, L. (2012). Risk of Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis: A Meta-analysis of Population-Based Cohort Studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 10, 639–645.

Jinadasa, R.N., Bloom, S.E., Weiss, R.S., and Duhamel, G.E. (2011). Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology* 157, 1851–1875.

Johnson, C.H., Dejea, C.M., Edler, D., Hoang, L.T., Santidrian, A.F., Felding, B.H., Ivanisevic, J., Cho, K., Wick, E.C., Hechenbleikner, E.M., et al. (2015). Metabolism links bacterial biofilms and colon carcinogenesis. *Cell Metab.* 21, 891–897.

Johnson, J.R., Johnston, B., Kuskowski, M.A., Nougayrede, J.-P., and Oswald, E. (2008). Molecular Epidemiology and Phylogenetic Distribution of the *Escherichia coli* pks Genomic Island. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 3906–3911.

- Jones, M., Helliwell, P., Pritchard, C., Tharakan, J., and Mathew, J. (2007). *Helicobacter pylori* in colorectal neoplasms: is there an aetiological relationship? *World J Surg Oncol* 5, 51.
- Jones, R.P., Jackson, R., Dunne, D.F.J., Malik, H.Z., Fenwick, S.W., Poston, G.J., and Ghaneh, P. (2012). Systematic review and meta-analysis of follow-up after hepatectomy for colorectal liver metastases. *Br J Surg* 99, 477–486.
- Kaffarnik, M.F., Urban, M., Hopt, U.T., and Utzolino, S. (2012). Impact of enterococcus on immunocompetent and immunosuppressed patients with perforation of the small or large bowel. *Technol Health Care* 20, 37–48.
- Kao, H., Amoscato, A.A., Ciborowski, P., and Finn, O.J. (2001). A new strategy for tumor antigen discovery based on in vitro priming of naive T cells with dendritic cells. *Clin. Cancer Res.* 7, 773s-780s.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon  $\gamma$ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *PNAS* 95, 7556–7561.
- Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R.S. (2010). Inflammatory Bowel Disease. *Annu Rev Immunol* 28, 573–621.
- Kawamori, T. (2003). Enhancement of colon carcinogenesis by prostaglandin E2 administration. *Carcinogenesis* 24, 985–990.
- Kayama, H., and Takeda, K. (2012). Regulation of intestinal homeostasis by innate and adaptive immunity. *Int Immunol* 24, 673–680.
- Keeley, E.C., Mehrad, B., and Strieter, R.M. (2010). Chapter 3 - CXC Chemokines in Cancer Angiogenesis and Metastases. In *Advances in Cancer Research*, G.F. Vande Woude, and G. Klein, eds. (Academic Press), pp. 91–111.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 677–704.
- Kettunen, H.L., Kettunen, A.S.L., and Rautonen, N.E. (2003). Intestinal Immune Responses in Wild-Type and *ApcMin*<sup>+/+</sup> Mouse, a Model for Colon Cancer. 8.
- Khan, Z., Siddiqui, N., and Saif, M.W. (2018). Enterococcus Faecalis Infective Endocarditis and Colorectal Carcinoma: Case of New Association Gaining Ground. *Gastroenterology Res* 11, 238–240.
- Khong, H.T., and Restifo, N.P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat. Immunol.* 3, 999–1005.
- 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, S., and Jazwinski, S.M. (2018). The Gut Microbiota and Healthy Aging: A Mini-Review. *Gerontology* 1–8.
- Kim, Y.S., and Ho, S.B. (2010). Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Curr Gastroenterol Rep* 12, 319–330.

- Kim, D., Zeng, M.Y., and Núñez, G. (2017). The interplay between host immune cells and gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *Experimental & Molecular Medicine* 49, e339.
- Kim, I.S., Yoo, D.-H., Jung, I.-H., Lim, S., Jeong, J.-J., Kim, K.-A., Bae, O.-N., Yoo, H.H., and Kim, D.-H. (2016). Reduced metabolic activity of gut microbiota by antibiotics can potentiate the antithrombotic effect of aspirin. *Biochemical Pharmacology* 122, 72–79.
- Kim, J.M., Cho, S.J., Oh, Y.-K., Jung, H.-Y., Kim, Y.-J., and Kim, N. (2002). Nuclear factor-kappa B activation pathway in intestinal epithelial cells is a major regulator of chemokine gene expression and neutrophil migration induced by *Bacteroides fragilis* enterotoxin. *Clin. Exp. Immunol.* 130, 59–66.
- Kim, J.M., Jung, H.Y., Lee, J.Y., Youn, J., Lee, C.-H., and Kim, K.-H. (2005a). Mitogen-activated protein kinase and activator protein-1 dependent signals are essential for *Bacteroides fragilis* enterotoxin-induced enteritis. *European Journal of Immunology* 35, 2648–2657.
- Kim, J.M., Lee, J.Y., and Kim, Y.-J. (2008). Inhibition of apoptosis in *Bacteroides fragilis* enterotoxin-stimulated intestinal epithelial cells through the induction of c-IAP-2. *European Journal of Immunology* 38, 2190–2199.
- Kim, K.J., Chung, J.W., and Kim, K.S. (2005b). 67-kDa Laminin Receptor Promotes Internalization of Cytotoxic Necrotizing Factor 1-expressing *Escherichia coli* K1 into Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 280, 1360–1368.
- Kim, N.H., Yang, H.-J., Park, S.-K., Park, J.H., Park, D.I., Sohn, C.I., and Jung, Y.S. (2018). The risk of colorectal neoplasia can be different according to the types of family members affected by colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 33, 397–403.
- Kim, Y.W., Kim, S.-K., Kim, C.S., Kim, I.Y., Cho, M.Y., and Kim, N.K. (2014). Association of Serum and Intratumoral Cytokine Profiles with Tumor Stage and Neutrophil Lymphocyte Ratio in Colorectal Cancer. *Anticancer Res* 34, 3481–3487.
- Kinlen, L.J., Webster, A.D., Bird, A.G., Haile, R., Peto, J., Soothill, J.F., and Thompson, R.A. (1985). Prospective study of cancer in patients with hypogammaglobulinaemia. *Lancet* 1, 263–266.
- Kirkali, G., Keles, D., Canda, A.E., Terzi, C., Reddy, P.T., Jaruga, P., Dizdaroglu, M., and Oktay, G. (2011). Evidence for upregulated repair of oxidatively induced DNA damage in human colorectal cancer. *DNA Repair (Amst)* 10, 1114–1120.
- Kirschenbaum, A., Liotta, D.R., Yao, S., Liu, X.H., Klausner, A.P., Unger, P., Shapiro, E., Leav, I., and Levine, A.C. (2000). Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human fetal and adult male reproductive tracts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 3436–3441.
- Kjeldsen, L., Sengelsv, H., and Borregaard, N. Identification of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as Novel Matrix Protein of Specific Granuleins Human Neutrophils. 10.
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., and Hocevar, B.A. (2010). Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 38, 96–109.
- Klebanoff, S.J., Kettle, A.J., Rosen, H., Winterbourn, C.C., and Nauseef, W.M. (2013). Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol* 93, 185–198.



- Klein, R.S., Catalano, M.T., Edberg, S.C., Casey, J.I., and Steigbigel, N.H. (1979). Streptococcus bovis septicemia and carcinoma of the colon. *Ann. Intern. Med.* 91, 560–562.
- Kloor, M., Becker, C., Benner, A., Woerner, S.M., Gebert, J., Ferrone, S., and Doeberitz, M. von K. (2005). Immunoselective Pressure and Human Leukocyte Antigen Class I Antigen Machinery Defects in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers. *Cancer Res* 65, 6418–6424.
- Ko, S.H., Rho, D.J., Jeon, J.I., Kim, Y.-J., Woo, H.A., Lee, Y.K., and Kim, J.M. (2016). Bacteroides fragilis Enterotoxin Upregulates Heme Oxygenase-1 in Intestinal Epithelial Cells via a Mitogen-Activated Protein Kinase- and NF- $\kappa$ B-Dependent Pathway, Leading to Modulation of Apoptosis. *Infection and Immunity* 84, 2541–2554.
- Kobayashi, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kamada, N., Chinen, H., Saito, R., Kitazume, M.T., Nakazawa, A., Sugita, A., Koganei, K., et al. (2008). IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn’s disease. *Gut* 57, 1682–1689.
- Koch, M., Beckhove, P., Op den Winkel, J., Autenrieth, D., Wagner, P., Nummer, D., Specht, S., Antolovic, D., Galindo, L., Schmitz-Winnenthal, F.H., et al. (2006). Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxic activity in situ. *Ann. Surg.* 244, 986–992; discussion 992-993.
- Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 903–907.
- Koelzer, V.H., Zlobec, I., and Lugli, A. (2016a). Tumor budding in colorectal cancer—ready for diagnostic practice? *Human Pathology* 47, 4–19.
- Koelzer, V.H., Canonica, K., Dawson, H., Sokol, L., Karamitopoulou-Diamantis, E., Lugli, A., and Zlobec, I. (2016b). Phenotyping of tumor-associated macrophages in colorectal cancer: Impact on single cell invasion (tumor budding) and clinicopathological outcome. *Oncoimmunology* 5, e1106677.
- Koi, M., Okita, Y., and M. Carethers, J. (2018). *Fusobacterium nucleatum* Infection in Colorectal Cancer: Linking Inflammation, DNA Mismatch Repair and Genetic and Epigenetic Alterations. *Journal of the Anus, Rectum and Colon* 2, 37–46.
- Komen, N., Sliker, J., Willemsen, P., Mannaerts, G., Pattyn, P., Karsten, T., de Wilt, H., van der Harst, E., van Leeuwen, W., Decaestecker, C., et al. (2014). Polymerase chain reaction for Enterococcus faecalis in drain fluid: the first screening test for symptomatic colorectal anastomotic leakage. The Appeal-study: analysis of parameters predictive for evident anastomotic leakage. *Int J Colorectal Dis* 29, 15–21.
- Kong, S.Y.J., Bostick, R.M., Flanders, W.D., McClellan, W.M., Thyagarajan, B., Gross, M.D., Judd, S., and Goodman, M. (2014). Oxidative balance score, colorectal adenoma, and markers of oxidative stress and inflammation. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 23, 545–554.
- Korpela, K., Salonen, A., Virta, L.J., Kekkonen, R.A., Forslund, K., Bork, P., and de Vos, W.M. (2016). Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. *Nature Communications* 7, 10410.
- Kostic, A.D., Gevers, D., Pedomallu, C.S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A.M., Ojesina, A.I., Jung, J., Bass, A.J., Tabernero, J., et al. (2012). Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma. *Genome Res.* 22, 292–298.

Kostic, A.D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J.N., Gallini, C.A., Michaud, M., Clancy, T.E., Chung, D.C., Lochhead, P., Hold, G.L., et al. (2013). *Fusobacterium nucleatum* Potentiates Intestinal Tumorigenesis and Modulates the Tumor-Immune Microenvironment. *Cell Host & Microbe* *14*, 207–215.

Kozłowski, C., Jeet, S., Beyer, J., Guerrero, S., Lesch, J., Wang, X., DeVoss, J., and Diehl, L. (2013). An entirely automated method to score DSS-induced colitis in mice by digital image analysis of pathology slides. *Disease Models & Mechanisms* *6*, 855–865.

Kraaij, M.D., Savage, N.D.L., Kooij, S.W. van der, Koekkoek, K., Wang, J., Berg, J.M. van den, Ottenhoff, T.H.M., Kuijpers, T.W., Holmdahl, R., Kooten, C. van, et al. (2010). Induction of regulatory T cells by macrophages is dependent on production of reactive oxygen species. *PNAS* *107*, 17686–17691.

Kraaij, M.D., Koekkoek, K.M., van der Kooij, S.W., Gelderman, K.A., and van Kooten, C. (2013). Subsets of human type 2 macrophages show differential capacity to produce reactive oxygen species. *Cellular Immunology* *284*, 1–8.

Krishnan, S., and Eslick, G.D. (2014). *Streptococcus bovis* infection and colorectal neoplasia: a meta-analysis. *Colorectal Dis* *16*, 672–680.

Kryczek, I., Wu, K., Zhao, E., Wei, S., Vatan, L., Szeliga, W., Huang, E., Greenson, J., Chang, A., Roliński, J., et al. (2011). IL-17+ regulatory T cells in the microenvironments of chronic inflammation and cancer. *J. Immunol.* *186*, 4388–4395.

Kuczma, M.P., Ding, Z.-C., Li, T., Habtetsion, T., Chen, T., Hao, Z., Bryan, L., Singh, N., Kochenderfer, J.N., and Zhou, G. (2017). The impact of antibiotic usage on the efficacy of chemoimmunotherapy is contingent on the source of tumor-reactive T cells. *Oncotarget* *8*, 111931–111942.

Kumar, A., Wu, H., Collier-Hyams, L.S., Kwon, Y.-M., Hanson, J.M., and Neish, A.S. (2009). The bacterial fermentation product butyrate influences epithelial signaling via reactive oxygen species-mediated changes in cullin-1 neddylation. *J. Immunol.* *182*, 538–546.

Kumar, A., Kim, M., and Lukin, D.J. (2018a). *Helicobacter pylori* is associated with increased risk of serrated colonic polyps: Analysis of serrated polyp risk factors. *Indian J Gastroenterol.*

Kumar, R., Herold, J.L., Taylor, J., Xu, J., and Xu, Y. (2018b). Variations among *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* strains in connection with colorectal cancer. *Sci Rep* *8*.

Kwong, T.N.Y., Wang, X., Nakatsu, G., Chow, T.C., Tipoe, T., Dai, R.Z.W., Tsoi, K.K.K., Wong, M.C.S., Tse, G., Chan, M.T.V., et al. (2018). Association Between Bacteremia From Specific Microbes and Subsequent Diagnosis of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* *155*, 383-390.e8.

Lakritz, J.R., Poutahidis, T., Mirabal, S., Varian, B.J., Levkovich, T., Ibrahim, Y.M., Ward, J.M., Teng, E.C., Fisher, B., Parry, N., et al. (2015). Gut bacteria require neutrophils to promote mammary tumorigenesis. *Oncotarget* *6*, 9387–9396.

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.

Lappas, M. (2013). NOD1 and NOD2 Regulate Proinflammatory and Prolabor Mediators in Human Fetal Membranes and Myometrium via Nuclear Factor-Kappa B. *Biol Reprod* *89*.

- Larco, J.E.D., Wuertz, B.R.K., and Furcht, L.T. (2004). The Potential Role of Neutrophils in Promoting the Metastatic Phenotype of Tumors Releasing Interleukin-8. *Clin Cancer Res* 10, 4895–4900.
- Laurent-Puig, P., Béroud, C., and Soussi, T. (1998). APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 26, 269–270.
- Lax, A.J. (2005). Bacterial toxins and cancer — a case to answer? 7.
- Lax, A.J. (2007). New genotoxin shows diversity of bacterial attack mechanisms. *Trends in Molecular Medicine* 13, 91–93.
- Lazennec, G., and Richmond, A. (2010). Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med* 16, 133–144.
- Le, D.T., Uram, J.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Kemberling, H., Eyring, A.D., Skora, A.D., Luber, B.S., Azad, N.S., Laheru, D., et al. (2015). PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *New England Journal of Medicine* 372, 2509–2520.
- Le, D.T., Durham, J.N., Smith, K.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Aulakh, L.K., Lu, S., Kemberling, H., Wilt, C., Luber, B.S., et al. (2017). Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 357, 409–413.
- Le Gall, T., Clermont, O., Gouriou, S., Picard, B., Nassif, X., Denamur, E., and Tenaillon, O. (2007). Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol. Biol. Evol.* 24, 2373–2384.
- Lee, N., and Kim, W.-U. (2017). Microbiota in T-cell homeostasis and inflammatory diseases. *Experimental & Molecular Medicine* 49, e340.
- Lee, W., Nelson, R., Mailey, B., Duldulao, M.P., Garcia-Aguilar, J., and Kim, J. (2012). Socioeconomic Factors Impact Colon Cancer Outcomes in Diverse Patient Populations. *J Gastrointest Surg* 16, 692–704.
- Lee, Y.K., Menezes, J.S., Umesaki, Y., and Mazmanian, S.K. (2011). Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 Suppl 1, 4615–4622.
- Leggett, B., and Whitehall, V. (2010). Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 138, 2088–2100.
- Lehouritis, P., Cummins, J., Stanton, M., Murphy, C.T., McCarthy, F.O., Reid, G., Urbaniak, C., Byrne, W.L., and Tangney, M. (2015). Local bacteria affect the efficacy of chemotherapeutic drugs. *Scientific Reports* 5.
- Lennard, K.S., Goosen, R.W., and Blackburn, J.M. (2016). Bacterially-Associated Transcriptional Remodelling in a Distinct Genomic Subtype of Colorectal Cancer Provides a Plausible Molecular Basis for Disease Development. *PLOS ONE* 11, e0166282.
- Leonardi, G.C., Accardi, G., Monastero, R., Nicoletti, F., and Libra, M. (2018). Ageing: from inflammation to cancer. *Immunity & Ageing* 15.
- 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. *Nature Cell Biology* 17, 1062–1073.

Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M., Kultima, J.R., Prifti, E., Nielsen, T., et al. (2014). An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.* 32, 834–841.

Li, Y., Kundu, P., Seow, S.W., de Matos, C.T., 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.

Li, Z., Zhao, R., Cui, Y., Zhou, Y., and Wu, X. (2018). The dynamic change of neutrophil to lymphocyte ratio can predict clinical outcome in stage I-III colon cancer. *Scientific Reports* 8, 9453.

Liang, Q., Chiu, J., Chen, Y., Huang, Y., Higashimori, A., Fang, J., Brim, H., Ashktorab, H., Ng, S.C., Ng, S.S.M., et al. (2017a). Fecal Bacteria Act as Novel Biomarkers for Noninvasive Diagnosis of Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 23, 2061–2070.

Liang, Q., Chiu, J., Chen, Y., Huang, Y., Higashimori, A., Fang, J., Brim, H., Ashktorab, H., Ng, S.C., Ng, S.S.M., et al. (2017b). Fecal Bacteria Act as Novel Biomarkers for Noninvasive Diagnosis of Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* 23, 2061–2070.

Liao, F., Rabin, R.L., Yannelli, J.R., Koniaris, L.G., Vanguri, P., and Farber, J.M. (1995). Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *Journal of Experimental Medicine* 182, 1301–1314.

Lin, S., Li, Y., Zamyatnin, A.A., Werner, J., and Bazhin, A.V. (2018a). Reactive oxygen species and colorectal cancer. *J. Cell. Physiol.* 233, 5119–5132.

Lin, S., Li, Y., Zamyatnin, A.A., Werner, J., and Bazhin, A.V. (2018b). Reactive oxygen species and colorectal cancer. *Journal of Cellular Physiology* 233, 5119–5132.

Ling, A., Edin, S., Wikberg, M.L., Öberg, Å., and Palmqvist, R. (2014). The intratumoural subsite and relation of CD8+ and FOXP3+ T lymphocytes in colorectal cancer provide important prognostic clues. *Br J Cancer* 110, 2551–2559.

Lissner, D., Schumann, M., Batra, A., Kredel, L.-I., Kühl, A.A., Erben, U., May, C., Schulzke, J.-D., and Siegmund, B. (2015). Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD: *Inflammatory Bowel Diseases* 1.

List, A.F., Greco, F.A., and Vogler, L.B. (1987). Lymphoproliferative diseases in immunocompromised hosts: the role of Epstein-Barr virus. *JCO* 5, 1673–1689.

Liu, C.-Y., Wang, Y.-M., Wang, C.-L., Feng, P.-H., Ko, H.-W., Liu, Y.-H., Wu, Y.-C., Chu, Y., Chung, F.-T., Kuo, C.-H., et al. (2010). Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b+/CD14-/CD15+/CD33+ myeloid-derived suppressor cells and CD8+ T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136, 35–45.

Liu, H., Liu, X., Zhang, C., Zhu, H., Xu, Q., Bu, Y., and Lei, Y. (2017a). Redox Imbalance in the Development of Colorectal Cancer. *Journal of Cancer* 8, 1586–1597.

- Liu, J., Duan, Y., Cheng, X., Chen, X., Xie, W., Long, H., Lin, Z., and Zhu, B. (2011). IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *407*, 348–354.
- Liu, Y., Wei, J., Guo, G., and Zhou, J. (2015). Norepinephrine-induced myeloid-derived suppressor cells block T-cell responses via generation of reactive oxygen species. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* *37*, 359–365.
- Liu, Y., Sun, H., Hu, M., Zhang, Y., Chen, S., Tighe, S., and Zhu, Y. (2017b). The Role of Cyclooxygenase-2 in Colorectal Carcinogenesis. *Clin Colorectal Cancer* *16*, 165–172.
- Llosa, N.J., Cruise, M., Tam, A., Wicks, E.C., Hechenbleikner, E.M., Taube, J.M., Blosser, R.L., Fan, H., Wang, H., Lubber, B.S., et al. (2015). The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov* *5*, 43–51.
- Loh, Y.H., Jakszyn, P., Luben, R.N., Mulligan, A.A., Mitrou, P.N., and Khaw, K.-T. (2011). N-nitroso compounds and cancer incidence: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)–Norfolk Study. *The American Journal of Clinical Nutrition* *93*, 1053–1061.
- Long, A.G., Lundsmith, E.T., and Hamilton, K.E. (2017a). Inflammation and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* *13*, 341–351.
- Long, A.G., Lundsmith, E.T., and Hamilton, K.E. (2017b). Inflammation and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* *13*, 341–351.
- Lopez, A., Pouillon, L., Beaugerie, L., Danese, S., and Peyrin-Biroulet, L. (2018). Colorectal cancer prevention in patients with ulcerative colitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* *32–33*, 103–109.
- Lopez-Ceron, M., and Pellise, M. (2012). Biology and diagnosis of aberrant crypt foci. *Colorectal Dis* *14*, e157-164.
- Louis, P., Hold, G.L., and Flint, H.J. (2014a). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat. Rev. Microbiol.* *12*, 661–672.
- Louis, P., Hold, G.L., and Flint, H.J. (2014b). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology* *12*, 661–672.
- 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. *Scientific Reports* *6*, 26337.
- Lucas, C., Barnich, N., and Nguyen, H.T.T. (2017). Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* *18*.
- Luo, C., and Zhang, H. (2017). The Role of Proinflammatory Pathways in the Pathogenesis of Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Mediators Inflamm* *2017*.
- Luster, A.D., and Ravetch, J.V. (1987). Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J. Exp. Med.* *166*, 1084–1097.
- Lynch, H.T., and de la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *348*, 919–932.

- MacDonald, T.T. (2003). The mucosal immune system. *Parasite Immunol.* *25*, 235–246.
- Macfarlane, S., Woodmansey, E.J., and Macfarlane, G.T. (2005). Colonization of Mucin by Human Intestinal Bacteria and Establishment of Biofilm Communities in a Two-Stage Continuous Culture System. *Applied and Environmental Microbiology* *71*, 7483–7492.
- Mack, D.R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., and Hollingsworth, M.A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* *52*, 827–833.
- Mackensen, A., Ferradini, L., Carcelain, G., Triebel, F., Faure, F., Viel, S., and Hercend, T. (1993). Evidence for in situ amplification of cytotoxic T-lymphocytes with antitumor activity in a human regressive melanoma. *Cancer Res.* *53*, 3569–3573.
- Macpherson, A.J., and Harris, N.L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology* *4*, 478–485.
- Macpherson, A.J., Hunziker, L., McCoy, K., and Lamarre, A. (2001). IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes and Infection* *3*, 1021–1035.
- Maddocks, O.D.K., Short, A.J., Sonnenberg, M.S., Bader, S., and Harrison, D.J. (2009). Attaching and Effacing *Escherichia coli* Downregulate DNA Mismatch Repair Protein In Vitro and Are Associated with Colorectal Adenocarcinomas in Humans. *PLOS ONE* *4*, e5517.
- Maddocks, O.D.K., Scanlon, K.M., and Sonnenberg, M.S. (2013). An *Escherichia coli* effector protein promotes host mutation via depletion of DNA mismatch repair proteins. *MBio* *4*, e00152-00113.
- Maglietta, A., Maglietta, R., Staiano, T., Bertoni, R., Ancona, N., Marra, G., and Resta, L. (2016). The Immune Landscapes of Polypoid and Nonpolypoid Precancerous Colorectal Lesions. *PLOS ONE* *11*, e0159373.
- Malapelle, U., Mayo de-Las-Casas, C., Rocco, D., Garzon, M., Pisapia, P., Jordana-Ariza, N., Russo, M., Sgariglia, R., De Luca, C., Pepe, F., et al. (2017). Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients. *Br. J. Cancer* *116*, 802–810.
- Mandal, P. (2018). Molecular mechanistic pathway of colorectal carcinogenesis associated with intestinal microbiota. *Anaerobe* *49*, 63–70.
- Mangerich, A., Knutson, C.G., Parry, N.M., Muthupalani, S., Ye, W., Prestwich, E., Cui, L., McFaline, J.L., Mobley, M., Ge, Z., et al. (2012). Infection-induced colitis in mice causes dynamic and tissue-specific changes in stress response and DNA damage leading to colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, E1820–E1829.
- Manichanh, C., Borruel, N., Casellas, F., and Guarner, F. (2012). The gut microbiota in IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* *9*, 599–608.
- Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity* *23*, 344–346.

- Mantovani, A., Germano, G., Marchesi, F., Locatelli, M., and Biswas, S.K. (2011). Cancer-promoting tumor-associated macrophages: New vistas and open questions. *European Journal of Immunology* 41, 2522–2525.
- Marchesi, J.R., Dutilh, B.E., Hall, N., Peters, W.H.M., Roelofs, R., Boleij, A., and Tjalsma, H. (2011). Towards the Human Colorectal Cancer Microbiome. *PLoS ONE* 6, e20447.
- Marcq, I., Martin, P., Payros, D., Cuevas-Ramos, G., Boury, M., Watrin, C., Nougayrede, J.-P., Olier, M., and Oswald, E. (2014). The Genotoxin Colibactin Exacerbates Lymphopenia and Decreases Survival Rate in Mice Infected With Septicemic *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* 210, 285–294.
- Mariani, F., Sena, P., and Roncucci, L. (2014). Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. *World J Gastroenterol* 20, 9716–9731.
- Mariani, F., Boarino, V., Bertani, A., Merighi, A., Pedroni, M., Rossi, G., Mancini, S., Sena, P., Benatti, P., and Roncucci, L. (2017). Myeloperoxidase-positive cell infiltration of normal colorectal mucosa is related to body fatness and is predictive of adenoma occurrence. *International Journal of Obesity* 41, 982–985.
- Marin-Acevedo, J.A., Dholaria, B., Soyano, A.E., Knutson, K.L., Chumsri, S., and Lou, Y. (2018). Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. *J Hematol Oncol* 11.
- Markman, J.L., and Shiao, S.L. (2015). Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer. 16.
- 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.
- Martín-Antonio, B., Suñe, G., Perez-Amill, L., Castella, M., and Urbano-Ispizua, A. (2017). Natural Killer Cells: Angels and Devils for Immunotherapy. *Int J Mol Sci* 18.
- Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6.
- Martins, M., Aymeric, L., du Merle, L., Danne, C., Robbe-Masselot, C., Trieu-Cuot, P., Sansonetti, P., and Dramsi, S. (2015). *Streptococcus gallolyticus* Pil3 Pilus Is Required for Adhesion to Colonic Mucus and for Colonization of Mouse Distal Colon. *J Infect Dis* 212, 1646–1655.
- Martins, M., Porrini, C., du Merle, L., Danne, C., Robbe-Masselot, C., Trieu-Cuot, P., and Dramsi, S. (2016). The Pil3 pilus of *Streptococcus gallolyticus* binds to intestinal mucins and to fibrinogen. *Gut Microbes* 7, 526–532.
- Mason, K.L., Huffnagle, G.B., Noverr, M.C., and Kao, J.Y. (2008). Overview of gut immunology. *Adv. Exp. Med. Biol.* 635, 1–14.
- Masopust, D., and Schenkel, J.M. (2013). The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nature Reviews Immunology* 13, 309–320.

- Matson, V., Fessler, J., Bao, R., Chongsuwat, T., Zha, Y., Alegre, M.-L., Luke, J.J., and Gajewski, T.F. (2018). The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* 359, 104–108.
- Matthews, L., Reeve, R., Gally, D.L., Low, J.C., Woolhouse, M.E.J., McAteer, S.P., Locking, M.E., Chase-Topping, M.E., Haydon, D.T., Allison, L.J., et al. (2013). Predicting the public health benefit of vaccinating cattle against *Escherichia coli* O157. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 16265–16270.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annual Review of Immunology* 12, 991–1045.
- Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O., and Kasper, D.L. (2005). An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell* 122, 107–118.
- McArdle, C.S., McMillan, D.C., and Hole, D.J. (2003). Male gender adversely affects survival following surgery for colorectal cancer. *BJS* 90, 711–715.
- 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, e53653.
- McDermott, A.J., and Huffnagle, G.B. (2014). The microbiome and regulation of mucosal immunity. *Immunology* 142, 24–31.
- McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G.B., Hirota, S.A., Slaba, I., Waterhouse, C.C.M., Beck, P.L., Muruve, D.A., and Kubes, P. (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 330, 362–366.
- McGilvray, R.W., Eagle, R.A., Watson, N.F.S., Al-Attar, A., Ball, G., Jafferji, I., Trowsdale, J., and Durrant, L.G. (2009). NKG2D Ligand Expression in Human Colorectal Cancer Reveals Associations with Prognosis and Evidence for Immunoediting. *Clin Cancer Res* 15, 6993–7002.
- Mendonça, F.M., de Sousa, F.R., Barbosa, A.L., Martins, S.C., Araújo, R.L., Soares, R., and Abreu, C. (2015). Metabolic syndrome and risk of cancer: which link? *Metab. Clin. Exp.* 64, 182–189.
- Meneghin, A., and Hogaboam, C.M. (2007). Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis. *J. Clin. Invest.* 117, 530–538.
- Mennigen, R., Nolte, K., Rijcken, E., Utech, M., Loeffler, B., Senninger, N., and Bruewer, M. (2009). Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G1140-1149.
- Mermelshtein, A., Gerson, A., Walfisch, S., Delgado, B., Shechter-Maor, G., Delgado, J., Fich, A., and Gheber, L. (2005). Expression of D-type cyclins in colon cancer and in cell lines from colon carcinomas. *British Journal of Cancer* 93, 338–345.
- Messaritakis, I., Stogiannitsi, M., Koulouridi, A., Sfakianaki, M., Voutsina, A., Sotiriou, A., Athanasakis, E., Xynos, E., Mavroudis, D., Tzardi, M., et al. (2018). Evaluation of the detection of Toll-like receptors (TLRs) in cancer development and progression in patients with colorectal cancer. *PLoS ONE* 13, e0197327.



Mihm, M.C., Clemente, C.G., and Cascinelli, N. (1996). Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab. Invest.* 74, 43–47.

Miller, T.L., and Wolin, M.J. Pathways of Acetate, Propionate, and Butyrate Formation by the Human Fecal Microbial Flora. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 4.

Mima, K., Sukawa, Y., Nishihara, R., Qian, Z.R., Yamauchi, M., Inamura, K., Kim, S.A., Masuda, A., Nowak, J.A., Noshio, K., et al. (2015). *Fusobacterium nucleatum* and T Cells in Colorectal Carcinoma. *JAMA Oncology* 1, 653.

Mima, K., Nishihara, R., Qian, Z.R., Cao, Y., Sukawa, Y., Nowak, J.A., Yang, J., Dou, R., Masugi, Y., Song, M., et al. (2016a). *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut* 65, 1973–1980.

Mima, K., Nishihara, R., Qian, Z.R., Cao, Y., Sukawa, Y., Nowak, J.A., Yang, J., Dou, R., Masugi, Y., Song, M., et al. (2016b). *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut* 65, 1973–1980.

Minamikawa, K., Shibata, M., Gonda, K., Ujiie, D., Ashizawa, M., Nakajima, T., Okayama, H., Sakamoto, W., Saito, M., Momma, T., et al. (2017). IL-17 and VEGF are significantly associated with disease progression involving systemic inflammation in patients with gastric and colorectal cancers. *Ann. Cancer Res. Therap.* 25, 67–76.

Mira-Pascual, L., Cabrera-Rubio, R., Ocon, S., Costales, P., Parra, A., Suarez, A., Moris, F., Rodrigo, L., Mira, A., and Collado, M.C. (2015). Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *Journal of Gastroenterology* 50, 167–179.

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.

Mitri, D.D., Toso, A., Chen, J.J., Sarti, M., Pinton, S., Jost, T.R., D'Antuono, R., Montani, E., Garcia-Escudero, R., Guccini, I., et al. (2014). Tumour-infiltrating Gr-1<sup>+</sup> myeloid cells antagonize senescence in cancer. *Nature* 515, 134–137.

Mittendorf, E.A., Alatrash, G., Qiao, N., Wu, Y., Sukhumalchandra, P., St John, L.S., Philips, A.V., Xiao, H., Zhang, M., Ruisaard, K., et al. (2012). Breast cancer cell uptake of the inflammatory mediator neutrophil elastase triggers an anticancer adaptive immune response. *Cancer Res.* 72, 3153–3162.

Mittrücker, H.-W., Visekruna, A., and Huber, M. (2014a). Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8<sup>+</sup> T Cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 62, 449–458.

Mittrücker, H.-W., Seidel, D., Bland, P.W., Zarzycka, A., Kaufmann, S.H.E., Visekruna, A., and Steinhoff, U. (2014b). Lack of microbiota reduces innate responses and enhances adaptive immunity against *Listeria monocytogenes* infection. *Eur. J. Immunol.* 44, 1710–1715.

Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Berger, A., Bindea, G., Meatchi, T., Bruneval, P., Trajanoski, Z., Fridman, W.-H., Pagès, F., et al. (2011). Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J. Clin. Oncol.* 29, 610–618.

Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H.K., Maby, P., Angelova, M., Tougeron, D., Church, S.E., Lafontaine, L., Fischer, M., Fredriksen, T., et al. (2016). Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show

Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity* 44, 698–711.

Moens, L., and Tangye, S.G. (2014). Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Front Immunol* 5, 65.

Moghaddam, A.A., Woodward, M., and Huxley, R. (2007). Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16, 2533–2547.

Mohajeri, M.H., Brummer, R.J.M., Rastall, R.A., Weersma, R.K., Harmsen, H.J.M., Faas, M., and Eggersdorfer, M. (2018). The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *Eur J Nutr.*

Moncrief, J.S., Obiso, R., Barroso, L.A., Kling, J.J., Wright, R.L., Van Tassell, R.L., Lyerly, D.M., and Wilkins, T.D. (1995). The enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a metalloprotease. *Infect Immun* 63, 175–181.

Monnet, E., Boutron, M.C., Faivre, J., and Milan, C. (1993). Influence of socioeconomic status on prognosis of colorectal cancer. A population-based study in Côte D'Or, France. *Cancer* 72, 1165–1170.

Moore, S.C., Lee, I.-M., Weiderpass, E., Campbell, P.T., Sampson, J.N., Kitahara, C.M., Keadle, S.K., Arem, H., Gonzalez, A.B. de, Hartge, P., et al. (2016). Association of Leisure-Time Physical Activity With Risk of 26 Types of Cancer in 1.44 Million Adults. *JAMA Intern Med* 176, 816–825.

Morris, J.S., Bradbury, K.E., Cross, A.J., Gunter, M.J., and Murphy, N. (2018). Physical activity, sedentary behaviour and colorectal cancer risk in the UK Biobank. *British Journal of Cancer* 118, 920–929.

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.

Moskal, A., Norat, T., Ferrari, P., and Riboli, E. (2007). Alcohol intake and colorectal cancer risk: a dose-response meta-analysis of published cohort studies. *Int. J. Cancer* 120, 664–671.

Mostafa, M., Hartley, C., Mackinnon, A., and Hagen, C. (2016). Evaluation of PD-L1 and PD-1 in Colorectal Polyps. *Am J Clin Pathol* 146.

Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 331–341.

Mowat, A.M., and Agace, W.W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 667–685.

Mulder, I.E., Schmidt, B., Lewis, M., Delday, M., Stokes, C.R., Bailey, M., Aminov, R.I., Gill, B.P., Pluske, J.R., Mayer, C.-D., et al. (2011). Restricting Microbial Exposure in Early Life Negates the Immune Benefits Associated with Gut Colonization in Environments of High Microbial Diversity. *PLoS One* 6.

Naccarati, A., Polakova, V., Pardini, B., Vodickova, L., Hemminki, K., Kumar, R., and Vodicka, P. (2012). Mutations and polymorphisms in TP53 gene--an overview on the role in colorectal cancer. *Mutagenesis* 27, 211–218.

Nagai, Y., Sunami, E., Yamamoto, Y., Hata, K., Okada, S., Murono, K., Yasuda, K., Otani, K., Nishikawa, T., Tanaka, T., et al. (2017). LINE-1 hypomethylation status of circulating cell-free DNA in plasma as a biomarker for colorectal cancer. *Oncotarget* 8, 11906–11916.

Nagamine, C.M., Sohn, J.J., Rickman, B.H., Rogers, A.B., Fox, J.G., and Schauer, D.B. (2008). Helicobacter hepaticus Infection Promotes Colon Tumorigenesis in the BALB/c-Rag2<sup>-/-</sup> ApcMin<sup>+</sup> Mouse. *Infection and Immunity* 76, 2758–2766.

Nagaraj, S., and Gabrilovich, D.I. (2007). Myeloid-derived suppressor cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 601, 213–223.

Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H., and Ohtani, H. (1998). CD8<sup>+</sup> T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 58, 3491–3494.

Nakanishi, Y., Nakatsuji, M., Seno, H., Ishizu, S., Akitake-Kawano, R., Kanda, K., Ueo, T., Komekado, H., Kawada, M., Minami, M., et al. (2011). COX-2 inhibition alters the phenotype of tumor-associated macrophages from M2 to M1 in ApcMin<sup>+</sup> mouse polyps. *Carcinogenesis* 32, 1333–1339.

Nakatsu, G., Li, X., Zhou, H., Sheng, J., Wong, S.H., Wu, W.K.K., Ng, S.C., Tsoi, H., Dong, Y., Zhang, N., et al. (2015). Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis. *Nat Commun* 6, 8727.

Nakayama, H., Kinouchi, T., Kataoka, K., Akimoto, S., Matsuda, Y., and Ohnishi, Y. (1997). Intestinal anaerobic bacteria hydrolyse sorivudine, producing the high blood concentration of 5-(E)-(2-bromovinyl)uracil that increases the level and toxicity of 5-fluorouracil. *Pharmacogenetics* 7, 35–43.

Nan, H., Hutter, C.M., Lin, Y., Jacobs, E.J., Ulrich, C.M., White, E., Baron, J.A., Berndt, S.I., Brenner, H., Butterbach, K., et al. (2015). Association of aspirin and NSAID use with risk of colorectal cancer according to genetic variants. *JAMA* 313, 1133–1142.

Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic Escherichia coli. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.

Natividad, J.M.M., and Verdu, E.F. (2013). Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. *Pharmacological Research* 69, 42–51.

NEISH, A.S. (2009). Microbes in Gastrointestinal Health and Disease. *Gastroenterology* 136, 65–80.

Neufert, C., Becker, C., and Neurath, M.F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc* 2, 1998–2004.

Newberry, R.D., and Lorenz, R.G. (2005). Organizing a mucosal defense. *Immunol. Rev.* 206, 6–21.

Ng, K., Meyerhardt, J.A., Chan, A.T., Sato, K., Chan, J.A., Niedzwiecki, D., Saltz, L.B., Mayer, R.J., Benson, A.B., Schaefer, P.L., et al. (2015). Aspirin and COX-2 inhibitor use in patients with stage III colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 107, 345.

Ng, S.B., Chua, C., Ng, M., Gan, A., Poon, P.S., Teo, M., Fu, C., Leow, W.Q., Lim, K.H., Chung, A., et al. (2017). Individualised multiplexed circulating tumour DNA assays for monitoring of tumour presence in patients after colorectal cancer surgery. *Sci Rep* 7.

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.

- Nicholson, J.K., and Wilson, I.D. (2003). Understanding “Global” Systems Biology: Metabonomics and the Continuum of Metabolism. *Nature Reviews Drug Discovery* 2, 668–676.
- Norat, T., Lukanova, A., Ferrari, P., and Riboli, E. (2002). Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int. J. Cancer* 98, 241–256.
- Norton, S.E., Ward-Hartstonge, K.A., Taylor, E.S., and Kemp, R.A. (2015). Immune cell interplay in colorectal cancer prognosis. *World J Gastrointest Oncol* 7, 221–232.
- Norton, S.E., Dunn, E.T.J., McCall, J.L., Munro, F., and Kemp, R.A. (2016). Gut macrophage phenotype is dependent on the tumor microenvironment in colorectal cancer. *Clin Transl Immunology* 5, e76.
- Nougayrède, J.-P., Taieb, F., Rycke, J.D., and Oswald, E. (2005). Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends in Microbiology* 13, 103–110.
- Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., and Oswald, E. (2006). *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 313, 848–851.
- Nowrouzian, F.L., and Oswald, E. (2012). *Escherichia coli* strains with the capacity for long-term persistence in the bowel microbiota carry the potentially genotoxic pks island. *Microbial Pathogenesis* 53, 180–182.
- Nugent, J.L., McCoy, A.N., Addamo, C.J., Jia, W., Sandler, R.S., and Keku, T.O. (2014). Altered Tissue Metabolites Correlate with Microbial Dysbiosis in Colorectal Adenomas. *Journal of Proteome Research* 13, 1921–1929.
- Numasaki, M., Fukushi, J., Ono, M., Narula, S.K., Zavodny, P.J., Kudo, T., Robbins, P.D., Tahara, H., and Lotze, M.T. (2003). Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 101, 2620–2627.
- O’Connell, J.B., Maggard, M.A., and Ko, C.Y. (2004). Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1420–1425.
- O’Connor, E.S., Greenblatt, D.Y., LoConte, N.K., Gangnon, R.E., Liou, J.-I., Heise, C.P., and Smith, M.A. (2011). Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features. *J. Clin. Oncol.* 29, 3381–3388.
- 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.
- Ogino, S., Kirkner, G.J., Nosho, K., Irahara, N., Kure, S., Shima, K., Hazra, A., Chan, A.T., Dehari, R., Giovannucci, E.L., et al. (2008). Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 8221–8227.
- Ogino, S., Nosho, K., Irahara, N., Meyerhardt, J.A., Baba, Y., Shima, K., Glickman, J.N., Ferrone, C.R., Mino-Kenudson, M., Tanaka, N., et al. (2009a). Lymphocytic Reaction to Colorectal Cancer is Associated with Longer Survival, Independent of Lymph Node Count, MSI and CpG Island Methylator Phenotype. *Clin Cancer Res* 15, 6412–6420.
- Ogino, S., Nosho, K., Irahara, N., Kure, S., Shima, K., Baba, Y., Toyoda, S., Chen, L., Giovannucci, E.L., Meyerhardt, J.A., et al. (2009b). A Cohort Study of Cyclin D1 Expression and Prognosis in 602 Colon Cancer Cases. *Clin Cancer Res* 15, 4431–4438.

- Ogino, T., Nishimura, J., Barman, S., Kayama, H., Uematsu, S., Okuzaki, D., Osawa, H., Haraguchi, N., Uemura, M., Hata, T., et al. (2013). Increased Th17-Inducing Activity of CD14<sup>+</sup> CD163<sup>low</sup> Myeloid Cells in Intestinal Lamina Propria of Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology* *145*, 1380–1391.e1.
- Ohki, S., Shibata, M., Gonda, K., Machida, T., Shimura, T., Nakamura, I., Ohtake, T., Koyama, Y., Suzuki, S., Ohto, H., et al. (2012). Circulating myeloid-derived suppressor cells are increased and correlate to immune suppression, inflammation and hypoproteinemia in patients with cancer. *Oncol. Rep.* *28*, 453–458.
- Ohnmacht, C., Marques, R., Presley, L., Sawa, S., Lochner, M., and Eberl, G. (2011). Intestinal microbiota, evolution of the immune system and the bad reputation of pro-inflammatory immunity. *Cellular Microbiology* *13*, 653–659.
- Okada, M., Bothin, C., Kanazawa, K., and Midtvedt, T. (1999). Experimental study of the influence of intestinal flora on the healing of intestinal anastomoses. *Br J Surg* *86*, 961–965.
- Okita, A., Takahashi, S., Ouchi, K., Inoue, M., Watanabe, M., Endo, M., Honda, H., Yamada, Y., and Ishioka, C. (2018). Consensus molecular subtypes classification of colorectal cancer as a predictive factor for chemotherapeutic efficacy against metastatic colorectal cancer. *Oncotarget* *9*, 18698–18711.
- O'Neil, B.H., Wallmark, J.M., Lorente, D., Elez, E., Raimbourg, J., Gomez-Roca, C., Ejadi, S., Piha-Paul, S.A., Stein, M.N., Abdul Razak, A.R., et al. (2017). Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced colorectal carcinoma. *PLOS ONE* *12*, e0189848.
- Opelz, G., and Döhler, B. (2004). Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am. J. Transplant.* *4*, 222–230.
- Ostman, S., Rask, C., Wold, A.E., Hultkrantz, S., and Telemo, E. (2006). Impaired regulatory T cell function in germ-free mice. *Eur. J. Immunol.* *36*, 2336–2346.
- O'Sullivan, T., Saddawi-Konefka, R., Vermi, W., Koebel, C.M., Arthur, C., White, J.M., Uppaluri, R., Andrews, D.M., Ngiow, S.F., Teng, M.W.L., et al. (2012). Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *J. Exp. Med.* *209*, 1869–1882.
- Oswald, E., Nougayrède, J.-P., Taieb, F., and Sugai, M. (2005). Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Current Opinion in Microbiology* *8*, 83–91.
- Ouwehand, A.C., Derrien, M., de Vos, W., Tiihonen, K., and Rautonen, N. (2005). Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. *Current Opinion in Biotechnology* *16*, 212–217.
- OuYang, L.-Y., Wu, X.-J., Ye, S.-B., Zhang, R., Li, Z.-L., Liao, W., Pan, Z.-Z., Zheng, L.-M., Zhang, X.-S., Wang, Z., et al. (2015). Tumor-induced myeloid-derived suppressor cells promote tumor progression through oxidative metabolism in human colorectal cancer. *Journal of Translational Medicine* *13*, 47.
- Pagès, F., Anne, B., Matthieu, C., Fatima, S.-C., Anne, C., Robert, M., Bernhard, M., Amos, K., Malin, N., Diane, D., et al. (2005). Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine* *13*.
- Pagès, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Asslaber, M., Tosolini, M., Bindea, G., Lagorce, C., Wind, P., Marliot, F., Bruneval, P., et al. (2009). In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* *27*, 5944–5951.

- Pagès, F., Mlecnik, B., Marliot, F., Bindea, G., Ou, F.-S., Bifulco, C., Lugli, A., Zlobec, I., Rau, T.T., Berger, M.D., et al. (2018). International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* *391*, 2128–2139.
- Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A., and Brown, P.O. (2007). Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biology* *5*, e177.
- Pan, P.-Y., Ma, G., Weber, K.J., Ozao-Choy, J., Wang, G., Yin, B., Divino, C.M., and Chen, S.-H. (2010). Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res.* *70*, 99–108.
- Pancione, M., Giordano, G., Remo, A., Febbraro, A., Sabatino, L., Manfrin, E., Ceccarelli, M., and Colantuoni, V. (2014). Immune Escape Mechanisms in Colorectal Cancer Pathogenesis and Liver Metastasis. *Journal of Immunology Research* *2014*, 1–11.
- Pardoll, D.M. (2002). Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 227–238.
- Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 252–264.
- Paritsky, M., Pastukh, N., Brodsky, D., Isakovich, N., and Peretz, A. (2015). Association of *Streptococcus bovis* presence in colonic content with advanced colonic lesion. *World J Gastroenterol* *21*, 5663–5667.
- Park, C.H., Eun, C.S., and Han, D.S. (2018). Intestinal microbiota, chronic inflammation, and colorectal cancer. *Intest Res* *16*, 338–345.
- Park, D.H., Kim, H.S., Kim, W.H., Kim, T.I., Kim, Y.H., Park, D.I., Kim, H.J., Yang, S.-K., Byeon, J.-S., Lee, M.S., et al. (2008). Clinicopathologic characteristics and malignant potential of colorectal flat neoplasia compared with that of polypoid neoplasia. *Dis. Colon Rectum* *51*, 43–49; discussion 49.
- Park, H.E., Kim, J.H., Cho, N.-Y., Lee, H.S., and Kang, G.H. (2017). Intratumoral *Fusobacterium nucleatum* abundance correlates with macrophage infiltration and CDKN2A methylation in microsatellite-unstable colorectal carcinoma. *Virchows Archiv*.
- Parsons, R., Myeroff, L.L., Liu, B., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1995). Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res.* *55*, 5548–5550.
- Pase, L., Layton, J.E., Wittmann, C., Ellett, F., Nowell, C.J., Reyes-Aldasoro, C.C., Varma, S., Rogers, K.L., Hall, C.J., Keightley, M.C., et al. (2012). Neutrophil-delivered myeloperoxidase dampens the hydrogen peroxide burst after tissue wounding in zebrafish. *Curr. Biol.* *22*, 1818–1824.
- Patel, S., Lipka, S., Shen, H., Barnowsky, A., Silpe, J., Mosdale, J., Pan, Q., Fridlyand, S., Bhavsar, A., Abraham, A., et al. (2014). The association of *H. pylori* and colorectal adenoma: does it exist in the US Hispanic population? *J Gastrointest Oncol* *5*, 463–468.
- Paulos, C.M., Wrzesinski, C., Kaiser, A., Hinrichs, C.S., Chieppa, M., Cassard, L., Palmer, D.C., Boni, A., Muranski, P., Yu, Z., et al. (2007). Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells via TLR4 signaling. *Journal of Clinical Investigation* *117*, 2197–2204.

- Paulson, E.C., Wirtalla, C., Armstrong, K., and Mahmoud, N.N. (2009). Gender influences treatment and survival in colorectal cancer surgery. *Dis. Colon Rectum* 52, 1982–1991.
- Payros, D., Secher, T., Boury, M., Brehin, C., Ménard, S., Salvador-Cartier, C., Cuevas-Ramos, G., Watrin, C., Marcq, I., Nougayrède, J.-P., et al. (2014). Maternally acquired genotoxic *Escherichia coli* alters offspring's intestinal homeostasis. *Gut Microbes* 5, 313–325.
- Peddareddigari, V.G., Wang, D., and DuBois, R.N. (2010). The Tumor Microenvironment in Colorectal Carcinogenesis. *Cancer Microenvironment* 3, 149–166.
- Pedrazzani, C., Mantovani, G., Fernandes, E., Bagante, F., Luca Salvagno, G., Surci, N., Campagnaro, T., Ruzzenente, A., Danese, E., Lippi, G., et al. (2017). Assessment of neutrophil-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio and platelet count as predictors of long-term outcome after R0 resection for colorectal cancer. *Sci Rep* 7.
- Peng, W., Chen, J.Q., Liu, C., Malu, S., Creasy, C., Tetzlaff, M.T., Xu, C., McKenzie, J.A., Zhang, C., Liang, X., et al. (2016). Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-Mediated Immunotherapy. *Cancer Discovery* 6, 202–216.
- Penn, I. (1996). Malignant melanoma in organ allograft recipients. *Transplantation* 61, 274–278.
- Pennock, N.D., White, J.T., Cross, E.W., Cheney, E.E., Tamburini, B.A., and Kedl, R.M. (2013). T cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ* 37, 273–283.
- Peterson, L.W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology* 14, 141–153.
- Phipps, A.I., Limburg, P.J., Baron, J.A., Burnett-Hartman, A.N., Weisenberger, D.J., Laird, P.W., Sinicrope, F.A., Rosty, C., Buchanan, D.D., Potter, J.D., et al. (2015). Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology* 148, 77-87.e2.
- Pierce, J.V., and Bernstein, H.D. (2016). Genomic Diversity of Enterotoxigenic Strains of *Bacteroides fragilis*. *PLOS ONE* 11, e0158171.
- Pimentel-Nunes, P., Teixeira, A.L., Pereira, C., Gomes, M., Brandão, C., Rodrigues, C., Gonçalves, N., Boal-Carvalho, I., Roncon-Albuquerque, R., Moreira-Dias, L., et al. (2013). Functional polymorphisms of Toll-like receptors 2 and 4 alter the risk for colorectal carcinoma in Europeans. *Dig Liver Dis* 45, 63–69.
- Pine, J.K., Morris, E., Hutchins, G.G., West, N.P., Jayne, D.G., Quirke, P., and Prasad, K.R. (2015). Systemic neutrophil-to-lymphocyte ratio in colorectal cancer: the relationship to patient survival, tumour biology and local lymphocytic response to tumour. *British Journal of Cancer* 113, 204–211.
- 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. *The Lancet Global Health* 4, e609–e616.
- Ponz de Leon, M., Sassatelli, R., Benatti, P., and Roncucci, L. (1993). Identification of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the general population. The 6-year experience of a population-based registry. *Cancer* 71, 3493–3501.
- Potter, J.D., Slattery, M.L., Bostick, R.M., and Gapstur, S.M. (1993). Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol Rev* 15, 499–545.

- Potter, M.A., Cunliffe, N.A., Smith, M., Miles, R.S., Flapan, A.D., and Dunlop, M.G. (1998). A prospective controlled study of the association of *Streptococcus bovis* with colorectal carcinoma. *Journal of Clinical Pathology* 51, 473–474.
- Poussier, P., Ning, T., Banerjee, D., and Julius, M. (2002). A Unique Subset of Self-specific Intraintestinal T Cells Maintains Gut Integrity. *J Exp Med* 195, 1491–1497.
- Powell, D.R., and Huttenlocher, A. (2016). Neutrophils in the tumor microenvironment. *Trends Immunol* 37, 41–52.
- Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235–237.
- Prall, F., and Ostwald, C. (2007). High-degree tumor budding and podia-formation in sporadic colorectal carcinomas with K-ras gene mutations. *Hum. Pathol.* 38, 1696–1702.
- Pritchard, C.C., and Grady, W.M. (2011). Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut* 60, 116–129.
- Prorok-Hamon, M., Friswell, M.K., Alswied, A., Roberts, C.L., Song, F., Flanagan, P.K., Knight, P., Codling, C., Marchesi, J.R., Winstanley, C., et al. (2014). Colonic mucosa-associated diffusely adherent *afaC+* *Escherichia coli* expressing *lpfA* and *pks* are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut* 63, 761–770.
- Pugh, S., and Thomas, G.A. (1994). Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. *Gut* 35, 675–678.
- Pulte, D., Jansen, L., and Brenner, H. (2017). Social disparities in survival after diagnosis with colorectal cancer: Contribution of race and insurance status. *Cancer Epidemiology* 48, 41–47.
- Purdie, C.A., and Piris, J. (2000). Histopathological grade, mucinous differentiation and DNA ploidy in relation to prognosis in colorectal carcinoma. *Histopathology* 36, 121–126.
- Putze, J., Hennequin, C., Nougayrede, J.-P., Zhang, W., Homburg, S., Karch, H., Bringer, M.-A., Fayolle, C., Carniel, E., Rabsch, W., et al. (2009). Genetic Structure and Distribution of the Colibactin Genomic Island among Members of the Family Enterobacteriaceae. *Infection and Immunity* 77, 4696–4703.
- Qiao, Y., Yang, T., Gan, Y., Li, W., Wang, C., Gong, Y., and Lu, Z. (2018). Associations between aspirin use and the risk of cancers: a meta-analysis of observational studies. *BMC Cancer* 18, 288.
- Qing, Y., Wang, M., Lin, Y.-M., Wu, D., Zhu, J.-Y., Gao, L., Liu, Y.-Y., and Yin, T.-F. (2016). Correlation between *Helicobacter pylori*-associated gastric diseases and colorectal neoplasia. *World J Gastroenterol* 22, 4576–4584.
- Qu, P., Boelte, K.C., and Lin, P.C. (2012). Negative Regulation of Myeloid-derived Suppressor Cells in Cancer. *Immunological Investigations* 41, 562–580.
- Queen, M.M., Ryan, R.E., Holzer, R.G., Keller-Peck, C.R., and Jorcyk, C.L. (2005). Breast Cancer Cells Stimulate Neutrophils to Produce Oncostatin M: Potential Implications for Tumor Progression. *Cancer Res* 65, 8896–8904.



- Quesada-Calvo, F., Massot, C., Bertrand, V., Longuespee, R., Bletard, N., Somja, J., Mazzucchelli, G., Smargiasso, N., Baiwir, D., De, P.-G., et al. (2017). OLFM4, KNG1 and Sec24C identified by proteomics and immunohistochemistry as potential markers of early colorectal cancer stages. *Clin Proteomics* *14*.
- Radoja, S., Rao, T.D., Hillman, D., and Frey, A.B. (2000). Mice Bearing Late-Stage Tumors Have Normal Functional Systemic T Cell Responses In Vitro and In Vivo. *The Journal of Immunology* *164*, 2619–2628.
- 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. *Laboratory Investigation* *95*, 296.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* *118*, 229–241.
- Ramsay, R.G., Ciznadija, D., Vanevski, M., and Mantamadiotis, T. (2003). Transcriptional regulation of cyclo-oxygenase expression: three pillars of control. *Int J Immunopathol Pharmacol* *16*, 59–67.
- Rao, H.-L., Chen, J.-W., Li, M., Xiao, Y.-B., Fu, J., Zeng, Y.-X., Cai, M.-Y., and Xie, D. (2012). Increased Intratumoral Neutrophil in Colorectal Carcinomas Correlates Closely with Malignant Phenotype and Predicts Patients' Adverse Prognosis. *PLoS One* *7*.
- Raskov, H. (2014). Colorectal carcinogenesis-update and perspectives. *World Journal of Gastroenterology* *20*, 18151.
- Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M., and Wentzensen, N. (2009). A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunol Immunother* *58*, 1535–1544.
- Reya, T., and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* *434*, 843–850.
- Reynolds, J.M., Angkasekwinai, P., and Dong, C. (2010). IL-17 family member cytokines: regulation, and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* *21*, 413–423.
- Rezasoltani, S., Asadzadeh Aghdaei, H., Dabiri, H., Akhavan Sepahi, A., Modarressi, M.H., and Nazemalhosseini Mojarad, E. (2018). The association between fecal microbiota and different types of colorectal polyp as precursors of colorectal cancer. *Microb. Pathog.*
- Rhee, K.-J., Wu, S., Wu, X., Huso, D.L., Karim, B., Franco, A.A., Rabizadeh, S., Golub, J.E., Mathews, L.E., Shin, J., et al. (2009). Induction of Persistent Colitis by a Human Commensal, Enterotoxigenic Bacteroides fragilis, in Wild-Type C57BL/6 Mice. *Infection and Immunity* *77*, 1708–1718.
- Rhodes, J.M., and Campbell, B.J. (2002). Inflammation and colorectal cancer: IBD-associated and sporadic cancer compared. *Trends Mol Med* *8*, 10–16.
- Ribatti, D. (2016). The concept of immune surveillance against tumors: The first theories. *Oncotarget* *8*, 7175–7180.

Richard, M.L., Liguori, G., Lamas, B., Brandi, G., da Costa, G., Hoffmann, T.W., Pierluigi Di Simone, M., Calabrese, C., Poggioli, G., Langella, P., et al. (2018a). Mucosa-associated microbiota dysbiosis in colitis associated cancer. *Gut Microbes* *9*, 131–142.

Richard, M.L., Liguori, G., Lamas, B., Brandi, G., da Costa, G., Hoffmann, T.W., Pierluigi Di Simone, M., Calabrese, C., Poggioli, G., Langella, P., et al. (2018b). Mucosa-associated microbiota dysbiosis in colitis associated cancer. *Gut Microbes* *9*, 131–142.

Ridlon, J.M., Kang, D.-J., and Hylemon, P.B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* *47*, 241–259.

Rigas, B., Goldman, I.S., and Levine, L. (1993). Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J. Lab. Clin. Med.* *122*, 518–523.

Robertis, M.D., Massi, E., Poeta, M.L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E., and Fazio, V.M. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog* *10*.

Rocca, Y.S., Roberti, M.P., Arriaga, J.M., Amat, M., Bruno, L., Pampena, M.B., Huertas, E., Loria, F.S., Pairola, A., Bianchini, M., et al. (2013). Altered phenotype in peripheral blood and tumor-associated NK cells from colorectal cancer patients. *Innate Immunity* *19*, 76–85.

Rodríguez, J.M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R.P., Kober, O.I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M.C., et al. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis* *26*.

Roelofs, H.M.J., Te Morsche, R.H.M., van Heumen, B.W.H., Nagengast, F.M., and Peters, W.H.M. (2014). Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer. *BMC Gastroenterol* *14*, 1.

Romagnani, S. (1999). Th1/Th2 cells. *Inflamm. Bowel Dis.* *5*, 285–294.

Roncucci, L., Fante, R., Losi, L., Di Gregorio, C., Micheli, A., Benatti, P., Madenis, N., Ganazzi, D., Cassinadri, M.T., Lauriola, P., et al. (1996). Survival for colon and rectal cancer in a population-based cancer registry. *Eur. J. Cancer* *32A*, 295–302.

Roncucci, L., Mora, E., Mariani, F., Bursi, S., Pezzi, A., Rossi, G., Pedroni, M., Luppi, D., Santoro, L., Monni, S., et al. (2008). Myeloperoxidase-positive cell infiltration in colorectal carcinogenesis as indicator of colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *17*, 2291–2297.

Rook, G.A.W., Raison, C.L., and Lowry, C.A. (2014). Microbial ‘old friends’, immunoregulation and socioeconomic status. *Clin Exp Immunol* *177*, 1–12.

Rossi, M., Jahanzaib Anwar, M., Usman, A., Keshavarzian, A., and Bishehsari, F. (2018). Colorectal Cancer and Alcohol Consumption—Populations to Molecules. *Cancers (Basel)* *10*.

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.

Rothwell, P.M., Wilson, M., Elwin, C.-E., Norrving, B., Algra, A., Warlow, C.P., and Meade, T.W. (2010a). Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* *376*, 1741–1750.

- Rothwell, P.M., Wilson, M., Elwin, C.-E., Norrving, B., Algra, A., Warlow, C.P., and Meade, T.W. (2010b). Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* *376*, 1741–1750.
- Routy, B., Gopalakrishnan, V., Daillère, R., Zitvogel, L., Wargo, J.A., and Kroemer, G. (2018a). The gut microbiota influences anticancer immunosurveillance and general health. *Nature Reviews Clinical Oncology* *15*, 382–396.
- Routy, B., Le Chatelier, E., Derosa, L., Duong, C.P.M., Alou, M.T., Daillère, R., Fluckiger, A., Messaoudene, M., Rauber, C., Roberti, M.P., et al. (2018b). Gut microbiome influences efficacy of PD-1–based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* *eaan3706*.
- Rowland, R.H., Ian R. (2000). Metabolic Activities of the Gut Microflora in Relation to Cancer. *Microbial Ecology in Health and Disease* *12*, 179–185.
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., and Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr* *57*, 1–24.
- 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.
- Rusch, T., Bayry, J., Werner, J., Shevchenko, I., and Bazhin, A.V. (2018). Immunotherapy as an Option for Cancer Treatment. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* *66*, 89–96.
- Russell, W.R., Duncan, S.H., Scobbie, L., Duncan, G., Cantlay, L., Calder, A.G., Anderson, S.E., and Flint, H.J. (2013). Major phenylpropanoid-derived metabolites in the human gut can arise from microbial fermentation of protein. *Molecular Nutrition & Food Research* *57*, 523–535.
- Sahin, U., and Pfreundschuh, M. (1997). Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Molecular Medicine Today* *3*, 342–349.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* *155*, 1151–1164.
- Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D., Platell, C., and Iacopetta, B. (2009). Tumor-Infiltrating FOXP3+ T Regulatory Cells Show Strong Prognostic Significance in Colorectal Cancer. *JCO* *27*, 186–192.
- Salama, P., Phillips, M., Platell, C., and Iacopetta, B. (2011). Low expression of Granzyme B in colorectal cancer is associated with signs of early metastatic invasion. *Histopathology* *59*, 207–215.
- Salavoura, K., Kolialexi, A., Tsangaris, G., and Mavrou, A. (2008). Development of cancer in patients with primary immunodeficiencies. *Anticancer Res.* *28*, 1263–1269.
- Samba-Louaka, A., Nougayrede, J.-P., Watrin, C., Oswald, E., and Taieb, F. (2009). The Enteropathogenic *Escherichia coli* Effector Cif Induces Delayed Apoptosis in Epithelial Cells. *Infection and Immunity* *77*, 5471–5477.
- Samuels, Y., and Ericson, K. (2006). Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol* *18*, 77–82.

- Sanapareddy, N., Legge, R.M., Jovov, B., McCoy, A., Burcal, L., Araujo-Perez, F., Randall, T.A., Galanko, J., Benson, A., Sandler, R.S., et al. (2012). Increased rectal microbial richness is associated with the presence of colorectal adenomas in humans. *ISME J* 6, 1858–1868.
- Sandhu, J.K., Privora, H.F., Wenckebach, G., and Birnboim, H.C. (2000). Neutrophils, Nitric Oxide Synthase, and Mutations in the Mutatetect Murine Tumor Model. *The American Journal of Pathology* 156, 509–518.
- Sandler, R.S., Halabi, S., Baron, J.A., Budinger, S., Paskett, E., Keresztes, R., Petrelli, N., Pipas, J.M., Karp, D.D., Loprinzi, C.L., et al. (2003). A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 883–890.
- Sartor, R.B. (2008). Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 134, 577–594.
- Savage, D.C. (1977). Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annual Review of Microbiology* 31, 107–133.
- Scheele, J., Stangl, R., and Altendorf-Hofmann, A. (1990). Hepatic metastases from colorectal carcinoma: impact of surgical resection on the natural history. *Br J Surg* 77, 1241–1246.
- Schieber, M., and Chandel, N.S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* 24, R453-462.
- Schmid, M.C., and Varner, J.A. (2010). Myeloid cells in the tumor microenvironment: modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation. *J Oncol* 2010, 201026.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 331, 1565–1570.
- Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 348, 69–74.
- Schwabe, R.F., and Jobin, C. (2013). The microbiome and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13, 800–812.
- Sclafani, F. (2017). PD-1 inhibition in metastatic dMMR/MSI-H colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 18, 1141–1142.
- Sconocchia, G., Eppenberger, S., Spagnoli, G.C., Tornillo, L., Drosner, R., Caratelli, S., Ferrelli, F., Coppola, A., Arriga, R., Lauro, D., et al. (2014). NK cells and T cells cooperate during the clinical course of colorectal cancer. *Oncoimmunology* 3, e952197.
- Sears, C.L. (2009). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a Rogue among Symbiotes. *Clin Microbiol Rev* 22, 349–369.
- Sears, C.L., and Garrett, W.S. (2014). Microbes, Microbiota, and Colon Cancer. *Cell Host & Microbe* 15, 317–328.
- Seno, H., Oshima, M., Ishikawa, T., Oshima, H., Takaku, K., Chiba, T., Narumiya, S., and Taketo, M.M. (2002). Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in *Apc(Delta716)* mouse intestinal polyps. *Cancer Res.* 62, 506–511.

- Seril, D.N., Liao, J., Ho, K.-L.K., Warsi, A., Yang, C.S., and Yang, G.-Y. (2002). Dietary iron supplementation enhances DSS-induced colitis and associated colorectal carcinoma development in mice. *Dig. Dis. Sci.* *47*, 1266–1278.
- Shang, F.-M., and Liu, H.-L. (2018). *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: A review. *World J Gastrointest Oncol* *10*, 71–81.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* *410*, 1107–1111.
- Sharpe, A.H., and Pauken, K.E. (2018). The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature Reviews Immunology* *18*, 153–167.
- Shawki, S., Ashburn, J., Signs, S.A., and Huang, E. (2018). Colon Cancer: Inflammation-Associated Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America* *27*, 269–287.
- Sheibanie, A.F., Yen, J.-H., Khayrullina, T., Emig, F., Zhang, M., Tuma, R., and Ganea, D. (2007). The proinflammatory effect of prostaglandin E2 in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23-->IL-17 axis. *J. Immunol.* *178*, 8138–8147.
- Sheil, A.G.R. (1986). Cancer after transplantation. *World J. Surg.* *10*, 389–396.
- Shen, P., Hawksworth, J., Lovato, J., Loggie, B.W., Geisinger, K.R., Fleming, R.A., and Levine, E.A. (2004). Cytoreductive surgery and intraperitoneal hyperthermic chemotherapy with mitomycin C for peritoneal carcinomatosis from nonappendiceal colorectal carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* *11*, 178–186.
- Sheng, H., Shao, J., Morrow, J.D., Beauchamp, R.D., and DuBois, R.N. (1998). Modulation of Apoptosis and Bcl-2 Expression by Prostaglandin E2 in Human Colon Cancer Cells. *Cancer Res* *58*, 362–366.
- Sheng, K.-C., Pietersz, G.A., Tang, C.K., Ramsland, P.A., and Apostolopoulos, V. (2010). Reactive Oxygen Species Level Defines Two Functionally Distinctive Stages of Inflammatory Dendritic Cell Development from Mouse Bone Marrow. *The Journal of Immunology* *184*, 2863–2872.
- Shenker, B.J., Hoffmaster, R.H., Zekavat, A., Yamaguchi, N., Lally, E.T., and Demuth, D.R. (2001). Induction of Apoptosis in Human T Cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Cytotoxic Distending Toxin Is a Consequence of G2 Arrest of the Cell Cycle. *The Journal of Immunology* *167*, 435–441.
- Shevach, E.M., and Thornton, A.M. (2014). tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol. Rev.* *259*, 88–102.
- Shi, T., Ma, Y., Yu, L., Jiang, J., Shen, S., Hou, Y., and Wang, T. (2018). Cancer Immunotherapy: A Focus on the Regulation of Immune Checkpoints. *Int J Mol Sci* *19*.
- Shibata, D., Reale, M.A., Lavin, P., Silverman, M., Fearon, E.R., Steele, G., Jessup, J.M., Loda, M., and Summerhayes, I.C. (1996). The DCC Protein and Prognosis in Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* *335*, 1727–1732.
- Shibutani, M., Maeda, K., Nagahara, H., Noda, E., Ohtani, H., Nishiguchi, Y., and Hirakawa, K. (2013). A High Preoperative Neutrophil-to-lymphocyte Ratio Is Associated with Poor Survival in Patients with Colorectal Cancer. *Anticancer Res* *33*, 3291–3294.

- Shiels, M.S., Pfeiffer, R.M., Irene Hall, H., Li, J., Goedert, J.J., Morton, L.M., Hartge, P., and Engels, E.A. (2011). Proportions of Kaposi Sarcoma, Selected Non-Hodgkin Lymphomas, and Cervical Cancer in the United States Occurring in Persons With AIDS, 1980–2007. *JAMA* 305, 1450–1459.
- Shimabukuro-Vornhagen, A., Schlößer, H.A., Gryschock, L., Malcher, J., Wennhold, K., Garcia-Marquez, M., Herbold, T., Neuhaus, L.S., Becker, H.J., Fiedler, A., et al. (2014). Characterization of tumor-associated B-cell subsets in patients with colorectal cancer. *Oncotarget* 5, 4651–4664.
- Shintani, N., Nakajima, T., Sugiura, M., Murakami, K., Nakamura, N., Kagitani, Y., and Mayumi, T. (1997). Proliferative Effect of Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Pulsed Macrophages on T Cells from Mice with DSS-Induced Colitis and Inhibition of Effect by IgG. *Scandinavian Journal of Immunology* 46, 581–586.
- Shomer, N.H., Fox, J.G., Juedes, A.E., and Ruddle, N.H. (2003). Helicobacter-Induced Chronic Active Lymphoid Aggregates Have Characteristics of Tertiary Lymphoid Tissue. *Infect Immun* 71, 3572–3577.
- Shukla, S.D., and Lim, R.W. (2013). Epigenetic Effects of Ethanol on the Liver and Gastrointestinal System. *Alcohol Res* 35, 47–55.
- Silva, R., Gullo, I., and Carneiro, F. (2016). The PD-1:PD-L1 immune inhibitory checkpoint in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: a comprehensive review and future perspectives. *Porto Biomedical Journal* 1, 4–11.
- Simmonds, P.C., Primrose, J.N., Colquitt, J.L., Garden, O.J., Poston, G.J., and Rees, M. (2006). Surgical resection of hepatic metastases from colorectal cancer: a systematic review of published studies. *Br. J. Cancer* 94, 982–999.
- Simon, S., and Labarriere, N. (2017). PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? *Oncoimmunology* 7.
- Sina, C., Gavrilova, O., Forster, M., Till, A., Derer, S., Hildebrand, F., Raabe, B., Chalaris, A., Scheller, J., Rehmann, A., et al. (2009). G Protein-Coupled Receptor 43 Is Essential for Neutrophil Recruitment during Intestinal Inflammation. *The Journal of Immunology* 183, 7514–7522.
- Sineshaw, H.M., Ng, K., Flanders, W.D., Brawley, O.W., and Jemal, A. (2018). Factors That Contribute to Differences in Survival of Black vs White Patients With Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 154, 906-915.e7.
- Singer, B.D., King, L.S., and D’Alessio, F.R. (2014). Regulatory T cells as immunotherapy. *Front Immunol* 5, 46.
- Sionov, R.V., Fridlender, Z.G., and Granot, Z. (2014). The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron* 8, 125–158.
- 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.
- Siveen, K.S., and Kuttan, G. (2009). Role of macrophages in tumour progression. *Immunol. Lett.* 123, 97–102.

Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., Cretney, E., Trapani, J.A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S.B., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2000a). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J. Exp. Med.* *191*, 661–668.

Smyth, M.J., Thia, K.Y.T., Street, S.E.A., MacGregor, D., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2000b). Perforin-Mediated Cytotoxicity Is Critical for Surveillance of Spontaneous Lymphoma. *The Journal of Experimental Medicine* *192*, 755–760.

Smyth, M.J., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology* *2*, 293–299.

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.

Son, J.S., Khair, S., Pettet, D.W., Ouyang, N., Tian, X., Zhang, Y., Zhu, W., Mackenzie, G.G., Robertson, C.E., Ir, D., et al. (2015). Altered Interactions between the Gut Microbiome and Colonic Mucosa Precede Polyposis in APCMin/+ Mice. *PLOS ONE* *10*, e0127985.

Sostres, C., Gargallo, C.J., and Lanas, A. (2014). Interaction between *Helicobacter pylori* infection, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and/or low-dose aspirin use: old question new insights. *World J. Gastroenterol.* *20*, 9439–9450.

Souza, D.G., Vieira, A.T., Soares, A.C., Pinho, V., Nicoli, J.R., Vieira, L.Q., and Teixeira, M.M. (2004). The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. *J. Immunol.* *173*, 4137–4146.

Spinner, M.A., Sanchez, L.A., Hsu, A.P., Shaw, P.A., Zerbe, C.S., Calvo, K.R., Arthur, D.C., Gu, W., Gould, C.M., Brewer, C.C., et al. (2014). GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. *Blood* *123*, 809–821.

Srivastava, M.K., Sinha, P., Clements, V.K., Rodriguez, P., and Ostrand-Rosenberg, S. (2010). Myeloid-Derived Suppressor Cells Inhibit T-Cell Activation by Depleting Cystine and Cysteine. *Cancer Res* *70*, 68–77.

St John, D.J., McDermott, F.T., Hopper, J.L., Debney, E.A., Johnson, W.R., and Hughes, E.S. (1993). Cancer risk in relatives of patients with common colorectal cancer. *Ann. Intern. Med.* *118*, 785–790.

Stappenbeck, T.S., Hooper, L.V., and Gordon, J.I. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *PNAS* *99*, 15451–15455.

Stark, G. (2005). Functional consequences of oxidative membrane damage. *J. Membr. Biol.* *205*, 1–16.

Stecher, B., and Hardt, W.-D. (2008). The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol.* *16*, 107–114.

Steinbach, G., Lynch, P.M., Phillips, R.K., Wallace, M.H., Hawk, E., Gordon, G.B., Wakabayashi, N., Saunders, B., Shen, Y., Fujimura, T., et al. (2000). The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N. Engl. J. Med.* *342*, 1946–1952.

Steinke, V., Engel, C., Büttner, R., Schackert, H.K., Schmiegel, W.H., and Propping, P. (2013). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)/Lynch syndrome. *Dtsch Arztebl Int* *110*, 32–38.

- Stoffel, E.M., and Chittenden, A. (2010). Genetic Testing for Hereditary Colorectal Cancer: Challenges in Identifying, Counseling, and Managing High-Risk Patients. *Gastroenterology* 139, 1436-1441.e1.
- Straus, D.S. (2013). TNF $\alpha$  and IL-17 cooperatively stimulate glucose metabolism and growth factor production in human colorectal cancer cells. *Mol. Cancer* 12, 78.
- Street, S.E., Cretney, E., and Smyth, M.J. (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97, 192–197.
- Street, S.E.A., Trapani, J.A., MacGregor, D., and Smyth, M.J. (2002). Suppression of Lymphoma and Epithelial Malignancies Effected by Interferon  $\gamma$ . *J Exp Med* 196, 129–134.
- Su, X., Ye, J., Hsueh, E.C., Zhang, Y., Hoft, D.F., and Peng, G. (2010). Tumor Microenvironments Direct the Recruitment and Expansion of Human Th17 Cells. *The Journal of Immunology* 184, 1630–1641.
- Sung, J., Kim, S., Cabatbat, J.J.T., Jang, S., Jin, Y.-S., Jung, G.Y., Chia, N., and Kim, P.-J. (2017). Global metabolic interaction network of the human gut microbiota for context-specific community-scale analysis. *Nature Communications* 8, 15393.
- Suzuki, S., Shibata, M., Gonda, K., Kanke, Y., Ashizawa, M., Ujiiie, D., Suzushino, S., Nakano, K., Fukushima, T., Sakurai, K., et al. (2013). Immunosuppression involving increased myeloid-derived suppressor cell levels, systemic inflammation and hypoalbuminemia are present in patients with anaplastic thyroid cancer. *Mol Clin Oncol* 1, 959–964.
- Svane, I.M., Engel, A.M., Nielsen, M.B., Ljunggren, H.G., Rygaard, J., and Werdelin, O. (1996). Chemically induced sarcomas from nude mice are more immunogenic than similar sarcomas from congenic normal mice. *Eur. J. Immunol.* 26, 1844–1850.
- Sveen, A., Bruun, J., Eide, P.W., Eilertsen, I.A., Ramirez, L., Murumägi, A., Arjama, M., Danielsen, S.A., Kryeziu, K., Elez, E., et al. (2018). Colorectal Cancer Consensus Molecular Subtypes Translated to Preclinical Models Uncover Potentially Targetable Cancer Cell Dependencies. *Clin Cancer Res* 24, 794–806.
- Svensson, C.I., and Yaksh, T.L. (2002). The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 553–583.
- Swidsinski, A., Khilkin, M., Kerjaschki, D., Schreiber, S., Ortner, M., Weber, J., and Lochs, H. (1998). Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology* 115, 281–286.
- Syed Khaja, A.S., Toor, S.M., El Salhat, H., Ali, B.R., and Elkord, E. (2017). Intratumoral FoxP3+Helios+ Regulatory T Cells Upregulating Immunosuppressive Molecules Are Expanded in Human Colorectal Cancer. *Front Immunol* 8.
- Szemes, T., Vlkova, B., Minarik, G., Tothova, L., Drahovska, H., Turna, J., and Celec, P. (2010). On the origin of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms in *Enterococcus faecalis*. *Redox Report* 15, 202–206.
- Szylberg, Ł., Janiczek, M., Popiel, A., and Marszałek, A. (2016). Expression of COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-4 in epithelium of serrated adenoma, adenoma and hyperplastic polyp. *Arch Med Sci* 12, 172–178.
- Taieb, F., Petit, C., Nougayrède, J.-P., and Oswald, E. (2016). The Enterobacterial Genotoxins: Cytolethal Distending Toxin and Colibactin. *EcoSal Plus* 7.



- Takada, H., Hirooka, T., Hiramatsu, Y., and Yamamoto, M. (1982). Effect of beta-glucuronidase inhibitor on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in rats. *Cancer Res.* *42*, 331–334.
- Takasuna, K., Hagiwara, T., Hirohashi, M., Kato, M., Nomura, M., Nagai, E., Yokoi, T., and Kamataki, T. (1996). Involvement of  $\beta$ -glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. *Cancer Research* *56*, 3752–3757.
- Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J. Exp. Med.* *195*, 161–169.
- Takizawa, H., Shintani, N., Natsui, M., Sasakawa, T., Nakakubo, H., Nakajima, T., and Asakura, H. (1995). Activated immunocompetent cells in rat colitis mucosa induced by dextran sulfate sodium and not complete but partial suppression of colitis by FK506. *Digestion* *56*, 259–264.
- Talero, E., Sánchez-Fidalgo, S., Villegas, I., de la Lastra, C.A., Illanes, M., and Motilva, V. (2011). Role of different inflammatory and tumor biomarkers in the development of ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Inflamm. Bowel Dis.* *17*, 696–710.
- Tanabe, T., and Tohnai, N. (2002). Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* *68–69*, 95–114.
- Tanaka, T. (2009). Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J Carcinog* *8*, 5.
- Tanaka, T., Watanabe, T., Kazama, Y., Tanaka, J., Kanazawa, T., Kazama, S., and Nagawa, H. (2008). Loss of Smad4 protein expression and 18qLOH as molecular markers indicating lymph node metastasis in colorectal cancer—a study matched for tumor depth and pathology. *Journal of Surgical Oncology* *97*, 69–73.
- Tanner, S.M., Daft, J.G., Hill, S.A., Martin, C.A., and Lorenz, R.G. (2016). Altered T-Cell Balance in Lymphoid Organs of a Mouse Model of Colorectal Cancer. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* *64*, 753–767.
- Taube, J.M., Galon, J., Sholl, L.M., Rodig, S.J., Cottrell, T.R., Giraldo, N.A., Baras, A.S., Patel, S.S., Anders, R.A., and Rimm, D.L. (2017). Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics. *Modern Pathology*.
- Taylor, N.S., Ge, Z., Shen, Z., Dewhirst, F.E., and Fox, J.G. (2003). Cytolethal Distending Toxin: A Potential Virulence Factor for *Helicobacter cinaedi*. *The Journal of Infectious Diseases* *188*, 1892–1897.
- Tecchio, C., Huber, V., Scapini, P., Calzetti, F., Margotto, D., Todeschini, G., Pilla, L., Martinelli, G., Pizzolo, G., Rivoltini, L., et al. (2004). IFN $\alpha$ -stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. *Blood* *103*, 3837–3844.
- Tenière, P., Songne, K., Frebourg, T., Moguelet, P., Foulatier, O., Michot, F., Le Pessot, F., Le Blanc, I., and Scotte, M. (2002). [Juvenile polyposis coli. The usefulness of a genetic study and the role of surgical treatment]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* *26*, 1047–1050.

- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., and Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* *138*, 2101–2114.e5.
- Thaker, A.I., Shaker, A., Rao, M.S., and Ciorba, M.A. (2012). Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). *J Vis Exp*.
- Thiele Orberg, E., Fan, H., Tam, A.J., Dejea, C.M., Destefano Shields, C.E., Wu, S., Chung, L., Finard, B.B., Wu, X., Fathi, P., et al. (2017a). The myeloid immune signature of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced murine colon tumorigenesis. *Mucosal Immunology* *10*, 421–433.
- Thiele Orberg, E., Fan, H., Tam, A.J., Dejea, C.M., Destefano Shields, C.E., Wu, S., Chung, L., Finard, B.B., Wu, X., Fathi, P., et al. (2017b). The myeloid immune signature of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced murine colon tumorigenesis. *Mucosal Immunol* *10*, 421–433.
- Thomas, L. (1959). Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States: A Symposium at the New York Academy of Medicine. *JAMA* *170*, 883–883.
- Thursby, E., and Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J* *474*, 1823–1836.
- Tilg, H., Adolph, T.E., Gerner, R.R., and Moschen, A.R. (2018a). The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer. *Cancer Cell* *33*, 954–964.
- Tilg, H., Adolph, T.E., Gerner, R.R., and Moschen, A.R. (2018b). The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer. *Cancer Cell* *33*, 954–964.
- Tjalsma, H., Schöller-Guinard, M., Lasonder, E., Ruers, T.J., Willems, H.L., and Swinkels, D.W. (2006). Profiling the humoral immune response in colon cancer patients: diagnostic antigens from *Streptococcus bovis*. *Int. J. Cancer* *119*, 2127–2135.
- Traskalová-Hogenová, H., Stepánková, R., Hudcovic, T., Tucková, L., Cukrowska, B., Lodinová-Zádníková, R., Kozáková, H., Rossmann, P., Bártová, J., Sokol, D., et al. (2004). Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol. Lett.* *93*, 97–108.
- 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 Research* *77*, 2620–2632.
- Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mager, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W.-H., Pagès, F., et al. (2011). Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Research* *71*, 1263–1271.
- Travaglione, S., Fabbri, A., and Fiorentini, C. (2008). The Rho-activating CNF1 toxin from pathogenic *E. coli*: A risk factor for human cancer development? *Infectious Agents and Cancer* *3*, 4.
- Tsuji, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., and DuBois, R.N. (1998). Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* *93*, 705–716.
- Tuncer, S., and Banerjee, S. (2015). Eicosanoid pathway in colorectal cancer: Recent updates. *World J Gastroenterol* *21*, 11748–11766.

- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* *444*, 1027–1031.
- Turner, N.D., and Lloyd, S.K. (2017). Association between red meat consumption and colon cancer: A systematic review of experimental results. *Exp Biol Med (Maywood)* *242*, 813–839.
- Turrientes, M.-C., González-Alba, J.-M., del Campo, R., Baquero, M.-R., Cantón, R., Baquero, F., and Galán, J.C. (2014). Recombination Blurs Phylogenetic Groups Routine Assignment in *Escherichia coli*: Setting the Record Straight. *PLoS ONE* *9*, e105395.
- Ueno, H., Murphy, J., Jass, J.R., Mochizuki, H., and Talbot, I.C. (2002). Tumour “budding” as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* *40*, 127–132.
- Ulger Toprak, N., 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. *Clinical Microbiology and Infection* *12*, 782–786.
- Ullman, T.A., and Itzkowitz, S.H. (2011). Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* *140*, 1807–1816.
- Umar, A. (2014). Cancer Immunoprevention: A New Approach to Intercept Cancer Early. *Cancer Prev Res* *7*, 1067–1071.
- Uribe-Herranz, M., Bittinger, K., Rafail, S., Guedan, S., Pierini, S., Tanes, C., Ganetsky, A., Morgan, M.A., Gill, S., Tanyi, J.L., et al. (2018). Gut microbiota modulates adoptive cell therapy via CD8 $\alpha$  dendritic cells and IL-12. *JCI Insight* *3*.
- Uronis, J.M., Mühlbauer, M., Herfarth, H.H., Rubinas, T.C., Jones, G.S., and Jobin, C. (2009). Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS ONE* *4*, e6026.
- Vande Voorde, J., Sabuncuoğlu, S., Noppen, S., Hofer, A., Ranjbarian, F., Fieuws, S., Balzarini, J., and Liekens, S. (2014). Nucleoside-catabolizing Enzymes in *Mycoplasma*-infected Tumor Cell Cultures Compromise the Cytostatic Activity of the Anticancer Drug Gemcitabine. *Journal of Biological Chemistry* *289*, 13054–13065.
- 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.
- Varela-Rey, M., Woodhoo, A., Martinez-Chantar, M.-L., Mato, J.M., and Lu, S.C. (2013). Alcohol, DNA Methylation, and Cancer. *Alcohol Res* *35*, 25–35.
- Venkatesh, M., Mukherjee, S., Wang, H., Li, H., Sun, K., Benechet, A.P., Qiu, Z., Maher, L., Redinbo, M.R., Phillips, R.S., et al. (2014). Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4. *Immunity* *41*, 296–310.
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 235–271.

- Vetizou, M., Pitt, J.M., Daillere, R., Lepage, P., Waldschmitt, N., Flament, C., Rusakiewicz, S., Routy, B., Roberti, M.P., Duong, C.P.M., et al. (2015a). Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* 350, 1079–1084.
- Vetizou, M., Pitt, J.M., Daillere, R., Lepage, P., Waldschmitt, N., Flament, C., Rusakiewicz, S., Routy, B., Roberti, M.P., Duong, C.P.M., et al. (2015b). Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* 350, 1079–1084.
- Veziat, J., Gagnière, J., Jouberton, E., Bonnin, V., Sauvanet, P., Pezet, D., Barnich, N., Miot-Noirault, E., and Bonnet, M. (2016). Association of colorectal cancer with pathogenic *Escherichia coli* : Focus on mechanisms using optical imaging. *World Journal of Clinical Oncology* 7, 293.
- Viaud, S., Saccheri, F., Mignot, G., Yamazaki, T., Daillère, R., Hannani, D., Enot, D.P., Pfirschke, C., Engblom, C., Pittet, M.J., et al. (2013). The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* 342, 971–976.
- 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 Journal of Gastroenterology* 24, 2327–2347.
- Vinolo, M.A.R., Ferguson, G.J., Kulkarni, S., Damoulakis, G., Anderson, K., Bohlooly-Y, M., Stephens, L., Hawkins, P.T., and Curi, R. (2011). SCFAs Induce Mouse Neutrophil Chemotaxis through the GPR43 Receptor. *PLoS ONE* 6, e21205.
- Vitale, M., Cantoni, C., Pietra, G., Mingari, M.C., and Moretta, L. (2014). Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur. J. Immunol.* 44, 1582–1592.
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., and Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol* 12, 239–252.
- Vizcaino, M.I., and Crawford, J.M. (2015). The colibactin warhead crosslinks DNA. *Nat Chem* 7, 411–417.
- Vogtmann, E., Hua, X., Zeller, G., Sunagawa, S., Voigt, A.Y., Hercog, R., Goedert, J.J., Shi, J., Bork, P., and Sinha, R. (2016). Colorectal Cancer and the Human Gut Microbiome: Reproducibility with Whole-Genome Shotgun Sequencing. *PLoS One* 11.
- Vries, R.G.J., Huch, M., and Clevers, H. (2010). Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Mol Oncol* 4, 373–384.
- Walker, A.J., Grainge, M.J., and Card, T.R. (2012). Aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drug use and colorectal cancer survival: a cohort study. *Br. J. Cancer* 107, 1602–1607.
- 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.

- Walsh, J., Griffin, B.T., Clarke, G., and Hyland, N.P. (2005). Drug–gut microbiota interactions: implications for neuropharmacology. *British Journal of Pharmacology* 0.
- Wang, D., Kreutzer, D.A., and Essigmann, J.M. (1998). Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 400, 99–115.
- Wang, D., Wang, H., Shi, Q., Katkuri, S., Walhi, W., Desvergne, B., Das, S.K., Dey, S.K., and DuBois, R.N. (2004). Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Cancer Cell* 6, 285–295.
- Wang, D., Buchanan, F.G., Wang, H., Dey, S.K., and DuBois, R.N. (2005). Prostaglandin E2 enhances intestinal adenoma growth via activation of the Ras-mitogen-activated protein kinase cascade. *Cancer Res.* 65, 1822–1829.
- Wang, D., Wang, H., Brown, J., Daikoku, T., Ning, W., Shi, Q., Richmond, A., Strieter, R., Dey, S.K., and DuBois, R.N. (2006). CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer. *J Exp Med* 203, 941–951.
- Wang, D., Sun, H., Wei, J., Cen, B., and DuBois, R.N. (2017a). CXCL1 Is Critical for Premetastatic Niche Formation and Metastasis in Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 77, 3655–3665.
- Wang, E.L., Qian, Z.R., Nakasono, M., Tanahashi, T., Yoshimoto, K., Bando, Y., Kudo, E., Shimada, M., and Sano, T. (2010). High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 102, 908–915.
- Wang, H.-F., Li, L.-F., Guo, S.-H., Zeng, Q.-Y., Ning, F., Liu, W.-L., and Zhang, G. (2016a). Evaluation of antibody level against *Fusobacterium nucleatum* in the serological diagnosis of colorectal cancer. *Scientific Reports* 6.
- Wang, J.-Y., Lin, S.-R., Wu, D.-C., Lu, C.-Y., Yu, F.-J., Hsieh, J.-S., Cheng, T.-L., Koay, L.-B., and Uen, Y.-H. (2007). Multiple molecular markers as predictors of colorectal cancer in patients with normal perioperative serum carcinoembryonic antigen levels. *Clin. Cancer Res.* 13, 2406–2413.
- Wang, Q., Takei, Y., Kobayashi, O., Osada, T., and Watanabe, S. (2009). Cyclooxygenase 2 Modulates Killing of Cytotoxic T Lymphocytes by Colon Cancer Cells. *J Clin Biochem Nutr* 45, 163–170.
- Wang, T., Cai, G., Qiu, Y., Fei, N., Zhang, M., Pang, X., Jia, W., Cai, S., and Zhao, L. (2012a). Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J* 6, 320–329.
- Wang, W., Zhu, J., Lyu, F., Panigrahy, D., Ferrara, K.W., Hammock, B., and Zhang, G. (2014).  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids-derived lipid metabolites on angiogenesis, inflammation and cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 113–115, 13–20.
- Wang, X., Allen, T.D., May, R.J., Lightfoot, S., Houchen, C.W., and Huycke, M.M. (2008). *Enterococcus faecalis* induces aneuploidy and tetraploidy in colonic epithelial cells through a bystander effect. *American Journal of Cancer, CAN. RES., CANCER RES., Cancer Research, Cancer Research., Journal of Cancer Research, The American Journal of Cancer, The Journal of Cancer Research* 68, 9909–9917.
- Wang, X., Yang, Y., Moore, D.R., Nimmo, S.L., Lightfoot, S.A., and Huycke, M.M. (2012b). 4-hydroxy-2-nonenal mediates genotoxicity and bystander effects caused by *Enterococcus faecalis*-infected macrophages. *Gastroenterology* 142, 543-551.e7.

- Wang, X., Allen, T.D., Yang, Y., Moore, D.R., and Huycke, M.M. (2013). Cyclooxygenase-2 Generates the Endogenous Mutagen trans-4-Hydroxy-2-nonenal in *Enterococcus faecalis*-infected Macrophages. *Cancer Prev Res (Phila)* 6, 206–216.
- 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. (2017b). Commensal-infected macrophages induce dedifferentiation and reprogramming of epithelial cells during colorectal carcinogenesis. *Oncotarget* 8, 102176–102190.
- Wang, Z., Li, S., Cao, Y., Tian, X., Zeng, R., Liao, D.-F., and Cao, D. (2016b). Oxidative Stress and Carbonyl Lesions in Ulcerative Colitis and Associated Colorectal Cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2016.
- 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, J., Zhang, M., and Zhou, J. (2015). Myeloid-derived suppressor cells in major depression patients suppress T-cell responses through the production of reactive oxygen species. *Psychiatry Research* 228, 695–701.
- Wei, Z., Cao, S., Liu, S., Yao, Z., Sun, T., Li, Y., Li, J., Zhang, D., and Zhou, Y. (2016a). Could gut microbiota serve as prognostic biomarker associated with colorectal cancer patients' survival? A pilot study on relevant mechanism. *Oncotarget* 7, 46158–46172.
- Wei, Z., Cao, S., Liu, S., Yao, Z., Sun, T., Li, Y., Li, J., Zhang, D., Zhou, Y., Wei, Z., et al. (2016b). 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* 365, 153–165.
- Wentworth, C.C., Jones, R.M., Kwon, Y.M., Nusrat, A., and Neish, A.S. (2010). Commensal-epithelial signaling mediated via formyl peptide receptors. *Am. J. Pathol.* 177, 2782–2790.
- Wershil, B.K., and Furuta, G.T. (2008). 4. Gastrointestinal mucosal immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, S380-383; quiz S415.
- Whiteside, T.L. (2012). What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Semin Cancer Biol* 22, 327–334.
- Wieser, V., Tymoszyk, P., Adolph, T.E., Grander, C., Grabherr, F., Enrich, B., Pfister, A., Lichtmanegger, L., Gerner, R., Drach, M., et al. (2016). Lipocalin 2 drives neutrophilic inflammation in alcoholic liver disease. *Journal of Hepatology* 64, 872–880.
- Willard-Mack, C.L. (2006). Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicol Pathol* 34, 409–424.

- Williams, R.E.O., Hill, M.J., and Drasar, B.S. (1971). The influence of intestinal bacteria on the absorption and metabolism of foreign compounds. *Journal of Clinical Pathology* *s3-5*, 125–129.
- Wimberly, A.L., Forsyth, C.B., Khan, M.W., Pemberton, A., Khazaie, K., and Keshavarzian, A. (2013). Ethanol-Induced Mast Cell-Mediated Inflammation Leads to Increased Susceptibility of Intestinal Tumorigenesis in the APC  $\Delta$ 468 Min Mouse Model of Colon Cancer. *Alcohol Clin Exp Res* *37*, E199–E208.
- Winter, S., Loddenkemper, C., Aebischer, A., Räbel, K., Hoffmann, K., Meyer, T.F., Lipp, M., and Höpken, U.E. (2010). The chemokine receptor CXCR5 is pivotal for ectopic mucosa-associated lymphoid tissue neogenesis in chronic *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Journal of Molecular Medicine* *88*, 1169–1180.
- Wislez, M., Rabbe, N., Marchal, J., Milleron, B., Crestani, B., Mayaud, C., Antoine, M., Soler, P., and Cadranet, J. (2003). Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: Role in tumor progression and death. *Cancer Research* *63*, 1405–1412.
- Wiśniewski, J.R., Duś-Szachniewicz, K., Ostasiewicz, P., Ziółkowski, P., Rakus, D., and Mann, M. (2015). Absolute Proteome Analysis of Colorectal Mucosa, Adenoma, and Cancer Reveals Drastic Changes in Fatty Acid Metabolism and Plasma Membrane Transporters. *J. Proteome Res.* *14*, 4005–4018.
- 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.
- Wongchana, W., and Palaga, T. (2012). Direct regulation of interleukin-6 expression by Notch signaling in macrophages. *Cell. Mol. Immunol.* *9*, 155–162.
- Wu, C.-H., Shih, Y.-W., Chang, C.-H., Ou, T.-T., Huang, C.-C., Hsu, J.-D., and Wang, C.-J. (2010a). EP4 upregulation of Ras signaling and feedback regulation of Ras in human colon tissues and cancer cells. *Arch. Toxicol.* *84*, 731–740.
- Wu, H.-J., Ivanov, I.I., Darce, J., Hattori, K., Shima, T., Umesaki, Y., Littman, D.R., Benoist, C., and Mathis, D. (2010b). Gut-Residing Segmented Filamentous Bacteria Drive Autoimmune Arthritis via T Helper 17 Cells. *Immunity* *32*, 815–827.
- Wu, N., Yang, X., Zhang, R., Li, J., Xiao, X., Hu, Y., Chen, Y., Yang, F., Lu, N., Wang, Z., et al. (2013). Dysbiosis Signature of Fecal Microbiota in Colorectal Cancer Patients. *Microbial Ecology* *66*, 462–470.
- Wu, P., Wu, D., Ni, C., Ye, J., Chen, W., Hu, G., Wang, Z., Wang, C., Zhang, Z., Xia, W., et al. (2014).  $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity* *40*, 785–800.
- Wu, S., Lim, K.C., Huang, J., Saidi, R.F., and Sears, C.L. (1998). *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 14979–14984.
- Wu, S., Morin, P.J., Maouyo, D., and Sears, C.L. (2003). *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology* *124*, 392–400.
- Wu, S., Powell, J., Mathioudakis, N., Kane, S., Fernandez, E., and Sears, C.L. (2004). *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Induces Intestinal Epithelial Cell Secretion of Interleukin-8 through Mitogen-

- Activated Protein Kinases and a Tyrosine Kinase-Regulated Nuclear Factor- $\kappa$ B Pathway. *Infection and Immunity* 72, 5832–5839.
- Wu, S., Shin, J., Zhang, G., Cohen, M., Franco, A., and Sears, C.L. (2006). The *Bacteroides fragilis* Toxin Binds to a Specific Intestinal Epithelial Cell Receptor. *Infection and Immunity* 74, 5382–5390.
- 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. *Nature Medicine* 15, 1016–1022.
- Wu, Y.-Y., Lin, C.-W., Cheng, K.-S., Lin, C., Wang, Y.-M., Lin, I.-T., Chou, Y.-H., and Hsu, P.-N. (2010c). Increased programmed death-ligand-1 expression in human gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 161, 551–559.
- Xiao, Y., and Freeman, G.J. (2015). The Microsatellite Instable (MSI) Subset of Colorectal Cancer is a particularly good candidate for checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Discov* 5, 16–18.
- Xu, X., and Zhang, X. (2015). Effects of cyclophosphamide on immune system and gut microbiota in mice. *Microbiol. Res.* 171, 97–106.
- 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. *The Journal of Immunology* 170, 816–822.
- Yan, Y., Kolachala, V., Dalmaso, G., Nguyen, H., Laroui, H., Sitaraman, S.V., and Merlin, D. (2009). Temporal and Spatial Analysis of Clinical and Molecular Parameters in Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis. *PLoS ONE* 4, e6073.
- Yang, Y. (2015). Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest* 125, 3335–3337.
- Yang, V.W., Shields, J.M., Hamilton, S.R., Spannhake, E.W., Hubbard, W.C., Hyland, L.M., Robinson, C.R., and Giardiello, F.M. (1998). Size-dependent increase in prostanoid levels in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis. *American Journal of Cancer, CAN. RES., CANCER RES., Cancer Research, Cancer Research., Journal of Cancer Research, The American Journal of Cancer, The Journal of Cancer Research* 58, 1750–1753.
- Yang, Y., Wang, X., Moore, D.R., Lightfoot, S.A., and Huycke, M.M. (2012). TNF- $\alpha$  mediates macrophage-induced bystander effects through Netrin-1. *Cancer Res* 72, 5219–5229.
- Yang, Y., Bazhin, A.V., Werner, J., and Karakhanova, S. (2013). Reactive oxygen species in the immune system. *Int. Rev. Immunol.* 32, 249–270.
- 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.
- Yaqub, S., Henjum, K., Mahic, M., Jahnsen, F.L., Aandahl, E.M., Bjørnbeth, B.A., and Taskén, K. (2008). Regulatory T cells in colorectal cancer patients suppress anti-tumor immune activity in a COX-2 dependent manner. *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 813–821.



Yatsuneneko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* *486*, 222–227.

Yazawa, T., Shibata, M., Gonda, K., Machida, T., Suzuki, S., Kenjo, A., Nakamura, I., Tsuchiya, T., Koyama, Y., Sakurai, K., et al. (2013). Increased IL-17 production correlates with immunosuppression involving myeloid-derived suppressor cells and nutritional impairment in patients with various gastrointestinal cancers. *Mol Clin Oncol* *1*, 675–679.

Yokoyama, W.M. (2000). Now you see it, now you don't! *Nature Immunology* *1*, 95–97.

Yoshimura, A., Wakabayashi, Y., and Mori, T. (2010). Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF- $\beta$ . *J Biochem* *147*, 781–792.

Yu, J., and Virshup, D.M. (2014). Updating the Wnt pathways. *Bioscience Reports* *34*, e00142.

Yu, J., Feng, Q., Wong, S.H., Zhang, D., Liang, Q., Yi, Q., Qin, Y., Tang, L., Zhao, H., Stenvang, J., Li, Y., et al. (2017a). Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. *Gut* *66*, 70–78.

Yu, T., Guo, F., Yu, Y., Sun, T., Ma, D., Han, J., Qian, Y., Kryczek, I., Sun, D., Nagarsheth, N., et al. (2017b). *Fusobacterium nucleatum* Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. *Cell* *170*, 548-563.e16.

Yu, X., Yuan, Z., Yang, Z., Chen, D., Kim, T., Cui, Y., Luo, Q., Liu, Z., Yang, Z., Fan, X., et al. (2018). The novel long noncoding RNA u50535 promotes colorectal cancer growth and metastasis by regulating CCL20. *Cell Death & Disease* *9*, 751.

Yuan, A., Steigen, S.E., Goll, R., Vonen, B., Husbekk, A., Cui, G., and Florholmen, J. (2008). Dendritic cell infiltration pattern along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *APMIS* *116*, 445–456.

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*.

Zafirellis, K., Zachaki, A., Agrogiannis, G., and Gravani, K. (2010). Inducible nitric oxide synthase expression and its prognostic significance in colorectal cancer. *APMIS* *118*, 115–124.

Zarbo, R.J., Nakhleh, R.E., Brown, R.D., Kubus, J.J., Ma, C.K., and Mackowiak, P. (1997). Prognostic significance of DNA ploidy and proliferation in 309 colorectal carcinomas as determined by two-color multiparametric DNA flow cytometry. *Cancer* *79*, 2073–2086.

Zeller, G., Tap, J., Voigt, A.Y., Sunagawa, S., Kultima, J.R., Costea, P.I., Amiot, A., Bohm, J., Brunetti, F., Habermann, N., et al. (2014). Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Molecular Systems Biology* *10*, 766–766.

Zhai, L., Ladomersky, E., Lenzen, A., Nguyen, B., Patel, R., Lauing, K.L., Wu, M., and Wainwright, D.A. (2018). IDO1 in cancer: a Gemini of immune checkpoints. *Cellular & Molecular Immunology* *15*, 447–457.

Zhang, L., and Wang, C.-C. (2014). Inflammatory response of macrophages in infection. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* *13*, 138–152.

- Zhang, N., and Bevan, M.J. (2011). CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity* 35, 161–168.
- Zhang, B., Wang, Z., Wu, L., Zhang, M., Li, W., Ding, J., Zhu, J., Wei, H., and Zhao, K. (2013). Circulating and Tumor-Infiltrating Myeloid-Derived Suppressor Cells in Patients with Colorectal Carcinoma. *PLoS One* 8.
- Zhang, Q., Zmasek, C.M., Cai, X., and Godzik, A. (2011). TIR domain-containing adaptor SARM is a late addition to the ongoing microbe-host dialog. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 461–468.
- Zhang, X., Kelaria, S., Kerstetter, J., and Wang, J. (2015a). The functional and prognostic implications of regulatory T cells in colorectal carcinoma. *J Gastrointest Oncol* 6, 307–313.
- Zhang, Y., Franzini, L., Chan, W., Xu, H., and Du, X.L. (2015b). Effects of Health Insurance on Tumor Stage, Treatment, and Survival in Large Cohorts of Patients with Breast and Colorectal Cancer. *J Health Care Poor Underserved* 26, 1336–1358.
- Zhao, L., Li, C., Zhang, R., Xue, H., Zhang, F., Zhang, F., and Gai, X. (2014). B7-H1 and B7-H4 expression in colorectal carcinoma: correlation with tumor FOXP3(+) regulatory T-cell infiltration. *Acta Histochem.* 116, 1163–1168.
- Zhu, H., Qin, H., Huang, Z., Li, S., Zhu, X., He, J., Yang, J., Yu, X., and Yi, X. (2015). Clinical significance of programmed death ligand-1 (PD-L1) in colorectal serrated adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 9351–9359.
- Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu. Rev. Immunol.* 28, 445–489.
- Zhuo, C., Li, Z., Xu, Y., Wang, Y., Li, Q., Peng, J., Zheng, H., Wu, P., Li, B., and Cai, S. (2014). Higher FOXP3-TSDR demethylation rates in adjacent normal tissues in patients with colon cancer were associated with worse survival. *Mol Cancer* 13, 153.
- Zhuo, C., Wu, X., Li, J., Hu, D., Jian, J., Chen, C., Zheng, X., and Yang, C. (2018). Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1 (CXCL1) Is Associated with Tumor Progression and Poor Prognosis in Patients with Colorectal Cancer. *Bioscience Reports* BSR20180580.
- Ziech, D., Franco, R., Pappa, A., and Panayiotidis, M.I. (2011). Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat. Res.* 711, 167–173.
- Zitvogel, L., Ayyoub, M., Routy, B., and Kroemer, G. (2016). Microbiome and Anticancer Immunosurveillance. *Cell* 165, 276–287.
- Zlobec, I., Lugli, A., Baker, K., Roth, S., Minoo, P., Hayashi, S., Terracciano, L., and Jass, J.R. (2007). Role of APAF-1, E-cadherin and peritumoral lymphocytic infiltration in tumour budding in colorectal cancer. *J. Pathol.* 212, 260–268.
- Zorn, E., and Hercend, T. (1999). A natural cytotoxic T cell response in a spontaneously regressing human melanoma targets a neoantigen resulting from a somatic point mutation. *Eur. J. Immunol.* 29, 592–601.
- Zou, W. (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 295–307.

Zou, S., Fang, L., and Lee, M.-H. (2018). Dysbiosis of gut microbiota in promoting the development of colorectal cancer. *Gastroenterol Rep (Oxf)* 6, 1–12.

Zumkeller, N., Brenner, H., Zwahlen, M., and Rothenbacher, D. (2006). *Helicobacter pylori* Infection and Colorectal Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Helicobacter* 11, 75–80.



# ANNEXES

---



## I- Annexe 1 : Liste des communications sur ces travaux

La majorité des résultats décrits dans ce manuscrit ont fait l'objet de communications orales et écrites. Les résumés et présentations ont tous été examinés par le comité de Sanofi selon les règles de confidentialité qui régissent la thèse CIFRE, l'autorisation de rendre publiques ces données a été approuvée pour toutes ces communications *via* le logiciel Matrix.

### 1- Publications

➤ **Deciphering immune microenvironment of whole organ slide, by digital imaging and Cognition Network Technology: application to mouse gut.**

A. Lopès, Al H. Casse, E. Billard, E. Boulcourt-Sambou, G. Roche, C. Larois, N. Barnich, S. Naimi, M. Bonnet, B. Dumas.

Publié dans **Scientific Report** le 12 novembre 2018

➤ **Microbial markers in colorectal cancer detection and/or prognosis**

R. Villéger, A. Lopès, J. Veziant, J. Gagnière, N. Barnich, E. Billard, D. Boucher, M. Bonnet

Revue publiée le 14 Juin 2018 dans **World Journal of Gastroenterology**

➤ **Colibactin-positive *E. coli* induces a pro-carcinogenic immune environment leading to immunotherapy resistance**

A. Lopès, E. Billard, Al H. Casse, R. Villeger, J. Veziant, G. Roche, G. Carrier, P. Sauvanet, E. Miot-Noirault, F. Pagès, S. Naimi, D. Pezet, N. Barnich, B. Dumas, M. Bonnet

En préparation

➤ **Brevet « Methods for selecting patients responding to anti-PD-1 treatment »»**

En préparation





## 2- Communications orales

### a) Internationales

- **25<sup>th</sup> Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, EACR, Amsterdam Jun. 30 – Jul. 30, 2018 :**

#### **IMPACT OF COLIBACTIN-PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* ON IMMUNE MICROENVIRONMENT IN PRECLINICAL COLORECTAL CANCER MODELS**

Ms A. Lopes, Mr Al H. Casse, Ms J. Veziant , Ms G. Roche, Mr N. Barnich, Ms E. Miot-Noirault, Ms S. Naimi, Ms E. Billard, Mr B. Dumas , Ms M. Bonnet

### b) Autres (Ecole doctorale et Sanofi)

- **21<sup>ème</sup> Journée de l'École Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement, JED SVSAE Clermont-Ferrand, Jun. 14 – Jun. 15, 2018 :**

#### **IMPACT DES *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTRICES DE COLIBACTINE SUR LE MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE D'UN MODEL PRÉCLINIQUE DU CANCER COLORECTAL**

Ms A. Lopes, Mr Al H. Casse, Ms J. Veziant , Ms G. Roche, Mr N. Barnich, Ms E. Miot-Noirault, Ms S. Naimi, Ms E. Billard, Mr B. Dumas , Ms M. Bonnet

- **1<sup>st</sup> Biologics Research Unit PhD and PostDoctoral Day, Sanofi R&D Vitry-Sur-Seine, Conference Call with Frankfurt, Germany and Cambridge, United States, Sanofi R&D Units – Oct. 19, 2016 :**

#### **CHRONIC INFECTION BY PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*: IMPACT ON TUMOR MICRO-ENVIRONMENT AND CARCINOGENESIS IN COLORECTAL CANCER**

Ms A. Lopes, Mr Al H. Casse , Ms G. Roche, Mr N. Barnich, Ms S. Naimi, Ms E. Billard, Mr B. Dumas , Ms M. Bonnet



### 3- Communications affichées

#### a) Internationales

- **25 th United European Gastroenterology Week, UEGW, Barcelone Oct. 28 – Nov. 1, 2017 :**

#### **IMPACT OF COLIBACTIN-PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* ON IMMUNE MICROENVIRONMENT IN PRECLINICAL COLORECTAL CANCER MODELS**

Ms A. Lopes, Mr Al H. Casse, Ms J. Veziant , Ms E. Cardamone, Mr D. Pezet, Mr N. Barnich, Ms E. Miot-Noirault, Ms S. Naimi, Mr E. Billard, Mr B. Dumas , Ms M. Bonnet

#### b) Sanofi

- **Biologics Research Symposium, Sanofi, Vitry-Sur-Seine Dec. 2017 :**

#### **IMPACT OF COLIBACTIN-PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* ON IMMUNE MICROENVIRONMENT IN PRECLINICAL COLORECTAL CANCER MODELS**

Ms A. Lopes, Mr Al H. Casse, Ms J. Veziant , Ms E. Cardamone, Mr D. Pezet, Mr N. Barnich, Ms E. Miot-Noirault, Ms S. Naimi, Mr E. Billard, Mr B. Dumas, Ms M. Bonnet



## **II- Annexe 2 : Revue de la littérature sur les marqueurs microbiens dans la détection et le pronostic du cancer colorectal**

## Microbial markers in colorectal cancer detection and/or prognosis

Romain Villéger, Amélie Lopès, Julie Veziat, Johan Gagnière, Nicolas Barnich, Elisabeth Billard, Delphine Boucher, Mathilde Bonnet

Romain Villéger, Amélie Lopès, Julie Veziat, Johan Gagnière, Nicolas Barnich, Elisabeth Billard, Delphine Boucher, Mathilde Bonnet, Université Clermont Auvergne, Inserm U1071, USC-INRA 2018, M2iSH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand 63000, France

Amélie Lopès, Research Biologics, Sanofi R&D, Vitry-Sur-Seine 94400, France

Julie Veziat, Johan Gagnière, Chirurgie digestive, Centre Hospitalier Universitaire, Clermont-Ferrand 63000, France

Nicolas Barnich, Elisabeth Billard, Delphine Boucher, Mathilde Bonnet, Université Clermont Auvergne, Institut Universitaire de Technologie de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand 63000, France

ORCID number: Romain Villéger (0000-0003-2815-045X); Amélie Lopès (0000-0001-8959-7840); Julie Veziat (0000-0001-5247-461X); Johan Gagnière (0000-0002-1820-3362); Nicolas Barnich (0000-0001-9465-7844); Elisabeth Billard (0000-0002-6066-4584); Delphine Boucher (0000-0002-6979-4094); Mathilde Bonnet (0000-0003-3629-7267).

**Author contributions:** Villéger R, Lopès A, Veziat J, Gagnière J, Billard E and Boucher D organized and wrote the manuscript; Barnich N critically revised the manuscript; Bonnet M organized, wrote and supervised the writing of the manuscript.

**Supported by** Inserm and Université Clermont Auvergne (UMR 1071), INRA (USC-2018); and grants from “Conseil régional Auvergne-Rhône-Alpes” and FDER/CPER.

**Conflict-of-interest statement:** None of the authors have any conflicts of interest to declare.

**Open-Access:** This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Manuscript source: Invited manuscript

**Correspondance to:** Mathilde Bonnet, PhD, Assistant Professor, M2iSH “Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l’Hôte” UMR 1071 Inserm/Université d’Auvergne USC INRA 2018, Centre Biomédical de Recherche et Valorisation, 28 Place Henri Dunant, Clermont-Ferrand 63000, France. [mathilde.bonnet@uca.fr](mailto:mathilde.bonnet@uca.fr)  
Telephone: +33-4-7318381  
Fax: +33-4-73178371

Received: April 6, 2018

Peer-review started: April 7, 2018

First decision: April 27, 2018

Revised: May 3, 2018

Accepted: May 18, 2018

Article in press: May 18, 2018

Published online: June 14, 2018

### Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the second leading cause of cancer worldwide. CRC is still associated with a poor prognosis among patients with advanced disease. On the contrary, due to its slow progression from detectable precancerous lesions, the prognosis for patients with early stages of CRC is encouraging. While most robust methods are invasive and costly, actual patient-friendly screening methods for CRC suffer of lack of sensitivity and specificity. Therefore, the development of sensitive, non-invasive and cost-effective methods for CRC detection and prognosis are necessary for increasing the chances of a cure. Beyond its beneficial functions for the host, increasing evidence suggests that the intestinal microbiota is a key factor associated with carcinogenesis. Many clinical studies have reported a disruption in the gut microbiota balance and an alteration in the faecal metabolome of CRC patients, suggesting the potential use of a microbial-based test as a non-invasive diagnostic and/or prognostic tool for CRC screening. This review aims to discuss the microbial signatures associated with CRC known to date, including dysbiosis and faecal metabolome alterations, and

the potential use of microbial variation markers for non-invasive early diagnosis and/or prognostic assessment of CRC and advanced adenomas. We will finally discuss the possible use of these markers as predictors for treatment response and their limitations.

**Key words:** Colorectal cancer; Microbiota; *F. nucleatum*; Colibactin-producing *E. coli*; Prognostic markers; Diagnostic markers; Dysbiosis

© **The Author(s) 2018.** Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Core tip:** Many clinical studies have reported a disruption in the gut microbiota balance and in the faecal metabolome in colorectal cancer. In this review, we describe the modifications in the microbiota composition and metabolome observed in colorectal cancer (CRC) tissue and stool samples. Then, we detail how these microbiota modifications may represent novel and promising non-invasive diagnostic and/or prognostic markers for CRC and advanced adenoma.

Villéger R, Lopès A, Veziant J, Gagnière J, Barnich N, Billard E, Boucher D, Bonnet M. Microbial markers in colorectal cancer detection and/or prognosis. *World J Gastroenterol* 2018; 24(22): 2327-2347 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v24/i22/2327.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v24.i22.2327>

## INTRODUCTION

Approximately 5% of the population in Western countries will develop colorectal cancer (CRC) during their lifetime<sup>[1]</sup>. CRC is a heterogeneous disease with a wide range of long-term outcomes and responses to treatment. Despite recent advances in the genetic and molecular characterization of tumours, CRC remains associated with a poor prognosis and very low rates of long-term survival among patients with advanced disease<sup>[2,3]</sup>. On the contrary, the 5-year survival of patients treated during the early stages of CRC, which represent only one-third of all CRC patients, is encouraging, ranging from 72% to 100%<sup>[4]</sup>. Therefore, early detection of both premalignant lesions and CRC is crucial for increasing the chances of a cure<sup>[5]</sup>. Moreover, accurate determination of the prognosis is crucial for the practitioners, in order to optimize and personalize treatment strategies. Given the poor prognosis of this cancer, it is essential to validate new diagnostic and prognostic markers. Studies on the implications of the gut microbiota in CRC are now increasing<sup>[6-11]</sup>. Identification of a CRC-associated dysbiosis and/or the targeted detection of procarcinogenic bacterial species and/or their effectors in stool or tissue samples may represent promising tools to overcome the limitations and the poor performance of current CRC screening

tools and prognostic/predictive factors. This review will focus on gut microbiota-related markers, which may be new biological markers for CRC screening or prognosis determination.

## CURRENT STRATEGIES FOR CRC SCREENING AND PROGNOSTIC FACTORS

### Screening strategies

Individual (opportunistic) and population-based (organized) screening strategies have been established permitting the reduction of CRC mortality either by detecting CRC or removing premalignant lesions<sup>[12]</sup>. Several CRC screening tests have been used and have different degrees of performance that vary worldwide and are primarily driven by costs, lifestyle and endoscopic resource constraints. In addition to the classic invasive endoscopic approaches, there has been great interest in developing and evaluating non-invasive methods, including radiographic examinations and stool- and blood-based tests, with the goal of creating efficient, safe, convenient and cost-effective screening tools<sup>[13-18]</sup>.

Endoscopy is currently the most effective modality for detecting asymptomatic premalignant polyps and CRC and for preventing CRC development by the immediate removal of premalignant lesions<sup>[13]</sup>. However, this procedure requires prior bowel cleansing and causes postprocedural discomfort, which are both responsible for low participation rates in colonoscopy CRC screening programmes<sup>[13]</sup>. Moreover, the need for general anaesthesia and the invasiveness of the procedure exposes patients to potentially severe complications<sup>[19,20]</sup>. Computed tomography (CT) colonography, also known as "virtual colonoscopy", is a non-invasive alternative to colonoscopy<sup>[21-23]</sup>. However, CT colonography presents some drawbacks such as its high cost, lack of standardized methods, need for bowel cleansing, poor performance for detecting small or flat lesions, and lack of ability to perform immediate biopsy<sup>[14,24]</sup>. For these reasons, other non-invasive stool- and blood-based tests are more promising tools for initial CRC screening in two-step approaches.

Non-invasive stool-based early CRC screening modalities involve either detecting occult bleeding in the stool, such as with guaiac fecal occult blood test (gFOBT) and faecal immunohistochemical testing (FIT), or detecting DNA, RNA and protein markers of neoplasia in faeces. The rationale for the use of such tools is that the mucosa of both polyps and CRC is more fragile and vascularized and thus bleeds and desquamates more easily than normal colonic mucosa. The effectiveness of gFOBT and FIT have been established for reducing both CRC incidence and mortality, thus permitting their use in many CRC screening programmes<sup>[2,19,21,25-36]</sup>. However, these techniques have been criticized for their relatively low specificity<sup>[14]</sup>. Therefore, new molecular

CRC screening methods targeting abnormal proteins or mRNA expression (e.g., *PKM2*,  $\beta$ -actin expression), gene mutations (e.g., *KRAS*, *APC*, *P53*), microsatellite instability (MSI) or aberrantly methylated promoter regions present in stool or body fluids are a developing area of investigation to establish innovative large-scale screening programmes<sup>[13,14,37-45]</sup>. As many tissues release some of their constituents in the bloodstream, the detection of circulating tumour cells DNA (cfDNA) in the blood is a recent area of great interest in CRC screening<sup>[46-49]</sup>. Although these biomarker tests show promising sensitivities, their high costs and high test positivity rates may lead to greater demands on endoscopy departments, and the absence of large-scale validation currently remains the main limitation of their routine use in population-based CRC screening programmes<sup>[18,40,41]</sup>.

### Prognostic and predictive factors

Many prognostic factors including many socioeconomic and clinical factors are routinely used to optimize and personalize treatment strategies<sup>[50-53]</sup>. However, pathological factors are currently the most powerful tools that are routinely used to adapt therapeutic strategies, especially for conditioning the administration of non-operative treatments, such as chemotherapy and radiotherapy. The TNM international staging system remains the gold-standard for determining both CRC prognosis and treatment indications<sup>[4,54-56]</sup>. Unfortunately, this classification is largely imperfect, which is highlighted by the constant changes it undergoes with the advances in the field of CRC research. Furthermore, it has some limitations. In particular, it is inaccurate for some subgroups of patients whose prognosis and indications for adjuvant treatments remain unclear. Therefore, some other pathological prognostic factors are routinely used, such as the presence of lymphovascular and/or perineural invasion<sup>[57-60]</sup>, tumour budding<sup>[61,62]</sup> and tumour differentiation grade<sup>[63,64]</sup>.

In addition, studies have shown tumour genomics and cellular alterations can supplement clinicopathological factors. Aneuploidy<sup>[65]</sup>, tumour-infiltrating lymphocytes<sup>[66,67]</sup>, overexpression of the CEA in tumours<sup>[68]</sup>, allelic loss in *DCC*, *TP53*, *APC* and *MCC* genes<sup>[69,70]</sup>, *TP53* gene mutations<sup>[71]</sup>, expression of CD44 protein<sup>[72]</sup>, high levels of thymidylate synthetase<sup>[73]</sup>, and the detection of MSI and both *RAS* and *BRAF* genes mutations all play prominent roles in determining CRC prognosis and in personalizing treatments. They are independent strong prognostic factors<sup>[74-82]</sup> and are also predictive of the response to some widely used chemotherapy regimens, including targeted therapies and immunotherapy<sup>[74,76,83-94]</sup>.

Serum prognostic factors [e.g., C-reactive protein (CRP), carcinoembryonic antigen (CEA), and cfDNA] can also be very useful tools. Both CRP and serum albumin levels are associated with a worse prognosis but are not routinely used as prognostic factors for CRC<sup>[95-101]</sup>. The CEA level is a well-recognized and routinely used independent prognostic factor for CRC<sup>[102,103]</sup>. Persis-

tently elevated CEA levels after treatment are correlated to both a higher risk of recurrence and decreased survival. Similarly, normal CEA levels after treatment are associated with improved recurrence-free and overall survival<sup>[104]</sup>. In addition to CRC screening, investigations evaluating cfDNA have recently gained attention in the field of CRC research. The detection and the quantification of specific gene mutations (*RAS* and *BRAF* genes) or DNA methylation alterations<sup>[105,106]</sup> are correlated with CRC prognosis<sup>[107,108]</sup>, independent of the tumour stage. In the future, monitoring of cfDNA levels may guide therapeutic strategies<sup>[109,110]</sup> and improve patient follow-up, allowing the earlier detection of recurrence.

As we previously mentioned, all these screening strategies and prognostic markers present many limitations. Therefore, there is still a need to develop other effective non-invasive screening and prognostic tools to replace or supplement those currently in use, with the aim of decreasing CRC mortality and optimizing treatment strategies. The study of intestinal microbiota provides new leads to identify powerful biomarkers.

## MICROBIAL SIGNATURES IN CRC

### Functions of intestinal microbiota on gut homeostasis

The intestinal microbiota and its host have coevolved to establish a symbiotic relationship leading to digestive system homeostasis. Many metabolic, immunological, structural and protection functions that are essential to the health of the host are performed by the intestinal microbiota. Thus, one of the major functions of the gut microbiota is to ferment complex carbohydrates in order to produce a large amount of metabolites (short chain fatty acids (SCFAs), bile acids, choline, essential vitamins, etc.), some of which represent energetic and nutrient substrates for intestinal cells<sup>[111,112]</sup>. Others are involved in the regulation of cellular processes or participate in regulating hepatic lipid and glucose homeostasis<sup>[112,113]</sup>. Another function of the gut microbiota is the maintenance of epithelial homeostasis since commensal bacteria can promote epithelial integrity<sup>[114]</sup>. They can induce structural and functional maturation of the colonic epithelium with strong modulation of mucus cells<sup>[115]</sup>. The intestinal microbiota also plays a fundamental role in the development, maturation and function of the host immune system<sup>[115,116]</sup> and also confers resistance to colonization by pathogenic microorganisms by competing both for nutrients and attachment sites to the intestinal epithelium, by producing and secreting antimicrobial compounds, such as bacteriocins, and by strengthening epithelial tight junctions<sup>[117]</sup>.

### CRC-associated gut microbiota dysbiosis

#### Approaches used to study the gut microbiome:

The gut microbiota has a very large diversity of microbial populations such as bacteria, archaea, eukaryotes and viruses. Because the colonic microbiota is mostly represented by bacteria, the bacterial community is the most studied. Both tissue and faecal samples



provide information about the structure of bacterial populations. The analysis of tissues is more relevant for evaluating the mechanisms of microbiota involvement in physiopathology. However, sampling of mucosa-associated bacteria by endoscopic biopsy of intestinal tissue is an invasive procedure. It is more difficult to implement than collection of a faecal sample, especially in healthy donors. Therefore, the vast majority of studies on the diversity and richness of the gut microbiota are conducted on stool samples, which are more useful for identifying diagnostic or prognostic markers for pathologies such as CRC.

The first data concerning the gut microbiota were provided by cultural approaches. However, these approaches allow only limited evaluation of this ecosystem, since less than 30% of intestinal bacteria have been cultivated to date. Since the 1990s, the advent of molecular tools targeting the bacterial 16S ribosomal RNA (rRNA) gene has revolutionized our knowledge of the gut microbiota from both faeces and tissues. Thus, genetic fingerprinting techniques (terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), hybridization approaches (fluorescence in situ hybridization (FISH), microarrays) and clone library analysis have been applied to provide a more complete description of its structure<sup>[118-122]</sup>. Currently, quantitative PCR (Q-PCR) and 16S rRNA gene next-generation sequencing (NGS) are the most used methods for describing the composition of the intestinal bacterial community and therefore for comparing the gut microbiota of healthy individual to that of patients with diseases. Thus, modifications in the microbiota composition, also called dysbiosis, in faeces and tissues have been described in CRC<sup>[123-130]</sup>. These different approaches allow only taxonomic identification of microbial communities. However, the gut is a complex and variable ecosystem. Understanding its function and the specific role of the different bacterial populations is essential. A metagenomics approach (shotgun sequencing) makes taxa identification possible and allows exploration of the metabolic potential of the intestinal microbiota<sup>[126,131,132]</sup>. Thus, the American Human Microbiome Project (HMP) and the European "MetaHIT" (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) consortia were formed in order to generate a catalogue of genes carried by the gut microbiota<sup>[133]</sup>. Intestinal microbial dysbiosis was recently investigated in patients with CRC<sup>[125,126,131,132]</sup>. Combining the metagenomics data available in databases with the application of other high-throughput meta-omics approaches, it is now possible to gain a better insight into the microbial function and to reveal the link between genetic potential and functionality in the gut microbiota.

**Cancer-associated microbiome alterations:** To date, there is no consensus in terms of the microbiota modifications observed in CRC using high-throughput sequencing of the bacterial 16S rRNA gene and metagenomics both in faecal and tissue samples compared

with samples from healthy individuals. The complexity of the gut microbial ecosystem associated with other technical or biological parameters, such as the geographical location of the studied populations, the lifestyle, the diet, the sample type (faeces, mucosa, tumour), the location of the tissue sampled (*i.e.*, right or left colon), the age of the individual, the stage of the disease, the number of patients studied, the molecular approach used (metagenomics, 16S rRNA gene NGS), the regions of the 16S rRNA targeted (V1-V2, V3, V3-V5, V4-V6 regions) for the NGS approach, and the taxonomic level considered, contribute to the lack of consensus on the definition of the composition of dysbiotic microbiota in patients with CRC.

Alpha diversity metrics, which represent the specific richness and the distribution of individuals within the species were found to be increased in adenoma and adenocarcinoma tissues compared with in normal mucosa<sup>[134-136]</sup>. However, these parameters were unchanged in faecal samples<sup>[125,134,137,138]</sup>, suggesting that the increase in diversity was limited to the neoplastic lesions and did not extend to the entire mucosa.

Significant shifts can be observed in the composition of the bacterial community at the phylum taxonomic level but also on a finer phylogenetic scale in CRC samples. However, these modifications vary depending on the analytic techniques used and the sample location (mucosa, adenocarcinoma, stool). It is accepted that *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* and *Proteobacteria* are enriched, while *Firmicutes* is decreased in CRC patients<sup>[10,139]</sup> (Figure 1). A similar dysbiosis has been described in CRC animal models<sup>[140,141]</sup>. In a taxonomy-based analyses conducted in 2013, Ahn *et al.*<sup>[142]</sup> described a lower relative abundance of *Clostridia* and increased *Fusobacterium* and *Porphyromonas* in case subjects compared with control subjects. Additionally, the genera *Bacteroides* and *Prevotella*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus gallolyticus* and *Escherichia coli* were overrepresented, while *Bacteroides vulgatus*, *Lactobacillus* and *Faecalibacterium prausnitzii* were decreased in the faeces or tumours of patients with CRC<sup>[123-125,131,143-146]</sup>. Other studies found that *Parvimonas micra*, *Solobacterium moorei*, *Peptostreptococcus stomatis* were consistently enriched in the microbiomes of the stools of CRC patients<sup>[126,131]</sup>. Many studies showed an enrichment of *Fusobacterium nucleatum* in stool and tissue samples from patients with colorectal carcinoma, which were confirmed by quantitative polymerase chain reaction (PCR)<sup>[126,131,147-149]</sup> (Figure 1). In addition to taxonomic studies, a metagenomics analysis showed an enrichment of virulence-associated bacterial genes in the tumour microenvironment<sup>[132]</sup>. Many studies reported a high prevalence of toxin genes expressed by some species described above. Most of enterotoxigenic *B. fragilis* (ETBF) strains detected in mucosal samples from patients with CRC harboured the *bft* gene, which encodes the bacterial toxin *B. fragilis* toxin (BFT)<sup>[149]</sup> (Figure 1). ETBF and BFT carrying strains were detected more

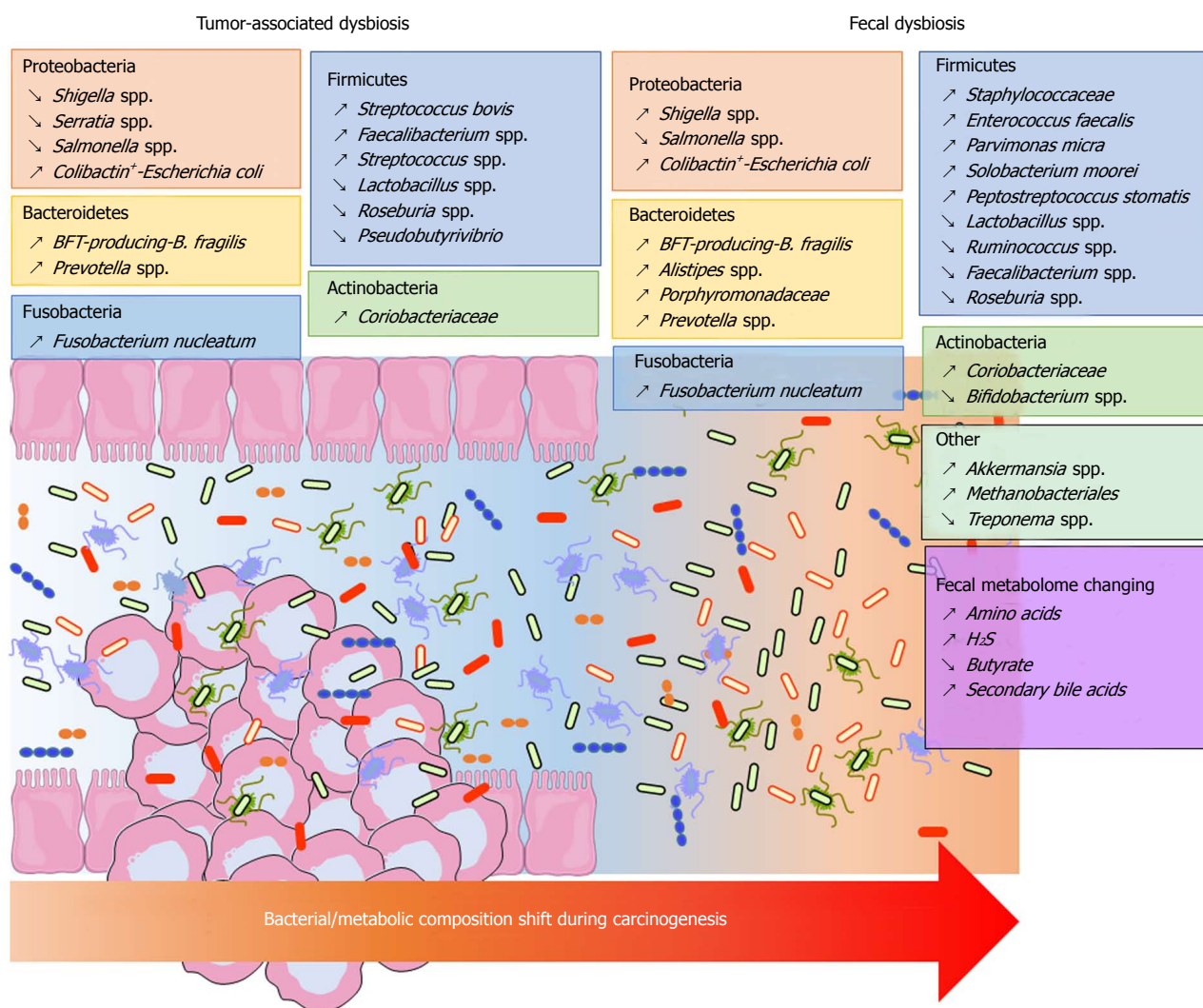


Figure 1 Bacterial and metabolic composition shifts during carcinogenesis. BFT: *B. fragilis* toxin.

often in stool samples from CRC patients compared with samples from controls<sup>[150]</sup>. Many studies reported that mucosa-associated BFT-producing *B. fragilis* was more prevalent in late-stage CRC<sup>[130,149]</sup>. Other toxins named cyclomodulins [cytolethal distending toxin (CDT), colibactin, cytotoxic necrotizing factor and cycle inhibiting factor], which are carried by *E. coli*, were more prevalent in CRC samples<sup>[145,146,151,152]</sup>. In particular, the colibactin toxin, which is synthesised from the *pks* island, was preferentially detected in strains isolated from CRC patients<sup>[145,146,152]</sup> (Figure 1). These toxin genes could be targets of interest for developing new prognostic or diagnostic factors.

The majority of published data were obtained in the adenocarcinoma stage. However, the intestinal mucosa might present different ecological niches according to the stage of colorectal tumour progression. Due to difficulties in sampling patients during the early stages of the disease, studies focusing on the temporal evolution of microbiota dysbiosis during colorectal carcinogenesis are scarce. Nevertheless, metacommunities can be defined from the bacterial community configurations

by Nakatsu *et al.*<sup>[153]</sup>. In early stages of CRC, bacteria belonging to *Fusobacterium*, *Parvimonas*, *Gemella* and *Leptotrichia* genera were more abundant<sup>[153]</sup>. Moreover, the occurrence of *Escherichia coli*, *Pseudomonas veronii* and *Lactococcus* were specific to adenomatous lesions<sup>[135,153]</sup>, whereas *Fusobacterium* enrichment was observed in carcinomas<sup>[153]</sup>. Additionally, the abundance of *Bacteroides fragilis* and *Granulicatella* were progressively increased during the adenoma-carcinoma sequence. Lu *et al.*<sup>[135]</sup> showed that there was a clear increase in both *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* in tissues from patients with colorectal adenoma compared with tissues from healthy volunteers. Kostic *et al.*<sup>[147]</sup> found that *Fusobacterium* spp. were enriched in human colonic adenomas relative to the surrounding tissues and in stool samples from patients with colorectal adenoma compared with samples from healthy subjects. In addition, *Lactococcus* and *Pseudomonas* were enriched in preneoplastic tissue, whereas *Enterococcus*, *Bacillus*, and *Solibacillus* were reduced. A high frequency of colibactin-producing *E. coli* and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* were also observed in adenomas from patients with

Familial Adenomatous Polyposis<sup>[154]</sup>. Recently, Eklöf *et al.*<sup>[151]</sup> showed that the prevalence of colibactin-producing *E. coli* were progressively increased in the adenoma-carcinoma sequence.

Finally, most of these studies do not take into account the heterogeneity of this pathology. As an example, *Prevotella* and *Firmicutes* populations were more abundant in individuals with proximal tumours, whereas *Bacteroidetes* populations were overrepresented in distal cancers<sup>[155]</sup>. More recently, a drastic difference in the microbial composition has been observed in the mucosa of colitis-associated CRC patients, with an increase in the *Enterobacteriaceae* family and the *Sphingomonas* genus and a decrease in *Fusobacterium* and *Ruminococcus* genera, when compared with the mucosa of sporadic CRC patients<sup>[156]</sup>. Similarly, we observed that colibactin-producing *E. coli* were more frequently identified in microsatellite stable (MSS) CRC<sup>[157]</sup>. In the same way, high colonization by *F. nucleatum* and negative-colibactin *E. coli* bacteria were detected in patients with MSI (microsatellite instability) compared with the MSS phenotype<sup>[149,157,158]</sup>. All these data suggest that the dysbiosis signature of CRC might be different according to the tumour phenotype and/or molecular alterations.

In conclusion, all these data show that there is an adenoma- and a CRC-associated signature in the microbiome (Figure 1). Metagenomics studies showed a redundancy in the metabolic functions of the intestinal microbiota. Therefore, studies of metabolites might reflect the CRC-associated microbiota dysbiosis with a lower heterogeneity than taxonomic determination.

### Profiling metabolome alterations in CRC

**Metabolite analysis procedures:** The metabolome has been defined as the complete complement of all small molecule (< 1500 Da) metabolites found in a specific cell, organ or organism<sup>[159]</sup>. Global metabolomics alterations reflect changes due to environmental factors, diet, drugs, exercise, genetic variation and regulation, changes in the gut microflora, and altered kinetic activity or levels of enzymes<sup>[160]</sup>. The most widely used analytical high-throughput tools for metabolomics studies are nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS), and they both can provide complementary snapshots of the metabolome of body fluids<sup>[161]</sup>. Sample preparation is arguably the most critical step in metabolomics, but there is no universal, robust and repeatable approach defined. NMR spectroscopy benefits from being highly reproducible<sup>[162]</sup> and offers the potential to precisely quantify compounds in complex mixtures without complex sample preparation requirements<sup>[163]</sup>. Gas chromatography coupled with MS (GC-MS), which is used for the analysis of volatile low molecular weight metabolites, and liquid chromatography coupled with MS (LC-MS), which is used for the analysis of non-volatile components, have a higher sensitivity than NMR, but the sample preparation must be more fastidious. For more details regarding sample preparation in metabolomics, several authors previously described methods for NMR,

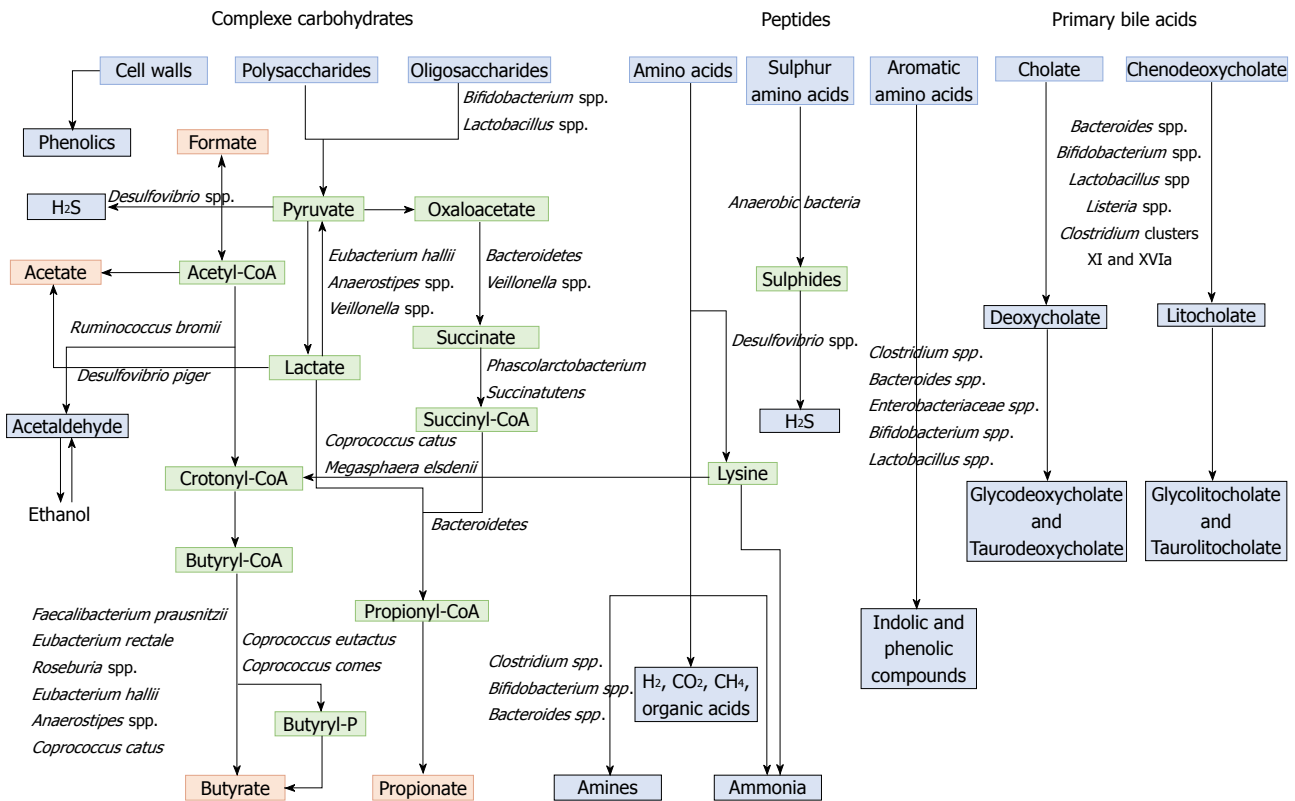
GC-MS and LC-MS analysis<sup>[163]</sup>.

During the last decade, using NMR and/or MS, metabolic profiles of colorectal tumour biopsies and matched colon mucosa samples revealed potential biomarkers in carbohydrate metabolism, short-chain fatty acid and other lipid metabolism, nucleotide biosynthesis, and secondary bile and steroid metabolism<sup>[164,165]</sup>. The repertoire of metabolic derangements derived from cancer cells, their microenvironment and the gut microbiota composition and activity may culminate in a distinct metabolic phenotype (also called metabotype) that characterizes the pathology of CRC. Metabolome analysis of blood and urine samples from CRC patients were performed, and several studies reported relevant biomarkers for CRC<sup>[166-168]</sup>. However, the transient localization of faeces in the colon and rectum makes it an ideal matrix for gaining information about the health and pathological state of the colon and rectum, and thus for colorectal cancer diagnosis<sup>[169]</sup>. Faecal samples consist of a diverse range of endogenous metabolites including tumour cell metabolites and gut microbiota metabolites<sup>[169]</sup>.

### Microbial influence on the faecal metabolome:

When ingested, the majority of food nutrients are absorbed in the small intestine. The residues that reach the colon are complex nutrients, generally fibres (complex carbohydrates), but also protein residues and host products such as mucin and bile acids secreted by the liver in response to fat ingestion<sup>[170]</sup>. These compounds are metabolized by the microbial populations into a diversity of metabolites that can be used by the host colonic cells<sup>[171]</sup>. The gut microbiota makes an important contribution to human metabolism by providing enzymatic functions that are not encoded by the human genome, such as the breakdown of polysaccharides and polyphenols and the synthesis of vitamins by fermentation and anaerobic degradation<sup>[172]</sup>.

Polysaccharides and non-digestible carbohydrates are the primary substrates for microbial fermentation<sup>[173]</sup>. Saccharolytic fermentation of carbohydrates produces beneficial metabolites such as short-chain fatty acids<sup>[174]</sup>. However, if there is limited carbohydrate intake, bacteria use alternative energy sources, resulting in the production of other metabolites that may be more detrimental to human health<sup>[172]</sup>. The three SCFAs acetate, propionate and butyrate, which are considered beneficial metabolites, are mainly produced from polysaccharides and oligosaccharides through their metabolism into pyruvate (Figure 2). Propionate and acetate can be produced from lactate, while butyrate and acetate can be produced from acetyl CoA (Figure 2)<sup>[171]</sup>. Butyrate is an important energy source for gut epithelial cells, while propionate and acetate are mostly metabolized in the liver for cholesterol synthesis, gluconeogenesis or lipogenesis<sup>[175]</sup>. For more information, the complete synthesis and functions of SCFAs was extensively and previously described<sup>[113,175]</sup>. Microbial use of bile salts is a classic example of the relationship between the gut



**Figure 2** Metabolism of food dietary components by the gut microbiota. Dietary residues are in blue, intermediate metabolites in green, SCFAs in red, and other metabolites in grey. Adapted from Louis *et al.*<sup>[255]</sup>, Russel *et al.*<sup>[164]</sup>; Rowland *et al.*<sup>[172]</sup>; Flint *et al.*<sup>[171]</sup>. SCFAs: Short chain fatty acids.

microbiota metabolism and the host metabolism. The primary bile acids cholic acid and chenodeoxycholic acid are produced in the liver from cholesterol and are conjugated to glycine or taurine. They are secreted by the liver following high fat intakes<sup>[176]</sup>. The intestinal microbiota can affect the biotransformation of bile acids *via* deconjugation, dehydrogenation, epimerization, and 7 $\alpha$ / $\beta$ -dehydroxylation of primary bile acids to generate secondary bile acids<sup>[177]</sup>. A number of gut bacteria possess bile salt hydrolase enzymes that are capable of hydrolysing the amide bond between the bile acid and its conjugated amino acid, producing the secondary bile acids deoxycholate and litocholate (Figure 2). Bile salt hydrolase genes were identified in *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, and *Listeria*<sup>[178]</sup>. Deconjugation of bile acids by microbial hydrolases leads to an increased level of secondary bile acids, especially deoxycholic acid, which is also known to exert carcinogenic activity<sup>[179]</sup>. Polyphenols from fruits and vegetables are poorly absorbed in the intestine, and 90-95% are metabolized by the gut microbiota<sup>[180]</sup>. The diversity of polyphenol compounds is wide and has been summarized by Marín *et al.*<sup>[181]</sup> and Rowland *et al.*<sup>[172]</sup>. Several gut microbial enzymes can transform plant polyphenols, such as phenolic acids, flavonoids, and lignans into simple phenolic metabolites<sup>[172,181,182]</sup>. These microbial phenolic metabolites are mostly known for their antioxidant activity and have been shown to inhibit the production of pro-inflammatory media-

tors<sup>[183]</sup>. Microbial protein fermentation generates potentially toxic and pro-carcinogenic metabolites involved in CRC, such as phenols, sulfides, ammonia and nitrosamines<sup>[7]</sup>. A subset of bacteria, including *Bacteroidetes* and *Firmicutes* species, produce potentially bioactive substances *via* the degradation of amino acids, especially nitrogenous compounds that can exert carcinogenic effects<sup>[184-186]</sup>. Moreover, sulfides produced in the gut by the bacterial reduction of dietary sulfate are enterotoxic<sup>[187]</sup>. Microbial metabolism may contribute to the toxicity of alcohol, especially in the gastrointestinal tract where aerobic and facultative anaerobic bacteria convert ethanol to acetaldehyde, which is known to be a highly toxic and pro-carcinogenic compound<sup>[188]</sup>. A specific role for bacterial biofilms in colonic metabolome was also reported<sup>[189]</sup>. With organic acids, gas is the major products of microbial fermentation in anaerobic systems. Anaerobic bacterial fermentation can lead to the synthesis of hydrogen, carbon dioxide, or methane for the majority. Some minor gases, such as NH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, volatile amines, indolic and phenolic compounds, that are mainly associated with peptide fermentation, are also produced<sup>[190,191]</sup> (Figure 2). Among them, H<sub>2</sub>S is produced by sulfate-reducing bacteria (*Desulfovibrio* spp.) by sulfur amino acids and taurine metabolism.

Given the key role of the gut microbiota in dietary metabolism and the growing evidence of its potential impact on host health, studies were performed to elucidate the metabolic functions of the gut micro-



biota. These studies mostly used metagenomic, meta-transcriptomic, or metaproteomic approaches, but using metabolomics to study the gut microbiota appears to be a promising method. Indeed, metabolomics allow the measurement of both host and microbial metabolites, including metabolites in host samples derived from the microbiota and host metabolites processed by the microbial population.

**Metabolome alterations in CRC:** The analysis of the CRC-associated metabolome has highlighted differences in the biochemical composition of CRC patients' stools. Few animal studies have investigated the metabolomic profile of faeces in CRC models. Significant alterations were observed in fatty acid metabolites and metabolites associated with bile acids (hypoxanthine xanthine, taurine) in faeces of *Hmga1* mice as analysed by ultra-performance liquid chromatography UPLC/MS/MS and GC-MS<sup>[192]</sup>. Increased levels of short, arginine-enriched, tetra-peptide fragments were reported in the transgenic mouse faeces<sup>[192]</sup>. Similarly, CRC patients were found to have higher levels of some amino acids and alterations in the levels of some SCFA in their stools compared with controls<sup>[193]</sup>. Butyrate and several butyrate-producing bacteria were depleted in CRC patients' stools<sup>[194]</sup>. Chen *et al.*<sup>[143]</sup> observed that butyrate and butyrate-producing bacteria were more prevalent in healthy controls than in advanced colorectal adenoma patients, with a lower prevalence of *Clostridium*, *Roseburia*, and *Eubacterium* spp. and a higher prevalence of *Enterococcus* and *Streptococcus* spp. Moreover, faecal  $\beta$ -glucuronidase activity is increased in patients with CRC compared with healthy controls<sup>[195]</sup>. High-fat diets, which are positively correlated with the incidence of CRC, lead to an increase in bile secretion, and increased faecal bile acid concentrations were reported in patients with CRC<sup>[196]</sup>. High faecal bile concentrations were positively correlated with the incidence of CRC, with potential tumour-promoting effects of bile acids themselves<sup>[176]</sup>. Furthermore, strong antimicrobial bile acid activities lead to significant changes in the gut microbiota composition, with a relative increase in some *Gammaproteobacteria* and *Bacteroidetes* species that are associated with CRC<sup>[197]</sup>. The dietary intake of preformed N-nitroso compounds is positively correlated with CRC in European populations<sup>[185]</sup>, but these compounds can also be formed endogenously *via* acid-driven nitrosation in the stomach and by the nitrosation of amines that are derived from the microbial fermentation of protein in the large intestine<sup>[198]</sup>. Higher levels of H<sub>2</sub>S were detected in CRC patients than those in healthy controls, but no increases in *Desulfovibrio* spp. were observed in faecal samples from patients with CRC<sup>[199]</sup>. Using metabolome screening, a metabolic influence of microbial biofilms on colonic tissues and the related occurrence of cancer has been reported. It was found that host cancer and specific bacterial biofilm structures contributed to the polyamine metabolite pool (N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-diacetylspermine), which might have an impact

on cancer development and progression<sup>[189]</sup>.

All these data suggest that faecal metabolomics may not only be used for diagnostic purposes but may also serve as a prognostic tool for CRC treatment in the future.

## MICROBIAL-RELATED BIOMARKERS FOR CRC DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION

### *Validation of multi-bacteria models for early detection and/or prognosis determination*

Even if a precise microbial signature associated with CRC and a precancerous lesion have not been exactly defined, different works have shown that dysbiosis may provide new significant biomarkers for CRC diagnosis or prognostic determination.

Several studies were able to determine a correlation between faecal microbial dysbiosis and CRC prognosis/diagnosis. In 2014, Zackular *et al.*<sup>[140]</sup> used faecal samples from 30 CRC patients, 30 colonic adenoma patients and 30 healthy controls to establish a classification model. The authors observed significant differences in the gut microbiome of healthy controls when compared with those with adenoma or CRC, and faecal microbial screening had an accuracy of 0.798 AUC for predicting CRC. By combining their gut microbiome data with known clinical risk factors (body mass index, age, race), they were able to significantly improve the ability of faecal microbial screening to discriminate between the three clinical groups when compared with risk factors alone. Zeller *et al.*<sup>[131]</sup>, with 53 CRC patients, 42 adenoma patients and 61 controls, established a 16S-based classifier for CRC detection and validated their model with an accuracy of 0.82. More recently, Ai *et al.*<sup>[200]</sup> sequenced the 16S rRNA gene from the faeces of 141 Chinese participants and evaluated the performance of different classifiers for predicting CRC based on faecal microbiota. The authors reported a strong variation in the CRC prediction between the different models tested, with the Bayes Net algorithm displaying the best performance. Their prediction test, with 0.93 AUC, was more accurate than the FOBT, while combining both tests improved the accuracy. This list of studies that assessed the use of changes in the faecal microbiota for colorectal adenoma and CRC screening is non-exhaustive. Among these studies, while an association between CRC and microbiota is clear, there is limited agreement in the taxa reported.

For this reason, Shah *et al.*<sup>[201]</sup> conducted a microbiome-based meta-analysis for CRC, using the results from 9 studies and including 79 colorectal adenomas patients, 195 CRC patients and 235 controls, in order to identify a common microbial marker in stool samples. In addition to the previously reported taxa, they highlighted a significant increase in *Parvimonas micra* ATCC 33270, *Streptococcus anginosus*, *Parabacteroides distasonis* and other members of *Proteobacteria*. Their microbiome-based CRC versus control classification produced an area under the receiver operating characteristic (AUROC)

curve of 80.3%, which was 91.3% when combined with clinical markers from the bioinformatics pipeline. Similarly, Amitay *et al.*<sup>[202]</sup> conducted a systematic review of 19 studies (including most of the studies cited above) examining the differences in the gut microbial community in faecal samples from people diagnosed with CRC or adenomas and from people without colorectal neoplasia to generate faecal multi-bacterial models for early detection of adenomas and CRC. Overall, they concluded that there was limited but encouraging evidence that the differences in the faecal gut microbiome between people diagnosed with CRC or adenoma and healthy controls could be used to develop new faecal tests. The authors suggested that future research should focus on developing unified documented and reproducible protocols for studying the human gut microbiome from faecal samples for more comparable results between cohorts<sup>[202]</sup>.

In many studies, patients had a corresponding decrease in the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio, which might be an important marker for intestinal dysbiosis in colorectal precancerous lesions. *F. nucleatum*, BFT-producing *B. fragilis*, and colibactin-producing *E. coli* are known to be associated with a more aggressive TNM stage<sup>[130,145,149,158]</sup>. Their detection by PCR in tissues or faeces might allow the development of rapid tests for new prognostic factors. With a 16S rRNA gene sequencing approach, *F. nucleatum*, *B. fragilis* and *Faecalibacterium prausnitzii* were identified as useful prognostic biomarkers for CRC<sup>[203]</sup>. Indeed, in this study, *F. nucleatum* and *B. fragilis* were more abundant in the groups with a worse prognosis, while *Faecalibacterium prausnitzii* was more abundant in the survival group. Similarly, Mima *et al.*<sup>[158]</sup> showed that the amount of *F. nucleatum* DNA in colorectal cancer tissue was associated with shorter survival. Another study demonstrated that the detection of *F. nucleatum* associated with the non-invasive screening FIT could be a promising marker for detecting neoplastic lesions<sup>[204]</sup>. Recently, Eklöf *et al.*<sup>[151]</sup> explored the use of microbial markers for bacteria harbouring the *pks* island, which codes for colibactin synthesis, and *F. nucleatum* in stool as potential screening markers for CRC. Authors suggested that the presence of the *pks* island and *F. nucleatum* detection could predict cancer with a specificity of 63.1% and a sensitivity of 84.6%, suggesting the potential value of these microbial parameters as putative non-invasive biomarkers for CRC detection<sup>[151]</sup>. Multicentric clinical studies need to be performed to validate all these promising results in a larger cohort. Moreover, these bacterial markers might provide a CRC-associated microbiome risk profile that might aid in the early identification of individuals who are at risk and require close surveillance.

### Screening faecal microbial-related metabolites for CRC detection

Screening the faecal metabolome is a promising non-invasive procedure for obtaining a unique metabolic fingerprint to diagnose or determine the prognosis of

CRC. To our knowledge, only a few studies with different metabolomics methods have shown the diagnostic potential of faecal samples for human colorectal cancer. They are summarized in Table 1. In 2009, Bezabeh *et al.*<sup>[205]</sup> used <sup>1</sup>H NMR to detect colorectal neoplasia in 111 CRC human faecal samples and compared them with samples from 412 healthy controls. NMR-based metabolic profiling of faecal water extracts from patients with colorectal cancer and healthy individuals was able to identify potential diagnostic markers, such as SCFA (acetate and butyrate) and amino acids (proline and cysteine)<sup>[206]</sup>. More recently, the analysis of lyophilized stools by HPLC-GC/MS-MS resulted in the identification of 41 relevant faecal metabolites, such as xenobiotics, heme, peptides/amino acids, vitamins and co-factors, that had increased or decreased concentrations in CRC samples<sup>[207]</sup>. Volatile metabolome profiling of faecal samples using GC/TOF-MS also had diagnostic potential for detecting colorectal cancer. Phua *et al.*<sup>[208]</sup> evaluated a small cohort and identified three specific markers (fructose, linoleic acid, and nicotinic acid) that were found at lower levels in the faecal volatile metabolome of CRC patients than in that of healthy subjects. A similar study using an electronic nose on samples from 40 CRC patients, 60 advanced adenoma patients, and 57 healthy controls was able to strongly distinguish the faecal volatile organic compounds (VOC) profile of patients with CRC and advanced adenoma from controls<sup>[209]</sup>. Given the volatility of the analysed compounds, improper sample collection and storage can drastically reduce the repeatability and robustness of the method. Batty *et al.*<sup>[210]</sup> proposed the use of selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) to classify 62 human faecal samples with a positive result on FOBT. Indeed, their method showed a 75% correct discrimination between CRC samples and low risk samples<sup>[210]</sup>. More recently, Sinha *et al.*<sup>[211]</sup> intended to establish a microbe-metabolite correlation through the analysis of lyophilized faecal samples of 42 CRC patients and 89 healthy controls using HPLC-GC/MS-MS. They reported that CRC was independently associated with lower levels of *Clostridia*, *Lachnospiraceae*, *p*-aminobenzoate and conjugated linoleate and with higher levels of *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *p*-hydroxy-benzaldehyde, and palmitoyl-sphingomyelin. The authors identified a strong microbe-metabolite correlation in CRC patients. In conclusion, the diagnostic potential of metabolic profiling of faeces is strongly supported by several human studies, but these analytical techniques require standard procedures in order to obtain comparable and robust high-quality data.

### Prediction of treatment response with microbial-associated markers

It has long been recognized that the gut microbiota can modify the pharmacokinetics of various drugs including anticancer therapies thus influencing therapeutic outcomes<sup>[212-217]</sup> and/or side effects<sup>[218-220]</sup>. Irinotecan, which is a first-line chemotherapeutic agent for metastatic CRC, causes adverse and dose-limiting effects that are

**Table 1 Fecal metabolic profiling studies in colorectal cancer**

Matrix	Cohort	Study observations	Analytical method	Ref.
Aqueous dispersion of stools	111 CRC, 412 healthy controls	Potential to detect colorectal neoplasia	One-dimensional <sup>1</sup> H magnetic resonance spectroscopy	[205]
Fecal water extract	21 CRC	Reproducible and effective method for detecting colorectal cancer markers.	NMR	[206]
Lyophilized human faeces	11 healthy controls 11 CRC 10 healthy controls	(\ ) SCFA (acetate, butyrate) appears to be the most effective marker in CRC. (\ ) butyric acid, linoleic acid, glycerol, (\ ) secondary bile acid associated with (\ ) <i>Ruminococcus</i> spp., (/ ) leucine, valine, acetic acid, valeric acid, isobutyric acid, isovaleric acid, (/ ) <i>A. muciniphila</i> associated with (/ ) proline, serine, threonine (\ ) fructose, linoleic acid, and nicotinic acid in CRC stools.	GC-MS	[193]
Lyophilized human faeces	11 CRC, 10 healthy controls		GC/TOF-MS	[208]
Volatile organic compounds in the headspace of lyophilized stool samples	40 CRC, 60 advanced adenomas, 57 healthy controls	Discrimination of fecal VOC profiles of patients with adenomas and CRC.	Electronic nose	[209]
Lyophilized human faeces	48 CRC, 102 healthy controls	41 metabolites significantly associated with CRC (\ ) xenobiotics (\ ) heme, peptides/amino acids, vitamins, co-factors, other CRC associated molecules.	HPLC-GC/MS-MS	[207]
Human faeces	31 CRC, 31 controls with positive FOBT	Discrimination of CRC samples with better specificity and sensitivity than FOBT. (\ ) ammonia, sulfides, acetaldehyde	SIFT-MS	[210]
Lyophilized human faeces	42 CRC, 89 healthy controls	Microbe-metabolite correlation in CRC: (/ ) <i>Clostridia</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>p</i> -aminobenzoate and conjugated linoleate. (/ ) <i>Fusobacterium</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>p</i> -hydroxy-benzaldehyde, and palmitoyl-sphingomyelin.	HPLC-GC/MS-MS	[211]
Human faeces	13 CRC	Discrimination of CRC samples with 7 metabolites: aliphahydroxyisovalerate, isovalerate, N1-methyl-2-pyridine-5-carboxamide, 7-ketodeoxycholate, deoxycholate, valerate, and tryptophylglycine	UPLC-MS/MS; GC/MS	[165]

CRC: Colorectal cancer; CT: Computed tomography; gFOBT: Guaiac fecal occult blood test; NMR: Nuclear magnetic resonance; MS: Mass spectrometry; GC-MS: Gas chromatography coupled with MS; LC-MS: Liquid chromatography coupled with MS; UPLC: Ultra-performance liquid chromatography; HPLC: High-performance liquid chromatography; TOF: Time of flight; VOC: Volatile organic compounds; SIFT-MS: Selected ion flow tube MS.

largely influenced by bacterial  $\beta$ -glucuronidase<sup>[214,219]</sup>. Metagenomic and metabolomic profiling of patients' gut microbiota could thus be informative before choosing this drug to predict side effects. Moreover, specific members of the gut microbiota might also drive chemoresistance to treatment. Indeed, *Fusobacterium nucleatum*, causes resistance to oxaliplatin and 5-FU through autophagy induction in colorectal cancer cell lines *in vitro* and *in vivo* in mouse models of colorectal xenografts<sup>[221]</sup>. Conversely, the sensitivity of cancer cells to many chemotherapeutic agents has been shown to be modulated by intra-tumoural microbial agents<sup>[212,215,216,221,222]</sup>. Moreover, the gut microbiota also has a long-term impact on both the efficacy and toxicity of anticancer therapies. In particular, it can modulate the concomitant anti-tumour immune response<sup>[223-227]</sup>. Indeed, various pre-clinical mouse models of subcutaneous tumours (melanoma, lung cancer, sarcoma) have suggested that specific crosstalk between bacteria and immune cells may affect responses to anticancer chemotherapies<sup>[223-227]</sup>. In terms of CRC in particular, the efficacy of oxaliplatin, which is a drug routinely used for CRC treatment, has been shown to be strongly reinforced by gut microbiota in mice that were transplanted with MC38 colorectal syngeneic tumours, due to myeloid cells with increased anti-tumour functions<sup>[224]</sup>. In addition, it has been described that the gut microbiota contributes to anti-tumour functions of

adoptively transferred T cells in several models, including colorectal tumours implanted in mice<sup>[225,228,229]</sup>. This suggests that the patients' microbiota should also be taken into account in future clinical studies involving infusion of autologous anticancer T cells.

Immune checkpoint therapies are often used in association with chemotherapies and can also be positively or negatively impacted by the gut microbiota in terms of toxicity<sup>[230-233]</sup> and therapeutic effect, as shown for anti-CTLA-4<sup>[231,233]</sup>, anti-PD-L1<sup>[234]</sup> and anti-PD-1<sup>[235-237]</sup> antibodies. Interestingly, three clinical investigations demonstrated that the gut microbiota can be used to predict responder and non-responder patients to PD-1/PDL-1 immunotherapies in several solid epithelial tumours<sup>[235-237]</sup>. In terms of CRC, many studies have shown the capacity of the gut microbiota to modulate tumour-infiltrating myeloid cell<sup>[238-240]</sup> and T cell responses<sup>[241-244]</sup>, while improvement in immunotherapy efficacy by the microbiota is mediated precisely by these immune pathways in solid human epithelial tumours (e.g., melanoma)<sup>[235-237]</sup>. Moreover, in a subcutaneous CRC mouse model, a positive impact of some microbial species on anti-CTLA-4 immunotherapy was observed<sup>[233]</sup>. Given the severe colitis observed in some patients receiving immunotherapies (e.g., antibodies to CTLA4 and PD-L1) and the role of gut microbes in colitis, it is possible that the gut microbiota influences this toxicity.

Investigations are thus needed to elucidate the potential role of the microbiota on immunotherapy efficacy and toxicity in preclinical models and patients. Gut microbiota profiling of CRC patients might be useful in the future to predict treatment responses and/or side effects of cancer chemotherapies and immunotherapies. All these data could lead to “personalized medicine 2.0” that is being developed in an ongoing study investigating the impact of the intestinal microbiome on treatment responses and the toxicity of capecitabine or TAS-102 chemotherapies in patients with metastatic and/or irresectable CRC<sup>[245]</sup>.

Perioperative antibiotic prophylaxis strategies targeting the gut microbiota are widely used in colorectal surgery. The aim of such approaches is to prevent both surgical site and wound infections, protecting against potential contamination by the microorganisms that are spread from surgically induced alterations of the intestinal epithelial barrier. However, these antibiotic prophylaxis strategies may also impair the beneficial impact of the gut microbiota on intestinal immune function and healing (for review<sup>[246]</sup>). Few studies have investigated the impact that bowel preparation prior to colorectal surgery may have on the mucosa-associated and luminal colonic microbiota<sup>[247]</sup>. After the suppression of beneficial bacteria, the host may lose its colonization resistance to pathogens and may have decreased local stimulation of systemic immunity and the healing process<sup>[248,249]</sup>. After surgery, if the commensal microbiota does not repopulate the tract, the situation can lead to the development of pathogenic bacteria such as *C. difficile*<sup>[250]</sup>. Moreover, data from animal and human studies have suggested that some of the bacteria present at the anastomotic site may respond to surgical stress by activating virulence pathways, which results in alterations in the healing process. An investigation of the faecal microbiota of patients before and after colorectal surgery for CRC revealed that *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* were the dominant pathogens present postoperatively in the stools, with a several log-fold increase during the postoperative recovery period<sup>[251]</sup>. Postoperative sepsis (e.g., anastomotic leakage, perianastomotic abscess) is the most feared complication after colorectal surgery and is responsible for potentially deadly complications and significant alterations in the patient’s quality of life. The critical role of the intestinal microbiome in sepsis has been illustrated by studies on germ-free animals, which demonstrated improved survival in these animals compared with conventional animals<sup>[252]</sup>. Therefore, the restoration and/or maintenance of a microbiota favouring intestinal healing and preventing surgical site infections after colorectal surgery could be a promising approach for the development of new therapeutic strategies, thus targeting the gut microbiota to improve surgical outcomes. Moreover, the parallel development of tools, such as the “personalized microbiota composition analysis”, to be performed pre- and postoperatively to evaluate the clinical relevance of gut microbiota modulation to positively influence the clinical outcomes

and to optimize the perioperative strategies appears promising.

### **Limitations of microbial markers and future challenges and directions**

The complexity of the microbiome turns the need for microbial marker-based diagnosis techniques into a real challenge. Numerous studies have reported associations between microbial markers, such as *F. nucleatum*, or colibactin-producing *E. coli*, and CRC, but to date, there is no universal microbial marker defined for CRC detection. Several limitations should be taken into consideration for the future development of new tests. First, the very high variability of the microbiota composition between individuals due to sex, age, diet, lifestyle, genetic background, medication use, ethnicity, or geographical location make finding a universal microbial marker almost impossible. Antibiotic therapy greatly influences the expression of microbial markers and is a critical limitation to microbial marker use. Moreover, standardization in terms sample collection and storage, RNA or metabolite extraction, sample analysis, and data processing is essential to compare studies. If studies that screen for microbiota composition use the same method of 16S rRNA sequencing, the use of metabolomics technologies will require exhaustive standardization between studies. Stary *et al.*<sup>[253]</sup> shared a very interesting and detailed list of recommendations for using microbial markers for CRC screening. (1) Any studies should be prepared carefully, taking into account the recommendations and limitations of techniques published previously. (2) Validation of CRC screening markers on specific populations should be encouraged because differences in the gut microbiome are observed in different geographical locations or in different racial/ethnic groups. (3) Whenever possible, conventional culture should be used to confirm the findings from sequencing studies. Particularly, the candidate marker status of species or genes revealed by molecular techniques should be confirmed or refuted by culture and vice versa. Systematic high-throughput culturomics should be developed because cultivation represents an approach that is economical. (4) Screening techniques for CRC risk should evaluate all the known candidate markers, combining particular species, genotoxin production and possibly further strain characteristics whenever relevant. And (5) the potential for practical detection should always be considered. For example, tumour screening, which requires colonoscopy, is costly, uncomfortable for patient and is the gold standard tool for CRC screening. Faecal samples are better non-invasive specimens for developing these microbial-associated-markers. However, faeces are likely to contain a large number of microbial species unrelated to the disease site, which may introduce noise in the detection of potential biomarkers of the disease. Because some bacteria that are associated with CRC, such as *F. nucleatum*, are indigenous to the human oral cavity, analysing the oral microbiome may be an alternative screening method



for CRC. Saliva is a biological fluid that may be suitable for biomarker detection. The oral microbial compositions may theoretically reflect the oral and general health status. Flemer *et al.*<sup>[254]</sup> found that several oral taxa (such as *Streptococcus* and *Prevotella* spp.) were differentially abundant in CRC patients versus controls. Moreover, they developed a classification model based on the oral swab microbiota that distinguished individuals with CRC or polyps from controls (sensitivity: 53% CRC, 67% polyps; specificity: 96%). Importantly, when data from both the faecal and oral swab microbiota were considered in this model, the sensitivity increased to 76% for CRC and 88% for polyps. In addition to Stry's recommendations, we showed that microbial markers might be different depending on the tumour CRC phenotype<sup>[157]</sup>. Moreover, a deeper understanding of the gut microbiota structure and function may help to identify several bacteria that when combined may provide a real CRC-associated microbial signature.

Finally, the therapeutic efficacy of anticancer drugs could also be improved by active modulation of the gut microbiota through the use of probiotics, prebiotics or specific inhibitors. This perspective is supported by the fact that immunotherapy resistance observed in germ-free mice, in antibiotic-treated mice, and in those that have previously received faecal microbiota transplantation (FMT) from non-responder patients, can be reversed by FMT from responder patients<sup>[233,235-237]</sup>. Moreover, it has been highlighted that specific bacterial species, such as *Lactobacillus johnsonii*<sup>[226]</sup>, *Enterococcus hirae*<sup>[223,226]</sup>, *Barnesiella intestinihominis*<sup>[223]</sup>, *Akkermansia muciniphila*<sup>[237]</sup>, *Bacteroides*<sup>[233]</sup> and *Bifidobacterium*<sup>[234,236]</sup> species, are beneficial in this context, which may lead the way to innovative "oncobiotics" strategies that combine anticancer and microbiota-targeting agents.

## CONCLUSION

In this review, we discuss both predictive and prognostic microbial-associated markers identified in CRC. The faecal-associated microbiota may be dynamically linked to colon cancer, which, in turn, may offer evidence for microflora-associated diagnostic, preventive, and prognostic approaches for CRC. However, it is clear that additional clinical studies are necessary to validate these parameters to improve the diagnosis and therapeutic management of CRC.

## REFERENCES

- 1 Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; **64**: 104-117 [PMID: 24639052 DOI: 10.3322/caac.21220]
- 2 Rees CJ, Bevan R. The National Health Service Bowel Cancer Screening Program: the early years. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; **7**: 421-437 [PMID: 23899282 DOI: 10.1586/17474124.2013.811045]
- 3 Jones RP, Jackson R, Dunne DF, Malik HZ, Fenwick SW, Poston GJ, Ghaneh P. Systematic review and meta-analysis of follow-up after hepatectomy for colorectal liver metastases. *Br J Surg* 2012; **99**: 477-486 [PMID: 22261895 DOI: 10.1002/bjs.8667]
- 4 O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004; **96**: 1420-1425 [PMID: 15467030 DOI: 10.1093/jnci/djh275]
- 5 Winawer SJ. The history of colorectal cancer screening: a personal perspective. *Dig Dis Sci* 2015; **60**: 596-608 [PMID: 25599958 DOI: 10.1007/s10620-014-3466-y]
- 6 Sears CL, Garrett WS. Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host Microbe* 2014; **15**: 317-328 [PMID: 24629338 DOI: 10.1016/j.chom.2014.02.007]
- 7 Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; **13**: 800-812 [PMID: 24132111 DOI: 10.1038/nrc3610]
- 8 Gao R, Gao Z, Huang L, Qin H. Gut microbiota and colorectal cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; **36**: 757-769 [PMID: 28063002 DOI: 10.1007/s10096-016-2881-8]
- 9 Yu YN, Fang JY. Gut Microbiota and Colorectal Cancer. *Gastrointest Tumors* 2015; **2**: 26-32 [PMID: 26674881 DOI: 10.1159/000380892]
- 10 Gagnière J, Raisch J, Veziat J, Barnich N, Bonnet R, Buc E, Bringer MA, Pezet D, Bonnet M. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016; **22**: 501-518 [PMID: 26811603 DOI: 10.3748/wjg.v22.i2.501]
- 11 Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol* 2012; **10**: 717-725 [PMID: 22941505 DOI: 10.1038/nrmicro2873]
- 12 Zhang J, Cheng Z, Ma Y, He C, Lu Y, Zhao Y, Chang X, Zhang Y, Bai Y, Cheng N. Effectiveness of Screening Modalities in Colorectal Cancer: A Network Meta-Analysis. *Clin Colorectal Cancer* 2017; **16**: 252-263 [PMID: 28687458 DOI: 10.1016/j.clcc.2017.03.018]
- 13 Bevan R, Rutter MD. Colorectal Cancer Screening-Who, How, and When? *Clin Endosc* 2018; **51**: 37-49 [PMID: 29397655 DOI: 10.5946/ce.2017.141]
- 14 Bray C, Bell LN, Liang H, Collins D, Yale SH. Colorectal Cancer Screening. *WJM* 2017; **116**: 27-33 [PMID: 29099566]
- 15 Hadjipetrou A, Anyfantakis D, Galanakis CG, Kastanakis M, Kastanakis S. Colorectal cancer, screening and primary care: A mini literature review. *World J Gastroenterol* 2017; **23**: 6049-6058 [PMID: 28970720 DOI: 10.3748/wjg.v23.i33.6049]
- 16 Hamzehzadeh L, Yousefi M, Ghaffari SH. Colorectal Cancer Screening: A Comprehensive Review to Recent Non-Invasive Methods. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2017; **11**: 250-261 [PMID: 28989593]
- 17 Issa IA, Nouredine M. Colorectal cancer screening: An updated review of the available options. *World J Gastroenterol* 2017; **23**: 5086-5096 [PMID: 28811705 DOI: 10.3748/wjg.v23.i28.5086]
- 18 Maida M, Macaluso FS, Ianiro G, Mangiola F, Sinagra E, Hold G, Maida C, Cammarota G, Gasbarrini A, Scarpulla G. Screening of colorectal cancer: present and future. *Expert Rev Anticancer Ther* 2017; **17**: 1131-1146 [PMID: 29022408 DOI: 10.1080/14737140.2017.1392243]
- 19 Leuraud K, Jezewski-Serra D, Viguier J, Salines E. Colorectal cancer screening by guaiac faecal occult blood test in France: Evaluation of the programme two years after launching. *Cancer Epidemiol* 2013; **37**: 959-967 [PMID: 24035240 DOI: 10.1016/j.canep.2013.07.008]
- 20 Rutter MD, Nickerson C, Rees CJ, Patnick J, Blanks RG. Risk factors for adverse events related to polypectomy in the English Bowel Cancer Screening Programme. *Endoscopy* 2014; **46**: 90-97 [PMID: 24477363 DOI: 10.1055/s-0033-1344987]
- 21 Rex DK, Johnson DA, Anderson JC, Schoenfeld PS, Burke CA, Inadomi JM; American College of Gastroenterology. American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening 2009 [corrected]. *Am J Gastroenterol* 2009; **104**: 739-750 [PMID: 19240699 DOI: 10.1038/ajg.2009.104]
- 22 Pox CP. Controversies in colorectal cancer screening. *Digestion* 2014; **89**: 274-281 [PMID: 25034478 DOI: 10.1159/000363287]
- 23 Sali L, Mascalchi M, Falchini M, Ventura L, Carozzi F, Castiglione G, Delsanto S, Mallardi B, Mantellini P, Milani S, Zappa M,

- Grazzini G; SAVE study investigators. Reduced and Full-Preparation CT Colonography, Fecal Immunochemical Test, and Colonoscopy for Population Screening of Colorectal Cancer: A Randomized Trial. *J Natl Cancer Inst* 2015; **108**: pii: djv319 [PMID: 26719225 DOI: 10.1093/jnci/djv319]
- 24 **Pooler BD**, Kim DH, Pickhardt PJ. Indeterminate but Likely Unimportant Extracolonic Findings at Screening CT Colonography (C-RADS Category E3): Incidence and Outcomes Data From a Clinical Screening Program. *AJR Am J Roentgenol* 2016; **207**: 996-1001 [PMID: 27505184 DOI: 10.2214/AJR.16.16275]
- 25 **Brenner H**, Stock C, Hoffmeister M. Effect of screening sigmoidoscopy and screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies. *BMJ* 2014; **348**: g2467 [PMID: 24922745 DOI: 10.1136/bmj.g2467]
- 26 **Vleugels JL**, van Lanschot MC, Dekker E. Colorectal cancer screening by colonoscopy: putting it into perspective. *Dig Endosc* 2016; **28**: 250-259 [PMID: 26257272 DOI: 10.1111/den.12533]
- 27 **Mandel JS**, Bond JH, Church TR, Snover DC, Bradley GM, Schuman LM, Ederer F. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study. *N Engl J Med* 1993; **328**: 1365-1371 [PMID: 8474513 DOI: 10.1056/NEJM199305133281901]
- 28 **Shaukat A**, Mongin SJ, Geisser MS, Lederle FA, Bond JH, Mandel JS, Church TR. Long-term mortality after screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013; **369**: 1106-1114 [PMID: 24047060 DOI: 10.1056/NEJMoa1300720]
- 29 **Holme Ø**, Bretthauer M, Frøtheim A, Odgaard-Jensen J, Hoff G. Flexible sigmoidoscopy versus faecal occult blood testing for colorectal cancer screening in asymptomatic individuals. *Cochrane Database Syst Rev* 2013 [PMID: 24085634 DOI: 10.1002/14651858.CD009259.pub2]
- 30 **Heresbach D**, Manfredi S, d'halluin PN, Bretagne JF, Branger B. Review in depth and meta-analysis of controlled trials on colorectal cancer screening by faecal occult blood test. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; **18**: 427-433 [PMID: 16538116 DOI: 10.1097/00042737-200604000-00018]
- 31 **Pitkääniemi J**, Seppä K, Hakama M, Malminiemi O, Palva T, Vuoristo MS, Järvinen H, Paimela H, Pikkarainen P, Anttila A, Elovainio L, Hakulinen T, Karjalainen S, Pyllkänen L, Rautalahti M, Sarkeala T, Vertio H, Malila N. Effectiveness of screening for colorectal cancer with a faecal occult-blood test, in Finland. *BMJ Open Gastroenterol* 2015; **2**: e000034 [PMID: 26462283 DOI: 10.1136/bmjgast-2015-000034]
- 32 **Katičić M**, Antoljak N, Kujundžić M, Stamenić V, Skoko Poljak D, Kramarić D, Stimac D, Strnad Pešikan M, Samija M, Ebling Z. Results of National Colorectal Cancer Screening Program in Croatia (2007-2011). *World J Gastroenterol* 2012; **18**: 4300-4307 [PMID: 22969192 DOI: 10.3748/wjg.v18.i32.4300]
- 33 **Steele RJ**, McClements PL, Libby G, Black R, Morton C, Birrell J, Mowat NA, Wilson JA, Kenicer M, Carey FA, Fraser CG. Results from the first three rounds of the Scottish demonstration pilot of FOBT screening for colorectal cancer. *Gut* 2009; **58**: 530-535 [PMID: 19036949 DOI: 10.1136/gut.2008.162883]
- 34 **Rex DK**, Boland CR, Dominitz JA, Giardiello FM, Johnson DA, Kaltenbach T, Levin TR, Lieberman D, Robertson DJ. Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients From the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2017; **153**: 307-323 [PMID: 28600072 DOI: 10.1053/j.gastro.2017.05.013]
- 35 **Navarro M**, Nicolas A, Ferrandez A, Lanás A. Colorectal cancer population screening programs worldwide in 2016: An update. *World J Gastroenterol* 2017; **23**: 3632-3642 [PMID: 28611516 DOI: 10.3748/wjg.v23.i20.3632]
- 36 **Hewitson P**, Glasziou P, Irwig L, Towler B, Watson E. Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemoccult. *Cochrane Database Syst Rev* 2007 [PMID: 17253456 DOI: 10.1002/14651858.CD001216.pub2]
- 37 **Li R**, Liu J, Xue H, Huang G. Diagnostic value of fecal tumor M2-pyruvate kinase for CRC screening: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2012; **131**: 1837-1845 [PMID: 22261915 DOI: 10.1002/ijc.27442]
- 38 **Haug U**, Rothenbacher D, Wentz MN, Seiler CM, Stegmaier C, Brenner H. Tumour M2-PK as a stool marker for colorectal cancer: comparative analysis in a large sample of unselected older adults vs colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2007; **96**: 1329-1334 [PMID: 17406361 DOI: 10.1038/sj.bjc.6603712]
- 39 **Tonus C**, Sellinger M, Koss K, Neupert G. Faecal pyruvate kinase isoenzyme type M2 for colorectal cancer screening: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2012; **18**: 4004-4011 [PMID: 22912551 DOI: 10.3748/wjg.v18.i30.4004]
- 40 **Imperiale TF**, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME; Colorectal Cancer Study Group. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med* 2004; **351**: 2704-2714 [PMID: 15616205 DOI: 10.1056/NEJMoa033403]
- 41 **Schreuders EH**, Grobbee EJ, Spaander MC, Kuipers EJ. Advances in Fecal Tests for Colorectal Cancer Screening. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2016; **14**: 152-162 [PMID: 26825703 DOI: 10.1007/s11938-016-0076-0]
- 42 **Ahlquist DA**. Multi-target stool DNA test: a new high bar for noninvasive screening. *Dig Dis Sci* 2015; **60**: 623-633 [PMID: 25492503 DOI: 10.1007/s10620-014-3451-5]
- 43 **Dhaliwal A**, Vlachostergios PJ, Oikonomou KG, Moshenyat Y. Fecal DNA testing for colorectal cancer screening: Molecular targets and perspectives. *World J Gastrointest Oncol* 2015; **7**: 178-183 [PMID: 26483873 DOI: 10.4251/wjgo.v7.i10.178]
- 44 **Imperiale TF**, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, Ahlquist DA, Berger BM. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med* 2014; **370**: 1287-1297 [PMID: 24645800 DOI: 10.1056/NEJMoa1311194]
- 45 **Knudsen AB**, Zaubler AG, Rutter CM, Naber SK, Doria-Rose VP, Pabiniak C, Johanson C, Fischer SE, Lansdorp-Vogelaar I, Kuntz KM. Estimation of Benefits, Burden, and Harms of Colorectal Cancer Screening Strategies: Modeling Study for the US Preventive Services Task Force. *JAMA* 2016; **315**: 2595-2609 [PMID: 27305518 DOI: 10.1001/jama.2016.6828]
- 46 **Hauptman N**, Glavač D. Colorectal Cancer Blood-Based Biomarkers. *Gastroenterol Res Pract* 2017; **2017**: 2195361 [PMID: 29147109 DOI: 10.1155/2017/2195361]
- 47 **Hench IB**, Hench J, Tolnay M. Liquid Biopsy in Clinical Management of Breast, Lung, and Colorectal Cancer. *Front Med (Lausanne)* 2018; **5**: 9 [PMID: 29441349 DOI: 10.3389/fmed.2018.00009]
- 48 **Jia S**, Zhang R, Li Z, Li J. Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget* 2017; **8**: 55632-55645 [PMID: 28903450 DOI: 10.18632/oncotarget.17184]
- 49 **Nordgård O**, Tjensvoll K, Gilje B, Søreide K. Circulating tumour cells and DNA as liquid biopsies in gastrointestinal cancer. *Br J Surg* 2018; **105**: e110-e120 [PMID: 29341153 DOI: 10.1002/bjs.10782]
- 50 **Law WL**, Choi HK, Lee YM, Ho JW. The impact of postoperative complications on long-term outcomes following curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2007; **14**: 2559-2566 [PMID: 17522945 DOI: 10.1245/s10434-007-9434-4]
- 51 **McArdle CS**, McMillan DC, Hole DJ. Impact of anastomotic leakage on long-term survival of patients undergoing curative resection for colorectal cancer. *Br J Surg* 2005; **92**: 1150-1154 [PMID: 16035134 DOI: 10.1002/bjs.5054]
- 52 **Nespoli A**, Gianotti L, Totis M, Bovo G, Nespoli L, Chiodini P, Brivio F. Correlation between postoperative infections and long-term survival after colorectal resection for cancer. *Tumori* 2004; **90**: 485-490 [PMID: 15656334 DOI: 10.1177/030089160409000508]
- 53 **Mynster T**, Christensen IJ, Moesgaard F, Nielsen HJ. Effects of the combination of blood transfusion and postoperative infectious complications on prognosis after surgery for colorectal cancer. Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group. *Br J Surg* 2000; **87**: 1553-1562 [PMID: 11091245 DOI: 10.1046/j.1365-2168.2000.01570.x]
- 54 **Adloff M**, Arnaud JP, Ollier JC, Schloegel M. [Can the prognosis of patients treated surgically in cancer of the rectum or colon

- be improved by follow-up? Prospective study of 909 patients]. *Chirurgie* 1989; **115**: 228-36; discussion 236-7 [PMID: 2805932]
- 55 **Moertel CG**, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med* 1990; **322**: 352-358 [PMID: 2300087 DOI: 10.1056/NEJM199002083220602]
- 56 **Greene FL**, Stewart AK, Norton HJ. A new TNM staging strategy for node-positive (stage III) colon cancer: an analysis of 50,042 patients. *Ann Surg* 2002; **236**: 416-21; discussion 421 [PMID: 12368669 DOI: 10.1097/00000658-200210000-00003]
- 57 **Compton CC**, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willett C. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; **124**: 979-994 [PMID: 10888773]
- 58 **Compton CC**. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol* 2003; **16**: 376-388 [PMID: 12692203 DOI: 10.1097/01.MP.0000062859.46942.93]
- 59 **Huh JW**, Kim HR, Kim YJ. Lymphovascular or perineural invasion may predict lymph node metastasis in patients with T1 and T2 colorectal cancer. *J Gastrointest Surg* 2010; **14**: 1074-1080 [PMID: 20431977 DOI: 10.1007/s11605-010-1206-y]
- 60 **Liebig C**, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, Berger DH, Albo D. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 5131-5137 [PMID: 19738119 DOI: 10.1200/JCO.2009.22.4949]
- 61 **Nakamura T**, Mitomi H, Kikuchi S, Ohtani Y, Sato K. Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2005; **52**: 1432-1435 [PMID: 16201089]
- 62 **Zlobec I**, Lugli A, Baker K, Roth S, Minoo P, Hayashi S, Terracciano L, Jass JR. Role of APAF-1, E-cadherin and peritumoral lymphocytic infiltration in tumour budding in colorectal cancer. *J Pathol* 2007; **212**: 260-268 [PMID: 17516584 DOI: 10.1002/path.2164]
- 63 **Purdie CA**, Piris J. Histopathological grade, mucinous differentiation and DNA ploidy in relation to prognosis in colorectal carcinoma. *Histopathology* 2000; **36**: 121-126 [PMID: 10672056 DOI: 10.1111/j.1365-2559.2000.00826.x]
- 64 **Cho YB**, Chun HK, Yun HR, Kim HC, Yun SH, Lee WY. Histological grade predicts survival time associated with recurrence after resection for colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2009; **56**: 1335-1340 [PMID: 19950787]
- 65 **Zarbo RJ**, Nakhleh RE, Brown RD, Kubus JJ, Ma CK, Mackowiak P. Prognostic significance of DNA ploidy and proliferation in 309 colorectal carcinomas as determined by two-color multiparametric DNA flow cytometry. *Cancer* 1997; **79**: 2073-2086 [PMID: 9179053 DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(19970601)79:11<2073::AID-CNCR4>3.0.CO;2-Q]
- 66 **Ohtani H**. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer. *Cancer Immun* 2007; **7**: 4 [PMID: 17311363]
- 67 **Baker K**, Zlobec I, Tornillo L, Terracciano L, Jass JR, Lugli A. Differential significance of tumour infiltrating lymphocytes in sporadic mismatch repair deficient versus proficient colorectal cancers: a potential role for dysregulation of the transforming growth factor-beta pathway. *Eur J Cancer* 2007; **43**: 624-631 [PMID: 17223543 DOI: 10.1016/j.ejca.2006.11.012]
- 68 **Jantschkeff P**, Terracciano L, Lowy A, Glatz-Krieger K, Grunert F, Micheel B, Brümmer J, Laffer U, Metzger U, Herrmann R, Rochlitz C. Expression of CEACAM6 in resectable colorectal cancer: a factor of independent prognostic significance. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 3638-3646 [PMID: 14512395 DOI: 10.1200/JCO.2003.55.135]
- 69 **Popat S**, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2005; **41**: 2060-2070 [PMID: 16125380 DOI: 10.1016/j.ejca.2005.04.039]
- 70 **Shibata D**, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G Jr, Jessup JM, Loda M, Summerhayes IC. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1996; **335**: 1727-1732 [PMID: 8929264 DOI: 10.1056/NEJM199612053352303]
- 71 **Schwandner O**, Schiedeck TH, Bruch HP, Duchrow M, Windhoevel U, Broll R. p53 and Bcl-2 as significant predictors of recurrence and survival in rectal cancer. *Eur J Cancer* 2000; **36**: 348-356 [PMID: 10708936 DOI: 10.1016/S0959-8049(99)00271-3]
- 72 **Mulder JW**, Kruijt PM, Sewnath M, Oosting J, Seldenrijk CA, Weidema WF, Offerhaus GJ, Pals ST. Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *Lancet* 1994; **344**: 1470-1472 [PMID: 7526103 DOI: 10.1016/S0140-6736(94)90290-9]
- 73 **Koopman M**, Venderbosch S, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Punt CJ. A review on the use of molecular markers of cytotoxic therapy for colorectal cancer, what have we learned? *Eur J Cancer* 2009; **45**: 1935-1949 [PMID: 19473832 DOI: 10.1016/j.ejca.2009.04.023]
- 74 **Gryfe R**, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; **342**: 69-77 [PMID: 10631274 DOI: 10.1056/NEJM200001133420201]
- 75 **Frankel TL**, Vakiani E, Nathan H, DeMatteo RP, Kingham TP, Allen PJ, Jarnagin WR, Kemeny NE, Solit DB, D'Angelica MI. Mutation location on the RAS oncogene affects pathologic features and survival after resection of colorectal liver metastases. *Cancer* 2017; **123**: 568-575 [PMID: 27737491 DOI: 10.1002/cncr.30351]
- 76 **Karagkounis G**, Torbenson MS, Daniel HD, Azad NS, Diaz LA Jr, Donehower RC, Hirose K, Ahuja N, Pawlik TM, Choti MA. Incidence and prognostic impact of KRAS and BRAF mutation in patients undergoing liver surgery for colorectal metastases. *Cancer* 2013; **119**: 4137-4144 [PMID: 24104864 DOI: 10.1002/cncr.28347]
- 77 **Stremitzer S**, Stift J, Gruenberger B, Tamandl D, Aschacher T, Wolf B, Wrba F, Gruenberger T. KRAS status and outcome of liver resection after neoadjuvant chemotherapy including bevacizumab. *Br J Surg* 2012; **99**: 1575-1582 [PMID: 23027075 DOI: 10.1002/bjs.8909]
- 78 **Vauthey JN**, Zimmitti G, Kopetz SE, Shindoh J, Chen SS, Andreou A, Curley SA, Aloia TA, Maru DM. RAS mutation status predicts survival and patterns of recurrence in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2013; **258**: 619-26; discussion 626-7 [PMID: 24018645 DOI: 10.1097/SLA.0b013e3182a5025a]
- 79 **Richman SD**, Seymour MT, Chambers P, Elliott F, Daly CL, Meade AM, Taylor G, Barrett JH, Quirke P. KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 5931-5937 [PMID: 19884549 DOI: 10.1200/JCO.2009.22.4295]
- 80 **Tran B**, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang ZQ, Lieu CH, Agarwal A, Maru DM, Sieber O, Desai J. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2011; **117**: 4623-4632 [PMID: 21456008 DOI: 10.1002/cncr.26086]
- 81 **Van Cutsem E**, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S, Schlichting M, Zube A, Celik I, Rougier P, Ciardiello F. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 2011; **29**: 2011-2019 [PMID: 21502544 DOI: 10.1200/JCO.2010.33.5091]
- 82 **Gafà R**, Maestri I, Matteuzzi M, Santini A, Ferretti S, Cavazzini L, Lanza G. Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer* 2000; **89**: 2025-2037 [PMID: 11066042 DOI: 10.1002/1097-0142(20001115)89:10<2025::AID-CNCR1>3.0.CO;2-S]
- 83 **Benatti P**, Gafà R, Barana D, Marino M, Scarselli A, Pedroni M, Maestri I, Guerzoni L, Roncucci L, Menigatti M, Roncarì B, Maffei S, Rossi G, Ponti G, Santini A, Losi L, Di Gregorio C, Oliani C, Ponz de Leon M, Lanza G. Microsatellite instability and



- colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 8332-8340 [PMID: 16322293 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1030]
- 84 **Bendardaf R**, Lamlum H, Ristamäki R, Korkeila E, Syrjänen K, Pyrhönen S. Mismatch repair status is a predictive factor of tumour response to 5-fluorouracil and irinotecan chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Tumour Biol* 2007; **28**: 212-220 [PMID: 17717427 DOI: 10.1159/000107417]
- 85 **Carethers JM**, Smith EJ, Behling CA, Nguyen L, Tajima A, Doctolero RT, Cabrera BL, Goel A, Arnold CA, Miyai K, Boland CR. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004; **126**: 394-401 [PMID: 14762775 DOI: 10.1053/j.gastro.2003.12.023]
- 86 **Jover R**, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, Piñol V, Xicola RM, Bujanda L, Reñé JM, Clófent J, Bessa X, Morillas JD, Nicolás-Pérez D, Payá A, Alenda C; Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer. *Gut* 2006; **55**: 848-855 [PMID: 16299036 DOI: 10.1136/gut.2005.073015]
- 87 **Ribic CM**, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; **349**: 247-257 [PMID: 12867608 DOI: 10.1056/NEJMoa022289]
- 88 **Llosa NJ**, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, Blosser RL, Fan H, Wang H, Lubber BS, Zhang M, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Sears CL, Anders RA, Pardoll DM, Housseau F. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov* 2015; **5**: 43-51 [PMID: 25358689 DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0863]
- 89 **Amado RG**, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 1626-1634 [PMID: 18316791 DOI: 10.1200/JCO.2007.14.7116]
- 90 **Douillard JY**, Oliner KS, Siena S, Taberero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocáková I, Ruff P, Błasińska-Morawiec M, Šmakal M, Canon JL, Rother M, Williams R, Rong A, Wiezorek J, Sidhu R, Patterson SD. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013; **369**: 1023-1034 [PMID: 24024839 DOI: 10.1056/NEJMoa1305275]
- 91 **Van Cutsem E**, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; **360**: 1408-1417 [PMID: 19339720 DOI: 10.1056/NEJMoa0805019]
- 92 **Pietrantonio F**, Petrelli F, Coiu A, Di Bartolomeo M, Borgonovo K, Maggi C, Cabiddu M, Iacovelli R, Bossi I, Lonati V, Ghilardi M, de Braud F, Barni S. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2015; **51**: 587-594 [PMID: 25673558 DOI: 10.1016/j.ejca.2015.01.054]
- 93 **Rowland A**, Dias MM, Wiese MD, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS, Soric MJ. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2015; **112**: 1888-1894 [PMID: 25989278 DOI: 10.1038/bjc.2015.173]
- 94 **van Brummelen EMJ**, de Boer A, Beijnen JH, Schellens JHM. BRAF Mutations as Predictive Biomarker for Response to Anti-EGFR Monoclonal Antibodies. *Oncologist* 2017; **22**: 864-872 [PMID: 28576857 DOI: 10.1634/theoncologist.2017-0031]
- 95 **McMillan DC**, Wotherspoon HA, Fearon KC, Sturgeon C, Cooke TG, McArdle CS. A prospective study of tumor recurrence and the acute-phase response after apparently curative colorectal cancer surgery. *Am J Surg* 1995; **170**: 319-322 [PMID: 7573721 DOI: 10.1016/S0002-9610(99)80296-7]
- 96 **Canna K**, McMillan DC, McKee RF, McNicol AM, Horgan PG, McArdle CS. Evaluation of a cumulative prognostic score based on the systemic inflammatory response in patients undergoing potentially curative surgery for colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; **90**: 1707-1709 [PMID: 15150596 DOI: 10.1038/sj.bjc.6601757]
- 97 **Crozier JE**, McKee RF, McArdle CS, Angerson WJ, Anderson JH, Horgan PG, McMillan DC. The presence of a systemic inflammatory response predicts poorer survival in patients receiving adjuvant 5-FU chemotherapy following potentially curative resection for colorectal cancer. *Br J Cancer* 2006; **94**: 1833-1836 [PMID: 16721360 DOI: 10.1038/sj.bjc.6603185]
- 98 **Al-Shaiba R**, McMillan DC, Angerson WJ, Leen E, McArdle CS, Horgan PG. The relationship between hypoalbuminaemia, tumour volume and the systemic inflammatory response in patients with colorectal liver metastases. *Br J Cancer* 2004; **91**: 205-207 [PMID: 15213726 DOI: 10.1038/sj.bjc.6601886]
- 99 **McMillan DC**, Watson WS, O'Gorman P, Preston T, Scott HR, McArdle CS. Albumin concentrations are primarily determined by the body cell mass and the systemic inflammatory response in cancer patients with weight loss. *Nutr Cancer* 2001; **39**: 210-213 [PMID: 11759282 DOI: 10.1207/S15327914nc392\_8]
- 100 **Cengiz O**, Kocer B, Sürmeli S, Santicky MJ, Soran A. Are pretreatment serum albumin and cholesterol levels prognostic tools in patients with colorectal carcinoma? *Med Sci Monit* 2006; **12**: CR240-CR247 [PMID: 16733481]
- 101 **McMillan DC**, Canna K, McArdle CS. Systemic inflammatory response predicts survival following curative resection of colorectal cancer. *Br J Surg* 2003; **90**: 215-219 [PMID: 12555298 DOI: 10.1002/bjs.4038]
- 102 **Takada S**, Namiki M, Takahara S, Matsumiya K, Kondoh N, Kokado Y, Matsumoto K, Nakamura T, Okuyama A. Serum HGF levels in acute renal rejection after living related renal transplantation. *Transpl Int* 1996; **9**: 151-154 [PMID: 8639257 DOI: 10.1111/j.1432-2277.1996.tb00870.x]
- 103 **Harrison LE**, Guillem JG, Paty P, Cohen AM. Preoperative carcinoembryonic antigen predicts outcomes in node-negative colon cancer patients: a multivariate analysis of 572 patients. *J Am Coll Surg* 1997; **185**: 55-59 [PMID: 9208961 DOI: 10.1016/S1072-7515(97)00012-4]
- 104 **Hohenberger P**, Schlag PM, Gerneth T, Herfarth C. Pre- and postoperative carcinoembryonic antigen determinations in hepatic resection for colorectal metastases. Predictive value and implications for adjuvant treatment based on multivariate analysis. *Ann Surg* 1994; **219**: 135-143 [PMID: 8129484 DOI: 10.1097/0000-0658-199402000-00005]
- 105 **Malapelle U**, Mayo de-Las-Casas C, Rocco D, Garzon M, Pisapia P, Jordana-Ariza N, Russo M, Sgariglia R, De Luca C, Pepe F, Martinez-Bueno A, Morales-Espinosa A, González-Cao M, Karachaliou N, Viteri Ramirez S, Bellevicine C, Molina-Vila MA, Rosell R, Troncone G. Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients. *Br J Cancer* 2017; **116**: 802-810 [PMID: 28170370 DOI: 10.1038/bjc.2017.8]
- 106 **Ng JM**, Yu J. Promoter hypermethylation of tumour suppressor genes as potential biomarkers in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2015; **16**: 2472-2496 [PMID: 25622259 DOI: 10.3390/ijms16022472]
- 107 **Basnet S**, Zhang ZY, Liao WQ, Li SH, Li PS, Ge HY. The Prognostic Value of Circulating Cell-Free DNA in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *J Cancer* 2016; **7**: 1105-1113 [PMID: 27326254 DOI: 10.7150/jca.14801]
- 108 **El Messaoudi S**, Mouliere F, Du Manoir S, Bascoul-Mollevi C, Gillet B, Nouaille M, Fiess C, Crapez E, Bibeau F, Theillet C, Mazard T, Pezet D, Mathonnet M, Ychou M, Thierry AR. Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care. *Clin Cancer Res* 2016; **22**: 3067-3077 [PMID: 26847055 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0297]
- 109 **Kitahara M**, Hazama S, Tsunedomi R, Takenouchi H, Kanekiyo S, Inoue Y, Nakajima M, Tomochika S, Tokuhisa Y, Iida M, Sakamoto

- K, Suzuki N, Takeda S, Ueno T, Yamamoto S, Yoshino S, Nagano H. Prediction of the efficacy of immunotherapy by measuring the integrity of cell-free DNA in plasma in colorectal cancer. *Cancer Sci* 2016; **107**: 1825-1829 [PMID: 27663862 DOI: 10.1111/cas.13085]
- 110 **Toledo RA**, Cubillo A, Vega E, Garralda E, Alvarez R, de la Varga LU, Pascual JR, Sánchez G, Sarno F, Prieto SH, Perea S, López-Casas PP, López-Ríos F, Hidalgo M. Clinical validation of prospective liquid biopsy monitoring in patients with wild-type RAS metastatic colorectal cancer treated with FOLFIRI-cetuximab. *Oncotarget* 2017; **8**: 35289-35300 [PMID: 27852040 DOI: 10.18632/oncotarget.13311]
- 111 **LeBlanc JG**, Milani C, de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol* 2013; **24**: 160-168 [PMID: 22940212 DOI: 10.1016/j.copbio.2012.08.005]
- 112 **Corrêa-Oliveira R**, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Vinolo MA. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin Transl Immunology* 2016; **5**: e73 [PMID: 27195116 DOI: 10.1038/cti.2016.17]
- 113 **Morrison DJ**, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 2016; **7**: 189-200 [PMID: 26963409 DOI: 10.1080/19490976.2015.1134082]
- 114 **Natividad JM**, Verdu EF. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol Res* 2013; **69**: 42-51 [PMID: 23089410 DOI: 10.1016/j.phrs.2012.10.007]
- 115 **Sommer F**, Bäckhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 2013; **11**: 227-238 [PMID: 23435359 DOI: 10.1038/nrmicro2974]
- 116 **Round JL**, Lee SM, Li J, Tran G, Jabri B, Chatila TA, Mazmanian SK. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science* 2011; **332**: 974-977 [PMID: 21512004 DOI: 10.1126/science.1206095]
- 117 **Bäumler AJ**, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* 2016; **535**: 85-93 [PMID: 27383983 DOI: 10.1038/nature18849]
- 118 **Hayashi H**, Sakamoto M, Benno Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol* 2002; **46**: 535-548 [PMID: 12363017 DOI: 10.1111/j.1348-0421.2002.tb02731.x]
- 119 **Matsumoto M**, Sakamoto M, Hayashi H, Benno Y. Novel phylogenetic assignment database for terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of human colonic microbiota. *J Microbiol Methods* 2005; **61**: 305-319 [PMID: 15767007 DOI: 10.1016/j.mimet.2004.12.009]
- 120 **Dehingia M**, Devi KT, Talukdar NC, Talukdar R, Reddy N, Mande SS, Deka M, Khan MR. Gut bacterial diversity of the tribes of India and comparison with the worldwide data. *Sci Rep* 2015; **5**: 18563 [PMID: 26689136 DOI: 10.1038/srep18563]
- 121 **Sagheddu V**, Patrone V, Miragoli F, Morelli L. Abundance and Diversity of Hydrogenotrophic Microorganisms in the Infant Gut before the Weaning Period Assessed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative PCR. *Front Nutr* 2017; **4**: 29 [PMID: 28695121 DOI: 10.3389/fnut.2017.00029]
- 122 **Swidsinski A**, Dörffel Y, Loening-Baucke V, Gille C, Reibhauer A, Göktas O, Krüger M, Neuhaus J, Schrödl W. Impact of humic acids on the colonic microbiome in healthy volunteers. *World J Gastroenterol* 2017; **23**: 885-890 [PMID: 28223733 DOI: 10.3748/wjg.v23.i5.885]
- 123 **Balamurugan R**, Janardhan HP, George S, Chittaranjan SP, Ramakrishna BS. Bacterial succession in the colon during childhood and adolescence: molecular studies in a southern Indian village. *Am J Clin Nutr* 2008; **88**: 1643-1647 [PMID: 19064526 DOI: 10.3945/ajcn.2008.26511]
- 124 **Sobhani I**, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, Corthier G, Tran Van Nhieu J, Furet JP. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One* 2011; **6**: e16393 [PMID: 21297998 DOI: 10.1371/journal.pone.0016393]
- 125 **Feng Q**, Liang S, Jia H, Stadlmayr A, Tang L, Lan Z, Zhang D, Xia H, Xu X, Jie Z, Su L, Li X, Li X, Li J, Xiao L, Huber-Schönauer U, Niederseer D, Xu X, Al-Aama JY, Yang H, Wang J, Kristiansen K, Arumugam M, Tilg H, Datz C, Wang J. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nat Commun* 2015; **6**: 6528 [PMID: 25758642 DOI: 10.1038/ncomms7528]
- 126 **Yu J**, Feng Q, Wong SH, Zhang D, Liang QY, Qin Y, Tang L, Zhao H, Stenvang J, Li Y, Wang X, Xu X, Chen N, Wu WK, Al-Aama J, Nielsen HJ, Küllerich P, Jensen BA, Yau TO, Lan Z, Jia H, Li J, Xiao L, Lam TY, Ng SC, Cheng AS, Wong VW, Chan FK, Xu X, Yang H, Madsen L, Datz C, Tilg H, Wang J, Brünner N, Kristiansen K, Arumugam M, Sung JJ, Wang J. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. *Gut* 2017; **66**: 70-78 [PMID: 26408641 DOI: 10.1136/gutjnl-2015-309800]
- 127 **Amitay EL**, Werner S, Vital M, Pieper DH, Höfler D, Gierse IJ, Butt J, Balavara Y, Cuk K, Brenner H. Fusobacterium and colorectal cancer: causal factor or passenger? Results from a large colorectal cancer screening study. *Carcinogenesis* 2017; **38**: 781-788 [PMID: 28582482 DOI: 10.1093/carcin/bgx053]
- 128 **Martin HM**, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, Englyst H, Williams HF, Rhodes JM. Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 2004; **127**: 80-93 [PMID: 15236175 DOI: 10.1053/j.gastro.2004.03.054]
- 129 **Abdulmir AS**, Hafidh RR, Bakar FA. 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 [PMID: 20846456 DOI: 10.1186/1476-4598-9-249]
- 130 **Bolij A**, Hechenbleikner EM, Goodwin AC, Badani R, Stein EM, Lazarev MG, Ellis B, Carroll KC, Albesiano E, Wick EC, Platz EA, Pardoll DM, Sears CL. The Bacteroides fragilis toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients. *Clin Infect Dis* 2015; **60**: 208-215 [PMID: 25305284 DOI: 10.1093/cid/ciu787]
- 131 **Zeller G**, Tap J, Voigt AY, Sunagawa S, Kultima JR, Costea PI, Amiot A, Böhm J, Brunetti F, Habermann N, Herczeg R, Koch M, Luciani A, Mende DR, Schneider MA, Schrotz-King P, Tourmignand C, Tran Van Nhieu J, Yamada T, Zimmermann J, Benes V, Kloor M, Ulrich CM, von Knebel Doeberitz M, Sobhani I, Bork P. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Mol Syst Biol* 2014; **10**: 766 [PMID: 25432777 DOI: 10.15252/msb.20145645]
- 132 **Burns MB**, Lynch J, Starr TK, Knights D, Blekhman R. Virulence genes are a signature of the microbiome in the colorectal tumor microenvironment. *Genome Med* 2015; **7**: 55 [PMID: 26170900 DOI: 10.1186/s13073-015-0177-8]
- 133 **Arumugam M**, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poullain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J; MetaHIT Consortium, Antolin M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariéz G, Dervyn R, Foerster KU, Friss C, van de Guchte M, Guédon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rimini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; **473**: 174-180 [PMID: 21508958 DOI: 10.1038/nature09944]
- 134 **Mira-Pascual L**, Cabrera-Rubio R, Ocon S, Costales P, Parra A, Suarez A, Moris F, Rodrigo L, Mira A, Collado MC. Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal

- cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *J Gastroenterol* 2015; **50**: 167-179 [PMID: 24811328 DOI: 10.1007/s00535-014-0963-x]
- 135 **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 [PMID: 27194068 DOI: 10.1038/srep26337]
- 136 **Hibberd AA**, Lyra A, Ouwehand AC, Rolny P, Lindegren H, Cedgård L, Wettergren Y. Intestinal microbiota is altered in patients with colon cancer and modified by probiotic intervention. *BMJ Open Gastroenterol* 2017; **4**: e000145 [PMID: 28944067 DOI: 10.1136/bmjgast-2017-000145]
- 137 **Sanapareddy N**, Legge RM, Jovov B, McCoy A, Burcal L, Araujo-Perez F, Randall TA, Galanko J, Benson A, Sandler RS, Rawls JF, Abdo Z, Fodor AA, Keku TO. Increased rectal microbial richness is associated with the presence of colorectal adenomas in humans. *ISME J* 2012; **6**: 1858-1868 [PMID: 22622349 DOI: 10.1038/ismej.2012.43]
- 138 **Goedert JJ**, Gong Y, Hua X, Zhong H, He Y, Peng P, Yu G, Wang W, Ravel J, Shi J, Zheng Y. Fecal Microbiota Characteristics of Patients with Colorectal Adenoma Detected by Screening: A Population-based Study. *EBioMedicine* 2015; **2**: 597-603 [PMID: 26288821 DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.04.010]
- 139 **Lucas C**, Barnich N, Nguyen HTT. Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2017; **18**: pii: E1310 [PMID: 28632155 DOI: 10.3390/ijms18061310]
- 140 **Zackular JP**, Rogers MA, Ruffin MT 4th, Schloss PD. The human gut microbiome as a screening tool for colorectal cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2014; **7**: 1112-1121 [PMID: 25104642 DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0129]
- 141 **Arthur JC**, Gharaibeh RZ, Mühlbauer M, Perez-Chanona E, Uronis JM, McCafferty J, Fodor AA, Jobin C. Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer. *Nat Commun* 2014; **5**: 4724 [PMID: 25182170 DOI: 10.1038/ncomms5724]
- 142 **Ahn J**, Sinha R, Pei Z, Dominianni C, Wu J, Shi J, Goedert JJ, Hayes RB, Yang L. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2013; **105**: 1907-1911 [PMID: 24316595 DOI: 10.1093/jnci/djt300]
- 143 **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 [PMID: 22761885 DOI: 10.1371/journal.pone.0039743]
- 144 **Wu N**, Yang X, Zhang R, Li J, Xiao X, Hu Y, Chen Y, Yang F, Lu N, Wang Z, Luan C, Liu Y, Wang B, Xiang C, Wang Y, Zhao F, Gao GF, Wang S, Li L, Zhang H, Zhu B. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microb Ecol* 2013; **66**: 462-470 [PMID: 23733170 DOI: 10.1007/s00248-013-0245-9]
- 145 **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 [PMID: 24334760 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1343]
- 146 **Arthur JC**, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, Fan TJ, Campbell BJ, Abujamel T, Dogan B, Rogers AB, Rhodes JM, Stintzi A, Simpson KW, Hansen JJ, Keku TO, Fodor AA, Jobin C. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 2012; **338**: 120-123 [PMID: 22903521 DOI: 10.1126/science.1224820]
- 147 **Kostic AD**, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, Ojesina AI, Jung J, Bass AJ, Taberero J, Baselga J, Liu C, Shivdasani RA, Ogino S, Birren BW, Huttenhower C, Garrett WS, Meyerson M. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012; **22**: 292-298 [PMID: 22009990 DOI: 10.1101/gr.126573.111]
- 148 **Marchesi JR**, Dutilh BE, Hall N, Peters WH, Roelofs R, Boleij A, Tjalsma H. Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLoS One* 2011; **6**: e20447 [PMID: 21647227 DOI: 10.1371/journal.pone.0020447]
- 149 **Viljoen KS**, Dakshinamurthy A, Goldberg P, Blackburn JM. 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; **10**: e0119462 [PMID: 25751261 DOI: 10.1371/journal.pone.0119462]
- 150 **Keenan JI**, Aitchison A, Purcell RV, Greenlees R, Pearson JF, Frizelle FA. Screening for enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in stool samples. *Anaerobe* 2016; **40**: 50-53 [PMID: 27166180 DOI: 10.1016/j.anaerobe.2016.05.004]
- 151 **Eklöf V**, Löfgren-Burström A, Zingmark C, Edin S, Larsson P, Karling P, Alexeyev O, Rutegård J, Wikberg ML, Palmqvist R. Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection. *Int J Cancer* 2017; **141**: 2528-2536 [PMID: 28833079 DOI: 10.1002/ijc.31011]
- 152 **Prorok-Hamon M**, Friswell MK, Alswied A, Roberts CL, Song F, Flanagan PK, Knight P, Codling C, Marchesi JR, Winstanley C, Hall N, Rhodes JM, Campbell BJ. Colonic mucosa-associated diffusely adherent afaC+ *Escherichia coli* expressing IpfA and pks are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut* 2014; **63**: 761-770 [PMID: 23846483 DOI: 10.1136/gutjnl-2013-304739]
- 153 **Nakatsu G**, Li X, Zhou H, Sheng J, Wong SH, Wu WK, Ng SC, Tsoi H, Dong Y, Zhang N, He Y, Kang Q, Cao L, Wang K, Zhang J, Liang Q, Yu J, Sung JJ. Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis. *Nat Commun* 2015; **6**: 8727 [PMID: 26515465 DOI: 10.1038/ncomms9727]
- 154 **Dejea CM**, Fathi P, Craig JM, Boleij A, Taddese R, Geis AL, Wu X, DeStefano Shields CE, Hechenbleikner EM, Huso DL, Anders RA, Giardiello FM, Wick EC, Wang H, Wu S, Pardoll DM, Housseau F, Sears CL. Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science* 2018; **359**: 592-597 [PMID: 29420293 DOI: 10.1126/science.aah3648]
- 155 **Flemer B**, Lynch DB, Brown JM, Jeffery IB, Ryan FJ, Claesson MJ, O'Riordain M, Shanahan F, O'Toole PW. Tumour-associated and non-tumour-associated microbiota in colorectal cancer. *Gut* 2017; **66**: 633-643 [PMID: 26992426 DOI: 10.1136/gutjnl-2015-309595]
- 156 **Richard ML**, Liguori G, Lamas B, Brandi G, da Costa G, Hoffmann TW, Pierluigi Di Simone M, Calabrese C, Poggioli G, Langella P, Campieri M, Sokol H. Mucosa-associated microbiota dysbiosis in colitis associated cancer. *Gut Microbes* 2017; Epub ahead of print [PMID: 28914591 DOI: 10.1080/19490976.2017.1379637]
- 157 **Gagnière J**, Bonnin V, Jarrousse AS, Cardamone E, Agus A, Uhrhammer N, Sauvanet P, Déchelotte P, Barnich N, Bonnet R, Pezet D, Bonnet M. Interactions between microsatellite instability and human gut colonization by *Escherichia coli* in colorectal cancer. *Clin Sci (Lond)* 2017; **131**: 471-485 [PMID: 28093453 DOI: 10.1042/CS20160876]
- 158 **Mima K**, Nishihara R, Qian ZR, Cao Y, Sukawa Y, Nowak JA, Yang J, Dou R, Masugi Y, Song M, Kostic AD, Giannakis M, Bullman S, Milner DA, Baba H, Giovannucci EL, Garraway LA, Freeman GJ, Dranoff G, Garrett WS, Huttenhower C, Meyerson M, Meyerhardt JA, Chan AT, Fuchs CS, Ogino S. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut* 2016; **65**: 1973-1980 [PMID: 26311717 DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310101]
- 159 **Wishart DS**. Current progress in computational metabolomics. *Brief Bioinform* 2007; **8**: 279-293 [PMID: 17626065 DOI: 10.1093/bib/bbm030]
- 160 **Holmes E**, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell* 2008; **134**: 714-717 [PMID: 18775301 DOI: 10.1016/j.cell.2008.08.026]
- 161 **Holmes E**, Loo RL, Stamler J, Bictash M, Yap IK, Chan Q, Ebbels T, De Iorio M, Brown IJ, Veselkov KA, Davighus ML, Kesteloot H, Ueshima H, Zhao L, Nicholson JK, Elliott P. Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature* 2008; **453**: 396-400 [PMID: 18425110 DOI: 10.1038/nature06882]
- 162 **Dumas ME**, Maibaum EC, Teague C, Ueshima H, Zhou B, Lindon JC, Nicholson JK, Stamler J, Elliott P, Chan Q, Holmes E. Assessment of analytical reproducibility of IH NMR spectroscopy



- based metabolomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Anal Chem* 2006; **78**: 2199-2208 [PMID: 16579598 DOI: 10.1021/ac0517085]
- 163 **Armitage EG**, Barbas C. Metabolomics in cancer biomarker discovery: current trends and future perspectives. *J Pharm Biomed Anal* 2014; **87**: 1-11 [PMID: 24091079 DOI: 10.1016/j.jpba.2013.08.041]
- 164 **Chan EC**, Koh PK, Mal M, Cheah PY, Eu KW, Backshall A, Cavill R, Nicholson JK, Keun HC. Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). *J Proteome Res* 2009; **8**: 352-361 [PMID: 19063642 DOI: 10.1021/pr8006232]
- 165 **Brown DG**, Rao S, Weir TL, O'Malia J, Bazan M, Brown RJ, Ryan EP. Metabolomics and metabolic pathway networks from human colorectal cancers, adjacent mucosa, and stool. *Cancer Metab* 2016; **4**: 11 [PMID: 27275383 DOI: 10.1186/s40170-016-0151-y]
- 166 **Farshidfar F**, Weljie AM, Kopciuk KA, Hilsden R, McGregor SE, Buie WD, MacLean A, Vogel HJ, Bathe OF. A validated metabolomic signature for colorectal cancer: exploration of the clinical value of metabolomics. *Br J Cancer* 2016; **115**: 848-857 [PMID: 27560555 DOI: 10.1038/bjc.2016.243]
- 167 **Farshidfar F**, Kopciuk KA, Hilsden R, McGregor SE, Mazurak VC, Buie WD, MacLean A, Vogel HJ, Bathe OF. A quantitative multimodal metabolomic assay for colorectal cancer. *BMC Cancer* 2018; **18**: 26 [PMID: 29301511 DOI: 10.1186/s12885-017-3923-z]
- 168 **Uchiyama K**, Yagi N, Mizushima K, Higashimura Y, Hirai Y, Okayama T, Yoshida N, Katada K, Kamada K, Handa O, Ishikawa T, Takagi T, Konishi H, Kuriu Y, Nakanishi M, Otsuji E, Itoh Y, Naito Y. Serum metabolomics analysis for early detection of colorectal cancer. *J Gastroenterol* 2017; **52**: 677-694 [PMID: 27650200 DOI: 10.1007/s00535-016-1261-6]
- 169 **Mal M**. Noninvasive metabolic profiling for painless diagnosis of human diseases and disorders. *Future Sci OA* 2016; **2**: FSO106 [PMID: 28031956 DOI: 10.4155/fsoa-2015-0014]
- 170 **O'Keefe SJ**. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; **13**: 691-706 [PMID: 27848961 DOI: 10.1038/nrgastro.2016.165]
- 171 **Flint HJ**, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; **9**: 577-589 [PMID: 22945443 DOI: 10.1038/nrgastro.2012.156]
- 172 **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* 2018; **57**: 1-24 [PMID: 28393285 DOI: 10.1007/s00394-017-1445-8]
- 173 **Ouwehand AC**, Derrien M, de Vos W, Tiihonen K, Rautonen N. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. *Curr Opin Biotechnol* 2005; **16**: 212-217 [PMID: 15831389 DOI: 10.1016/j.copbio.2005.01.007]
- 174 **Miller TL**, Wolin MJ. Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Appl Environ Microbiol* 1996; **62**: 1589-1592 [PMID: 8633856]
- 175 **van der Beek CM**, Dejong CHC, Troost FJ, Masclee AAM, Lenaerts K. Role of short-chain fatty acids in colonic inflammation, carcinogenesis, and mucosal protection and healing. *Nutr Rev* 2017; **75**: 286-305 [PMID: 28402523 DOI: 10.1093/nutrit/nuw067]
- 176 **Barrasa JL**, Olmo N, Lizarbe MA, Turnay J. Bile acids in the colon, from healthy to cytotoxic molecules. *Toxicol In Vitro* 2013; **27**: 964-977 [PMID: 23274766 DOI: 10.1016/j.tiv.2012.12.020]
- 177 **Ridlon JM**, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 2006; **47**: 241-259 [PMID: 16299351 DOI: 10.1194/jlr.R500013-JLR200]
- 178 **Jones BV**, Begley M, Hill C, Gahan CG, Marchesi JR. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 13580-13585 [PMID: 18757757 DOI: 10.1073/pnas.0804437105]
- 179 **Ocvirk S**, O'Keefe SJ. Influence of Bile Acids on Colorectal Cancer Risk: Potential Mechanisms Mediated by Diet - Gut Microbiota Interactions. *Curr Nutr Rep* 2017; **6**: 315-322 [PMID: 29430336 DOI: 10.1007/s13668-017-0219-5]
- 180 **Manach C**, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; **79**: 727-747 [PMID: 15113710 DOI: 10.1093/ajcn/79.5.727]
- 181 **Marín L**, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 905215 [PMID: 25802870 DOI: 10.1155/2015/905215]
- 182 **Russell W**, Duthie G. Plant secondary metabolites and gut health: the case for phenolic acids. *Proc Nutr Soc* 2011; **70**: 389-396 [PMID: 21781364 DOI: 10.1017/S0029665111000152]
- 183 **Cardona F**, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J Nutr Biochem* 2013; **24**: 1415-1422 [PMID: 23849454 DOI: 10.1016/j.jnutbio.2013.05.001]
- 184 **Russell WR**, Duncan SH, Scobbie L, Duncan G, Cantlay L, Calder AG, Anderson SE, Flint HJ. Major phenylpropanoid-derived metabolites in the human gut can arise from microbial fermentation of protein. *Mol Nutr Food Res* 2013; **57**: 523-535 [PMID: 23349065 DOI: 10.1002/mnfr.201200594]
- 185 **Loh YH**, Jakszyn P, Luben RN, Mulligan AA, Mitrou PN, Khaw KT. N-Nitroso compounds and cancer incidence: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk Study. *Am J Clin Nutr* 2011; **93**: 1053-1061 [PMID: 21430112 DOI: 10.3945/ajcn.111.012377]
- 186 **Gill CI**, Rowland IR. Diet and cancer: assessing the risk. *Br J Nutr* 2002; **88** Suppl 1: S73-S87 [PMID: 12215186 DOI: 10.1079/BJN2002632]
- 187 **Roediger WE**, Moore J, Babidge W. Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1997; **42**: 1571-1579 [PMID: 9286219 DOI: 10.1023/A:1018851723920]
- 188 **Homann N**. Alcohol and upper gastrointestinal tract cancer: the role of local acetaldehyde production. *Addict Biol* 2001; **6**: 309-323 [PMID: 11900609 DOI: 10.1080/13556210020077028]
- 189 **Johnson CH**, Dejea CM, Edler D, Hoang LT, Santidrian AF, Felding BH, Ivanisevic J, Cho K, Wick EC, Hechenbleikner EM, Uritboonthai W, Goetz L, Casero RA Jr, Pardoll DM, White JR, Patti GJ, Sears CL, Siuzdak G. Metabolism links bacterial biofilms and colon carcinogenesis. *Cell Metab* 2015; **21**: 891-897 [PMID: 25959674 DOI: 10.1016/j.cmet.2015.04.011]
- 190 **Cummings JH**, Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* 1991; **70**: 443-459 [PMID: 1938669]
- 191 **Suarez F**, Furne J, Springfield J, Levitt M. Insights into human colonic physiology obtained from the study of flatus composition. *Am J Physiol* 1997; **272**: G1028-G1033 [PMID: 9176210 DOI: 10.1152/ajpgi.1997.272.5.G1028]
- 192 **Williams MD**, Xian L, Huso T, Park JJ, Huso D, Cope LM, Gang DR, Siems WF, Resar L, Reeves R, Hill HH Jr. Fecal Metabolome in Hmg1 Transgenic Mice with Polyposis: Evidence for Potential Screen for Early Detection of Precursor Lesions in Colorectal Cancer. *J Proteome Res* 2016; **15**: 4176-4187 [PMID: 27696867 DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b00035]
- 193 **Weir TL**, Manter DK, Sheflin AM, Barnett BA, Heuberger AL, Ryan EP. Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults. *PLoS One* 2013; **8**: e70803 [PMID: 23940645 DOI: 10.1371/journal.pone.0070803]
- 194 **Weaver GA**, Krause JA, Miller TL, Wolin MJ. 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* 1988; **29**: 1539-1543 [PMID: 3209110 DOI: 10.1136/gut.29.11.1539]
- 195 **Kim DH**, Jin YH. Intestinal bacterial beta-glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch Pharm Res* 2001; **24**: 564-567 [PMID: 11794536 DOI: 10.1007/BF02975166]
- 196 **Ou J**, DeLany JP, Zhang M, Sharma S, O'Keefe SJ. Association between low colonic short-chain fatty acids and high bile acids in high colon cancer risk populations. *Nutr Cancer* 2012; **64**: 34-40 [PMID: 22136517 DOI: 10.1080/01635581.2012.630164]
- 197 **Yoshimoto S**, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari

- S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Honda K, Ishikawa Y, Hara E, Ohtani N. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* 2013; **499**: 97-101 [PMID: 23803760 DOI: 10.1038/nature12347]
- 198 **Roisin Hughes IR**. Metabolic Activities of the Gut Microflora in Relation to Cancer. *Microb Ecol Health Dis* 2000; **12**: 179-185 DOI: 10.1080/089106000750060431]
- 199 **Carbonero F**, Benefiel AC, Gaskins HR. Contributions of the microbial hydrogen economy to colonic homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; **9**: 504-518 [PMID: 22585131 DOI: 10.1038/nrgastro.2012.85]
- 200 **Ai L**, Tian H, Chen Z, Chen H, Xu J, Fang JY. Systematic evaluation of supervised classifiers for fecal microbiota-based prediction of colorectal cancer. *Oncotarget* 2017; **8**: 9546-9556 [PMID: 28061434 DOI: 10.18632/oncotarget.14488]
- 201 **Shah MS**, DeSantis TZ, Weinmaier T, McMurdie PJ, Cope JL, Altrichter A, Yamal JM, Hollister EB. Leveraging sequence-based faecal microbial community survey data to identify a composite biomarker for colorectal cancer. *Gut* 2018; **67**: 882-891 [PMID: 28341746 DOI: 10.1136/gutjnl-2016-313189]
- 202 **Amitay EL**, Krilaviciute A, Brenner H. Systematic review: Gut microbiota in fecal samples and detection of colorectal neoplasms. *Gut Microbes* 2018; 1-15 [PMID: 29543545 DOI: 10.1080/19490976.2018.1445957]
- 203 **Wei Z**, Cao S, Liu S, Yao Z, Sun T, Li Y, Li J, Zhang D, Zhou Y. Could gut microbiota serve as prognostic biomarker associated with colorectal cancer patients' survival? A pilot study on relevant mechanism. *Oncotarget* 2016; **7**: 46158-46172 [PMID: 27323816 DOI: 10.18632/oncotarget.10064]
- 204 **Wong SH**, Kwong TNY, Chow TC, Luk AKC, Dai RZW, Nakatsu G, Lam TYT, Zhang L, Wu JCY, Chan FKL, Ng SSM, Wong MCS, Ng SC, Wu WKK, Yu J, Sung JY. Quantitation of faecal *Fusobacterium* improves faecal immunochemical test in detecting advanced colorectal neoplasia. *Gut* 2017; **66**: 1441-1448 [PMID: 27797940 DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312766]
- 205 **Bezabeh T**, Somorjai R, Dolenko B, Bryskina N, Levin B, Bernstein CN, Jeyarajah E, Steinhart AH, Rubin DT, Smith IC. Detecting colorectal cancer by 1H magnetic resonance spectroscopy of fecal extracts. *NMR Biomed* 2009; **22**: 593-600 [PMID: 19259992 DOI: 10.1002/nbm.1372]
- 206 **Monleón D**, Morales JM, Barrasa A, López JA, Vázquez C, Celda B. Metabolite profiling of fecal water extracts from human colorectal cancer. *NMR Biomed* 2009; **22**: 342-348 [PMID: 19006102 DOI: 10.1002/nbm.1345]
- 207 **Goedert JJ**, Sampson JN, Moore SC, Xiao Q, Xiong X, Hayes RB, Ahn J, Shi J, Sinha R. Fecal metabolomics: assay performance and association with colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2014; **35**: 2089-2096 [PMID: 25037050 DOI: 10.1093/carcin/bgu131]
- 208 **Phua LC**, Chue YP, Koh PK, Cheah PY, Ho HK, Chan EC. Non-invasive fecal metabonomic detection of colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2014; **15**: 389-397 [PMID: 24424155 DOI: 10.4161/cbt.27625]
- 209 **de Meij TG**, Larbi IB, van der Schee MP, Lentferink YE, Paff T, Terhaar Sive Droste JS, Mulder CJ, van Bodegraven AA, de Boer NK. Electronic nose can discriminate colorectal carcinoma and advanced adenomas by fecal volatile biomarker analysis: proof of principle study. *Int J Cancer* 2014; **134**: 1132-1138 [PMID: 23959518 DOI: 10.1002/ijc.28446]
- 210 **Batty CA**, Cauchi M, Lourenço C, Hunter JO, Turner C. Use of the Analysis of the Volatile Faecal Metabolome in Screening for Colorectal Cancer. *PLoS One* 2015; **10**: e0130301 [PMID: 26086914 DOI: 10.1371/journal.pone.0130301]
- 211 **Sinha R**, Ahn J, Sampson JN, Shi J, Yu G, Xiong X, Hayes RB, Goedert JJ. Fecal Microbiota, Fecal Metabolome, and Colorectal Cancer Interrelations. *PLoS One* 2016; **11**: e0152126 [PMID: 27015276 DOI: 10.1371/journal.pone.0152126]
- 212 **Bronckaers A**, Balzarini J, Liekens S. The cytostatic activity of pyrimidine nucleosides is strongly modulated by Mycoplasma hyorhinis infection: Implications for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2008; **76**: 188-197 [PMID: 18555978 DOI: 10.1016/j.bcp.2008.04.019]
- 213 **Espin JC**, González-Sarriás A, Tomás-Barberán FA. The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. *Biochem Pharmacol* 2017; **139**: 82-93 [PMID: 28483461 DOI: 10.1016/j.bcp.2017.04.033]
- 214 **Guthrie L**, Gupta S, Daily J, Kelly L. Human microbiome signatures of differential colorectal cancer drug metabolism. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2017; **3**: 27 [PMID: 29104759 DOI: 10.1038/s41522-017-0034-1]
- 215 **Vande Voorde J**, Sabuncuoğlu S, Noppen S, Hofer A, Ranjbarian F, Fieus S, Balzarini J, Liekens S. Nucleoside-catabolizing enzymes in mycoplasma-infected tumor cell cultures compromise the cytostatic activity of the anticancer drug gemcitabine. *J Biol Chem* 2014; **289**: 13054-13065 [PMID: 24668817 DOI: 10.1074/jbc.M114.558924]
- 216 **Geller LT**, Barzily-Rokni M, Danino T, Jonas OH, Shental N, Nejman D, Gavert N, Zwang Y, Cooper ZA, Shee K, Thaiss CA, Reuben A, Livny J, Avraham R, Frederick DT, Ligorio M, Chatman K, Johnston SE, Mosher CM, Brandis A, Fuks G, Gurbatri C, Gopalakrishnan V, Kim M, Hurd MW, Katz M, Fleming J, Maitra A, Smith DA, Skalak M, Bu J, Michaud M, Trauger SA, Barshack I, Golan T, Sandbank J, Flaherty KT, Mandinova A, Garrett WS, Thayer SP, Ferrone CR, Huttenhower C, Bhatia SN, Gevers D, Wargo JA, Golub TR, Straussman R. Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science* 2017; **357**: 1156-1160 [PMID: 28912244 DOI: 10.1126/science.aah5043]
- 217 **Geller LT**, Straussman R. Intratumoral bacteria may elicit chemoresistance by metabolizing anticancer agents. *Mol Cell Oncol* 2017; **5**: e1405139 [PMID: 29404397 DOI: 10.1080/23723556.2017.1405139]
- 218 **Takasuna K**, Hagiwara T, Hirohashi M, Kato M, Nomura M, Nagai E, Yokoi T, Kamataki T. Involvement of beta-glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. *Cancer Res* 1996; **56**: 3752-3757 [PMID: 8706020]
- 219 **Wallace BD**, Wang H, Lane KT, Scott JE, Orans J, Koo JS, Venkatesh M, Jobin C, Yeh LA, Mani S, Redinbo MR. Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. *Science* 2010; **330**: 831-835 [PMID: 21051639 DOI: 10.1126/science.1191175]
- 220 **Nakayama H**, Kinouchi T, Kataoka K, Akimoto S, Matsuda Y, Ohnishi Y. Intestinal anaerobic bacteria hydrolyse sorivudine, producing the high blood concentration of 5-(E)-(2-bromovinyl)uracil that increases the level and toxicity of 5-fluorouracil. *Pharmacogenetics* 1997; **7**: 35-43 [PMID: 9110360]
- 221 **Yu T**, Guo F, Yu Y, Sun T, Ma D, Han J, Qian Y, Kryczek I, Sun D, Nagarsheth N, Chen Y, Chen H, Hong J, Zou W, Fang JY. *Fusobacterium nucleatum* Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. *Cell* 2017; **170**: 548-563.e16 [PMID: 28753429 DOI: 10.1016/j.cell.2017.07.008]
- 222 **Lehouritis P**, Cummins J, Stanton M, Murphy CT, McCarthy FO, Reid G, Urbaniak C, Byrne WL, Tangney M. Local bacteria affect the efficacy of chemotherapeutic drugs. *Sci Rep* 2015; **5**: 14554 [PMID: 26416623 DOI: 10.1038/srep14554]
- 223 **Daillère R**, Vétizou M, Waldschmitt N, Yamazaki T, Isnard C, Poirier-Colame V, Duong CPM, Flament C, Lepage P, Roberti MP, Routy B, Jacquilot N, Apetoh L, Becharaf S, Rusakiewicz S, Langella P, Sokol H, Kroemer G, Enot D, Roux A, Eggermont A, Tartour E, Johannes L, Woerther PL, Chachaty E, Soria JC, Golden E, Formenti S, Plebanski M, Madondo M, Rosenstiel P, Raoult D, Cattoir V, Boneca IG, Chamaiillard M, Zitvogel L. Enterococcus hirae and *Barnesiella intestinihominis* Facilitate Cyclophosphamide-Induced Therapeutic Immunomodulatory Effects. *Immunity* 2016; **45**: 931-943 [PMID: 27717798 DOI: 10.1016/j.immuni.2016.09.009]
- 224 **Iida N**, Dzutsev A, Stewart CA, Smith L, Bouladoux N, Weingarten RA, Molina DA, Salcedo R, Back T, Cramer S, Dai RM, Kiu H, Cardone M, Naik S, Patri AK, Wang E, Marincola FM, Frank KM, Belkaid Y, Trinchieri G, Goldszmid RS. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science* 2013; **342**: 967-970 [PMID:



- 24264989 DOI: 10.1126/science.1240527]
- 225 **Kuczma MP**, Ding ZC, Li T, Habtetsion T, Chen T, Hao Z, Bryan L, Singh N, Kochenderfer JN, Zhou G. The impact of antibiotic usage on the efficacy of chemoimmunotherapy is contingent on the source of tumor-reactive T cells. *Oncotarget* 2017; **8**: 111931-111942 [PMID: 29340102 DOI: 10.18632/oncotarget.22953]
- 226 **Viaud S**, Saccheri F, Mignot G, Yamazaki T, Daillère R, Hannani D, Enot DP, Pfirschke C, Engblom C, Pittet MJ, Schlitzer A, Ginhoux F, Apetoh L, Chachaty E, Woerther PL, Eberl G, Bérard M, Ecobichon C, Clermont D, Bizet C, Gaboriau-Routhiau V, Cerf-Bensussan N, Opolon P, Yessaad N, Vivier E, Ryffel B, Elson CO, Doré J, Kroemer G, Lepage P, Boneca IG, Ghiringhelli F, Zitvogel L. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* 2013; **342**: 971-976 [PMID: 24264990 DOI: 10.1126/science.1240537]
- 227 **Xu X**, Zhang X. Effects of cyclophosphamide on immune system and gut microbiota in mice. *Microbiol Res* 2015; **171**: 97-106 [PMID: 25553830 DOI: 10.1016/j.micres.2014.11.002]
- 228 **Paulos CM**, Wrzesinski C, Kaiser A, Hinrichs CS, Chieppa M, Cassard L, Palmer DC, Boni A, Muranski P, Yu Z, Gattinoni L, Antony PA, Rosenberg SA, Restifo NP. Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8+ T cells via TLR4 signaling. *J Clin Invest* 2007; **117**: 2197-2204 [PMID: 17657310 DOI: 10.1172/JCI32205]
- 229 **Uribe-Herranz M**, Bittinger K, Rafail S, Guedan S, Pierini S, Tanes C, Ganetsky A, Morgan MA, Gill S, Tanyi JL, Bushman FD, June CH, Facciabene A. Gut microbiota modulates adoptive cell therapy via CD8 $\alpha$  dendritic cells and IL-12. *JCI Insight* 2018; **3** [PMID: 29467322 DOI: 10.1172/jci.insight.94952]
- 230 **Carbannel F**, Soularue E, Coutzac C, Chaput N, Mateus C, Lepage P, Robert C. Inflammatory bowel disease and cancer response due to anti-CTLA-4: is it in the flora? *Semin Immunopathol* 2017; **39**: 327-331 [PMID: 28093620 DOI: 10.1007/s00281-016-0613-x]
- 231 **Chaput N**, Lepage P, Coutzac C, Soularue E, Le Roux K, Monot C, Boselli L, Routier E, Cassard L, Collins M, Vaysse T, Marthey L, Eggermont A, Asvatourian V, Lanoy E, Mateus C, Robert C, Carbannel F. Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann Oncol* 2017; **28**: 1368-1379 [PMID: 28368458 DOI: 10.1093/annonc/mdx108]
- 232 **Dubin K**, Callahan MK, Ren B, Khanin R, Viale A, Ling L, No D, Gobourne A, Littmann E, Huttenhower C, Pamer EG, Wolchok JD. Intestinal microbiome analyses identify melanoma patients at risk for checkpoint-blockade-induced colitis. *Nat Commun* 2016; **7**: 10391 [PMID: 26837003 DOI: 10.1038/ncomms10391]
- 233 **Vétizou M**, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, Rusakiewicz S, Routy B, Roberti MP, Duong CP, Poirier-Colame V, Roux A, Becharaf S, Formenti S, Golden E, Cording S, Eberl G, Schlitzer A, Ginhoux F, Mani S, Yamazaki T, Jacquolot N, Enot DP, Bérard M, Nigou J, Opolon P, Eggermont A, Woerther PL, Chachaty E, Chaput N, Robert C, Mateus C, Kroemer G, Raoult D, Boneca IG, Carbannel F, Chamillard M, Zitvogel L. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* 2015; **350**: 1079-1084 [PMID: 26541610 DOI: 10.1126/science.aad1329]
- 234 **Sivan A**, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, Benyamin FW, Lei YM, Jabri B, Alegre ML, Chang EB, Gajewski TF. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* 2015; **350**: 1084-1089 [PMID: 26541606 DOI: 10.1126/science.aac4255]
- 235 **Gopalakrishnan V**, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinetz TV, Prieto PA, Vicente D, Hoffman K, Wei SC, Cogdill AP, Zhao L, Hudgens CW, Hutchinson DS, Manzo T, Petaccia de Macedo M, Cotechini T, Kumar T, Chen WS, Reddy SM, Szczepaniak Sloane R, Galloway-Pena J, Jiang H, Chen PL, Shpall EJ, Rezvani K, Alousi AM, Chemaaly RF, Shelburne S, Vence LM, Okhuysen PC, Jensen VB, Swennes AG, McAllister F, Marcelo Riquelme Sanchez E, Zhang Y, Le Chatelier E, Zitvogel L, Pons N, Austin-Breneman JL, Haydu LE, Burton EM, Gardner JM, Sirmans E, Hu J, Lazar AJ, Tsujikawa T, Diab A, Tawbi H, Glitza IC, Hwu WJ, Patel SP, Woodman SE, Amaria RN, Davies MA, Gershenwald JE, Hwu P, Lee JE, Zhang J, Coussens LM, Cooper ZA, Futreal PA, Daniel CR, Ajami NJ, Petrosino JF, Tetzlaff MT, Sharma P, Allison JP, Jenq RR, Wargo JA. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* 2018; **359**: 97-103 [PMID: 29097493 DOI: 10.1126/science.aan4236]
- 236 **Matson V**, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre ML, Luke JJ, Gajewski TF. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* 2018; **359**: 104-108 [PMID: 29302014 DOI: 10.1126/science.aao3290]
- 237 **Routy B**, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, Fluckiger A, Messaoudene M, Rauber C, Roberti MP, Fidelle M, Flament C, Poirier-Colame V, Opolon P, Klein C, Iribarren K, Mondragón L, Jacquolot N, Qu B, Ferrere G, Clémenson C, Mezquita L, Masip JR, Naltet C, Brosseau S, Kaderbhai C, Richard C, Rizvi H, Levenez F, Galleron N, Quinquis B, Pons N, Ryffel B, Minard-Colin V, Gonin P, Soria JC, Deutsch E, Loriot Y, Ghiringhelli F, Zalcman G, Goldwasser F, Escudier B, Hellmann MD, Eggermont A, Raoult D, Albiges L, Kroemer G, Zitvogel L. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* 2018; **359**: 91-97 [PMID: 29097494 DOI: 10.1126/science.aan3706]
- 238 **Kostic AD**, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, Clancy TE, Chung DC, Lochhead P, Hold GL, El-Omar EM, Brenner D, Fuchs CS, Meyerson M, Garrett WS. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe* 2013; **14**: 207-215 [PMID: 23954159 DOI: 10.1016/j.chom.2013.07.007]
- 239 **Park HE**, Kim JH, Cho NY, Lee HS, Kang GH. Intratumoral *Fusobacterium nucleatum* abundance correlates with macrophage infiltration and CDKN2A methylation in microsatellite-unstable colorectal carcinoma. *Virchows Arch* 2017; **471**: 329-336 [PMID: 28597080 DOI: 10.1007/s00428-017-2171-6]
- 240 **Thiele Orberg E**, Fan H, Tam AJ, Dejea CM, Destefano Shields CE, Wu S, Chung L, Finard BB, Wu X, Fathi P, Ganguly S, Fu J, Pardoll DM, Sears CL, Housseau F. The myeloid immune signature of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced murine colon tumorigenesis. *Mucosal Immunol* 2017; **10**: 421-433 [PMID: 27301879 DOI: 10.1038/mi.2016.53]
- 241 **Bhattacharya N**, Yuan R, Prestwood TR, Penny HL, DiMaio MA, Reticker-Flynn NE, Krois CR, Kenkel JA, Pham TD, Carmi Y, Tolentino L, Choi O, Hulett R, Wang J, Winer DA, Napoli JL, Engleman EG. Normalizing Microbiota-Induced Retinoic Acid Deficiency Stimulates Protective CD8(+)-T Cell-Mediated Immunity in Colorectal Cancer. *Immunity* 2016; **45**: 641-655 [PMID: 27590114 DOI: 10.1016/j.immuni.2016.08.008]
- 242 **Cremonesi E**, Governa V, Garzon JFG, Mele V, Amicarella F, Muraro MG, Trella E, Galati-Fournier V, Oertli D, Däster SR, Drosner RA, Weixler B, Bolli M, Rosso R, Nitsche U, Khanna N, Egli A, Keck S, Slotta-Huspenina J, Terracciano LM, Zajac P, Spagnoli GC, Eppenberger-Castori S, Janssen KP, Borsig L, Iezzi G. Gut microbiota modulate T cell trafficking into human colorectal cancer. *Gut* 2018; Epub ahead of print [PMID: 29437871 DOI: 10.1136/gutjnl-2016-313498]
- 243 **Mima K**, Sukawa Y, Nishihara R, Qian ZR, Yamauchi M, Inamura K, Kim SA, Masuda A, Nowak JA, Noshio K, Kostic AD, Giannakis M, Watanabe H, Bullman S, Gilmer DA, Harris CC, Giovannucci E, Garraway LA, Freeman GJ, Dranoff G, Chan AT, Garrett WS, Huttenhower C, Fuchs CS, Ogino S. *Fusobacterium nucleatum* and T Cells in Colorectal Carcinoma. *JAMA Oncol* 2015; **1**: 653-661 [PMID: 26181352 DOI: 10.1001/jamaoncol.2015.1377]
- 244 **Wu S**, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, Huso DL, Brancati FL, Wick E, McAllister F, Housseau F, Pardoll DM, Sears CL. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med* 2009; **15**: 1016-1022 [PMID: 19701202 DOI: 10.1038/nm.2015]

- 245 **Aarnoutse R**, de Vos-Geelen JMPGM, Penders J, Boerma EG, Warmerdam FARM, Goorts B, Olde Damink SWM, Soons Z, Rensen SSM, Smidt ML. Study protocol on the role of intestinal microbiota in colorectal cancer treatment: a pathway to personalized medicine 2.0. *Int J Colorectal Dis* 2017; **32**: 1077-1084 [PMID: 28444508 DOI: 10.1007/s00384-017-2819-3]
- 246 **Guyton K**, Alverdy JC. The gut microbiota and gastrointestinal surgery. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; **14**: 43-54 [PMID: 27729657 DOI: 10.1038/nrgastro.2016.139]
- 247 **Bachmann R**, Leonard D, Delzenne N, Kartheuser A, Cani PD. Novel insight into the role of microbiota in colorectal surgery. *Gut* 2017; **66**: 738-749 [PMID: 28153961 DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312569]
- 248 **Sassone-Corsi M**, Raffatellu M. No vacancy: how beneficial microbes cooperate with immunity to provide colonization resistance to pathogens. *J Immunol* 2015; **194**: 4081-4087 [PMID: 25888704 DOI: 10.4049/jimmunol.1403169]
- 249 **Karrasch T**, Jobin C. Wound healing responses at the gastrointestinal epithelium: a close look at novel regulatory factors and investigative approaches. *Z Gastroenterol* 2009; **47**: 1221-1229 [PMID: 19960401 DOI: 10.1055/s-0028-1109766]
- 250 **Lee L**, Liberman S, Charlebois P, Stein B, Kaneva P, Carli F, Feldman LS. The impact of complications after elective colorectal resection within an enhanced recovery pathway. *Tech Coloproctol* 2018; **22**: 191-199 [PMID: 29508102 DOI: 10.1007/s10151-018-1761-x]
- 251 **Ohigashi S**, Sudo K, Kobayashi D, Takahashi T, Nomoto K, Onodera H. Significant changes in the intestinal environment after surgery in patients with colorectal cancer. *J Gastrointest Surg* 2013; **17**: 1657-1664 [PMID: 23807702 DOI: 10.1007/s11605-013-2270-x]
- 252 **Souza DG**, Vieira AT, Soares AC, Pinho V, Nicoli JR, Vieira LQ, Teixeira MM. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. *J Immunol* 2004; **173**: 4137-4146 [PMID: 15356164]
- 253 **Stary L**, Mezerova K, Skalicky P, Zboril P, Raclavsky V. Are we any closer to screening for colorectal cancer using microbial markers? A critical review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2017; **161**: 333-338 [PMID: 29235578 DOI: 10.5507/bp.2017.051]
- 254 **Flemer B**, Warren RD, Barrett MP, Cisek K, Das A, Jeffery IB, Hurley E, O'Riordain M, Shanahan F, O'Toole PW. The oral microbiota in colorectal cancer is distinctive and predictive. *Gut* 2017; Epub ahead of print [PMID: 28988196 DOI: 10.1136/gutjnl-2017-314814]
- 255 **Louis P**, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol* 2014; **12**: 661-672 [PMID: 25198138 DOI: 10.1038/nrmicro3344]

**P- Reviewer:** Lorenzo-Zúñiga V, Mayol J, Sunakawa Y  
**S- Editor:** Gong ZM **L- Editor:** A **E- Editor:** Wang C





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA  
Telephone: +1-925-223-8242  
Fax: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
Help Desk: <http://www.f6publishing.com/helpdesk>  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1007-9327

